

면역효소항체법에 의한 β -용혈성 연쇄구균 *Streptococcus* sp.의 신속진단에 대하여

田世圭·崔東琳·朴守一

釜山水産大學 水族病理學科

The Rapid Diagnosis of β -Haemolytic *Streptococcus* sp. by Immunoperoxidase Method

Seh-Kyu CHUN·Dong-Lim CHOI·Soo-Il PARK

Department of Fish Pathology,

National Fisheries University of Pusan, Pusan 607-737, Korea

For the rapid diagnosis of bacterial diseases of cultured fishes, the immunoperoxidase method was applied to the detection of β -haemolytic *Streptococcus* sp. strain KST-2 isolated from tilapia(*Oreochromis niloticus*). The suitability of field analysis and the sensitivity of the immunoperoxidase method was compared with those of the counterimmunoelectrophoresis (CIE) and the immunodiffusion(ID).

Results of testing cross-reactivity which did not indicate any cross reactivity with other fish pathogens, this method was specific to *Streptococcus* sp. The sensitivity of this method was 1×10^3 CFU/ml which was at least 10^2 times greater than the CIE and 10^4 times greater than the ID.

The immunoperoxidase method was more suitable for field application and more sensitive than other diagnostic techniques tested on this study.

緒 論

최근 양식중인 담수어 및 해산어 양식장에서 세균성 질병이 빈번히 발생되어 많은 경제적 손실을 입고 있으나 효과적인 예방대책이 알려지지 않았기 때문에 조기발견이 매우 중요한 실정이다(田, 1988).

양식어류의 세균성 질병의 신속한 진단을 위하여 이중면역확산법(Bullock등, 1974), 간접 및 직접형광항체법(Chen등, 1975; Huh등, 1987), 상호응집반응(Kimura등, 1981, 1983), counterimmunoelectrophoresis

(CIE)(Cipriano등, 1985)와 면역효소항체법(Sakai등, 1986, 1987a, 1987b)등의 많은 면역혈청학적인 방법이 사용되고 있다. 면역효소항체법(Immunoperoxidase method)은 세균의 검출시 민감도가 매우 뛰어날 뿐 아니라 형광항체법이나 Radioimmunoassay(RIA)와 같은 특수한 시약이나 장치를 필요로 하지 않기 때문에 질병의 진단에 널리 사용되고 있다(Johnstone 및 Thorpe, 1982). 면역효소법중에서 가장 많이 쓰이는 방법은 Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA)이며 (Nakamura등, 1979), 이를 변형시킨 "dot blot method"

(Hawker 등, 1982)는 cellulose acetate막을 사용함으로써 현장사용이 비교적 용이하고 경제적인 잇점이 있어 양식어류의 증상이 뚜렷하지 않은 병원균이나 신속히 진단해야 하는 병원균의 검출에 매우 적합하다. 따라서 *V. anguillarum*(Cipriano 등, 1985), *A. salmonicida*(Sakai 등, 1986), *R. salmoninarum*(Sakai 등, 1987a, 1987b)의 검출에 사용되었으며, 높은 검출민감도를 나타내나 바 있으나 상기방법은 검출방법이 다소 복잡하여 실제 현장사용에 어려움을 지니고 있다(Sakai 등, 1986).

본 연구는 신속 간편한 현장진단 방법을 개발하기 위하여 기존의 "dot-blot method"를 약간 변형한 새로운 방법으로 틸라피아에서 분리된 *Streptococcus* sp. KST-2균주를 검출함으로써 방법론의 타당성을 조사한 후 기존의 어병진단 방법과 그 민감도를 비교하였다. 또 실제 양식장에서 사육되고 있는 틸라피아를 대상으로 연쇄구균증을 진단함으로써 본 방법의 유용성을 검토하였다.

