

제주도 양식넙치병어에서 분리된 연쇄상구균의 약제내성 전이성 plasmid

김중훈 · 이창훈* · 김은희†

전남대학교 수산생명의학과, *국립수산과학원 제주수산연구소

Transferable R plasmid of Streptococci Isolated from Diseased Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju

Jong-Hun Kim, Chang-Hoon Lee* and Eunheui Kim†

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

*Jeju Fisheries Research Institute, National Fisheries Research & Development Institute, Jeju 690-192, Korea

Seventy-five streptococci were isolated from diseased olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Jeju. Their drug susceptibility and transferable multiple drug resistance were characterized. All isolates were resistant to flumequine (AR) and oxolinic acid (OA) and 26 isolates (34.7%) showed 4~6 multiple resistance of ampicillin (ABPC), AR, doxycycline (DOXY), erythromycin (EM), norfloxacin(NOR), OA and oxytetracycline (OTC) in various combinations. pST9 of a transferable R plasmid was detected from a multiple drug resistance strain, *Streptococcus* sp., ST9 originated from diseased flounder in Jeju, previously. We performed DNA hybridization to know the distribution of plasmid with the same DNA structure as pST9 in streptococci. Thirteen out of 60 isolates analyzed were positive in colony DNA hybridization and the part of bacteria isolated from raw meal was also hybridized with pST9. It suggested that raw meal is one of the origin of the resistance plasmid and R plasmid with DNA structure differing from pST9 is also involving in multiple drug resistance of the streptococci. In conjugation experiment, we found transferable R plasmid carrying OTC, DOXY and/or EM resistance determinant in the 13 resistance strains. All of the streptococci carrying the transferable R plasmid were similar in RAPD patterns. However, pST -type R plasmid was rare in *S. iniae* most frequently appearing in flounder farm.

Key words : Multiple drug resistance, Streptococci, Olive flounder, Transferable R plasmid, DNA hybridization

제주도의 육상 수조식 넙치양식은 년 중 풍부한 지하해수 (16~18°C)를 이용하여 적절한 사육 환경을 조성할 수 있게 됨으로써, 고밀도화 및 대형화 되어왔다. 이러한 고밀도 사육관리는 각종 질병을 유발시키는 원인이 되고 있어 감염성 질병이 빈번하게 발생하고 있다. 양식 넙치에 발생하는 연쇄상구균증은 매년 반복적으로 출현하며, 특히 *Edwardsiella tarda* 등과의 혼합감염이 빈번하여 우리나라 넙치 양식 산업에 큰 피해를

주고 있다 (Oh *et al.*, 1998). 뿐만 아니라 다양한 종류의 연쇄상구균이 본 질병에 관여하고 있고 (Kim & Kim, 2003; Kim *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2001) 치료를 위해 사용하는 항균제에 대한 내성균의 출현도 빈번하여 항균제에 의한 치료효과가 낮은 원인이 되고 있다 (Kim *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 1998). 그러므로 양식 어류의 연쇄상구균증에 관여하는 세균들의 종과 분포를 조사하고 이들의 세균학적 특성 및 병원성의 차이를

†Corresponding Author : Eunheui Kim, Tel : 061-659-3171,
Fax : 061-659-3171, E-mail : ehkim@chonnam.ac.kr

