< Case Report >

인공사육장에서 패혈증으로 집단폐사한 북방산개구리의 증례 보고

정여진¹ · 김종택^{1*} · 서국현²

강원대학교 수의과대학¹, 전남대학교 수의과대학²

Case Report: Mass death of frogs (*Rana dybowskii*) caused by septicemia in artificial raising farm

Yeo-Jin Jeong¹, Jong-Taek Kim^{1*}, Guk-Hyun Suh²

¹College of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

²College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

(Received 3 September 2014; revised 18 September 2014; accepted 24 September 2014)

Abstract

Frog culture industry is not yet familiar but has much potential. Generally, in farm, the population density is higher than that of in nature and frog farm is not the exception. But when population density is high, it can easily leads to stressful condition, poor sanitation. When a disease occur, it is a primary factor that makes the population more susceptible and the results more grave. Because of severe Rhabditoidea- helminth infection and subsequent bacterial septicemia, 50~70% of the total population had been died in a farm in Jeong-sun in Gangwon-do and Chungju in Chungcheongbuk-do from late June, 2012 to September, 2012. Diseased frogs showed ruptured lung, bloody ascites, liver discoloration, myocardium weakness, congested kidney, microcytic anemia and so on. Enterobacteriaceae, *Citrobacter*.sp, *Cupriavidus metallidurans*, *Acinetobacter*.sp were isolated as major bacterium that had caused septicemia in frogs. Among isolated bacterium, *Cupriavidus metallidurans*, *Ewingella americana*, *Shewanella aquimarina* and *Pseudoalteromonas* sp. have not reported as potential pathogens in frogs before. It is a good example that severe helminth infection in frogs can lead to secondary infection of bacteria.

Key words : Frog, Bacterial septicemia, Helminth, *Cupriavidus metalidurans*, *Pseudoalteromonas* sp.

서 론

개구리는 양서류군(amphibian)의 무미류(anurans)에 속하며, 수십 개 종 중 일부는 식용 또는 약용 목적으로 인공사육을 하고 있다. 인공사육 환경은 자연계보다 개체 밀도가 높기 때문에, 인공사육 환경에서의 질병발생 시 전염율 및 폐사율이 높아질 가능성이 크다. 따라서 인공사육장 내 질병예방이 개체 관리를 위해서는 필수적이다. 개구리의 주요 질병으로는 부종, 피부 및 내부장기의 출혈과 피부 호흡 이상 등의 병증을 나타내는 Ranavirus 감염증 및 항아리곰팡이

병(*Chytridiomycosis*) 등이 잘 알려져 있으며(Massoni 등, 2009; Miller 등, 2011; Annis 등, 2004), 이들은 발병 시 단시간 내에 전 개체군을 폐사시킬 수 있을 정도로 치명적이다. 그 외 개구리의 주요 병원체로는 세균, 기생충 등이 있다(Densmore 등, 2007).

외국의 경우, 임상적으로 병증을 나타낸 인공사육 개구리들에서 다양한 세균이 분리 되었다는 보고가 있으며(Mauel 등, 2002; Glorioso 등, 1974; Green 등, 1999), 정상적인 개구리의 장관 내에서도 다양한 세균이 검출되고 있음이 보고되어 있다(Hird 등, 1983). 우리나라에서는 금개구리(Gold-spotted pond frog) 양식장에서 병증을 보인 개구리로부터 ranavirus가 검출되었으며(Kim 등, 2009), 항아리곰팡이병의 원인체인

*Corresponding author: Jong-Taek Kim, Tel. +82-33-250-8673,
Fax. +82-33-259-5625, E-mail. kimjt@kangwon.ac.kr

Fig. 1. Lesions of diseased frogs. (A) Pinpointed hemorrhage on lower back and decolorat spots on hip. (B) Yellowish ventral skin, hemorrhage of pectoral muscle and decomposed front foot. (C) Yellowish liver and ruptured right lung. Left lung has lost much of parenchyma. (D) Bloody ascites under egg follicle.

