

간접형광항체법을 이용한 담수양식어의 병원균 *Edwardsiella tarda*의 검출

류해진, 조우영, 이청산, 허강준*

충청북도 가축위생시험소 남부지소, 충북대학교 수의학과*

Detection of *Edwardsiella tarda*, the Pathogenic Bacteria in Freshwater Fishes by Means of the Indirect Fluorescent Antibody Technique.

Hae-Jin Ryu, Woo-Young Cho, Cheong-San Lee, Gang-Joon Heo*

Southern Branch of Chungbuk Veterinary Service Laboratory,
Department of Veterinary Medicine, Chungbuk National University.*

Abstract

In this study, we carried out the rapid diagnostic system based on indirect fluorescent antibody technique(IFAT) for detection of bacterial diseases in cultured freshwater fishes.

1. When the fishes were tested with graded dilution of *Edwardsiella tarda* FPC 470 bacteria detection from ten fishes injected with 4.1×10^3 colony forming unit(CFU) /ml, all of them were detected by IFAT but only two fishes were recognizable by the culture method in the tested fishes injected with 4.1×10^3 CFU /ml.
2. The bacteria *E.tarda* could be detected by IFAT method from 1 to 48hrs after injection in the tissues tested such as kidney, liver and spleen of the fishes, whereas detection by culture method could be recognized from 1 to 48hrs after injection in the kidney and spleen but it was not possible from preinjection to 1 hr in the liver.
3. Thus, IFAT proved to be more useful technique than plate culture method in the diagnosis of *Edwardsiellosis* in the freshwater fishes.

Key words : detection, *Edwardsiella tarda*, indirect fluorescent antibody technique.

서 론

금붕어, 송어와 돛 등의 다수 어종에 감염되는 에드워드병의 원인으로 수중이나 뱀, 수중곤충 *E. tarda*균은 뱀장어, 메기, 틸라피아, 잉어, 이나 실지렁이 장내에서도 검출되는 장내 세균

과에 속하는 병원균이다.¹⁾

이 균에 의해 감염된 병어는 지느러미와 복부가 붉어지며 간장, 신장에 농양이 형성되는 것을 특징으로 하며,^{2, 3)} 본 병은 우리나라의 내수면 양식이 도입된 이래로 많은 피해를 준 질병으로 알려져 왔다.

현재 우리나라의 내수면 양식의 현황을 살펴 보면, 밀집사육의 결과로 인한 세균성 질병에 의해 양식어에 높은 폐사율을 나타내고 있으나, 그 예방 및 치료는 물론이고, 그 병인 및 역학마저도 정확히 밝혀지지 않고 있는 것이 사실이다. 따라서 세균성 질병의 정확, 신속한 진단만이 양식업자들의 어병의 방역 및 치료대책 등의 여러 면에서 어려운 점을 해결 할 수가 있다.⁴⁾

지금까지는 세균성 질병인 경우 임상조건 및 해부조건에 의해 진단하거나 평판도말배양법으로 원인균을 검출하였으나, 많은 배지 및 시간이 필요로 할 뿐만 아니라 현지출장 조사에서의 애로점 등 여러가지 면에서 불편한 점이 많았다.

최근에 항원, 항체반응으로 높은 면역반응을 이용한 형광항체법의 기술이 도입되었으며 형광항체법으로는 Coons 등⁵⁾에 의해 최초로 개발된 것으로 직접법과 간접법이 이용되고 있다.^{6, 7, 8)} 河原 등^{9, 10)}은 형광항체법이 양식어류의 혼합 감염증에서도 검출 효과가 높다고 하였고, 許 등¹¹⁾은 잠균이 많이 포함되어 있는 시료에서도 간접형광항체법이 균검출에 효과적이라고 하였다.