알아보고자하는 노력이 이어지고 있다. Kim & Kim (2003)은 넙치 병어에서 검출되는 연쇄상구균의 RAPD fingerprint를 근거로 하여 RA I, II, III, IV, V group으로 분류하였고, 그 중 *Streptococcus iniae* type의 RA1 group이 우점적으로 출현하고 있으며 다음으로 *S. parauberis* type의 RA2가 출현하고 있다고 보고한 바 있다. Woo 등 (2006)은 해산양식어류에서 분리되는 연쇄상구균 35주에 대하여 종 다양성과 병원성을 조사한 결과에서 넙치에서 분리된 28균주 중 17균주가 *S. iniae*이며 이들은 넙치와 조피볼락에 대하여 급성병원성을 나타낸다고 보고하였다. 한편 양식 어류의 질병대책으로써 면역증강물질개발 (Choi *et al.*, 2005; Hwang *et al.*, 1999) 및 백신개발을 위한 노력이 이어지고 있으나 (Cho *et al.*, 2006; Eldar *et al.*, 1997), 아직은 항균제에 의한 치료에 거의 의존하고 있는 실정이므로 치료효과를 높이기 위해서는 병원세균들의 항균제내성 특성을 아는 것은 중요하다. 항균제의 사용이 빈번하면 그 사용빈도만큼 약제에 대한 내성균의 출현빈도가 급격히 상승하는 것이 일반적이다. 그러나 oxytetracycline (OTC)은 양식어류생산현장에서의 사용역사가 비교적 오래되었음에도 불구하고 지금도 넙치의 세균성어류질병 치료제로서 선호도가 높은 항균제 중의 하나이다. 어류병원세균의 항균제내성도 전이성 R plasmid에 있는 내성유전자에 의하여 나타나며 (Adams *et al.*, 1998; Aoki, 1988; Choi *et al.*, 1996; Kim, 1999), 이들 R plasmid의 구조형성에 transposon이 관여하고 있다는 증거가 제시되고 있다 (Kim and Aoki, 1994; Abee-Lund and Sorum, 2000). 본 연구는 제주도내 양식장의 넙치병어로부터 연쇄상구균들을 분리하여 OTC 내성균 출현비와 다제내성균의 출현 및 내성에 관여하는 plasmid의 특성에 관하여 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용된 균주는 국립수산물과학원 제주수산물연구소에서 제주도내 넙치 양식장으로부터 채집한 감염어의 안구, 복수, 간, 신장 부위로부터 분리한 것으로서 2001년에 분리한 50균주와 2002년에 분리한 25균주이다. 분리 균은 Brain Heart Infusion Agar (BHIA) medium으로 30°C에서 48시간 배양한 후, 순수하게 형성된 집락을 얻어 그람양성이고 연쇄상구균이며 catalase를 생산하지 않는 특성을 확인하여 사용하였다. 한편 접합 전달성 내성 plasmid를 확인하기 위하여 사용한 전이성 R plasmid 수용균은 1998년 제주도 넙치병어에서 분리한 연쇄상구균으로 *S. iniae* type의 RAPD profile을 보이는 균주이다. 또한 수용균은 flumequine (AR), oxolinic acid (OA)에 대하여 내성이며 기타 조사된 다른 항균제에 대하여 모두 감수성이었으므로 공여균과 구분하기 위하여 시험관에서 rifampicin (RFP) 내성을 유도시켜 사용하였다 (AR^r OA^r RFP^r). 전달성 R plasmid DNA 분포를 조사하기 위한 probe DNA (pST9) (Kim *et al.*, 2003)는 ST9의 transconjugant로부터 분리하여 사용하였다.

분리 균에 대한 항균제의 최소생장억제농도 (MIC) 및 내성균 결정

분리 균에 대한 각종 화학요법제의 MIC는 Kim (1999) 및 Murray 등 (1999)의 방법에 따라 two fold plate dilution 방법으로 조사하였다. 각각의 분리 균을 BHI broth에서 24시간 전 배양한 후, 사용 당일 BHI broth로 재 배양한 대수증식기의 균 부유액을 이용하였다. 사용한 항균제는 ampicillin (ABPC), doxycycline (DOXY), erythromycin (EM), flumequine (AR), norfloxacin (NFLX), oxolinic acid (OA), OTC의 7종으로써 모두 Sigma사로부터 구입하였다. 각각의 화학요법제는 항균제의 특성에 따라 알코올, 알칼리용액 및 증류수로 녹인 후 BHIA배지와 섞어 최종 항균제농도가 100 µg/ml에서부터 1/2씩 단계 희석된 총 12단계 농도의 배지를 만들었다. 각 약제의 농도별 배지 위에 균 부유액을 5 µl씩 (10⁴

CFU/ml) 접종하여 30°C에서 48시간 동안 배양한 후 균의 성장여부를 약제를 포함하지 않은 대조구에서의 성장정도와 비교하였다. 균의 생장이 완전히 저지되는 약제농도를 그 균에 대한 약제의 MIC로 하였으며 각 항균제의 MIC 분포표를 작성하였다. 분포 표에서 break point가 형성되는 농도를 기준으로, ABPC, AR, EM은 25 µg/ml DOXY는 3.13 µg/ml NFLX는 50 µg/ml OA와 OTC는 6.25 µg/ml 보다 높은 농도 쪽에 분포하는 균주들을 내성균 군으로 결정하였다.

Streptococcus spp.의 전이성 항균제내성 확인

Streptococcus spp.의 항균제내성 전달을 확인하기 위하여 filter mating 법을 변형하여 실시하였다. 항균제들에 대하여 복합적으로 내성을 보인 균주들을 내성인자 공여균으로 이용하였다. 공여균과 수용균을 각각 BHI broth에서 24시간 배양한 후 2:1의 비율로 섞어 BHI 평판배지에 떨어뜨려 24시간 동안 배양하였다. 이들을 다시 회수하여 공여균의 선별표지 약제와 RFP 10 µg/ml을 함유한 BHI plate에 접종하였으며 이때 자라난 세균 집락을 transconjugant로 분리하였다. Transconjugant의 내성 pattern은 ready made disc (BBL)를 이용하여 diffusion 방법으로 확인하였다.

