

연쇄상구균의 표현형적 특성과 RAPD profiles 비교

송진경 · 김종훈 · 김은희[†]

여수대학교 수산생명의학과

Comparison of RAPD Profiles and Phenotypical Characters of Streptococcal Strains

Jin-Kyung Song, Jong-Hun Kim and Eunheui Kim[†]

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

Streptococcal infection is one of the most serious disease of cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea and caused by more than one species. However, there has been considerable confusions about the taxonomic position of the fish pathogenic streptococci. In this study, We performed the randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) pattern analysis to evaluate the possible classification in 8 streptococci isolated from diseased olive flounder and reference strains based on their DNA structure. RAPD PCR with DNA solution prepared by simple boiling and 10-mer random primer was appeared to be a good tool for discrimination of different streptococcal strains. Phenotypical characters by simple biological test and API 20 Strep corresponded well to the specific profiles of RAPD in streptococcal isolates of this study. Therefore, the RAPD profile was considered as one of differential characters to discriminate the streptococcal isolates from diseased olive flounder.

Key words : Streptococci, RAPD profile, Olive flounder, Random primer, Characterization.

어류 병원성 연쇄구균은 단일감염뿐 아니라, 다른 세균과의 혼합감염으로 양식어류에 큰 피해를 주고있다 (Lee *et al.*, 1995 ; Oh *et al.*, 1998). 어류의 연쇄구균증 (Streptococcosis)은 여러 종의 연쇄상구균에 의하여 발생하는 질병을 통칭하는 이름으로 25종 이상의 어류에서 발병하며, *Streptococcus difficilis*, *S. agalactiae*, *S. iniae*, *S. parauberis*, *S. equi*, *S. equisimilis*, *S. faecium*, *S. pyogenes*, *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*, *Lactococcus garvieae* (= *E. seriolicida*), *L. lactis* 등이 본 질병에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Austin and Austin, 1999). 이는 어종 및 지역에 따라, 질병에 관여하는 연쇄상구균의 종류가 다르기 때문인 것으로 보고 있지만, 연쇄상구균 균을 구성하고 있는 종 조성이 다양

할 뿐 아니라, 표준화된 분류 방법이 없다는 것도 이러한 다양성의 한 원인이 되었을 것으로 추정된다. 일본의 방어에서 분리되어 *Streptococcus* sp. (Kusuda *et al.*, 1976)로 발표되었던 연쇄상구균을 *E. seriolicida* (Kusuda *et al.*, 1991)로 명명하였다가, 다시 *L. garvieae* (Eldar *et al.*, 1996)로 명명하는 등 분류에 어려움이 있었는데, 우리 나라에서도 양식산 어류의 연쇄구균증 원인균을 통상 *Streptococcus* sp.라하고 있지만 (Lee *et al.*, 1995 ; Oh *et al.*, 1998), 다양한 연쇄상구균이 관여하고 있을 것으로 보인다. Lee *et al.* (2001)은 생화학적 성상 및 혈청학적 특징과 *L. garvieae*에 대한 특이 primer를 이용하여 PCR을 실시한 결과에 근거하여 우리 나라 해산어류에서 분리된 연쇄상구균들의 종 조성을 조사하

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

였다. 그 결과 35 시험균 중의 21균주가 *L. garvieae*이며, *Enterococcus* sp. 5균주, *Streptococcus* sp. 9균주로 보고하여 *L. garvieae*가 우점적임을 보고하였다.