材料 및 方法

1. 시험균

1987년 7월 北尾忠利 (Tadatoshi Kitao)로부터 분양 받은 β 용혈성 연쇄구균인 *Streptococcus* sp. KST-2균주를 시험균으로 사용하였다.

2. 항원 제작

계대배양중의 KST-2균주를 0.5% glucose를 첨가한 Brain heart infusion(Difco, BHI) 한천배지에 접종하여 25°C에서 24시간 배양하여 얻은 집락을 0.5% glucose BHI broth 배지에 접종하여 27°C에서 48시간 진탕 배양한 후 최종농도 0.3% 되도록 포르말린(Junsei)을 가하여 24시간 방치하여 불활성화시켰다. 균액을 4°C에서 10분간 10,000rpm으로 원심분리(Hitachi, Japan)하여 집균한 후 0.85% 생리식염수로 3회 세척한 후 0.02% NaN_3 (Merck)가 포함된 멸균생리식염수로 1mg/ml되게 현탁시켜 4°C에 보관하여 항원으로 사용하였다.

3. 항혈청 제작

상기 2의 항원을 토끼(φ , 1.3kg)의 각 발목에 0.4ml씩

주사하였다. 최초 주사후 1주간격으로 동량을 3회 강화 주사하고, 40일간 사육한 후 귀동맥으로부터 채혈하였다(Hames 및 Rickwood, 1981). 얻어진 항혈청의 응집역가를 측정한 결과 1024로 나타났다.

4. 면역효소항체법(Immunoperoxidase method)

4-1. 검출방법

면역효소항체법의 검출방법은 Fig. 1과 같이 하였다.

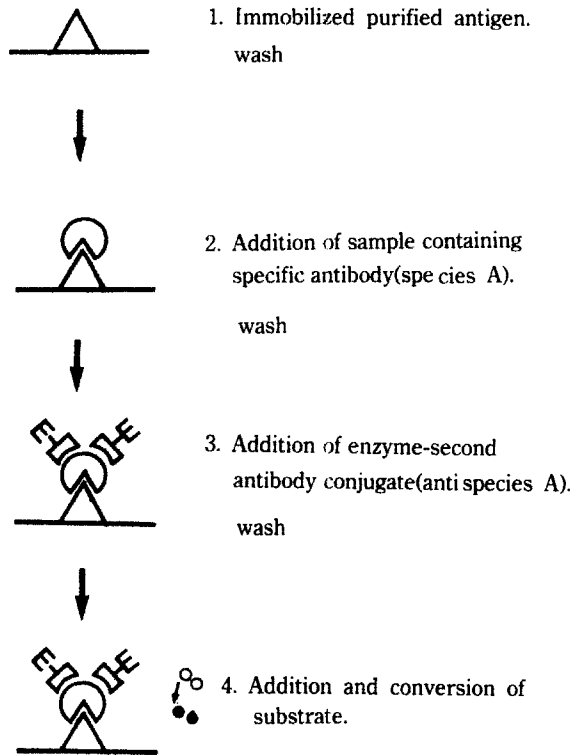


Fig. 1. Scheme of Enzyme-labelled antibody method

Fig. 1에서 보듯이 첫째, ml당 10⁸CFU의 세균수로 정량한 항원을 0.45 μ m millipore filter에 0.5ml를 떨어뜨린 다음 습윤상(humidity chamber)내에 넣고 실온에서 30분간 방치한 후 0.85% 생리식염수로 5분간 세척한다. 둘째, 비특이적인 단백질 결합을 방지하기 위하여 3% gelatin-TBS(20mM Tris, 0.5M NaCl, pH7.5) 용액을 가하여 30분간 실온에서 방치한 후 TBS용액으로 100배

희석한 KST-2균주에 대한 토끼항혈청을 막에 가하여 습윤상내에 넣고 실온에서 30분간 방치한 후 TBS 용액으로 5분간 세척한다. 셋째, horseradishperoxidase가 결합된 anti-rabbit IgG goat antiserum(Sigma)을 TBS 용액으로 100배 희석하여 막에 가한 후 습윤상내에 넣고 30분간 방치한 후 TBS, 3% gelatin-TBS 및 TBS 용액을 사용하여 차례로 각 10분씩 세정한다. 넷째, DAB-TBS(diaminobenzidine tetrahydrochloride(Sigma) 20mg, H₂O₂(ROTS) 0.1ml in TBS 100ml) 용액을 가하여 발색반응을 일으킨다. 대조구는 항원 대신 멸균된 생리식염수를 사용하였다.