전이성 R plasmid DNA의 분리

전이성 R plasmid DNA는 lysis broth를 이용하는 Anderson and McKay (1983)의 방법과 고농도의 lysozyme과 ethidium bromide (Et-Br)를 이용하는 O'Sullivan and Klaenhammer (1993)의 방법을 응용하여 분리하였다. 액체 배양한 transconjugant를 집균하여 sucrose와 30 mg/ml의 lysozyme을 함유한 용액으로 37°C에서 15분 동안 처리한 후, 20% SDS 용액과 3N NaOH 용액으로 완전히 용해하였다. 세포 용해액에 3M sodium acetate를 처리하여 얻은 상층 액에 0.5 mg/ml의 Et-Br 용액을 첨가한 후 phenol 정제하였다. 한편 세균을 200 ml 배양하여 R plasmid DNA를

대량으로 분리하였다. 30 mg/ml의 lysozyme 용액을 이용하는 O'Sullivan and Klaenhammer (1993)의 방법에 준하여 DNA를 분리하였다. Ausbel 등 (1995)의 방법을 응용하여 CsCl을 포함한 DNA 용액에 10 mg/ml의 Et-Br 용액 0.4 ml를 더하여 5 ml quick-seal ultracentrifuge tube에 넣어 sealing 한 후 60,000 rpm으로 12시간 동안 밀도 구배 원심분리를 실시하여 plasmid DNA만을 순수 분리하였다.

DNA Probe 제작과 DNA-DNA 혼성화

Transconjugant로부터 분리되어 정제된 plasmid DNA를 probe로 사용하기 위하여 DIG labeling kit (Roche, Germany)를 이용하여 random primed DNA labeling을 실시하였다. Labeling 과정은 제조사의 protocol에 따라 실시하였다.

1) DNA transfer

30°C에서 24시간 배양된 세균의 집락을 멸균 봉으로 nylon membrane에 적당한 간격으로 spotting하여 0.5 N NaOH와 1.5 M NaCl을 함유한 용액에서 15분간 용해시킨 후, 0.5 M Tris-Cl (pH 8.0)과 1.5 M NaCl을 함유한 용액에서 15분간 중화시켰다. 한편 plate colony hybridization을 실시할 경우에는 TSA 평판 배지에 적당한 간격으로 집락을 형성한 plate를 선택하여 4°C 냉장고에 30분 둔 다음, 페트리디쉬 크기의 nylon membrane을 세균 집락 위에 올려 놓았다 떼어낸 후 lysis 과정을 거쳤다. Membrane에 transfer된 DNA는 UV-cross linker를 이용하여 고정시켰다.

2) Hybridization and detection

DNA-DNA 혼성화에 사용된 wash and block solution, detection kit, hybridization solution 등은 Roche사 (Mannheim, Germany)의 것으로 제조사의 사용법을 따랐으며, hybridization 과정은 Ausbel 등 (1995)의 방법으로 42°C로 12시간 동안 실시하였다.

혼성화가 끝난 membrane은 washing과 block-

ing 처리 후 anti-digoxygenin- AP가 들어있는 antibody solution과 color substrate로써 NBT/BCIP가 들어있는 detection buffer를 이용하였으며 어두운 곳에 정치하여 6시간 이상 발색시켜 확인하였다.

RAPD profile analysis

전이성 plasmid의 분포조사를 위하여 DNA 혼성화에 사용하였던 연쇄상구균들의 DNA 구조상의 차이를 보기 위하여 Romalde 등 (1999)의 방법에 따라 RAPD pattern을 분석하였다. 세균의 total DNA solution은 Kim and Kim (2003)의 방법으로 준비하였다. 즉 BHI broth를 이용하여 30°C에서 24시간 배양한 세균배양액을 9.0×10^8 cfu/ml로 조정 한 후 세균 배양액 5 ml로부터 세균을 모아 멸균증류수로 3회 세척하고 50 µl의 멸균증류수에 다시 부유하여 100°C에서 5분간 끓였다. 이것을 8,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 세균의 total DNA solution으로 사용하였다. Ready-To-Go-RAPD analysis beads와 PCR band 형성이 양호한 P6 (CCCGTCAGCA) (Kim & Kim., 2003; Ravelo *et al.*, 2003), 10-mer Random primer (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. PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기 영동하여 나타나는 RAPD fingerprints를 비교하였다.