이에 본 연구자는 충청북도 남부지역 양식장에서의 세균성 질병의 감염상태 및 발생분포 상황을 기초로하여, 형광항체법에 의한 진단의 신속성과 정확성, 간편성을 토대로 양식업자의 경제적 손실을 방지하고자 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

공시어

충청북도 남부지역의 틸라피아 양어장 3곳에서 외관상 건강한 100~200g되는 것을 무작위로

채집하여, 세균성 질병의 감염여부를 확인한 후 감염되지 않은 것 만을 사용하였다.

공시균주

담수어류에 있어 주요 세균성 질병의 원인균의 기준주로는 에로모나스증의 *Aeromonas hydrophila*, 궤양병의 *Aeromonas salmonicida*, 백운병의 *Pseudomonas fluorescens*, 비브리오행의 *Vibrio anguillarum*, 연쇄구균증의 *Streptococcus* sp., 그리고 에드워드병의 *Edwardsiella tarda*를 사용하였다.

여기서 *Edwardsiella tarda* FPC 470균주는 항혈청 제작 및 각종 시험의 주대상 균주로 사용하였고, 그 외 5종의 균주는 참조용 균주로 사용하였다.

항원 및 인공접종

방 등¹²⁾의 방법을 응용하여 그림 1과같이 제조하여, 균액의 농도를 4.1×10^7 CFU/ml로 하였다.

이 균액을 총 21마리의 틸라피아 복강내에 0.3ml씩 주사한 후 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48시간 간격으로 3마리씩 채취하여 간장, 비장, 신장에서의 균 검출여부를 조사하였고, 4.1×10^7 CFU/ml의 균액을 10배씩 단계별로 희석하여 10마리 씩 5개 군으로 나누어, 각 단계별로 희석된 균액을 복강내 0.3ml씩 접종하여 간접형광항체법과 평판도말배양법으로 균 검출 여부를 조사하였다. 대조군으로는 0.8% 생리식염수 0.3ml을 복강내에 주사하여, 동일한 방법으로 비교 검토하였다.

항혈청

항혈청 제조를 위한 *Edwardsiella tarda* FPC 470항원은 許 등¹¹⁾, 방 등¹²⁾의 방법에 준하여 그림 2와 같이 제조하였다. 증균배지 Tryptic soy broth(TSB, Difco)에 *E. tarda*를 접종하여 48시간 배양한 후 균액이 0.7%포르말린 농도가 되도록 조종한 후 24시간 불활화 시킨 다음 원심분리하였다. 다음 상층액을 제거한후 침전된 균체