최근에는 어류 병원성 연쇄상구균을 분류하는데 다양한 분자생물학적 연구기법들이 이용되고 있다 (Romalde *et al.*, 1999 ; Swenshon *et al.*, 1998). 그러므로 어류질병도 과거와 같이 β -haemolytic streptococcal disease (Sakai *et al.*, 1987), 또는 원인균을 *Streptococcus* sp. (Baya *et al.*, 1990)와 같이 기술하는 경우는 드물고, *S. iniae* infection (Eldar and Ghittino, 1999), 또는 turbot pathogenic *S. parauberis* (Romalde *et al.*, 1999) 등으로 기술하고 있다. 일반적으로 종 특이 primer가 개발되어 있지 않은 경우, 어류병원성 연쇄상구균을 분류하기 위하여 생화학적 특성 분석, Kit에 의한 동정, 세균 자동동정기를 이용한 분석 등을 수행하고 있으나 이들 표현형에 근거한 분류는 균의 생리 상태 및 실험 조건에 따라 상당한 결과 차이를 가져올 수 있다는 단점이 있다. *L. garvieae* (Zlotkin *et al.*, 1998)나 *S. iniae* (Berridge *et al.*, 1998)의 경우에는, 16S rRNA gene을 근거로 한 specific primer가 개발되어, 많은 연구에서 이용되고 있다. 그러나 Aoki *et al.* (2000)은 *L. garvieae*의 16S rRNA sequence가 *L. lactice*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *S. agalactiae*, *S. bovis*, *S. canis*, *S. equi*의 sequence와 90%이상의 상동성을 보이므로 특정 primer를 이용한 PCR에 의하여 *L. garvieae*만 특이적으로 구분해내는데 어려움이 있다는 것을 지적하였다. 최근에는 세균의 전체 DNA 구조차이를 이용하는 Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis를 통하여 연쇄상구균의 종간, 또는 종내에서의 차이를 알고자하는 다양한 연구가 진행되고 있다 (Moschetti *et al.*, 2001 ; Revelo *et al.*, 2003).

본 연구에서는 random primer를 이용한 RAPD profiles을 양식넙치에서 분리되는 연쇄상구균들의 분류에 이용할 수 있는지를 알아보기 위하여

넙치병어에서 분리된 연쇄상구균의 표현형적 분류특성들과 비교하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에는 넙치 병어에서 분리된 연쇄상구균 10 균주와 참고균주로 *L. garvieae* (KG+), *Streptococcus* sp. (NG8206), *E. faecalis* (KCTC3206), *S. pyogenes* (KCTC3096)를 분양받아 사용하였다 (Table 1).

세균의 간이동정

시험균주는 모두 24~48시간 동안 호기적 조건으로 1%의 NaCl이 첨가된 BHI (Brain heart infusion) broth에서 전 배양한 후 사용하였다. Koneman *et al.* (1997)의 방법에 따라 세균의 형태학적, 생화학적 정상시험을 실시하였으며 그 결과에 근거하여 간이 동정하였다.

API 20 Strep을 이용한 동정

API 20 Strep kit를 이용한 동정방법은 제조회사의 manual에 따랐으며, 4시간 배양결과와 24시간 배양결과를 APILAB identification System (APILAB Plus, V 3-3-3. bioMerieux, France) 으로 분석하였다.

DNA 시료 준비

세균의 total DNA는 BHI broth로 30°C에서 24시간 배양한 세균으로부터 alkali lysis와 boiling 방법으로 각각 준비하였다. Alkali lysis는 Ausubel *et al.* (1995)의 mini prep에 의한 DNA 조제 방법으로 실시하였다. 한편 boiling방법으로 total DNA를 준비하기 위하여 세균배양액을 9.0×10^8 cfu/ml로 조정하였다. 세균 배양액 5ml로부터 세균을 모아 3회 세척한 후, 50 μ l의 멸균증류수에 다시 부유하여 100°C에서 5분간 끓였다. 이것을 8000 rpm에서 5분간 원심분리하여

Table 1. Origin of the strains included in this study

Strain	Host	Region	Year
Streptococcal isolate			
ST9801	Flounder	Yosu	1998
ST9806	Flounder	Goheung	1998
ST9811	Flounder	Yosu	1998
ST9814	Flounder	Wando	1998
ST0001	Flounder	Cheju	2000
ST0002	Flounder	Cheju	2000
ST0101	Flounder	Yosu	2001
ST0102	Flounder	Yosu	2001
ST0103	Flounder	Cheju	2001
ST0104	Flounder	Cheju	2001
Reference strain			
<i>Enterococcus faecalis</i> (KCTC3206)	Human		
<i>Lactococcus garvieae</i> KG+	Yellowtail	Japan	
<i>Streptococcus</i> sp. NG8206	Ayu	Japan	
<i>Streptococcus pyogenes</i> (KCTC3096)	Human		

연은 상층액을 boiling DNA 시료로 이용하였다.