결과 및 고찰

항균제의 MIC와 내성균 비율

각 분리균에 대한 7종 항균제의 MIC 분포는 Table 1과 같다. 저항성균 균이 형성되어 있는 약제는 ABPC, DOXY, EM, NFLX, OTC였으며 AR과 OA에 대해서는 모든 균주를 내성균 균으로 볼 수 있었다. 이는 OA가 *S. iniae*를 분리하기 위한 선택배지에 이용되는 항균제 (Nguyen and Kanai, 1999)인 점을 고려해볼 때, OA나 AR내성은 연쇄상구균의 선천적인 내성으로 사료된다.

연쇄상구균 75 분리주의 약제별 감수성을 보면, ABPC에서는 100 µg/ml의 고도 내성균주가 나타나긴 했으나, 약 79% (59주/75주)의 균은 0.1 µg/ml 이하의 농도에서 생장이 억제됨으로써 연쇄상구균증 치료제로 효과적인 약제임을 알 수 있었다. DOXY, EM, OTC의 경우, 내성그룹에 속하는 균주 수는 각각 29 (39%), 9 (12%), 26 (35%)주 였으나, 감수성균의 출현 빈도도 높게 유지되고 있으므로 치료약제로 선택할 경우 감수성 test가 필수적이라 하겠다. Heo 등 (2002)은 경남 남부지역의 양식어류에서 분리된 병원세균의 항균제감수성에 관한 연구에서 연쇄상구균이 EM에 대하여 50% 이상 내성을 형성하였고, DOXY에 대해서는 70% 이상이 감수성을, 그리고 OTC에 대해서도 64%의 균이 감수성을 나타내었다고 보고하였다. 세균의 분리 지역이 달라 다소 차이가 있기는 하나, 연쇄상구균들이

Table 1. MIC distribution of 75 streptococci isolated from diseased olive flounders, *Paralichthys olivaceus* in Jeju

| MIC (µg/ml) | 100 | 50 | 25 | 12.5 | 6.25 | 3.13 | 1.56 | 0.78 | 0.39 | 0.20 | 0.10 | 0.05 |
|-----------------|-----|----|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Ampicillin | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 3 | 7 | 2 | 0 | 6 | 53 |
| Doxycycline | | 4 | 14 | 10 | 1 | | 1 | 6 | 21 | 8 | 4 | 6 |
| Erythromycin | 9 | | | | 1 | 2 | 3 | 14 | 2 | 2 | 9 | 33 |
| Flumequine | 66 | 5 | 4 | | | | | | | | | |
| Norfloxacin | 1 | 0 | 1 | 21 | 27 | 16 | 6 | 3 | | | | |
| Oxolinic acid | 51 | 19 | 3 | 2 | | | | | | | | |
| Oxytetracycline | 14 | 10 | 1 | 1 | | 3 | 9 | 26 | 6 | 5 | | |

Table 2. Drug resistance patterns of streptococcal isolates

| Resistance pattern | Number of isolates |
|------------------------|--------------------|
| Ar Oa | 45 |
| Ar Oa Doxy | 3 |
| Ar Oa Nflx | 1 |
| Ar Oa Doxy Otc | 16 |
| Ar Oa Doxy Otc Abpc | 1 |
| Ar Oa Doxy Otc Em | 8 |
| Ar Oa Doxy Otc Em Abpc | 1 |
| Total | 75 |

Abbs. : Resistance markers against ABPC (ampicillin), AR (flumequine), DOXY (doxycycline), EM (erythromycin), NFLX (norfloxacin), OA (oxolinic acid), and OTC (oxytetracycline).

OTC와 DOXY에 대하여 감수성이 있음은 본 결과와 일치하였다

모든 분리 균이 내성을 나타내는 AR과 OA를 제외한 기타 항균제에 대하여 복합적으로 내성을 보인 균주는 모두 30균주였다. AR과 OA를 포함하여 5종류 이상의 항균제에 대하여 내성을 보인균주는 10균주로써 전체의 13.3%였다 (Table 2).

동일 DNA 구조인 R plasmid의 출현빈도

동일 DNA 구조를 한 R plasmid의 집단 내 출현빈도를 보기 위하여 넘치에서 분리된 연쇄상구균인 ST9의 다재내성전이성 plasmid (pST9)를 probe로 하여 colony 혼성화 반응을 실시하였다

(Table 4, Fig. 1). 계대 배양에 실패한 균주를 제외한 60균주에 대한 혼성화를 실시한 결과, DOXY나 OTC 또는 EM에 대하여 저항성을 나타내는 17균주 중 13균주 (76.5%)에서 양성 반응이 나타남으로써 pST9와 동일한 DNA 구조를 한 plasmid가 우점적으로 분포한다고 볼 수 있었다. 그러나 ST21, 156, 162, 163은 DOXY 또는 OTC에 대하여 내성인 균주임에도 불구하고 혼성화 반응에서는 음성결과를 보임으로써 또 다른 DNA 구조의 R plasmid가 있음을 시사하였다. 이 외에 DOXY나 OTC에 대하여 감수성을 보인 균주들은 모두 혼성화 음성으로 나타나 pST9와 같은 DNA 구조의 plasmid가 없는 것으로 판단되었다. Adams 등 (1998)도 *Aeromonas salmonicida*의 OTC내성의 약 66%가 plasmid에 의하여 *Escherichia coli*로 전이되었는데, 이들 전이성 plasmid의 구조가 서로 다를 것을 보고하였다.