4-2. 특이성 시험

면역효소항체법의 특이성(specificity)을 시험하기 위하여 Table 1과 같이 다른 어류병원균들과 교차반응을 실시하였다. 각 균들의 항원액의 농도는 생리식염수로 10⁸CFU/ml로 조정하였으며, 포르말린으로 불활성화하여 사용하였다.

5. 검출민감도 비교실험

5-1. 검출실험

5-1-1. 이중면역확산법

이중면역확산법은 Fryer 등(1985)의 방법에 따라 행하였다. Tris-barbiturate 완충용액(TBB, pH8.6)에 1% agarose(Gibco)를 가하여 완전히 녹인 후 8.5×9.5cm 유리판에 부어 굳힌 후 gel punch로 구멍을 내어 항원(10 μ l), 항혈청(10 μ l)을 넣고 실온에서 48시간동안 방치한 후 0.1M NaCl 용액으로 30분간 세척한 후 0.5% Coomassie brilliant blue R-250(Sigma)으로 염색하였다.

5-1-2. Counterimmunoelectrophoresis(CIE)

0.1% agarose TBB(pH8.2)를 충분히 녹인 후 2.5×7.5 cm의 슬라이드 위에 부어 굳힌 후 양극쪽에 홈(trough)을 내고, 음극쪽에 구멍을 내어 홈에는 100 μ l의 항원을 넣은 후 10 $^{\circ}$ C에서 100V로 1시간동안 전기영동하고 0.1 M NaCl 용액으로 15분간 세척하여 0.5% CBB으로 염색하였다(Hames & Rickwood, 1981).

5-2. 비교민감도에 대한 시험(Test of comparative sensitivities)

10⁸CFU/ml의 항원을 10²CFU/ml의 농도까지 멸균생리식염수로 단계적으로 희석하여, 각 항원을 사용하여 면역효소항체법, 이중면역확산법 및 CIE를 행하여 각 진단법의 최소항원검출농도를 측정하였다.

6. β 용혈성연쇄구균증 진단

6-1. 인위 감염어

부산수산대학 수족병리학과 어병진단학교실에서 사육중인 틸라피아(*Tilapia* sp.) (어체중 300g) 10마리에 생균(KST-2균주) 10⁸cells를 복강주사한 후 25 $^{\circ}$ C에 24시간 사육한 후 각 시험어의 뇌와 심장을 분리하여 멸균생리식염수를 동량(g/ml)으로 섞어 마쇄(homogenized)하여 500rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액을 시료로 사용하여 면역효소항체법을 행하였으며, 뇌조직으로부터 얻은 시료를 사용하여 이중면역확산법 및 CIE를 행하였다.

6-2. 자연감염어

본 어병진단학교실에서 사육중인 틸라피아중에서 연쇄구균증의 병상을 보이는 8마리를 0.05% FA 100(田邊製藥)에 마취시킨 뒤 복부를 절개하여 간, 비장 및 심장과 뇌를 무균적으로 분리하여 상기 6-1과 동일한 방법으로 항원시료를 제작하여 면역효소항체법을 시행하여 각 기관에서의 항원의 검출여부를 시험하였다.