RAPD analysis

연쇄상구균들의 DNA 구조상의 차이를 보기 위하여 Romalde *et al.* (1999)의 방법에 따라 RAPD pattern을 분석하였다. Ready-To-Go-RAPD analysis beads와 10-mer Random primer (Amersham Biosciences, USA)를 이용하여 PCR 30 cycles (denature - 95°C, 1분 ; annealing - 35°C, 2분 ; extention - 72°C, 2분)을 실시하였다. 사용한 primer는 Primer 1 (GGTGC GGGAA), Primer 2 (GTTTCGCTCC), Primer 3 (GTAGACCCGT), Primer 4 (AAGAGCCCGT), Primer 5 (AACGCG-CAAC), Primer 6 (CCCGTCAGCA)이며 PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 나타나는 DNA band pattern을 비교하였다. DNA 분리법에 따른 RAPD profiling 상의 차이를 알아보기 위하여, alkali lysis 법과 boiling 법으로 ST9806과 ST9811 (Table 1)로부터 DNA를 분리하여 PCR

을 실시하였다. 적절한 primer를 선택하기 위하여 ST9806 DNA를 template로하고 primer 1부터 6까지 사용하여 PCR을 실시하였다. 한편 본 연구에 사용된 연쇄상구균들의 RAPD profiles은 boiling으로 준비된 DNA solution으로 primer 5를 이용하여 PCR을 실시한 후 비교하였다.

전기영동 상에서 나타나는 main band들은 필요에 따라 Dice coefficient ($Sd = [2A / (2A + B + C)] \times 100$; A, matching band 수; B and C, 서로 다른 band 수)를 계산하여 균주간 유사도를 평가하였다.

결과 및 고찰

연쇄상구균의 생물학적 분류특징

사용한 균주들은 모두 그람양성 연쇄상구균으로 운동성이 없고, catalase를 생산하지 않았다. 이들의 몇몇 분류학적 특징은 Table 2에 나타내었다. ST9801와 ST9814는 참고균주인 *S. pyogenes*와 동일한 특성을 보였으며, ST0001,

Table 2. Characterizations of streptococci by simple biological tests

Streptococcal strain	Gram stain	Production of		Growth at (on)			Esculine hydrolysis	Hemolysis
		catalase	cytochrome oxidase	pH9.6	NaCl 6.5%	10°C		
ST9801	GP	-	-	-	-	-	-	β
ST9814	GP	-	-	-	-	-	-	β
ST0001	GP	-	-	+	-	+	-	γ
ST0002	GP	-	-	+	-	+	-	γ
ST0101	GP	-	-	+	-	+	-	β
ST0102	GP	-	-	+	-	+	-	β
ST0103	GP	-	-	+	+	+	+	γ
ST0104	GP	-	-	-	+	+	+	γ
<i>Streptococcus pyogenes</i>	GP	-	-	-	-	-	-	β
<i>Streptococcus</i> sp.	GP	-	-	+	+	+	+	γ
<i>Enterococcus faecalis</i>	GP	-	-	+	+	+	+	γ
<i>Lactococcus garvieae</i>	GP	-	-	+	-	+	+	α

ST0002, ST0101, ST0102는 용혈성 이외의 특성들이 서로 같았다. ST0103은 참고 균주인 *Streptococcus* sp. 및 *E. faecalis*와 특성을 공유하였지만 ST0104는 그 특성이 부분적으로 차이를 보였다.