전이성 내성 plasmid 검출

내성전달성 R plasmid를 검출하기 위하여 DNA 혼성화에서 양성을 보인 13균주를 R plasmid 공여균으로 하여 conjugation을 실시하였다. 공여균의 지표인 OTC와 수용균의 지표인 RFP를 각각 30 µg/ml, 10 µg/ml 함유하고 있는 배지에서 분리된 transconjugants의 내성형태는 2가지였다 (Table 4). 모든 donor의 DOXY와 OTC내성은 수용균으로 전달되었으나, EM내성은 1균주 (ST153)에서는 전달되었고, 다른 4균주에서는 전달되지 않아 이들 EM내성인자는 염색체 상에 있거나 다른 cryptic plasmid 상에 있을 것으

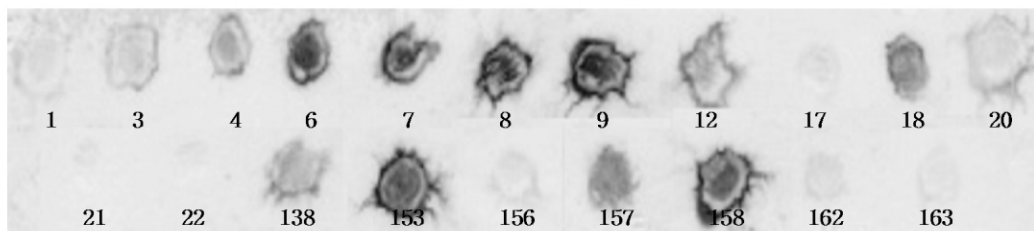


Fig. 1. Colony hybridization of *Streptococcus* strains with transferable R plasmid DNA isolated from ST9 transconjugant as a probe. Numbers are strain number.

Table 3. Colony hybridization intensities with transferable R plasmid DNA of streptococcal isolate, ST9

| ST isolate NO. | Hybridization Intensity ¹⁾ | Resistance marker ²⁾ |
|---------------------|---------------------------------------|---------------------------------|
| 6 | +++ | Doxy Em Otc |
| 7 | +++ | Doxy Em Otc |
| 8 | +++ | Doxy Em Otc |
| 153 | +++ | Doxy Em Otc |
| 158 | +++ | Doxy Em Otc |
| 4 | ++ | Doxy Otc |
| 12 | ++ | Doxy Otc |
| 18 | ++ | Doxy Otc |
| 138 | ++ | Doxy Otc |
| 157 | ++ | Doxy Otc |
| 1 | + | Doxy Otc |
| 3 | + | Doxy Otc |
| 20 | + | Doxy Otc |
| 17 | - | S |
| 21 | - | Doxy Otc |
| 22 | - | S |
| 156 | - | Doxy Otc |
| 162 | - | Doxy |
| 163 | - | Doxy Otc |
| Positive control(9) | +++ | Doxy Em Otc |

¹⁾ +++, strong positive; ++, medium positive; +, weak positive; -, negative

²⁾ Abbs. : Doxy, Em and Otc are resistance marker against doxycycline (DOXY), erythromycin (EM) and oxytetracycline (OTC), respectively.

S, sensitive to DOXY, EM and OTC

Table 4. Conjugal transfer of drug resistance marker of *Streptococcus* spp. isolated from diseased olive flounder in Jeju

| | Strain (ST Number) | Resistant marker | |
|-----------|-------------------------------|------------------|-----------------|
| | | Donor | Transconjugant |
| Donor | 1, 3, 4, 12, 18, 20, 138, 157 | Doxy Otc | Doxy Otc Rfp |
| | 6, 7, 8, 158 | Doxy Em Otc | Doxy Otc Rfp |
| | 153 | Doxy Em Otc | Doxy Em Otc Rfp |
| Recipient | | Rfp | |

Abbs. : Doxy, Em, Otc and Rfp are resistance marker against doxycycline, erythromycin, oxytetracycline and rifampicin, respectively.