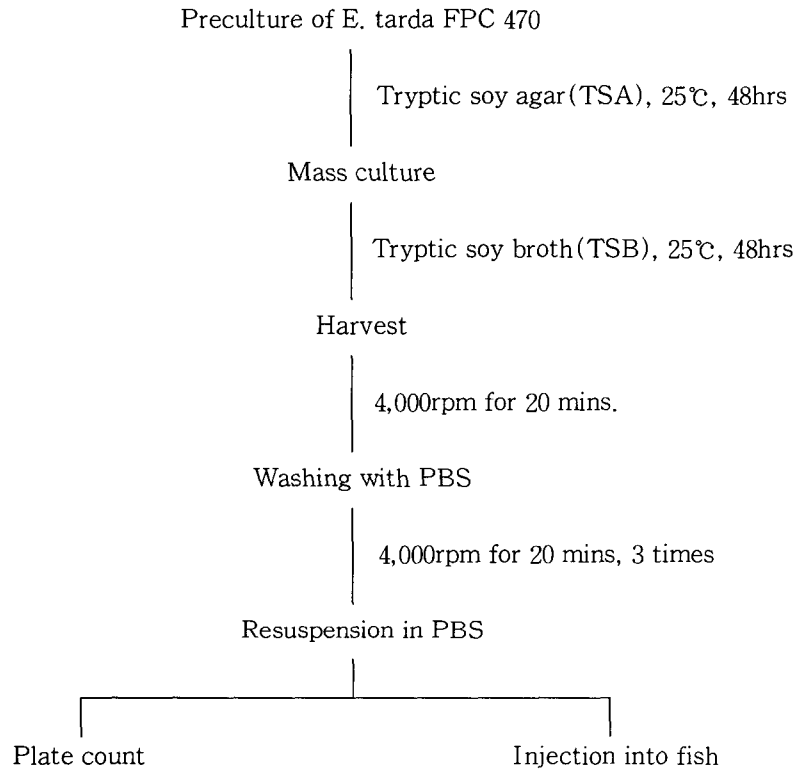


Fig 1. Preparation of bacterial solution

는 생리식염수로 세정하여 동량의 Adjuvant (Adjuvant complete freunt, sigma)로 혼합된 항원액 0.8ml을 토끼의 등쪽 피하에 0.1ml씩 8군데 접종하였다. 접종 2주 후 항 E. tarda의 응집소가가 1 : 512인 것을 확인한 후 항혈청으로 공시하였다.

간접형광항체법

간접형광항체법에 의한 병어로부터의 세균 검출시험은 許 등¹¹⁾, 방 등¹²⁾, Ainaworth 등¹³⁾의 방법으로 그림 3과같이 실시하였다. 본 실험에 사용된 conjugate는 Anti-Rabbit IgG FITC c-

onjugate(Sigma)이었다.

항생제 감수성 시험

Bryant¹⁴⁾의 방법에 따라 Sensi disk(BBL)를 이용한 디스크 확산법으로 E. tarda에 대한 약제 감수성 시험을 실시하였다.

결과 및 고찰

접종량 농도에 따른 간접형광항체법과 평판도 말배양법의 균검출을 비교한 바 균검출 결과는

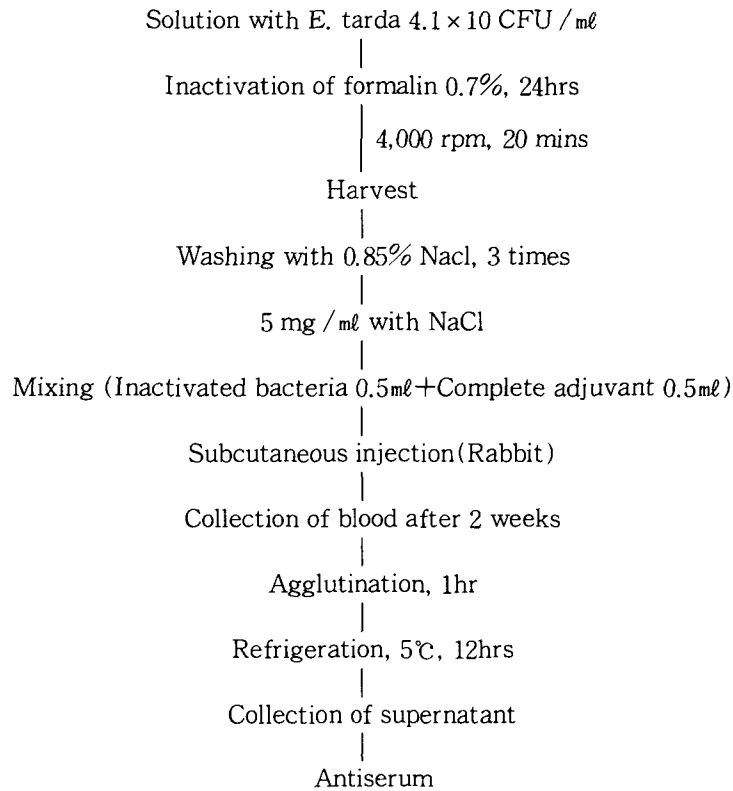


Fig 2. A manufacturing process of antiserum

표 1과 같이 $4.1 \times 10^6 \text{CFU} / \text{ml}$ 농도를 접종한 공시어 간접형광항체법과 평판도말배양법에서 10마리 공히 검출되었으나, $4.1 \times 10^3 \text{CFU} / \text{ml}$ 을 접종한 공시어에서는 간접형광항체법의 경우 10마리가 검출된 반면, 평판도말배양법에서는 2마리에서만 균이 검출되었다.

