

Arowana(*Scleropages formosus*)에서 Hemolysin Gene을 지닌 *Aeromonas sobria* 분리 및 특성

전진우 · 김지형 · 카시아노 허모피아 · 데니스 고메즈 · 신상필 · 한지은 · 박세창¹
서울대학교 수의과대학 수생동물질병학연구실, BK21 수의과학 (연구인력양성) 사업단

(게재승인 : 2009년 12월 09일)

Isolation of *Aeromonas sobria* Containing Hemolysin Gene from Arowana (*Scleropages formosus*)

Jin-Woo Jun, Ji-Hyung Kim, Casiano Choresca Jr., Dennis K. Gomez, Sang-Phil Shin, Jee-Eun Han and Se-Chang Park¹

Laboratory of Aquatic Animal Medicine and BK 21 Program for Veterinary Science, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract : Arowana (*Scleropages formosus*) is the most valuable group of ornamental fishes and very much in demand in the ornamental fish trade and commands high price ranging from hundreds to thousands of dollars per fish. In this paper, we described a case of mortality of arowana from a private aquarium in Korea. A bacterial pathogen from fish organs (brain, kidney, liver) was cultured, identified and confirmed using Vitek System 2, API 20E test, multiplex PCR and 16S rRNA gene sequencing. The morphological and biochemical properties of the bacterium isolated from the brain, kidney and liver of the fish were similar to *Aeromonas sobria*. Positive amplification products using the multiplex PCR assay for detection of *A. sobria* were obtained from these organs. The 16S rRNA gene of the isolates from fish was identical and exhibited 100% sequence similarity with *A. sobria* (AY987762.1) strain available from GenBank. This bacterium contained hemolysin gene, a virulence factor that plays an important role in outbreaks of disease and is pathogenic to humans as well as in fish. Although this opportunistic bacterium was isolated from a fish without any external symptoms, this pathogen may act as a reservoir and enhance chances of zoonosis to human such as during handling.

Key words : Arowana, *Aeromonas sobria*, hemolysin gene.

서 론

Genus *Aeromonas*는 Aeromonadaceae과에 속하는 세균으로서, 수중환경에 자연적으로 존재하는 환경 미생물이다(2,4,10). *Aeromonas sobria* (*Aeromonas veronii* bv. *sobria*)는 그람 음성 세균이며, virulence factors로 hemolysin, proteases, elastase, lipases, DNases을 가지고 있고, 어류와 인간을 비롯한 여러 종에서 질병을 유발하는 것으로 보고되어 있다(2,7,15-18).

Arowana (*Scleropages formosus*)는 Osteoglossidae과에 속하는 육식성 원시 어류로서, 동남아시아에 주로 서식하며, 성체의 경우 무게가 7kg 이상, 체장이 1m 이상에 달하는 대형 어종이다(1,5,8). 멸종위기 종 국제 거래협약(CITES; The Convention of International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora)에서 이 종을 멸종 위기 종으로

지정하였으며, 싱가포르를 비롯한 몇몇 국가에서 이 종의 인공 사육이 이뤄지고 있으나, 자연으로부터의 불법 포획 및 불법 거래가 여전히 이루어지고 있다(6,11,13,14). 이 종은 우리나라에 상당수 수입되어 관상어로 사육되고 있으며, 국내에서 고가에 거래되는 최고급 관상어이다.

본 연구에서는 arowana로부터 인수공통의 잠재적 위험성을 지닌 *A. sobria* containing hemolysin gene의 분리를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

육안 소견 및 질병 원인체의 분리 동정

2009년 4월 서울 소재 수족관에서 2~3일간 무기력함을 보이다가 폐사한 arowana(체장 42.5 cm 체중 736.6 g)를 부검하였다. 10 마리의 arowana가 같은 수조에서 사육되었고 폐사한 개체를 제외한 다른 모든 개체들은 건강한 상태를 유지하였다. 폐사어는 외부 소견에서는 특이 증상이 없었으나,