로 추정되었다. 한편 AR과 OA 내성은 공여균과 수용균이 모두 내성을 가지므로 전이여부를 확인할 수 없었지만 이들 quinolone계 항균제에 대한 내성은 DNA gyrase 유전자 (*gyr*)의 변이에 의하여 나타나는 것이 일반적이므로, 넘치병어에서 분리되는 연쇄상구균의 AR과 OA내성도 염색체에 있는 이들 유전자의 변이에 의한 것으로서 전이성 plasmid에는 이들 내성인자가 없을 것으로 여겨졌다.

DNA 혼성화 결과와 RAPD profile 비교

전이성 R plasmid의 출현빈도 조사에 이용된 20균주를 혼성화 정도와 균주들 특성과의 관계를 알아보기 위하여 RAPD profile을 비교하였다 (Fig. 2). Table 3에서 혼성화 정도가 가장 높은 ST6, 7, 8, 9, 153, 158균주는 모두 DOXY, EM, OTC에 대한 내성을 갖고 있으며, 그 외의 혼성화 양성 균주들은 DOXY와 OTC에 대한 내성을 갖고 있었으나 이들의 RAPD profile은 모두 유사하였다. Kim and Kim (2003)은 1kb 근처에 2개의 뚜렷한 main band를 공유하는 group을 RA I (*S. iniae* type fingerprint), 1개의 main band를 형성하는 group을 RA II (*S. parauberis* type fingerprint)로 분류한 바 있는데, 혼성화에서 양성 반응을 보인 균주들은 모두 RA group II에 속하였다. 그러므로 *S. parauberis* type인 RA II group의 균주들은 내성 전이성 plasmid인 pST9형

plasmid를 보유하고 있어 항균제에 대한 내성을 쉽게 얻을 수 있음을 시사하였다. Kim & Kim (2003)은 RAPD fingerprint를 근거로 하여 넘치병어에서 분리된 연쇄상구균에는 *S. iniae* type의 RA1 group이 우점적으로 출현하고 있으며 다음으로 *S. parauberis* type의 RA2가 출현하고 있다고 보고한 바 있다. 또한 Woo 등 (2006)은 해산 양식어류에서 분리되는 연쇄상구균 35주에 대하여 종 다양성과 병원성을 조사한 결과에서 넘치에서 분리된 28균주 중 17균주가 *S. iniae*라고 보고하였다. 그러나 ST156, 162, 163은 우리나라 넘치 병어에서 우점적으로 분리되는 것으로 알려진 *S. iniae* type fingerprint를 갖는 RA group I에 속하는 균주이나, 이들 중에는 pST9형 plasmid가 분포하지 않았다. 이는 사용되어 온 기간에 비해 OTC와 EM이 *S. iniae*에 의한 발병빈도가 높은 제주도 넘치의 연쇄상구균에 대하여 여전히 효과적인 치료약이 되는 이유라 하겠다. 이 등 (2006)은 제주지역 양식넘치에서 분리된 *S. iniae*와 *S. parauberis*의 특성 비교연구에서 *S. parauberis*가 *S. iniae*에 비하여 DOXY, EM, OTC에 대하여 낮은 감수성을 보인다고 보고하여 본 고찰을 뒷받침하는 결과라 하겠다.

전이성 plasmid의 생사료 분리세균 내 분포

pST9와 같은 DNA 구조를 갖는 plasmid가 사육수 및 생사료 세균 내에 어느 정도 분포하고

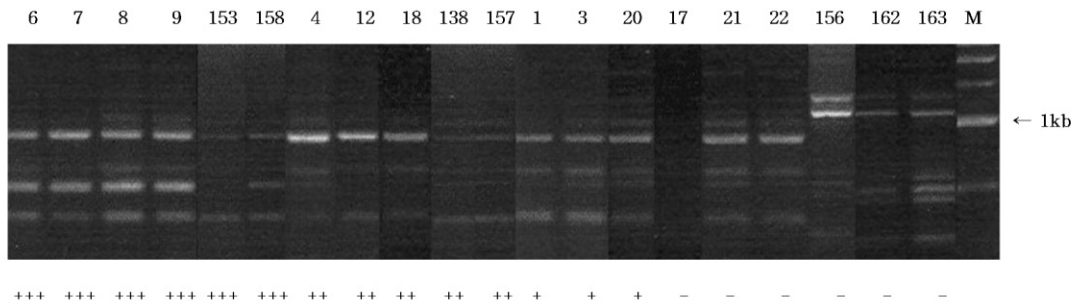


Fig. 2. Comparisons of RAPD patterns of streptococci and their hybridization intensities. Numbers are strain number. M is DNA size marker. +/- referred in Table 3.