현지 양식장에서 면역효소항체법에 의한 감염균의 검출실험을 위하여 본 어병진단학 교실에서 사육중인 틸라피아 중 20마리를 무작위로 채포하여 각 시험어의 뇌를 무균적으로 분리하여 상기의 방법으로 시료를 제작하여 면역효소항체법에 의해 β -용혈성 연쇄구균의 감염여부를 조사하여 보았다.

結 果

1. 면역효소항체법

1-1. 검 출

"Dot-blot method" (Hawkers 등, 1982)를 약간 변

형하여 본 실험에서 사용한 면역효소항체법을 실시한 결과 시험항원의 검출은 양성반응일 경우 갈색의 발색반응이 일어나며, 음성반응일 경우 발색반응이 일어나지 않는 것으로 나타났다(Fig. 2).

혀 교차반응이 일어나지 않는 것으로 보아 *Streptococcus* sp. KST-2균주에 특이성이 있음을 알 수 있었다.

Table 1. Specificity of Immunoperoxidase tests using other fish pathogen

Bacterial antigen used	Anti- <i>Streptococcus</i> sp. strain KST-2 serum
<i>Edwardsiella tarda</i> TE8703	-
<i>Edwardsiella tarda</i> NG8104	-
<i>Vibrio anguillarum</i> PT24	-
<i>Vibrio anguillarum</i> PT493	-
<i>Vibrio anguillarum</i> PT213	-

Fig. 2. Results of Immunoperoxidase method for specific detection of *Streptococcus* sp. strain KST-2.

1-2. 특이성

면역효소항체법의 특이성 유무를 알기 위하여 어류 병원균들과 교차반응을 실시한 결과 Table 1과 같이 나타났다. 면역효소항체법은 다른 어류병원균들과 전

2. 검출 민감도 비교

Streptococcus sp. KST-2균주를 사용하여 이중면역 확산법, CIE 및 면역효소항체법의 검출민감도를 비교하기 위하여 10^8 CFU, 10^7 CFU, 10^6 CFU, ..., 10^2 CFU/ml의 농도에서 검출시험한 결과는 Table 2에 나타난 것과 같다. 면역효소항체법의 최소 검출가능 농도는 10^3 CFU/ml였으며, CIE는 10^6 CFU/ml, 이중면역확산법은 10^7 CFU/ml로 나타났다. 즉, 면역효소항체법은 CIE에 비해 10^4 배, 이중면역확산법에 비해 10^4 배의 높은 검출 민감도를 가지고 있는 것으로 나타났다(Table 2).

Table 2. Comparative sensitivities of the Immunodiffusion, the Counterimmunoelectrophoresis and Immunoperoxidase method for specific detection of *Streptococcus* sp. strain KST-2

Bacterial number(/ ml)	Immuno-diffusion	Counterimmunoelectrophoresis	Immunoperoxidase method
1×10^8	+	+	+
1×10^7	+	+	+
1×10^6	-	+	+
1×10^5	-	+	+
1×10^4	-	-	+
1×10^3	-	-	+
1×10^2	-	-	-
Control	-	-	-

3. β 용혈성 연쇄구균증 진단

3-1. 인위감염어

KST-2의 10^6 cells의 생균을 복강주사한 틸라피아 10미에 대한 뇌와 심장조직으로부터 면역효소항체법을 사용하여 항원을 검출한 결과 뇌조직의 시험항원은 10미에서 모두 검출되었으나 심장조직의 시험항원은 9미에서 검출되었다(Table 3). 뇌조직의 시험항원의 검출결과 이중면역확산법은 2미 및 CIE에서 7미가 검출되었다.

3-2. 자연감염어

β -용혈성 연쇄구균증의 외부 병상(체색흑화, 안구출혈, 아가미 뚜껑내 출혈, 항문주위 출혈, 복부 점상출혈 및 꼬리지느러미 기부 출혈 등) (Kitao 등, 1981)을 보이는 시험어의 조직으로부터 면역효소항체법을 사용하여 항원의 존재유무를 시험한 결과 뇌에서는 10미, 심장에서는 9미, 간에서는 3미, 비장에서는 9미에서 양성반응이 나타나 β 용혈성 연쇄구균의 진단은 뇌, 심장 및 비장의 조직을 사용함이 좋은 것으로 나타났다 (Table 4).

