

## 養殖海産魚에서 分離한 *Vibrio anguillarum*의 血清型에 對하여

李 鍾 演\* · 田 世 圭\*\* · 朴 守 一\*\*

### Serotyping of *Vibrio anguillarum* isolated from cultured marine fishes

Jong-Yun LEE\*, Seh-Kyu CHUN\*\*, Soo-Il PARK\*\*

\*Aquaculture Reserch, Purina Korea, Inc.

C.P.O. Box 5112, Seoul, Korea

\*\*Department of Fish Pathology

National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-023 Korea

26 strains of *Vibrio anguillarum* isolated from *Seriola quinqueradiata*, *Chrysophrys major* and *Oplegnathus fasciatus* between July 1985 and December 1986 were examined for their serological identification.

When the isolates were examined on the basis of cross-agglutination and cross-absorption tests with thermostable antigens(O) of *V. anguillarum* 6 serotypes reported by Kitao et al.(1983), they showed positive agglutination reaction only with serotype C, the representative strain PT-213, and also formed double precipitation lines against anti-PT-213 serum, and specifically reacted with the PT-213 strain on cross-absorption test.

Therefore, it was thought that all the isolates have single serotype and its serotype is identical with serotype C. the representatve strain PT-213, reported by Kitao et al. (1983).

#### 緒 論

*Vibrio anguillarum*은 養殖海産魚에 비브리오病을 일으키는 重要한 病原性 細菌으로 널리 알려져오고 있다(Kusuda, 1966 ; 楠田等, 1975 ; Jo et al., 1979 ; Tajima, 1981).

우리나라에서는 1980年代들어 海産魚가두리 養殖産業이 活潑해 지면서 방어稚魚에 대한 비브리오病의 被害가 점차 커지고 있으나, 이에대한 治療는 抗生劑 使用에 全的으로 依存하고 있다. 그러나 비브리오病의 驅除를 위하여 抗生劑를 長期間使用해온 日本에서는 이미 오래전부터 耐性菌이 出現(Aoki et al., 1974)하여, 이病의 治療를 더욱 어렵게 하고 있는 實情이다.

따라서 이 비브리오病 感染을 豫防하는 方法의 하 나로서 백신의 開發을 위한 *V. anguillarum*의 血清學

的및 抗原의 研究가 美國과 日本等地에서는 많이 實施 되어오고 있으나(Pacha and Kiehn, 1969 ; Harrel et al., 1978 ; 北尾等, 1975 ; 楠田, 1975 ; Johnson, 1977 ; Strout et al., 1978 ; Sørensen and Larsen, 1986) 우리나라에서는 아직 *V. anguillarum*의 血清學 的 研究에 대한 報告가 없다.

따라서 本研究는 우리나라 養殖海産魚에서 分離한 病原性 *V. anguillarum*을 日本의 Kitao et al. (1983) 이 報告한 *V. anguillarum*과의 血清學的 比較를 통하여 이들의 血清型을 同定하였다.

#### 材料 및 方法

抗血清製作과 血清型調査는 Sørensen and Larsen (1986) 및 Kitao et al. (1983)의 方法에 따랐고, 抗原

性調査는 Nelson and Macleod(1977)의 方法에 따라 Ouchterlony의 免疫擴散法으로 行하였다.

### 結果 및 考察

#### 1. 血清型

*V. anguillarum*의 血清型을 調査하기 위한 抗原의 製作에는 0.4% 포르마린 處理法과 121°C에 2時間加熱한 加熱處理法 두가지를 使用하였다.

各 分離菌들의 抗 YT-85805 血清에 대한 Slide 凝集反應檢査結果 모든 菌株가 陽性反應을 나타내었으

므로, Microtiter法에 의한 凝集素價를 포르마린 處理死菌의 경우 RB-85801을 除外하고는 모두 免疫原菌株인 YT-85805의 凝集素價와 同一한 516이었고, 加熱處理死菌에서는 YT-85706등 3個의 菌株를 除外하고는 免疫原菌株의 凝集素價와 同一한 32였다.

또한, 凝集素價에 있어서 免疫原菌株와 差異가 나는 菌株들도 그 差異가 한 order以內이었으므로 Park et al. (1983)에 따라 같은 凝集素價의 범위로 판단되는 것이 타당하다고 생각된다.

抗 YT-85805血清에 대한 各 試驗菌株의 抗原別, 즉, 포르마린 處理死菌과 加熱處理死菌사이의 凝集素價가

Table 1. Agglutinin titers of rabbit anti YT-85805 serum against formalin of heat killed *V. anguillarum* YT-85805.