*Batrachochytrium dendrobatidis*가 전국적으로 널리 분포되어 있는 것으로 보고되어 있으나(정 등, 2010), 양식 개구리에 대한 세균 분포 조사나 관련 질병 발생에 대해서는 보고된 바가 없다.

본 증례에서는 최근 하절기에, 강원 정선지역과 충북 충주지역의 북방산 개구리(*Rana dybowskii*) 양식장에서 선충류의 중감염 및 속발성 패혈증으로 전 군의 50~70%가 대량 폐사한 사례를 보고하고자 한다.

증 례

증례 1

2012년 6월말부터 9월말까지 강원도 정선의 북방산개구리 인공사육장에서 총 사육 개체 10만 마 중 7만 마 이상이 폐사하였다. 6월 말 부터 9월 초까지는 30°C를 웃도는 고온 다습한 상태가 지속되었고, 사육장 내 개체밀도는 매우 높았다. 폐사 개체 수는 6월 말, 일일 100여 마리에서 8월 말에는 일일 300~400여 마리에 다다랐으며, 처음에는 2년생 개체군에서만 폐사가 발생하였으나, 8~9월 경에는 1년생 개체군에서도 폐사가 일어났다. 2년생 개체군은 휴지기 없이

동일 구획에서 계속 사육되어 왔으며, 1년생 개체는 그 해 봄, 외부에서 유입되어 2년생 과는 다른 구획에서 사육되고 있었다. 양식장 흙바닥에서는 매년 1~5 mm의 실벌레들이 있어왔으며, 그 수는 여름을 기점으로 증가와 감소를 반복해왔다. 그러나 2012년 6월에는 그 수가 전년도에 비해 매우 증가하였으며, 그 시기와 일치하여, 폐사율이 비정상적으로 증가하기 시작하였다. 사육자들은 그 시기의 폐사체 중에는 배가 부풀어 죽은 개체가 많았으며, 부검 시 폐는 실질이 소실되고 허탈되어 있었으며, 흉·복강에서 흙바닥의 벌레와 동일해 보이는 다수의 벌레들을 발견할 수 있었다고 하였다.

폐사 원인 규명을 위하여 양식장을 방문한 9월 13일 당시에는, 바닥의 실벌레는 이미 감소기에 접어들어 찾아보기 힘들었으며, 병증을 보이는 개체들은 머리를 들지 못하고, 사람이 다가가도 도망가지 않고 입을 벌리며 공격자세를 취하는 이상반응을 보였으며, 사지가 신장된 채 마비된 후 곧바로 폐사하기도 하였다. 육안적 병변으로는 배측 및 흉복측 피부의 미세 출혈반, 둔부의 탈색반(Fig. 1A), 황색으로 변색된 복부 피부, 발가락 근육 괴사와 지골의 노출(Fig. 1B), 충혈되고 오돌토돌한 서혜부, 뒷다리의 부종, 직장탈장 등이 관찰되었다.

병증을 보이는 개체 위주로 50마를 포획하여 실험실로 운반하였으며, 추가적인 감염을 방지하기 위하여 oxytetracycline 약욕을 매일 실시하였다. 부검은 빈사상태(24시간 후 7마, 72시간 후 14마)에 빠지거나, 활력이 급격히 저하된 개체 순으로 실시하였는데, 0.1% Tricaine methane sulfonate (MS-222)를 사용하여 마취 후 진행하였다. 주된 부검소견으로는 한쪽 또는 양쪽 폐의 파열, 폐실질의 소실(Fig. 1C), 근 출혈(Fig. 1B), 혈액 복수 저류(Fig. 1D), 황갈색 또는 회색 빛으로 변색된 간(Fig. 1C), 심근 쇠약 등의 소견을 보였다. 또한 소화기 장관 외벽에 출혈반이 확인된 개체도 있었다.