감염어의 임상증상이 나타나기 시작한 것은 $4.1 \times 10^5 \text{CFU} / \text{ml}$ 이상을 접종한 공시어로, 지느러미가 붉어졌고, 부검 소견상 간장표면에 농양이 형성되어 있는 것을 관찰할 수 있었다.

$4.1 \times 10^2 \text{CFU} / \text{ml}$ 농도로 접종한 공시어에서 평판도말배양법으로 검출되지 않는 것은, 河原

등^{9, 10)}의 성적과 같이 감염초기 병어에서는 균수가 적기 때문에 평판도말배양법으로는 균검출이 어려운 것으로 사료된다.

許 등¹¹⁾은 *Flavobacterium* sp. strain FDL-1의 접종농도가 $1.34 \times 10^4 \text{CFU} / \text{ml}$ 일때, 간접형광항체법으로는 균이 검출되지만 평판도말배양법으로는 균이 검출되지 않았으며, 접종농도가 $2 \times 10^5 \text{CFU} / \text{ml}$ 이상에서는 2가지 방법으로 모두 검출되었다고 하였고, 방 등¹²⁾은 *Virio anguillarum* YT85901의 접종농도가 $1.6 \times 10^2 \text{CFU} / \text{ml}$ 일때 간접형광항체법으로는 방어 6마리 중 6마리 모두 균이 검출되었고, 평판도말배양법으

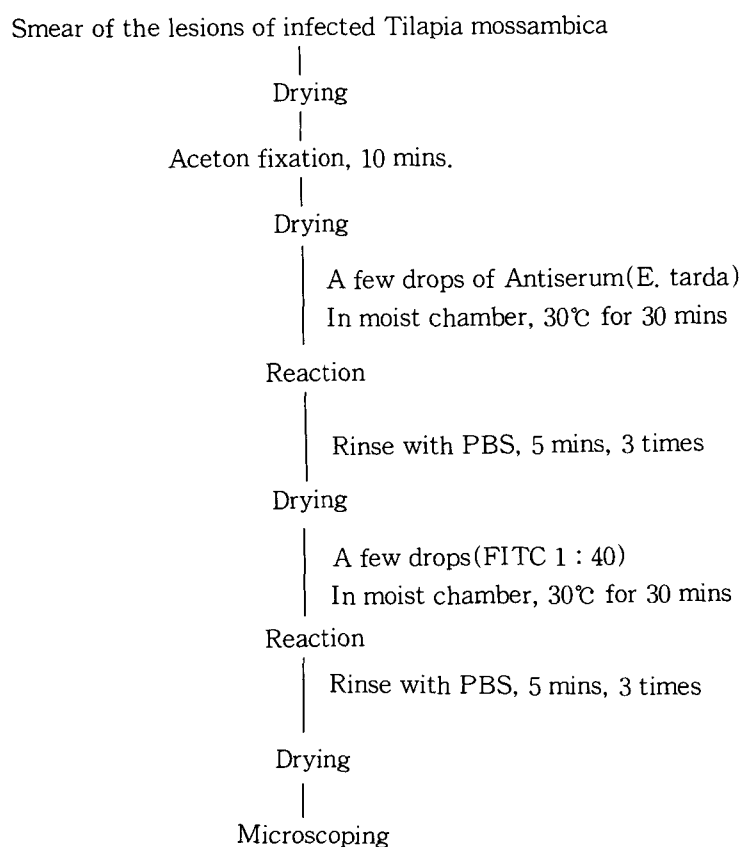


Fig 3. A standard manufacture of IFAT

Table 1. Detection by IFAT and culture method according to graded dilution of *Edwardsiella tarda* injected into *Tilapia mossambica*