¹Corresponding author.
E-mail : parksec@snu.ac.kr

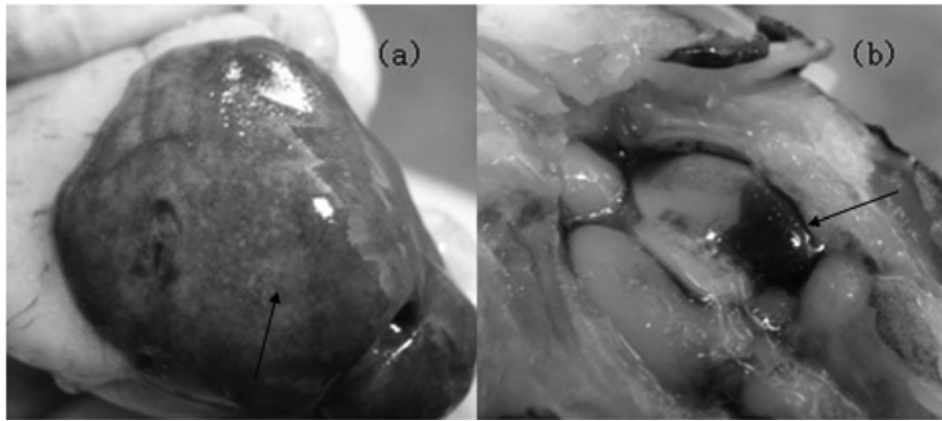


Fig 1. Postmortem examination of two organs from arowana. Discoloration of the liver (a). Hemorrhage on the brain (b).

내부 소견에서는 간에서 병변이 발견되었고 뇌에서도 출혈 소견이 발견되었다(Fig 1).

우선적으로 어류의 환경학적 폐사 유발 요인을 알아내기 위해서 사육수의 용존산소량, 수온, 수소이온농도, 수중 암모니아 농도를 검사하였고, 다음으로 폐사어의 아가미와 피부에서 곰팡이와 기생충 감염 여부를 검사하였다. 간의 병변 부위와 뇌의 출혈 부분에서 세균을 sterile swap 하여 tryptic soy agar (TSA) (Difco, USA)에서 25°C에서 24 시간 동안 배양하여 한 종류의 순수 단독 콜로니가 배양되었고, 그 단독 콜로니를 순수 분리하였다. 분리된 균을 형태학적 분류를 하고, 생화학적 분석을 위하여 Vitek System 2 (BioMérieux, France) test와 API 20E test (BioMérieux, France)를 수행하였다.

Multiplex-PCR 및 염기서열분석

A. sobria hemolysin gene *asaI*을 검출하기 위한 PCR 은 Wang 등의 방법(7)에 따라 수행하였다. PCR 반응 조건은 95°C에서 5분간 initial denaturation 시킨 다음, denaturation 95°C/30초, annealing 59°C/30초 그리고 extension 72°C/30초간 3단계로 50 cycle을 수행한 후, final extension은 72°C에서 7분간 수행하였다. 본 multiplex PCR에서는 ASA1 (*A. sobria* hemolysin gene *asaI*, 249 bp), AHH 1 (*A. hydrophila* extracellular hemolysin gene *ahhI*, 130 bp), AH-aerA (*A. hydrophila* aerolysin gene *aerA*, 309 bp), 총 3가지의 primer를 사용하였다.

염기서열분석에는 세균의 16S rRNA gene을 검출할 수 있는 universal primer인 518 F와 800 R을 사용하여 PCR을 수행한 후 얻어진 amplicon을 사용하였다. DNA isolation과 purification은 DNeasy Tissue Kit (QIAGEN, Germany)을 사용하였다. Sequencing 반응은 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 진행하였다. PCR 반응은 PTC-225 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, USA)를 사용하였다. 반응이 끝난 후, ethanol을 이용하여 반응에 참여하지 않은 dNTP와 반응물을 분리해 내고, 정제된 PCR product는 3차 증류수에 다시 녹여 ABI PRISM 3730XL Analyzer에서 분석을 하였다. 분

Table 1. Antimicrobial susceptibility test of *Aeromonas sobria* isolated from arowana

Antibiotics(μg)	Isolated strain
Amikacin (30)	S ^a
Amoxicillin/clavulanic acid (30)	S
Ampicillin (10)	R ^a
Carbenicillin (100)	R
Cefepime (30)	S
Cefixime (5)	S
Cefoperazone (75)	S
Cefotaxime (30)	S
Chloramphenicol (30)	S
Ciprofloxacin (5)	S
Colistin (10)	R
Enrofloxacin (5)	S
Gentamicin (10)	S
Kanamycin (30)	S
Nalidixic acid (30)	R
Neomycin (30)	S
Nitrofurantoin (300)	S
Norfloxacin (10)	S
Ofloxacin (5)	S
Oxytetracycline (30)	S
Polymyxin B(300IU)	R
Tetracycline (30)	S
Tobramycin (10)	S
Trimethoprim (5)	S
Trimethoprim/Sulfamethoxazole (1.25/23.75)	S

^aThe category 'S' means sensitive to antibiotic; 'R' means resistant. Each category was decided by zone diameter interpretive standards (13).