API 20 Strep identification system에 의한 동정

넙치 분리균주들을 API 20 Strep으로 동정한 결과를 Table 3에 제시하였다. 넙치 병어로부터 분리된 ST9801과 ST9814는 ID number (ID No.) 4161017로, 그리고 ST0104은 ID No. 4161510으로 각각 동정확률 99.5%와 93%였으며 *S. pyogenes*로 동정되었다. ST0103은 ID No. 5143710의 *E. faecalis*로, 그리고 ST0001은 ID No. 7140710의 *E. avium*으로 90%이상의 동정확률을 보였으며 ST0002는 ID No. 7042110의 *L. lactice*로 54.6%의 동정확률을 보였으나, 신뢰할 수 있는 결과는 아니었다. 한편 ST0101과 0102는 모두 ID No. 4162117로 database 내에 일치하는 균주가 없었다. ID No. 4162117은 Iida *et al.* (1991)

이 해당분류군이 없다고 보고했던 4162017이나 4162115와 많은 공통점을 가질 것으로 보였다. 참고균주인 *E. faecalis* KCTC3206는 ID No. 5143710의 *E. faecalis* (98% 확률)로, 그리고 *S. pyogenes* KCTC3096은 ID No. 0161014의 *S. pyogenes*로 (99.9% 확률) 정확하게 동정되었으므로 실험 과정상의 오차는 없는 것으로 생각되었다.

Iida *et al.* (1991)은 API 20 Strep identification system을 이용하여, 어류유래의 연쇄상구균을 동정하고자 하였다. 그러나 결과에 있어서, 다른 균종이지만 동일한 API ID number가 얻어지는 경우 뿐 아니라, 동일 균종에 대하여 5회 API test를 실시하였을 때, 실시횟수에 따라 다른 ID number가 얻어지는 경우가 나타났다. 이와같이 세균의 생화학적 특성에 의한 분류는 실험자나 실험조건 등에 의해 영향을 받는다는 것을 알 수 있다. 그러나 이들은 database 내에 해당 분류군이 없을지라도 test 횟수에 관계없이 일정한 ID number가 얻어지는 균주들은 동일 group으로 구분할 수 있다는 것을 제시한 바 있다.

Table 3. Differential characteristics of streptococcal strains obtained with API 20 Strep identification system. Results were recorded after incubation at 35° for 24 hrs

Test \ Strain	Streptococcal Isolates (ST~)								<i>Streptococcus</i>	<i>Enterococcus</i>
	9801	9814	0001	0002	0101	0102	0103	0104	<i>pyogenes</i>	<i>faecalis</i>
VP	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+
HIP	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
ESC	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
PYRA	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
α GAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β GUL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β GAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAL	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-
LAP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
RIB	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
ARA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MAN	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
SOR	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
LAC	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
TRE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RAF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AMD	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
GLYG	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
β HEM	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-
Result [†]	S1	S1	E1				E2	S2	99.9%	98%

Result[†] : S1, *S. pyogenes* (99.5%) ; S2, *S. pyogenes* (93.2%) ;
 E1, *E. avium* (98.1%) ; E2, *E. faecalis* (98%).

RAPD analysis용 DNA 분리법 및 primer 선택

Alkali lysis에 의한 total DNA 정제 방법으로 분리한 ST9806 및 ST9811 DNA와 boiling법으로 준비한 DNA를 동시에 RAPD 분석을 해 본 결과, DNA band pattern에 큰 차이를 나타내지 않았다 (Fig. 1). 이는 boiling에 의하여 편리한 방법으로 준비된 DNA solution (Lanes Ab, Bb)이라 할지라도 RAPD analysis 결과에 전혀 영향을 미치지 않는다는 것을 의미한다. 한편 Alkali lysis에 의하여 DNA를 분리하는데는 1시간 이상이 소요될 뿐 아니라, 여러 가지 시약을 사용해야 된다. 그러나 boiling으로 DNA solution을 준비하는 데는 20분 정도의 시간 소요와 시약이 거의 들지 않으므로 극히 경제적이다 할 수 있다.