Infective dose(CFU / ml)	No. of fish tested	Clinical signs	No. of fishes detected by	
			IFAT	Culture method
4.1×10^6	10	+	10 / 10	10 / 10
4.1×10^5	10	+	10 / 10	8 / 10
4.1×10^4	10	-	10 / 10	7 / 10
4.1×10^3	10	-	10 / 10	2 / 10
4.1×10^2	10	-	5 / 10	0 / 10

로는 6마리 중 1마리도 균이 검출되지 않았으며, 접종 농도가 1.6×10^5 CFU/ml 이상일때는 간접형광항체법과 평판도말배양법 공히 6마리 모두 균이 검출되었다고 하였다.

본 실험에서도 접종농도에 따른 *E. tarda* 검출이 평판도말배양법 보다 간접형광항체법이 월등한 결과는 상기 연구자의 성적과 큰 차이가 없었다.

E. tarda 접종후 시간별 간접형광항체법과 평판도말배양법의 검출 비교에서 신장, 비장, 간장으로부터 균을 검출한 성적은 표 2와 같다.

간접형광항체법에서는 접종 1시간 경과시부터 신장, 비장, 간장에서 모두 항원이 검출되기 시작하였고(사진 1, 3), 접종후 24시간 후부터 뚜렷한 양성반응을 관찰 할 수 있었다. (사진 2, 4) 비장에서만 균이 검출되었으나 접종 후 2시간부터는 간장에서도 검출되기 시작하여 접종 후 24시간 후 부터는 신장, 비장, 간장에서 공히 다량의 균이 검출되었다.

許 등¹¹⁾은 *Flavobacterium* sp. strain FDL-1의 접종균액 1.6×10^3 CFU/ml을 무지개 송어의

아가미에 인공감염 시킨 후 18시간 경과 되었을 때 간접형광항체법에서의 세균수는 2.18×10^6 CFU/ml이고, 평판도말배양법에서는 7.1×10^5 CFU/ml로 나타났다고 하였고, 방 등¹²⁾은 *Virioanguillarum* YT 85901의 접종 균액 6.9×10^8 CFU/ml를 방어의 복강내 접종한 후 간접형광항체법에서는 0.5시간부터 간장, 비장, 신장 및 심장혈에서 양성으로 나타난 반면에, 평판도말배양법에서는 접종 후 0.5시간에서 3시간까지 신장과 비장에서만 검출되었다고 하였다.

이는 본 실험에서 접종 후 1시간 경과시 간접형광항체법에서는 간장, 비장, 신장에서 양성반응이 나타났고 평판도말배양법에서는 비장, 신장에서 균이 검출된 성적과 비교해 볼 때 거의 일치하였다. 다만, *E. tarda*을 접종후 시간별 간접형광항체법과 평판도말배양법의 균 검출면에서 큰 차이가 없었던 것은 복강내 인공접종시 기계적인 손상으로 인한 복합감염의 가능성과 부검, 균분리 동정시 오염 가능성 등의 영향이 있을 수 있다고 사료된다.

Table 2. Comparison of IFAT with culture method

Hours after injection	IFAT*			Culture method**		
	Kidney	Spleen	Liver	Kidney	Spleen	Liver
Preinjection	-	-	-	-	-	-
1	+	+	+	+	+	-
2	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+
8	+	++	+	+	+	+
12	+	++	++	++	++	+
24	++	++	++	++	++	++
48	++	++	++	++	++	++

* - : no definite fluorescence, + : clear fluorescence, ++ : intense fluorescence.

** - : not detect colony, + : a few colony, ++ : much colony.

감염된 병어로부터 분리된 균에 대한 항균제 감수성 시험 결과 표 3에서와 같이 cephalothin, chloramphenicol, sulfamethoxazole / trimetho-

prin은 매우 감수성이 높은 것으로 colistin, methicillin, streptomycin은 감수성이 전혀 없는 것으로 나타났다.