석을 통해 얻은 rRNA sequence를 GenBank database와 비교하여 sequence의 유사성을 조사하였다.

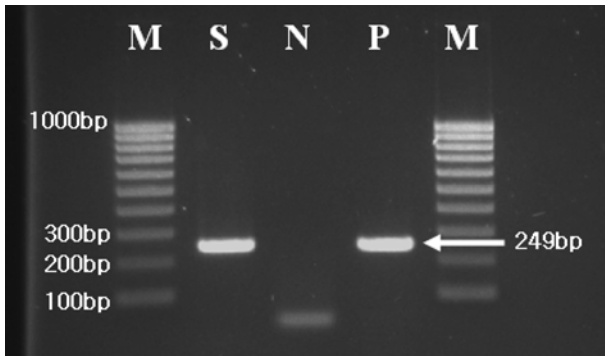


Fig 2. Representative amplification products obtained using the multiplex PCR assay for detection of *Aeromonas sobria* hemolysin gene *asa1* in arowana. In this multiplex PCR, 3 primers were used for detection *ahh1* (*A. hydrophila* extracellular hemolysin gene), *aerA* (*A. hydrophila* aerolysin gene) and *asa1* (*A. sobria* hemolysin gene). Lanes M, 100-bp DNA ladder; lane S, positive for *A. sobria* (249 bp); lane N, negative control; lane P, positive control (*A. sobria* ATCC 9071, 249 bp).

항생제 감수성 검사

분리된 세균의 항생제 감수성 검사는 antibiotic disc diffusion method를 사용하여 검사하였다(3). 항생제 감수성 검사 결과는 Table 1과 같다. 분리 세균의 항생제에 대한 감수성 여부에 있어서의 기준은 'Zone Diameter Interpretive Standards' 준수하였다(12). 사용한 antibiotic discs (BBL, USA)로는 amikacin, amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin, carbenicillin, cefepime, cefixime, cefoperazone, cefotaxime, chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, enrofloxacin, gentamicin, kanamycin, nalidixic acid, neomycin, nitrofurantoin, norfloxacin, ofloxacin, oxytetracycline, polymyxin B, tetracycline, tobramycin, trimethoprim, trimethoprim/sulfamethoxazole

이었다.

결 과

균 분리 및 생화학 시험 결과

사육수의 용존산소량, 수온, 수소이온농도, 수중 암모니아 농도는 정상 범위였으며 곰팡이와 기생충은 발견되지 않았고 내부 장기에서 순수 분리된 콜로니를 통해 폐사의 주원인은 세균성 질병으로 사료되었다. 신장, 간과 뇌로부터 분리된 세균은 그람 음성으로 콜로니의 직경은 2 mm였으며, 혈액 배지에서 β -용혈(β -hemolysis)의 성상을 나타내었으며, 25°C와 36°C에서 배양되었다. 순수 분리된 세균으로 CFU를 측정 한 결과, 6.0×10^9 CFU/ml (absorbance dose, 600 nm)로 측정되었다. Vitek System 2 결과와 API 20E test 결과를 Bergey's manual에 따라서 *A. sobria* type strain인 ATCC 43979와 비교하여 *A. sobria*로 판정되었다(9).

Multiplex-PCR 및 염기서열분석

PCR 검사를 통하여 *A. sobria* hemolysin gene *asa1* (249 bp)에 해당하는 band를 확인하였고, 분리된 세균은 *A. sobria*로 확인하였다(Fig 2). 또 이 세균의 16S rRNA sequence 분석을 통하여 *A. sobria* strain (GenBank accession no. AY987762.1)과 100% 일치하는 결과를 얻었다(Fig 3).

항생제 감수성

분리된 *A. sobria*의 항생제 감수성 검사 결과는 Table 1과 같다. 이 세균은 penicillin, polymyxin, quinolone 계열 항생제에 내성을 나타내었으나, aminoglycoside, cephalosporin, fluoroquinolone, tetracycline 계열 항생제에 감수성을 나타내었다.