한편 각종 검사를 위한 시료는 부검한 50개체 중, 폐사 직후였거나 부검 시 심장박동을 확인한 35개체를 대상으로 내부장기, 척추, 뒷발물갈퀴, 서혜부 피부 및 근육조직, 발가락 그리고 혈액을 채취하였다. 부검 후 서혜부 피부를 포함한 실질장기에 대하여 조직표본을 제작한 다음 H&E 염색(Hematoxylin and eosin stain)을 실시한 후 200배율의 광학현미경으로 관찰하였다(Fig. 2). 간에서는 림프구에 의한 세포 탐식을 관찰할 수 있었고, 괴사가 진행되고 있음을 확인

Fig. 2. Histopathological pathogenic lesions of organ. (A) Permeation of lymphocytes leading to piecemeal necrosis of hepatocytes and Melano-macrophage centres (MMC). (B) Nucleus pushed away from the center in hepatocytes and vacuolated cytoplasm. (C) Hemosiderin accumulation and MMC in spleen. (D) Hyaline casts in distal convoluted tubule in kidney. (E) Severe congestion in kidney and degeneration of nephron. (F) Hemorrhage and inflammatory cells in cardiac muscle and leakage of blood into muscle. (G) Decomposed front digit and MMC. (H) MMC around the dorsal root ganglion in the spine cross section. (I) Rupture of alveolar septae, interstitial tissue almost disappeared. (J) Hyperplasia of connective tissue around vessel and MMC in lung. (K) Sick cells and inflammatory cells in vessel in the dermis of groin. (L) Thickened villi epithelium, blunted and branched villi, inflammatory cells in mucosa.

하였다(Fig. 2A, B). 비장에서도 hemosiderin 침착과 melano-macrophage centred (MMC)가 관찰되었고(Fig. 2C), 신장에서는 심한 울혈과 네프론의 괴사, 원위세뇨관의 초자양 물질(protein-like substances)이 관찰되어 amyloidosis를 확인할 수 있었다(Fig. 2D, E). 척추의 신경절 주위에서도 MMC가 관찰되었다(Fig. 2H). 폐조직은 실질이 거의 소실되었고 폐포 중격이 파열된 곳이 많았으며, 일부 폐 조직은 증생 또는 화생 소견을 보였다(Fig. 2I, J). 오돌토돌하고 충혈된 서해부의 피부 진피층 혈관에서는 겸상적혈구와 단핵구성염증세포가 관찰되었다(Fig. 2K). 소장 용모상피에서

과성장된 부분을 확인할 수 있었고, 일부 용모는 간상화(branched)되어 있었으며, 끝이 편평해지고 짧아진 모습도 관찰되었다. 용모 점막에는 염증세포가 침윤해 있었다(Fig. 2L). 심장, 간, 폐, 비장, 신장, 피부 그리고 척추단면에서 모두 다수의 MMC가 관찰되었고, 간과 폐, 비장에서도 출혈 및 울혈소견이 나타났다. 이 외에도 심근의 괴사가 일부 진행 중인 개체도 있었다.

심장에서 천자하거나 혈액 복수에서 채취한 혈액을 슬라이드에 도말하여 diff-quick 염색 한 후 관찰한 결과(Fig. 3), 적혈구가 전반적으로 정상 크기에 비해

매우 작아져 있는 개체가 많았고(Fig. 3A), 적혈구 막 파괴로 막에 공포가 보이는 적혈구가 많았다(Fig. 3B). 적혈구 대소부동증과 함께 poikilocytosis가 나타나기도 했으며(Fig. 3C), 혈액 내 hemolysin 발현으로 용혈 반응을 나타낸 개체도 있었다(Fig. 3D). 혈액 내 백혈구 수는 2개체를 제외하면 뚜렷한 증가는 나타나지 않았으며, 적혈구 내 inclusion body는 관찰되지 않았다.

폐사원인을 규명하기 위하여 부검 시 채취한 혈액

Fig. 3. Microscopic examinations on blood smears. (A) Small dimension of erythrocytes. (B) Vacuoles in erythrocyte membrane. (C) Poikilocytes. (D) Erythrocytes aggregation and hemolysis.