Strains used as antigens	Agglutinin titers	
	Formalin-killed cells	Heat-killed cells
YT-85805	512	32
YT-85701	512	32
YT-85702	512	32
YT-85706	512	16
YT-85707	512	32
YT-85708	512	32
YT-85709	512	32
YT-85711	512	32
YT-85712	512	32
YT-85801	512	32
YT-85804	512	16
YT-85806	512	16
YT-85807	512	32
YT-85809	512	32
YT-85810	512	32
YT-85811	512	32
YT-85814	512	32
YT-85904	512	32
YT-85905	512	32
YT-85911	512	32
YT-85913	512	32
YT-85901	512	32
YT-85916	512	32
RB-85801	256	32
RB-86105	512	32
RB-86108	512	32

서로 다르며, 특히, 加熱處理死菌의 것이 훨씬 낮게 나타났다. 이러한 理由로서는 抗 YT-85805 血清의 製作抗原이 포르마린 處理死菌이었는데 비하여, 加熱處理死菌의 경우는 加熱處理도중 易熱性인 抗原物質이 제거되었기 때문에 생각된다.

免疫擴散 試驗에서는 그림1에 나타난 바와 같이 形成된 2重의 沈降線이 一致하고 있었다.

以上の 結果로부터 本實驗에 使用한 分離菌들은 모두 같은 血清型에 속하는 것으로 판단되었다.

2. *V. anguillarum*의 血清型 比較

分離된 *V. anguillarum* 菌株들을 Kitao et al. (1983)

이 *V. anguillarum* 菌株들로 製作한 抗血清과 slide凝集反應을 시켰을때 表2에서처럼 全試驗菌株가 陽性反應을 나타낸것은 血清型C뿐이었다.

한편, 抗 YT-85895血清과 血清型C의 抗血清에 대하여 血清型A~F의 菌株를 포르마린 處理한 抗原으로 凝集素價를 測定하였을 때의 結果는 表3과 같다. 즉 PT-213과 YT-85805를 除外한 나머지 菌株들은 항 YT-85805 血清과 抗 PT-213 혈청에 대하여 32와 40~의 낮은 凝集素價를 나타내어 凝集素價間에 큰 차이를 보였다.

그러나, 이와같이 서로 다른 菌株間에도 다소간의 차이는 있었으나 交叉凝集素價가 確認되었으므로, 本

Table 2. Agglutiation test.

Antisera	Type A	Type B	Type C	Type D	Type E	Type F
Stains	PT-24	PT-493	PT-213	PB-15	PB-28	ET-1
YT-85701	-	-	+	-	-	-
YT-85702	-	-	+	-	-	-
YT-85706	-	-	+	-	-	-
YT-85707	-	-	+	-	-	-
YT-85708	-	-	+	-	-	-
YT-85709	-	-	+	-	-	-
YT-85711	-	-	+	-	-	-
YT-85712	-	-	+	-	-	-
YT-85801	-	-	+	-	-	-
YT-85804	-	-	+	-	-	-
YT-85805	-	-	+	-	-	-
YT-85806	-	-	+	-	-	-
YT-85807	-	-	+	-	-	-
YT-85809	-	-	+	-	-	-
YT-85810	-	-	+	-	-	-
YT-85811	-	-	+	-	-	-
YT-85904	-	-	+	-	-	-
YT-85905	-	-	+	-	-	-
YT-85911	-	-	+	-	-	-
YT-85913	-	-	+	-	-	-
YT-85901	-	-	+	-	-	-
YT-85916	-	-	+	-	-	-
YT-85801	-	-	+	-	-	-
YT-85901	-	-	+	-	-	-
YT-85105	-	-	+	-	-	-
YT-85108	-	-	+	-	-	-

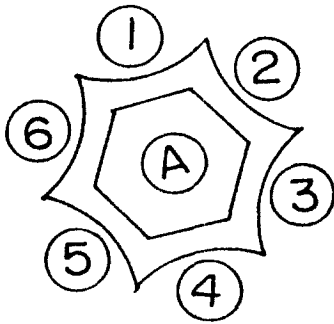


Fig. 1. Ouchterlony immunodiffusion analysis of *V. anguillarum* against anti-YT-85805 serum (A, anti-YT-85805 serum; 1, YT-85701; 2, YT-85807; 4, YI-85811; 5, KB-85801; 6, YT-85901)

Table 3. Agglutinin titer

Strains	Anti-YT-85805 serum	Anti-PT-213 serum
PT- 23(A)	32	40
PT-493(B)	32	40
PT-213(C)	256	2560
PT- 15(D)	32	80
PT- 28(E)	32	40
ET- 1(F)	32	80
YT-85805	515	2560