AY987762.1	553	AGC	GCA	CGC	AGG	CGG	TTG	GAT	AAG	TTA	GAT	GTG	AAA	GCC	CCG	GGC	TCA	ACC	TGG	GAA	TTG	612
Aro	553	612
AY987762.1	613	CAT	TTA	AAA	CTG	TCC	AGC	TAG	AGT	CTT	GTA	GAG	GGG	GGT	AGA	ATT	CCA	GGT	GTA	CGC	GTG	672
Aro	613	672
AY987762.1	673	AAA	TGC	GTA	GAG	ATC	TGG	AGG	AAT	ACC	GGT	GGC	GAA	GGC	GGC	CCC	CTG	GAC	AAA	GAC	TGA	732
Aro	673	732
AY987762.1	733	CGC	TCA	GGT	GCG	AAA	GCG	TGG	GGA	GCA	AAC	AGG	ATT	AGA	TAC	CCT	GGT	AGT	CCA	CGC	CGT	792
Aro	733	792
AY987762.1	793	AAA	CGA	TGT	CGA	TTT	GGA	GGC	TGT	GTC	CTT	GAG	ACG	TGG	CIT	CCG	GAG	CTA	ACG	CGT	TAA	852
Aro	793	852
AY987762.1	853	ATC	GAC	CGC	CTG	GGG	AGT	ACG	GCC	GCA	AGG	TTA	AAA	CTC	AAA	TGA	ATT	GAC	GGG	GGC	CCG	912
Aro	853	912
AY987762.1	913	CAC	AAG	CGG	TGG	AGC	ATG	TGG	TTT	AAT	TGG	ATG	CAA	CGC	GAA	GAA	CCT	TAC	CTG	GCC	TTG	972
Aro	913	972
AY987762.1	973	ACA	TGT	CTG	GAA	TCC	TGC	AGA	GAT	GCG	GGA	GTG	CCT	TCG	GGA	ATC	AGA	ACA	CAG	GTG	CTG	1032
Aro	973	1032
AY987762.1	1033	CAT	GGC	TGT	CGT	CAG	CTC	GTG	TGG	TGA	GAT	GTT	GGG	TTA	AGT	CCC	GCA	ACG	AGC	GCA	ACC	1092
Aro	1033	1092
AY987762.1	1093	CCT	GTC	CTT	TGT	TGC	CAG	CAC	GTA	ATG	GTG	GGA	ACT	CAA	1131							
Aro	1093	1131							

Fig 3. The alignment of the 16S rRNA sequence of *A. sobria* was obtained through analysis of the bacteria isolated from the liver of arowana (Aro). GenBank accession number for the sequence used: *A. sobria* (AY987762.1). The 16S rRNA gene of *A. sobria* from arowana was identical and exhibited 100% sequence similarity with *A. sobria* in GenBank (accession No. AY987762.1).

고 찰

일반적으로 *A. sobria*에 감염된 어류에서는 외부 소견으로는 복부 팽만, 안구 돌출, 지느러미의 기부와 피부에서 점상 출혈을 관찰할 수 있고 내부 소견으로는 복수, 간 비대, 장관의 팽창과 장관 내부에 액체가 저류된 소견을 관찰할 수 있다. Wahli 등(19)이 발표한 논문에서는 *A. sobria*에 감염되어 폐사한 perch (*Perca fluviatilis*)에 대하여 보고하였는데, 지느러미와 피부에서의 전형적인 출혈 소견을 관찰할 수 있었다. 이와 다르게 본 연구에서 arowana는 외부 소견에서 아무런 증상을 발견할 수가 없었다. 외관상 무증상인 개체에서 이 세균이 분리되었으므로 실제 유통되고 있는 외관상 무증상인 관상어들이 이 세균에 감염되어 있을 수 있다는 가능성을 배제할 수 없다.

*A. sobria*는 hemolysin, proteases, elastase, lipases, DNases 등의 virulence factors를 가지고 있으나 본 연구에서는 Multiplex-PCR을 사용하여 그 중 하나인 hemolysin gene을 확인하였으며 이와 같은 gene을 지니는 *A. sobria*는 수생동물에서 출혈성 패혈증을 일으킬 뿐만 아니라 면역성이 저하된 사람에게서 급성 설사 질병을 유발하는 것으로 보고되어 있다(7).