RAPD profiling을 비교하기에 가장 이상적인 primer를 선택하기 위하여 boiling법으로 준비한 ST9806 DNA를 6가지 primer로 각각 반응시킨 다음, PCR 산물을 전기영동하여 band pattern을 비교하였다 (Fig. 2). Primer 1, 2, 3, 4, 6에 의해 나타나는 DNA band 수는 적거나 분명하지 않아, 여러 균주를 비교하기에 적합하지 않음을 알 수

있었으며 4개의 band를 형성한 primer 5 (Lane E)가 가장 이상적인 것으로 판단되었다. 최근 Ravelo *et al.* (2003)도 본 primer 5를 이용하여 어류 병원성 *L. garvieae*의 DNA fingerprinting이 가능하다는 것을 보고하였다.

연쇄상구균들의 RAPD patterns 비교

Primer 5를 이용하여 넓치에서 분리된 8균주와 참고균주에 대한 RAPD 분석 결과를 Fig. 3에 제시하였다. 표현형적 특성분류가 유사하거나 차이를 보이는 균주들은 RAPD profile에서도 유사하거나, 뚜렷한 차이를 보였다. ST9801과 ST9814, 그리고 ST0104의 band profiling (lanes E, F, and L)은 아주 유사하게 나타났다. 이는 생화학적 정상검사와 API 20 Strep Kit를 이용한 동정시험에서 (Table 2 and 3) 이들 세 분리 균주가 모두 *S. pyogenes*으로 동정된 것과 일치하는 결과라 할 수 있다. 그러나 이들 분리균의 main band를 중심으로 한 RAPD profile은 참고균주인 *S. pyogenes* (lane D)의 것과 상당한 차이가 있어, RAPD상의 유사도가 40%였다. Romalde *et al.*

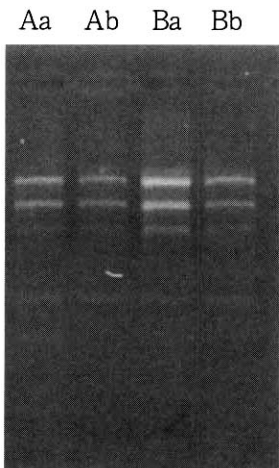


Fig. 1. Comparison of RAPD profiles obtained with DNA prepared by alkali lysis or boiling from streptococcal isolates employing primer 5.

Lanes : Aa and Ab, isolate ST9806 DNA by alkali lysis and boiling, respectively ; Ba and Bb, isolate ST9811 DNA by alkali lysis and boiling, respectively.

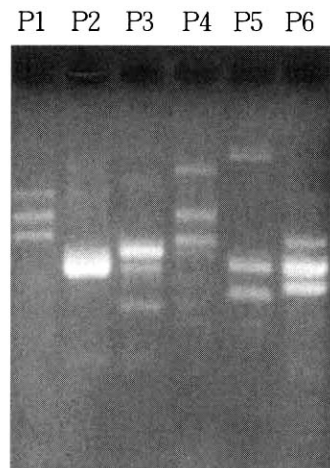


Fig. 2. RAPD patterns obtained for the streptococcal isolate ST9806 with 6 kinds of random primer, from P1 to P6.

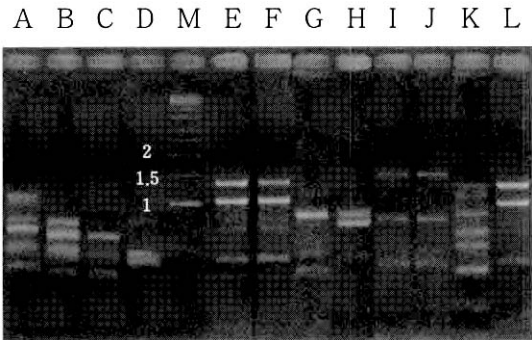


Fig. 3. RAPD patterns obtained with 8 streptococcal isolates and reference strains employing the primer 5.