Table 3. Detection of *Streptococcus* sp. strain KST-2 from experimentally infected tilapia

Fish lot No.	Immuno-diffusion	Counterimmunoelectrophoresis	Immunoperoxidase method	
			Brain	Heart
1	+	+	+	+
2	-	+	+	+
3	-	+	+	+
4	-	-	+	+
5	-	-	+	+
6	-	-	+	-
7	+	+	+	+
8	-	+	+	+
9	+	+	+	+
10	-	+	+	+
Total	3	7	10	9

Table 4. Detection of β -haemolytic *Streptococcus* sp. from cultured tilapia by immunoperoxidase method

Fish No.	Brain	Heart	Liver	Spleen
1	+	+	+	+
2	+	+	+	+
3	+	+	+	+
4	+	-	-	+
5	+	+	-	+
6	+	+	-	+
7	+	+	-	-
8	+	+	-	+

현지 양식장에서의 면역효소항체법의 효과적인 진단 여부를 알아보기 위하여 무작위로 채포된 시험어의 뇌로부터 항원을 검출시험한 결과 Table 5와 같이 14 마가 양성반응을 나타내어 70%가 β -용혈성 연쇄구균에 감염되어 있는 것으로 나타났다.

Table 5. Detection of β -haemolytic *Streptococcus* sp. from tilapia cultured in Nat. Fish. Univ. Pusan, Dept. Fish Pathol.

Fish No.	Immunoperoxidase method
1	+
2	+
3	+
4	+
5	+
6	+
7	-
8	-
9	+
10	+
11	+
12	-
13	-
14	-
15	+
16	-
17	+
18	+
19	+
20	+
Total	70%

考 察

양식어류의 세균성 질병의 신속한 진단을 위한 면역효소항체법의 유용성 여부에 대하여 많은 보고가 있다(Cipriano등, 1985a ; Sakai등, 1986, 1987a, 1987b). 본 연구에서 사용된 면역효소항체법은 10^3 CFU/ml 농도까지 검출가능하여, 그 민감도에 있어 CIE에 비해

10^2 배, 이중면역확산법에 비해 10^4 배 정도 검출민감도가 뛰어난 것으로 나타났다. 이 결과는 여타의 보고와 일치한다. 예컨대, Cipriano등(1985b)은 BIO-RAD사 제품의 PAP kit를 사용하여 *Vibrio anguillarum* 항원을 검출한 결과 간접형광항체법에 비해 10^2 배나 검출이 민감한 10^2 cells/ml의 농도까지 검출이 가능한 것으로 보고한 바 있으며, Sakai등(1986)은 면역효소항체법의 변형방법인 nitrocellulose막을 이용한 peroxidase-anti-peroxidase(PAP) 방법으로 *Aeromonas salmonicida*를 검출시험한 결과 3×10^3 cells/ml의 농도까지 검출되어 라텍스응집반응(3×10^7 cells/ml)에 비해 10배가 민감한 것으로 보고한 바 있다. 또한 Sakai등(1987b)은 BKD의 원인균인 *Renibacterium salmoninarum*의 검출실험에서 PAP방법은 간접형광항체법에 비해 100배, CIE에 비해 10배 정도 검출 민감도가 뛰어나며, cellulose acetate막을 항원의 solid phase로 사용함으로써 현장사용이 용이하며, 자연감염어 중에서도 검출이 가능하다는 것을 보고한 바 있다. 그러나 PAP 방법은 간접형광항체법(Bullock등, 1980)이나 상호응집반응시험(Kimura등, 1981)에 비해 조작이 다소 복잡하며, 시간이 걸린다는 결점이 있다. 따라서 본 연구에서 실시한 millipore막을 solid phase로 사용한 면역효소항체법은 PAP방법에 비해 민감도는 다소 낮으나 조작이 간편하며, 시간이 단축되므로 경제적 잇점을 지니고 있어 산업에의 직접 이용이 가능하리라 사료된다.