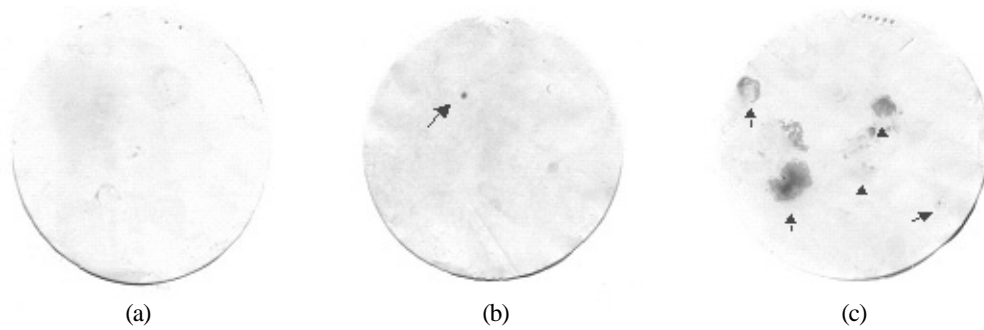


Fig. 3. Plate colony hybridization of bacteria cultured from cultural water and raw meal. a) farm water; b) chub mackerel (*Scombe japonicus*); c) sand eel (*Hypoptychus dybowskii*). Arrows are positive signals.

있는가를 알아보기 위하여 평판배지에 배양된 total 세균에 대하여 colony 혼성화 반응을 실시하였다 (Fig. 3). 사육수내의 세균에서는 양성 반응을 나타내는 세균 집락이 없었으나, 생사료의 원료로 쓰이는 고등어, 양치에서는 양성 반응을 보이는 세균 집락이 나타났다. 그러므로 생사료 내의 일부 세균이 pST와 유사한 plasmid를 보유하고 있어서 이것이 어류병원성 연쇄구균의 약제내성 전달성 R plasmid의 기원에 관여하고 있다고 추정되나, 추가적인 연구가 필요한 부분이라 하겠다.

요 약

제주도내 양식넙치 병어에서 분리된 연쇄상구균 75균주의 항균제에 대한 감수성 경향 및 내성균 출현빈도를 조사하고 다제내성 균주로부터 전이성 R plasmid를 검출하였다. 넙치 병어에서 분리된 모든 연쇄상구균은 flumequine (AR)과 oxolinic acid (OA)에 대하여 저항성이었으며, 그 중 30균주 (41%)는 ampicillin (ABPC), doxycycline (DOXY), erythromycin (EM), norfloxacin (NFLX), oxyteracycline (OTC)의 약제에 대하여 다양한 조합으로 동시내성을 나타내었다. AR과 OA를 포함하여 4~6약제에 대하여 다제내성을 보인 균주는 26주였다. 연쇄상구균의 다제내성 전이에 관여하는 R plasmid인 pST9와 DNA구조

가 유사한 plasmid의 분포를 알아보기 위하여 60분리 균주에 대한 colony 혼성화를 실시하였다. 그 결과 13분리균에서 혼성화 양성반응이 나타났으며 생사료의 원료로 사용되는 양치와 고등어에서도 양성반응이 나타남으로써 동일 DNA구조의 plasmid가 분포함을 시사하였다. 혼성화 양성반응을 보인 13균주로부터 전이성 R plasmid를 검출하기 위하여 conjugation을 실시하였다. OTC, DOXY, EM에 대한 항균제 내성 marker인 Otc, Doxy, Em은 R plasmid에 의하여 수용균인 *Streptococcus* sp.로 전이가 이루어졌다. 또한 이들 전이성 R plasmid를 보유하고 있는 연쇄상구균들이 동일 분류군에 속하는지를 알아보기 위하여 RAPD pattern을 분석하였다. 내성균주들의 RAPD pattern은 모두 유사하였으며, *Streptococcus iniae* type의 RAPD pattern (Kim and Kim, 2003)은 나타나지 않았다. 그러므로 pST9와 동일 DNA구조의 R plasmid는 *S. iniae*에서의 출현 빈도가 매우 낮을 것으로 예상되었다.

참 고 문 헌

- Adams, C.A., Austin, B., Meaden, P.G. and McIntosh, D.: Molecular characterization of plasmid mediated oxytetracycline resistance in *Aeromonas salmonicida*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 4194-4201, 1998.