과 조직, 개구리의 먹이로 급여하는 귀뚜라미를 시료로 하여 의심되는 병원체의 유전자를 효소중합연쇄반응(PCR)으로 증폭하였다. 개구리에서 추출한 DNA에서는 *Ranavirus*, *Batrachochytrium dendrobatidis*, 기타 진균류, *Rhabdias* spp.를, 혈액 및 귀뚜라미에서는 세균의 존재유무를 확인하였다. 또한 혈액과 혈액성 복수를 Trypticase soy agar (TSA), *Salmonella shigella* agar (SS), Brain heart infusion agar (BHIA), Thiosulfate-Citrate-Bile-Sucrose agar (TCBS) (BD, USA) 및 면양혈액배지(Komed, 한국)에 배양하였으며, 각각의 colony는 API 20E kit (bioMérieux, France)로 동정하였다.

병원체의 유전자를 증폭하기 위하여 채취한 개구리 조직시료 및 귀뚜라미 94마리(♀ 34마리, ♂ 50마리, ♀은 2~3마리, ♂은 3~4마리를 모아 한 개의 시료로 함)는 1.5 mL sterilized tube와 bead (Watson, USA)를 사용하여 4.0 m/s의 속도로 20~40초간 분쇄하였다. 전처리 한 혈액(혈액 복수 시료 포함)과 조직 및 귀뚜라미 시료의 DNA의 추출은 Dneasy blood and tissue kit (Qiagen, USA)를 이용하여 제조사의 방법에 준하여 실시하였다. 진균류의 DNA를 추출은 추가적으로 분쇄 시료를 Diethylpyrocarbonate (DEPC)에 희석하였으며, 희석액 400 µL와 Ultra prepman (Applied biosystems, USA) 시약 80 µL를 혼합한 후 100°C에서 10분간 가열하고 상온에서 2분간 냉각시켰다. 상기 처리한 희석액은 1,300 rpm에서 3분간 원심분리 하였으며, 40 µL의 상층액에서 진균류의 DNA 추출하였다(정 등, 2010). 항응고제(K2EDTA)가 첨가된 micro tube에 채취한 혈액 및 혈액성 복수 역시 Dneasy

Table 1. PCR protocols for the amplification of major pathogens

Pathogen	Primer name	Primer sequence (5'-3')	PCR protocol	Product size (bp)
Ranavirus	M153	ATGACCGTCGCCCTCATCAC	94°C for 3 min→30 cycles at 94°C for 30', 64°C for 30', 72°C for 30'→72°C for 5 min	625
	M154	CCATCGAGCCGTTCATGATG		
<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	Bd1a	CAGTGTGCCATATGTCAC	95°C for 1min→35 cycles at 95°C for 30', 50°C for 30' 72°C for 30'→72°C for 5 min	300
	Bd2a	CATGGTTCATATCTGTCCAG		
Fungi	nu-SSU-0817-5'	TTAGCATGGAATAATRAATAGGA	35 cycles at 94°C for 1', 56°C for 10', 72°C for 30' →72°C for 2 min	422
	nu-SSU-1196-3'	TCTGGACCTGGTGAGTTTCC		
<i>Rhabdias</i> .spp	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	94°C for 2 min→30 cycles at 94°C for 30', 56°C for 30', 72°C for 2 min → 72°C for 7 min	1600
	1500R	GCTATCCTGACCCAAACTTCG		
Bacteria	Bac1	CGGCCAGACTCCTAGGGACCCAGCA	94°C for 5 min→30 cycles at 94°C for 30', 64°C for 30', 72°C for 30' → 72°C for 7 min	490
	Bac2	GCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCC

Fig. 4. Results of PCR amplification on pathogens in samples from Jeongsun. (A) Ranavirus, M: Marker (100 bp), 1-35: DNA products from sample No.1-35. (B) *Batrachochytrium dendrobatidis*, M: Marker (100 bp), 1-35: DNA products from sample No.1-35. (C) Bacteria from frog, M: Marker (100 bp), 1-16: DNA products from sample No.1-16, 17-26: DNA products from sample No.17-26, 27: DNA products from groin of sample No.26, 28-30: DNA products from sample No.27-29.

blood와 tissue kit (Qiagen, USA)을 사용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA의 농도와 순도는 Nanovue (GE Healthcare, U.K)을 이용하여 측정하였고, 추출된 DNA는 -20°C 에서 보관하여 PCR을 실시하였다.