Dixon등(1984)은 숙주조직세포내의 rhabdovirus를 ELISA로 직접 검출하여 이종바이러스간의 교차반응을 통해 항원연관성의 유무를 결정된 바 있다. 본 연구의 시험항혈청과 여타 어류병원균과의 교차반응시험 결과 음성반응을 나타낸 것은 시험항원과의 항원연관성이 없음을 나타내고 있다. 따라서 현장에서 연쇄구균증을 진단할 경우 특이항혈청을 사용함으로써 면역효소항체법에 의해 신속정확하게 진단이 가능할 것으로 사료된다.

양식어류의 세균성 질병의 신속진단을 위하여 여러 가지 면역혈청학적 방법을 현장에서 직접 사용함으로써 높은 검출민감도를 나타낸 많은 보고가 있다. 예컨대, Sakai등(1987b)은 PAP방법을 현장에서 검출 시험한 결과 94.7%, 간접형광항체법은 84%, 상호응집반응은 84%의 검출 효과를 보고한 바 있으며, Cip-

riano등(1985)은 "dot blot method"가 70%, 세균배양법이 50%, 간접형광항체법이 28.6%의 검출민감도를 보고하였다. 본 연구에서 사용된 면역효소항체법은 70%의 검출효과를 나타내어 Kawahara등(1986)이 형광항체법을 이용하여 연쇄구균을 검출한 결과 25%의 검출효과를 나타낸 것에 비해 매우 높은 검출의 효과가 있음을 보여 주었으며, 이는 여타의 면역효소항체법에 비해 거의 동일한 검출효과가 있는 것으로 사료된다.

이상의 결과를 통하여 면역효소항체법은 검출민감도가 매우 뛰어나 감염초기에 신속하게 원인균의 진단이 가능할 것으로 사료된다. 아울러 특별한 장비가 필요하지 않고, 결과를 육안으로 직접 식별할 수 있기 때문에 현장에서의 사용이 용이할 것으로 사료된다.

국 문 요 지

양식어류의 세균성 질병의 신속한 진단을 위하여 텔라피아(*O. niloticus*)로부터 분리된 β 용혈성 연쇄구균인 *Streptococcus* sp. KST-2균주를 사용하여 면역효소법으로 검출실험을 하였으며, 면역효소법의 현장사용의 용이함과 검출의 민감도를 알아보기 위하여 counterimmunoelectrophoresis(CIE), 및 이중면역확산법 등과 비교하여 보았다.

다른 어류 병원균과의 교차반응 결과 교차반응이 전혀 일어나지 않는 것으로 보아 이 방법은 β 용혈성 연쇄구균(KST-2균주)에 매우 특이적임을 알 수 있었다. 연쇄구균의 검출실험한 결과 면역효소법은 1×10^5 CFU/ml의 농도까지 검출가능하였으며, 검출의 민감성이 CIE에 비해 10^2 배, 이중면역확산법에 비해 10^4 배나 높은 것으로 나타났다. 면역효소법은 이번 연구에서 사용된 진단법 중에서 현장사용이 가장 용이하며, 민감성이 가장 뛰어난 것으로 나타났다.