Table 3. Therapeutic susceptibility of the strain isolated from infected *Tilapia mossambica*.

Antibiotic agent	Concentration(mcg)	Susceptibility of the strain*
Cephalothin	30	+++
Chloramphenicol	30	+++
Sulfamethoxazole / Trimethoprim	23.75 / 1.25	+++
Gentamicin	10	++
Novobiocin	5	++
Tetracycline	30	++
Amikacin	30	+
Colistin	10	-
Methicillin	5	-
Streptomycin	10	-

* : +++ : High susceptibility, ++, + : Medium susceptibility, - : Resistance.

결 론

*E. tarda*을 이용하여 틸라피아에 균액 0.3ml씩 복강내 접종시 접종농도별, 경과시간별에 따른 간접형광항체법과 평판도말배양법의 균 검출을 비교한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 접종농도별로 보면 4.1×10^6 CFU/ml을 10마리 공시어에 접종시 간접형광항체법과 평판도말배양법 공히 10마리 모두 균이 검출 되었으나, 4.1×10^3 CFU/ml 농도로 접종한 10마리 중 간접형광항체법으로는 모두 검출되었고, 평판도말배양법에서는 2마리만 검출되었다.

2. 접종 후 시간별로 보면 간접형광항체법에서는 1시간에서 48시간까지 간장, 신장, 비장에서 모두 양성반응을 관찰 할 수 있었으나, 평판도말배양법에서는 접종 후 1시간에서는 신장, 비장에만 균이 검출되었다.

3. 분리균에 대한 항생제 감수성 시험결과는

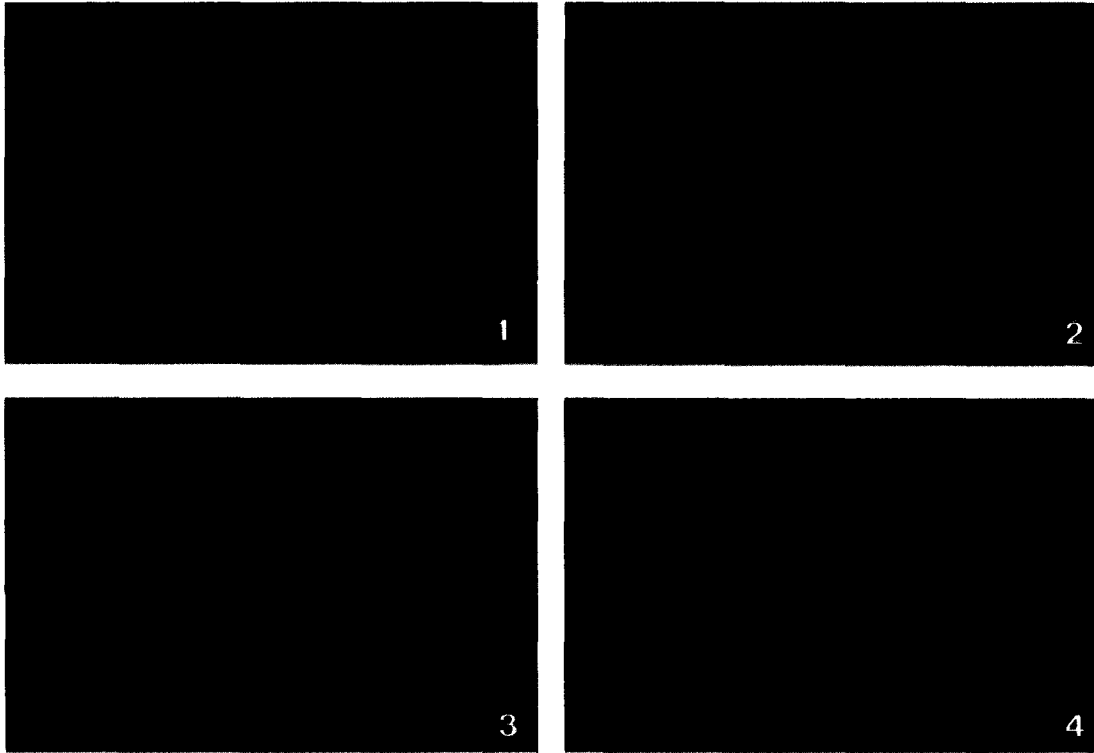
cephalothin, chloramphenicol, sulfamethoxazole / trimethoprim에 감수성이 높은 것으로 나타났다.