각각의 병원체의 유전자를 증폭하기 위한 PCR의 반응 조건은 Table 1에 제시하였다. PCR 반응 동안 제공되는 primer는 한정된 양이므로, primer를 가장 많이 사용하여 중합반응을 일으킨 박테리아가 혈액 내 가장 많은 양을 차지하는 세균으로서, 의심 밴드 내에서 검출이 될 것이라는 전제 하에, Bacterial 16S rRNA를 target으로 하는 박테리아 common primer (Bac1, Bac2)를 사용하여 혈액 내 세균 유전자 증폭을 시행하였다. 또한 기타 Fungi 역시 common primer인 nu-SSU-0817-5'와 nu-SSU-1196-3'를 사용하였고(Borneman 등, 2000), *Rhadias* spp. 검출에는 ITS5, 1500R

Fig. 5. Free living larva detected from the farm soil in Jeongsun ($\times 200$).

primer를 사용하였다(Kuzmin 등, 2007). Polymerase로는 EX Taq를 사용하였는데 *Rhadias* spp. 검사에는 RR001A (Takara, Japan)를, 그 밖의 원인체에는 RR001AM (Takara, Japan)을 사용하였다. 각 원인체 검출을 위한 primer는 Bio-RP purification과정을 거친 제품을 10 pmol 농도로 사용하였고, PCR mixture의 조성은 Ex Taq 제품의 PCR 기본 조성을 따랐다. PCR은 PTC 0220G (Bio-rad, USA)를 이용하였다.

북방산개구리 1~35개체 중 26번 개체와 29번 개체의 서혜부 피부와 근육은 충혈과 오돌토돌한 정도가 심하여, 그 부위는 세균검사를 위해 DNA template 표본에 추가하여 PCR을 실시하였다. PCR산물은 1% agarose gel에서 전기영동을 한 다음 ethidium bromide로 DNA 염색을 하여 UV transilluminator에서 관찰하였다. 증폭된 유전자 단편산물에 대하여 염기서열의 분석을 실시(Solgent Inc, 한국)하였으며, National Biotechnology Information (NCBI) Blast의 프로그램을 이용하여 유사유전자를 검색 및 비교하였다.

PCR 검사 결과, 총 35개체의 조직 및 혈액 시료에서 추출한 DNA로부터 Ranavirus의 예상 크기인 625 bp의 M153, M154 유전자단편이 증폭되지 않아(Fig. 4A), 개구리의 Ranavirus 감염은 없는 것으로 확인하였다. 향아리곰팡이병의 원인체로 알려진 *Batrachochytrium dendrobatidis*의 예상 크기인 300 bp의 Bd1a, Bd2a 유전자단편이 증폭되지 않았으며(Fig. 4B), 기타 곰팡이의 nu-SSU-0817-5' 및 nu-SSU-1196-3' 유전자 단편도 증폭되지 않았다. 자유생활사를 갖는 선충류인 *Rhadias* spp. 검출을 위하여 primer인 ITS5와 1500R를 이용한 검사에서도 의심 밴드가 발현되지

않았다.

그러나 양식장 바닥의 흙을 증류수와 잘 혼합하여 직경 60 μm 의 mesh로 여과 한 다음, 여과되지 않은 잔류물을 증류수에 희석한 후 현미경으로 관찰한 결과, Rhabditoidea류로 추정되는 길이 약 200 μm 의 자유생활 유충이 다수 발견되었다(Fig. 5). 개구리 먹이로 사용한 귀뚜라미에서는 세균감염과 관련된 밴드가 관찰되지 않았다.