( ) : serotype

分離菌株들의 抗原과 血清型A~F 菌株와의 사이에 共通因자의 存在를 알기 위하여 吸收抗血清에 의한 交叉凝集反應을 行한 結果는 表4와 같다. 즉, 各 實驗 菌株들은 抗血清製原抗原을 除外한 나머지 抗原들로 吸收시킨 抗血清C에 대해서만, 吸收處理 以前의 凝集素價보다 二 order 낮은 凝集素價640을 나타냈을 뿐 다른 吸收抗血清에 대하여는 凝集素價20 以下로서 큰 差異를 보였다.

따라서, 本實驗에 使用한 菌株는 血清型C에 속하며, C型菌株는 다른 血清型的 菌株와 區分되는 抗原의 特性이 있음이 分明하였다.

抗 YT-85805血清에 대하여 各 血清型的 代表抗原을 免疫擴散法으로 反應시켰을때 그림2에서 처럼 血清型C抗原만이 뚜렷한 하나의 沈降線과 약한 하나의 沈降線으로 構成된 2重의 沈降線을 形成하였고, 나머지 抗原들은 약한 하나의 沈降線만을

形成하여 本 分離菌들은 血清型C 以外的 抗原들 과도 共通抗原的 要素가 있다는 것을 알 수 있었다.

그리고 YT-85805, RB-85801 및 PT-213菌株들을 PT-213 抗血清에 대하여 免疫擴散시켰을때 그림3에서 처럼 모두 同一한 沈降線을 形成하였다.

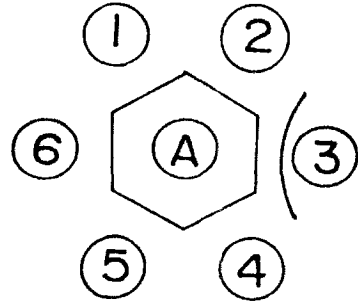


Fig. 2. Ouchterlony immunodiffusion analysis of *V. anguillarum* against anti-TY-85805 serum (A, anti-YT-85805 serum; 1, PT-24; 2, PT-493; 3, PT-213; 4, PT-15; 5, PT-28; 6, ET-1).

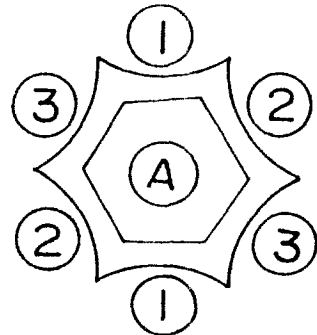


Fig. 3. Ouchterlony immunodiffusion analysis of *V. anguillarum* against anti-PT-213 serum (A, anti-PT-213 serum; 1, YT-85805; 2, P1-213; 3, RB-85801).

以上의 結果로부터 本 實驗에 使用된 試驗菌株의 血清型과 現在까지 外國에서 報告되고 있는 血清型을 比較檢討했을때, Harrel et al. (1976)의 type I, 北尾等 (1975)의 C, 楠田(1975)의 III, Johnson(1977)의 Group 2, Strout et al. (1978)의 775A group 그리고 Sørensen and Larsen(1986)의 O, 血清型과 同一한 것으로 판단되었다.

繪面等(1980)은 日本에서 分離된 Phenon I의 type 의 *V. anguillarum* 170菌株 中에서 血清型 C에 속하

Table 4. Cross-agglutinin titers to each absorbed antiserum

Monospecific antiserum (1 : 10)	Absorbed with antigens	Agglutination antigens				
		YT-85706	YT-85801	YT-85805	YT-85904	RB-85801
Type A (PT-24)	(B)					
	(C)					
	(D)	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
	(E)					
	(F)					
Type B (PT-493)	(A)					
	(C)					
	(D)	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
	(E)					
	(F)					
Type C (PT-213)	(A)					
	(B)					
	(D)					
	(E)	640	640	640	640	640
	(F)					
Type C (PT-15)	(A)					
	(B)					
	(C)	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
	(E)					
	(F)					
Type E (PT-28)	(A)					
	(B)					
	(C)	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
	(D)					
	(F)					
Type F (ET-1)	(A)					
	(B)					
	(C)	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
	(D)					
	(E)					

는 것은 56菌株였으며, 이들 가운데 46菌株(82%)가 養殖海産魚에서 分離되었고, 특히, 이 중에서 방어로부터 分離된 29菌株는 모두가 血清型 C에 속한다고 報告하였다. 또한, Sørensen and Larsen(1986)은 덴마크에서 海水養殖중인 무지개송어(*Salmo gairdneri*)로부터 分離한 157菌株가 111菌株(70.7%)로서 優占種이었다고 하였다.