Lanes : M, DNA size marker (1, 1.5 and 2 indicate kilobase); A, *Enterococcus faecalis* ; B, *Streptococcus* sp. NG8206 ; C, *Lactococcus garvieae* KG+ ; D, *S. pyogenes* ; E-L, Streptococcal isolates from diseased flounders (E, ST9801 ; F, ST9814 ; G, ST0001 ; H, ST0002 ; I, ST0101 ; J, ST0102 ; K, ST0103 ; L, ST0104).

(1999)은 turbot에서 분리된 *S. parauberis* 균주들이 ribotyping에서 90%이상의 높은 상동성을 보여 같은 ribogroup으로 분류되었다 할지라도 RAPD pattern 상에서는 유사도가 20~90%로 다양하게 나온다는 것을 보고한 바 있다. 이러한 차이가 동일 종 내에서 지역에 따라, 또는 host에 따라 서로 다른 clonal line을 형성한 것인지도 모른다고 가정하였다. 이런 가정 하에서 본다면 넙치에서 분리되는 *S. pyogenes*와 사람에서 분류되는 *S. pyogenes*가 서로 다른 clonal line을 형성한 것이라 볼 수 있다. 그러나 전통적인 생화학적, 혈청학적 방법에 의하여 분류되어있던 연쇄상구균 종들에 있어서, 분자유전학적 분류 방법으로 접근해 보았을 때 동일 종간에도 서로 상동성이 낮은 균주가 있는가 하면 다른 종임에도 높은 상동성을 보이는 경우가 나타나므로 연쇄상구균들의 재분류가 필요하다고 하였다. 그러므로 추후 표준균주를 포함하는 다양한 연쇄상구균들을 대상으로 종합적인 검토가 있어야 할 것으로 생각된다.

한편 API test에서 *E. faecalis*로 동정된 ST0001 (Lane G)은 표준균주 (Lane A)와 표현형적 차이를 보였는데 RAPD 상에서는 83% 정도

의 유사성을 보였다. 한편 같은 *Enterococcus* 속으로 분류된 ST0103 (Lane K)은 약 66.7%의 RAPD pattern 유사도를 보여 표현형적 분류결과와 잘 일치하였다. 뿐만아니라 ST0101과 ST0102도 API database로 분류가 불가능했지만 표현형적 특성과 RAPD profiles이 동일하게 나타났다. 이와 같은 결과는 RAPD profiles만으로도 연쇄상구균의 분류 및 추적이 가능하다는 것을 의미하므로 다양한 어류병원성 연쇄상구균들을 대상으로 RAPD profiles의 표준화가 필요할 것으로 보인다.

요 약

연쇄상구균증은 양식 넙치에 큰 피해를 주는 주요질병의 하나로서 다양한 종류의 연쇄상구균이 본 질병에 관여하고 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구는 10-mer random primer를 이용한 RAPD profiles을 넙치에서 분리되는 연쇄상구균의 동정에 이용할 수 있는지 알아보기 위하여 실시하였다. 넙치 병어에서 분리된 연쇄상구균 8 균주와 참고 균주들의 생물학적인 특성 분석, API 20 Strep에 의한 동정 및 RAPD analysis를 실시하여 그 결과를 비교하였다. 시험 균주들의 생물학적인 특성과 API test 결과가 동일한 균주들 (ST9801과 ST9814, 그리고 ST0101과 ST0102)은 RAPD profile도 서로 동일한 반면, 표현형적 특성에 차이가 있는 균주들은 RAPD profiles에서도 뚜렷한 차이를 보였다. 그러나 표준균주인 *Enterococcus faecalis*와 ST0103은 생물학적특성과 API test 결과가 동일하게 나타났음에도 불구하고 RAPD profiles에서 차이를 보였다. 한편 ST9801과 ST9814는 API data base에서 99.5% 확률의 *S. pyogenes*으로 동정되었으나, 표준 균주인 *S. pyogenes*과 상당히 다른 결과를 보여 연쇄상구균의 종 분류에 대한 재조명이 필요함을 보여주었다. 뿐만 아니라, 표현형적 차이에 민감한 RAPD profiles 분석에 의하여 어류병원성 연쇄상구균들의 분류가 가능할 것으로 사

료되어 다양한 어류병원성 연쇄상구균들을 대상으로 RAPD profiles의 표준화가 필요할 것으로 보인다.