- Anderson, D.G. and McKay, L.L.: Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46: 549-552, 1983
- Aoki, T.: Drug resistant plasmids from fish pathogen. *Microbiol. Sci.*, 5: 219-223, 1988.
- Ausbel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K.: Short protocols in molecular biology, 3rd., John Wiley & Son, 1995.
- Cho, M.Y., Lee, J.S., Lee, D.C., Choi, H.J. and Kim, J.W.: Immune response of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* against β -hemolytic *Streptococcus iniae* formalin-killed cells. *J. Fish Pathol.*, 19: 73-83, 2006.
- Choi, M.S., Park, K.H., Choi, S.H., Jang, S.I., Yoon, C.Y., Cho, J.G. and Song H.S.: Survey of drug resistance in *Edwardsiella tarda* isolated from diseased eels (*Anguilla japonica*). *J. Fish Pathol.*, 9: 195-210, 1996.
- Choi, M.S., Park, S.W. and Park, K.H.: Effect of red ginseng extract on immune function of Israeli carp, *Cyprinus carpio*. *J. Fish Pathol.*, 18: 277-285, 2005.
- Eldar, A., Horovitz, A. and Bercovier, H.: Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 56: 175-183, 1997.
- Heo, J.H., Jung, M.H., Cho, M.H., Kim, G.H., Lee, K.C., Kim, J.H. and Jung, T.S.: The study on fish diseases with reference to bacterial susceptibility to antibiotics in the southern area of Kyeognam. *J. Vet. Clin.*, 19: 19-22, 2002
- Hwang, M.H., Park, S.I. and Kim, Y.C.: Effect of dietary herb medical stuff on the non-specific immune response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. Fish Pathol.*, 12: 5-15, 1999.
- Kim, E.: Transferable R plasmid of *Edwardsiella tarda* isolated from diseased flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish Pathol.*, 12: 115-121, 1999.
- Kim, E. and Aoki, T.: The transposon-like structure of IS26-tetracycline and kanamycin resistance determinant derived from transferable R plasmid of fish pathogens, *Pasteurella piscicida*. *Microbiol. Immunol.*, 37: 103-109, 1994
- Kim, H.J., Woo, S.H., Kim, J.W. and Park, S.I.: Morphological characteristics and pathogenicity of *Streptococcus iniae*. *J. Fish Pathol.*, 18: 167-178, 2005.
- Kim, J.H. and Kim, E.: Diversity of streptococcal strains isolated from diseased olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J. Kor. Fish Soc.*, 36: 654-660, 2003.
- Kim, J.H., Yim, D.H., Lee, C.H., Lee, S.J., Lee, W.L., Hwang, M.H. and Kim, E.: Multiple drug resistance and transferable R plasmid of streptococci isolated from diseased olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J. Fish Pathol.*, 16: 61-68, 2003.
- L'Abée-Lund, T.M. and Sorum, H.: Functional Tn5393-like transposon in the R plasmid pRAS2 from the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* isolated in Norway. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 : 5533-5535, 2000.
- Lee, D.C., Lee, J.I., Park, C.I. and Park, S.I.: The study on the causal agent of streptococciosis (*Lactococcus garvieae*), isolated from cultured marine fishes. *J. Fish Pathol.*, 14: 71-80, 2001.
- Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, M.A., Tenover, F.C. and Tenover, R.H.: Manual of clinical microbiology. 7th ed. 1469-1497. American Society for Microbiology, Washington, USA,

- 1999.
- Nguyen, H.T. and Kanel, K.: Selective agars for the isolation of *Streptococcus iniae* from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, and its cultural environment. J. Appl. Microbiol., 86: 769-776, 1999.
- Oh, S.P., Kim, D.W., Lee, J.J. and Lee, C.H.: Bacterial disease in flounder farms of Cheju island. J. Fish Pathol., 11: 23-27, 1998.
- O'Sullivan, D.J. and Klaenhammer, T.R.: Rapid mini prep isolation of high quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. Appl. Environ. Microbiol., 59: 2730-2733, 1993.
- Ravelo, C., Magarinos, B., López-Romalde, S., Toranzo A.E. and Romalde, J.L.: Molecular fingerprinting of fish-pathogenic *Lactococcus garvieae* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. J. Clin. Microbiol., 41: 751-756, 2003.
- Romalde, J.L., Magarinos, B., Villar, C., Barja, J.L. and Toranzo, A.E.: Genetic analysis of turbot pathogenic *Streptococcus parauberis* strains by ribotyping and random amplified polymorphic DNA. FEMS Microbiol. Lett., 459: 297-304, 1999.
- Woo, S.H., Kim, H.J., Lee, J.S., Kim, J.W. and Park, S.I.: Pathogenicity and classification of streptococci isolated from cultured marine fishes. J. Fish Pathol., 19: 17-33, 2006.
- 이창훈, 김필연, 고창식, 강봉조: 제주지역 양식 넙치의 연쇄구균증 원인균 *Streptococcus iniae*와 *Streptococcus parauberis*의 생물학적 특성 비교. 2006년도 추계 한국어병학회 학술발표회 요약집.: 59-60, 2006.

Manuscript Received : October 11, 2006

Revision Accepted : December 11, 2006

Responsible Editorial Member : Kwan-Ha Park
(Kunsan Univ.)