그러나 모든 혈액에서 16S rRNA를 target으로 하는 박테리아 common primer인 Bac1와 Bac2의 490 bp 증폭산물을 확인하였고(Fig. 4C), 이들의 염기서열을 분석한 후 NCBI Blast의 프로그램을 사용하여 분리된 세균을 확인하였다. 본 결과에서 Query coverage와 Max identity의 범위는 각각 96~97%, 98~99%로 E-value 또한 0.0을 나타낸 것을 최종 검출 세균으로 동정 하였다. Total score가 동일하거나, 수치 상 우선

순위를 가리기 힘들거나, forward와 reverse primer에 따라 다른 동정결과를 보인 개체에 대해서는 중복감염으로 구분하였다. 그 결과 Table 2와 같이 단독감염이 48.5%, 이중감염 이상이 48.5%를 나타내어, 개구리가 다양한 세균에 중복감염 되어있음을 알 수 있었다.

중복된 단편에 대한 염기서열 분석결과 총 16종 59주의 세균이 동정되었는데, 분리빈도는 *Enterobacteriaceae* 과가 33.8% (20주)로 가장 많았으며, 그 다음이 *Citrobacter* 속이 28.8% (*Citrobacter freundii* 15%, 9주; *Citrobacter murlinae* 6.7%, 4주; *Citrobacter werkmanii* 3.3%, 2주; *Citrobacter* sp. 3.3%, 2주)였으며, *Cupriavidus*속 13.5% (8주), *Acinetobacter* sp. 10.2% 순으로 동정되었다.

한편 심장에서 채취한 혈액과 혈액성 복수에 대해 세균 배양 검사를 실시한 결과, TCBS 배지를 제외한 모든 배지에서 다수의 세균 colony가 형성되었으며, colony 를 API 20E kit를 사용하여 동정하여 가장 많이 검출된 균은 *Providencia rettgerii*였다. 그 밖에 *Hafnia alvei* 1, *Pasteurella pneumotropica*/*Mannheimia haemolytica*, *Pantoea* sp., *Raoultella ornithinolytica* 등이 주로 검출 되었다.

9월 초부터 기생충구제제인 ivermectin제제(ivermectin 1%, (주)신일, 한국)를 물에 1 : 2,500으로 희석하여 여러 차례 살포했으나, 폐사율 감소는 미미하였다. 세균 검출결과를 고려하여 9월 말부터 Doxycycline (독시아쿠아, (주)삼우메디안, 한국)과 Florfenicol 제제(아쿠아플로액, 이화팜텍(주), 한국)를 각각 1 : 500, 1 : 100으로 물에 희석하여 양식장에 분무하였으며, 그 결과 폐사율이 점차적으로 감소하여 2~3주 후에는 개구리 사육이 안정화 되었다. 면양혈액한천배지에서 1~2개의 colony를 채취하여 증류수에 희석한 후 항생제 감수성 검사(Disk 확산법)를 실시한 결과, Amoxycillin, Doxycycline, Sulphafurazole 등에서 중등도의 약제 감수성을 나타내었다.

중례 2

충북 충주의 북방산개구리 양식장에서도 2012년 6월 말부터 폐사가 시작되어 9월까지 계속되었고, 누적 폐사량은 약 5만 마에 이르렀다. 정선의 양식장과 마찬가지로 시작한지 2년이 조금 넘는 양식장이었고, 각 양식장끼리 서로 몇 차례 개체 교류가 있었다. 병증을 보이는 개구리들은 외관상 서해부가 붉게 충혈

Table 2. Detected bacterium by bacterial 16S rRNA amplification and sequencing from blood samples of *Rana dybowskii* in Jeongsun