Reference

- Bullock, G. L. and H. M. Stuckey(1975) : Fluorescent antibody identification and detection of the *Renibacterium* causing kidney disease of salmonids. J. Fish. Res. Board Can. 32,2224-2227.
- Bullock, G.L., B.R. Griffin and H.M. Stuckey(1980) : Detection of *Renibacterium salmoninarum* by direct fluorescent antibody test. J. Fish Res. Board Can. 37,719-721.
- Chen, P. K., G. L. Bullock, H. M. Stuckey, and A. C. Bullock(1974) : Serological diagnosis of Renibacterial kidney disease of salmonids. J. Fish. Res. Board Can. 31,1939-1940.
- Chun, S. K. (1988) : Detection and control of bacterial diseases of cultured fishes in Korea. Bul. Kor. Soc. Fish Pathol. 1, 5-30.
- Cipriano R. C., J. B. Pyle, C. E. Staker and S. W. Pyle(1985b) : Detection of *Vibrio anguillarum* antigen by the dot blot assay. J. Wildlife Dis. 21,211-218.
- Cipriano, R. C., C. E. Starliper and H. M. Schancthe (1985a) : Comparative sensitivities of diagnosis procedures to detect bacterial kidney disease in salmonid fishes. J. Wildlife Dis. 21,144-148.
- Dixon, P. F. and B. J. Hill(1983) : Rapid detection of infectious pancreatic necrosis virus(IPNV) by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). J. Gen. Virol. 64,321-330.
- Dixon, P.F. and B.J. Hill(1984) : Rapid detection of fish rabdoviruses by the enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). Aquaculture 42,1-12.
- Getchell, R. G., J. S. Rohovec, and J. L. Fryer(1985) : Comparison of *Renibacterium salmoninarum* isolates by antigenic analysis. Fish Pathol. 20(2/3),149-159.
- Hames, B. D. and Rickwood(1981) : Gel electrophoresis of proteins(a practical approach). IRL Press Ltd, Oxford, pp1-248.
- Hawkers R., E. Niday and J. Gordon(1982) : A dot immunobinding assay for monoclonal and other antibody. Annal Biochem. 119, 142-147.
- Huh, G. J. and H. Wakabayashi(1987) : Detection of *Flavobacterium* sp., a pathogen of bacterial gill disease, using indirect fluorescent antibody technique. Fish Pathol. 22(4), 215-220.

- Johnstone, A. and R. Thorpe(1982) : Immunochemistry in practice. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp1-277.
- Kimura, T. and M. Yoshimizu(1981) : Rapid method for detection of bacterial kidney disease of salmonid protein A containing Staphylococci. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 47, 1173-1183.
- Kitao, T and M. Yoshimizu (1983) : Coagglutination test with antibody-sensitized Staphylococci for rapid and simple serological diagnosis of fish furunculosis. Fish Pathol., 17(4), 259-262.
- Kitao, T., T. Aoki and R. Sakoh(1981) : Epizootic causing by B-Haemolytic Streptococcus Species in cultured fresh water fish. Fish Pathol. 15(3/4), 301-307.
- Laidler, L.A.(1980) : Detection and identification of bacterial kidney disease(BKD) organism by the indirect fluorescent antibody technique. J. Fish Dis. 3,67-69.
- McCarthy, D. H. (1975) : Detection of *Aeromonas salmonicida* antigen in diseased fish tissue. J. Gen. Microbiol., 88,384-386.
- Nakamura, R. M., W. R. Dito and E. S. Tucker III (1979) : Immunoassays in the clinical laboratory. Alan R. Liss, Inc., New York, pp1-147.
- Sakai, M., N. Amaaki, S. Atsuta and M. Kobayashi (1987a) : Comparative sensitivities of several dot blot methods used to detect bacterial kidney diseases. J. Fish Dis. 10,229-231.
- Sakai, M., T. Ishii, S. Atsuta and M. Kobayashi(1986) : Detection of *Aeromonas salmonicida* antigen by Enzyme immuno assay using nitrocellulose membrane. Fish Pathol. 21(2),131-132.
- Sakai, M., G. Koyama and S. Azsuta(1987b) : Detection of *Renibacterium salmoninarum* by a modified peroxidase-antiperoxidase(PAP) procedure. Fish Pathology 22(1),1-5.