따라서 담수어류의 세균성 질병인 에드워드병의 진단에 있어서는 간접형광항체법이 평판도말배양법보다 유용하고 신속한 것으로 증명되었다.

참고문헌

1. 전세규. 1988. 뱀장어에 유행되는 출혈성 패혈증. 대한수의사회지. 620-622.
2. 전세규. 1985. 어병학. 제일문화사 : 98-103.
3. 이영순, 허강준, 박재학. 1993. 어병질병학.新光종합출판 : 335-372.
4. 유한상, 권병준, 윤용덕, 등. 1990. 국내 담수어류에서 분리한 *Aeromonas hydrophila*의 특성에 관한 연구. 농시논문집. 가축위생편.

- 32(1) : 63-73.
5. Coons AH, Creech HJ, R Norman Jones, et al. 1942. The demonstration of pneumococ calantigen in tissue by the use of fluorescent antibody. *J Immunol.* 45 : 159-170.
 6. Hudson L, Hay FC. 1976. *Practical Immunology.* Oxford. Blackwell Scientific publication : 298
 7. Narin RC. 1969. *Fluorescent protein tracing.* Baltimore. Williams, Wilkins : 503.
 8. Rodriguez J, Deinhardt F. 1960. Preparation of a semipermanent mounting medium for fluorescent antibody studies. *Virology.* 12 : 326-317.
 9. 河原榮二郎, 楠田理一. 1987. 直接螢光抗體法と細菌培養法による *Streptococcus* sp. の菌數測定. *水産増殖.* 35(3) : 197-199.
 10. 河原榮二郎, 楠田理一. 1987. 直接螢光抗體法によるウナギ 主要細菌疾病の迅速診断. *水産増殖.* 53(3) : 395-399.
 11. 許康俊, 若林久嗣. 1987. 間接螢光抗體法による細菌性魚病の原因菌 *Flavobacterium* sp. の検出. *魚病研究.* 22(4) : 215-220.
 12. 방종덕, 전세규, 박수일. 1992. 간접형광항체법에 의한 실험 감염 해산양식어류에서의 *Vibrio anguillarum* 검출. *수산연구보고.* 45 : 149-157.
 13. Ainaworth AJ, G Capley, D Munson, et al. 1986. Use of monoclonal antibody in the indirect fluorescent antibody technique (IFA) for the diagnosis of *Edwardsiella ictaluri*. *J fish diseases.* 9 : 439-444.
 14. Bryant MC. 1972. *Antibiotics and their laboratory control.* 2nd ed. Butterworth. London : 34-65



Legends of Photos

- Photo 1. Immunofluorescence of the liver taken from the Tilapia artificially infected with *E. tarda* FPC 470. 1hr after intraperitoneal injection(1000×)
- Photo 2. Immunofluorescence of the liver taken from the Tilapia artificially infected with *E. tarda* FPC 470. 24hr after intraperitoneal injection(1000×)
- Photo 3. Immunofluorescence of the kidney taken from the Tilapia artificially infected with *E. tarda* FPC 470. 1hr after intraperitoneal injection(1000×)
- Photo 4. Immunofluorescence of the kidney taken from the Tilapia artificially infected with *E. tarda* FPC 470. 24hrs after intraperitoneal injection(1000×)