그리고, 本 實驗에 使用된 菌株들이 모두 養殖海産魚에서 分離되었으며, 또한 이들이 모두 血清型C에 속한다는 事實로 봐서 우리나라 養殖海産魚에 비브리오패염을 일으키는 *V. anguillarum*의 血清型도 C型이 優占種인 것으로 판단되었다.

## 要 約

1985年 7월부터 1986年 12월사이에 養殖방어, 참돔 및 돌돔으로부터 分離한 26菌株의 *Vibrio anguillarum*에 대한 血清學的 同定의 實施하였다.

이 分離菌들을 Kitao et al. (1983)이 報告한 6가지 血清型的 *V. anguillarum*에 대하여 耐熱性 O抗原을 利用하여 相互凝集反應시켜본 結果,

1. 本 分離菌은 모두 하나의 同一한 血清型을 가지고 있었으며 Kitao et al. (1983)이 報告한 血清型C(代表菌株 PT-213)와 만이 凝集反應하였다.

2. 本 分離菌은 모두 PT-213血清에 대하여 同一한 2重의 沈降線을 形成하였다.

3. 本 分離菌은 모두 PT-213의 因子抗血清에 대하여만 特異反應을 하였다.

따라서 本 分離菌들의 血清型은 모두 Kitao et al. (1983) 이 報告한 血清型C와 동일한 것으로 판단되었다.

## 參 考 文 獻

- 繪面良男·田島研·吉水 守·木村高久(1980) : 魚類 *Vibrio* 屬病原菌의 分類學的 ならびに 血清學的檢討. 魚病研究, 14(4), 167-179.
- Harrel, L. W., H. M. Etlinger and H. D. Hodgins (1976) : Humoral factors important in resistance of Salmonid fish to bacterial disease II. Anti-*Vibrio anguillarum* activity in mucus and observations on complement. *Aquaculture*, 7,363-370.
- Johnsen, G.S.(1977) : Immunological studies on *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture*, 10,221-230.
- Jo Y., Ohnishi K. and Muroga K. (1979) : *Vibrio anguillarum* isolated from cultured yellowtail. *Fish Pathology* 14, 43-47.
- 北尾忠利, 青木山, 佐佐武三, 合田朗(1975) : *Vibrio anguillarum* の 抗原分析 昭和 50年度 日本水産學會 秋季大會講演要旨集, 72.
- Kitao, T., T. Aoki, M. Fukudomi, K. Kawano, Y. Wada and Y. Mizuno(1983) : Serotyping of *Vibrio anguillarum* isolated from diseased freshwater fish in Japan. *J. Fish Diseases*, 6, 175-181.
- 楠田理一, 川合研兒, 佐右浩(1975) : 魚類 の 病原性 *Vibrio* の 分離學的研究-II. 血清學的性狀による檢討. 昭和 50年度 日本水産學會秋季大會講義要旨集, 71.
- Nelson, J. D. and R. A. Macleod (1977) : Distribution of lipopolysaccharide and the detection of a new subfraction in the cell envelope of marine *Pseudomonas*. *Journal of Bacteriology*, Vol. 129, 1059-1065.
- Kusuda R.(1966) : Studies on the ulcer disease of marine fishes. *Proceedings of the 1st US-Japan Joint Conference on Marine Microbiology*, Tokyo, pp. 1-13.
- Pacha R. E. and Kiehn E. D. (1969) : Characterization and relatedness of marine vibrios pathogenic to fish : physiology, serology and epidemiology. *Journal of Bacteriology*, 100, 1242-1247.
- Park, S. I., H. Wakabayashi and Y. Watanabe (1983) : Serotype and virulence of *Edwardsiella tarda* isolated from eel and their environments. *Fish Pathology*, 18(2), 85-89.
- Sørensen, U. B. S. and J. L. Larsen (1986) : Serotyping of *Vibrio anguillarum*. *Appl. Envir. Microbiol.*, 593-597.
- Strout, R. G., E. S. Sawyer and B. A. Coutermarsh (1978) : Pathogenic Vibrios in confinement-reared and fishes of the Marine New Hampshire coast. *J. Fish. Res. Board Can.*, 35, 403-408.
- Tajima K., Yoshimizu M., Ezura Y. and Kimura T. (1981) : Studies on the causative organisms of Viriosis among the pen-cultured Coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, in Japan. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 47, 35-42.