감사의 말씀

이 논문은 2001년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구된 결과의 일부이며, 이에 감사드립니다. (KRF-2001-002-H00008)

참 고 문 헌

- Aoki, T., Park, C-I., Yamashita, H. and Hirono, I. : Species-specific polymerase chain reaction primers for *Lactococcus garvieae*. J. Fish Diseases, 23 : 1-6, 2000.
- 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.
- Austin, A. and Austin, D.A. : Bacterial fish pathogens, 3rd ed., Springer. London, 1999.
- Baya, A.M., Lupiani, B., Hetrick, F.M., Roberson, B.S., Lukacovic, R., May, E. and Poukish, C. : Association of *Streptococcus* sp. with fish mortalities in the Chesapeake bay and its tributaries. J. Fish Diseases, 13 : 251-253, 1990.
- Berridge, B.R., Fuller, J.D., Azavedo, J., Low, D.E., Bercovier, H. and Frelie, P.F. : Development of specific nested oligonucleotide PCR primers for the *Streptococcus iniae* 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer. J. Clin. Microbiol., 36 : 2778-2781, 1998.
- Eldar, A. and Ghittino, C. : *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* : similar, but different diseases. Dis. Aquat. Org., 36 : 227-231, 1999.
- Eldar, A., Ghittino, C., Asanta, L., Bozzetta, E., Goria, M., Prearo, M. and Bercovier, H. : *Enterococcus seriolicida* is a junior synonym of *Lactococcus garvieae*, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish. Curr. Microbiol., 32 : 85-88, 1996.
- Iida, T., Hamasaki, K. and Wakabayashi, H. : Rapid identification for fish pathogenic streptococci by Api 20 strep. Fish Pathol., 26 : 93-94, 1991. (in Japanese)
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckberger, P.C. and Winn, W.C. : The Gram positive cocci. In *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, pp. 577-649, 5th ed., Allen, A. Lippincott - Raven. Washington, 1997.
- Kusuda, R., Kawai, K., Salati, F., Banner, C.R. and Fryer, J.L. : *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. Int. J. Syst. Bacteriol., 41 : 406-409, 1991.
- Kusuda, R., Kawai, K., Toyoshima, T. and Komatsu, I. : A new pathogenic bacterium belonging to the genus *Streptococcus*, isolated from an epizootic of cultured yellowtail. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 42 : 1345-1352, 1976. (in Japanese)
- 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. (in Korean)
- Lee, S.D., Sohn, S.G. and Park, M.A. : Research on the disease of cultured flounder in the land based tank system. Bull. Nat. Fish. Res. Dev. Agency, 122 : 55-77, 1995. (in Korean)
- Moschetti, G., Blaiotta, G., Villani, F., Coppola, S. and Parente, E. : Comparison of Statistical Methods for Identification of *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis*, and

- Enterococcus faecium* from Randomly Amplified Polymorphic DNA Patterns. Appl. Environ. Microbiol., 67 : 2156-2166, 2001.
- 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. (in Korean)
- 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. Letters, 459 : 297-304, 1999.
- Sakai, M., Kubota, R., Atsuta, S. and Kobayashi, M. : Vaccination of rainbow trout *Salmo gairdneri* against β -haemolytic streptococcal disease. Nippon Suisan Gakkaishi, 53 : 1373-1376, 1987.
- Swenshon, M., Lammler, C. and Siebert, U. : Identification and molecular characterization of beta-hemolytic streptococci isolated from harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) of the north and baltic seas. J. Clin. Microbiol., 36 : 1902-1906, 1998.
- Zlotkin, A., Eldar, A., Ghittino, C. and Bercovier, H. : Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. J. Clin. Microbiol., 36 : 983-985, 1998.

Manuscript Received : February 2, 2003

Revision Accepted : April 1, 2003

Responsible Editorial Member : Sang-Hoon Choi
(Kunsan Univ.)