이 세균은 수중 환경에 자연적으로 존재할 정도로 흔한 세균이지만, 인간에게도 감염된다는 점에서 중요한 세균이라고 할 수 있다. 이 세균이 어류에서 인간으로 직접적으로 전염된 사례는 아직 보고되어 있지 않지만, 이 세균이 어류와 인간 모두에게 병원성이 있다는 점에서, 인간이 어류로부터 직접 감염될 가능성을 배제할 수 없다. 또, 최근 관상어의 인기가 높아짐에 따라, 관상어를 사육하는 수족관이 증가하고 있어 사육과정 중 어류를 다루거나 수조 세척 과정 중에 사육사들이 이 세균에 노출될 가능성이 높다. 본 연구에서 항생제 감수성 검사 결과 *A. sobria*는 aminoglycoside, cephalosporin, fluoroquinolone, tetracycline 과 같은 항생제에는 민감성을 나타내고 있으므로, 사육 중인 관상어가 이 세균을 보균하고 있음을 발견하였을 때 인간에게 전파되기 전에 미리 감수성을 지닌 항생제를 사용하여 치료하는 것이 요구된다.

감사의 글

본 논문은 학술진흥재단 중점연구소(KRF-2006-005-J502901)와 서울대학교 수의과학연구소 지원으로 이루어 졌습니다.

참 고 문 헌

1. Alfred ER. The fresh-water food fishes of Malaya. *Scleropages formosus* (Muller and Schlegel). *Fed Malay St Mus J* 1964; 9: 80-83.
2. Austin B, Altwegg M, Gosling PJ, Joseph SW. Fish pathogens. In: The genus *Aeromonas*. San Francisco: John

- Wiley & Sons Co. 1996: 198-281.
3. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Truck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; 45: 493-496.
4. Borrell N, Figueras MJ, Guarro J. Phenotypic identification of *Aeromonas* genomospecies from clinical and environmental sources. *Can J Microbiol* 1998; 40: 103-108.
5. Dawes J, Lim LL, Cheong L. CITES and the Dragon Fish. In: *The Dragon Fish*. England: Kingdom Books. 1999: 34-41.
6. Fernando AA, Lim LC, Jeyaseelan K, Teng SW, Liang MC, Yeo CK. DNA fingerprinting: application to conservation of the CITES-listed dragon fish; *Scleropages formosus* (Osteoglossidae). *Aquar Sci Conserv* 1997; 1: 91-104.
7. Wang G, Clark CG, Liu C, Pucknell C, Munro CK, Kruk TMAC, Caldeira R, Woodward DL, Rodgers FG. Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1048-1054.
8. Greenwood PH, Rosen DE, Weitzman SH, Myers GS. Phyletic studies of teleostean fishes, with a provisional classification of living form. *Bull Amer Mus Nat Hist* 1996; 131: 338-456.
9. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. Facultatively anaerobic gram-negative rods. In: *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins Co. 1994: 177-204.
10. Janda JM, Abbott SL. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 332-344.
11. Joseph J, Evans D, Broad S. International trade in Asian Bonytongues. *Traffic Bull* 1983; 7: 73-76.
12. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 3rd ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Co. 1988: 489-491.
13. Kottelat M, Whitten AJ. Freshwater biodiversity in Asia with special reference to fish. Washington DC: World Bank-Technical Papers. 1996: 58-59.
14. Ng PKL, Tan HH. Freshwater fishes of Southeast Asia: potential for the aquarium fish trade and conservation issues. *Aquar Sci Conserv* 1997; 1: 79-90.
15. Pemberton JM, Kidd SP, Schmidt R. Secreted enzymes of *Aeromonas*. *FEMS Microbiol Lett* 1997; 152: 1-10.
16. Santos JA, Gonzalez CJ, Otero A, Garcia-Lopez ML. Hemolytic activity and siderophore production in different *Aeromonas* species isolated from fish. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 5612-5614.
17. Soler L, Figueras MJ, Chacon MR, Vila J, Marco F, Martinez-Murcia AJ, Guarro J. Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffii* recovered from freshwater and seawater. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; 32: 243-247.
18. Kita-Tsukamoto K, Oyaizu H, Nanba K, Simidu U. Phylogenetic relationships of marine bacteria, mainly members of the family Vibrionaceae, determined on the basis of 16S rRNA sequences. *Int J Syst Bacteriol* 1993; 43: 8-19.
19. Wahli T, Burr SE, Pugovkin D, Mueller O, Frey J. *Aeromonas sobria*, a causative agent of disease in farmed perch, *Perca fluviatilis* L. *J Fish Dis* 2005; 28: 141-150.