	No. of isolates (%)
No. of multiplicity of isolation	n=35
Single	17 (48.5)
Double	8 (22.8)
Triple $\leq$	9 (25.7)
Unknown	2 (5.7)
Microorganism	n=59
<i>Citrobacter</i> sp.	2 (3.3)
<i>Citrobacter freundii</i>	9 (15.2)
<i>Citrobacter murlinae</i>	4 (6.7)
<i>Citrobacter werkmanii</i>	2 (3.3)
<i>Cupriavidus</i> sp.	3 (5.0)
<i>Cupriavidus metallidurans</i>	5 (8.4)
<i>Acinetobacter</i> sp.	4 (6.7)
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	2 (3.3)
<i>Enterobacter</i> sp.	1 (1.6)
<i>Serratia</i> sp.	2 (3.3)
<i>Yersinia</i> sp.	1 (1.6)
<i>Klebsiella</i> sp.	1 (1.6)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 (1.6)
<i>Hafnia alvei</i>	4 (6.7)
<i>Raoultella</i> sp.	3 (5.0)
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	2 (3.3)
<i>Morganella morganii</i>	1 (1.6)
<i>Pantoea</i> sp.	2 (3.3)
<i>Ewingella americana</i>	2 (3.3)
<i>Shewanella aquimarina</i>	1 (1.6)
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	3 (5.0)
<i>Pseudomonas</i> sp.	2 (3.3)
<i>Pseudomonas reactans</i>	1 (1.6)
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	1 (1.6)

Fig. 6. Frogs showing hernia of colon and some show rough and red skin of groin and feet.

Fig. 7. Helminths detected in the gut. (A) Nematode larvae and eggs. (B) Two adult worms looks like male and hermatophrodite (Androdiocecy). (C) Magnification on the contacted parts of worms, looks like outcrossing. (D) Magnification on the tail of adult worm.

되었고 매우 오돌토돌 했으며, 탈장이 된 개체들이 많았으나(Fig. 6), 정선 양식장에서 관찰된 사지 말단의 괴사처럼 심각한 증상은 보이지 않았다. 폐사원인을 규명하기 위해 각 시기별로 10~15마의 개구리를 부검하여 기생충 및 세균에 대한 검사를 실시하였다. 검사는 7월에 2회, 8월에 2회 그리고 9월에 1회 실시하였다.

7월 17일, 1차 부검한 2년생 개구리의 폐는 실질 소실이 일부 육안적으로 확인되었으며, 장관을 슬라이

Table 3. Result of examination on bacterium and helminthes from *Rana Dybowskii* in Chung-ju.

Date (Y/M/D)	Age (years)	Bacterium	Presence of Helminth in gut
2012/7/17	2	-	+
2012/7/23	2	<i>Citrobacter freundii</i>	+
	1	<i>Citrobacter freundii</i>	-
2012/8/23	1	<i>Pasteurella multocida</i>	-
	2	<i>Pasteurella multocida</i>	-
2012/8/27	1	<i>Pasteurella multocida</i>	-
	2	<i>Pasteurella multocida</i>	-
2012/9/11	1	<i>Morganella morganii</i>	-
	2	<i>Morganella morganii</i>	-

드 글라스에 압인하여 현미경으로 관찰한 결과, 다수의 유충과 알, hermaphrodite으로 추정되는 성충들이 발견되었다(Fig. 7). 검사결과를 바탕으로 Fenbendazole제제(제일펜벤다졸, (주)제일바이오, 한국)를 양식장에 살포한 결과 일일 폐사율이 낮아졌으며, 8월 23일, 3차 부검 이후에는 2년생 개구리 체내에서도 기생충이 검출되지 않았다(Table 3). 그러나 구충제 투여 효과는 오래가지 않았고 일일 폐사율은 다시 증가하기 시작하였는데, 이는 세균이 검출되기 시작하는 7월 23일, 검사 시점과 일치하였다(Table 3).

세균은 개구리에서 무균적으로 채취한 장기를 혈액배지에 접종하여 배양한 후, 독립colony를 미생물 자동동정기인 Vitek32 (bioMérieux, France)를 사용하여 동정하였다. 매 시기별 부검 시 배양한 20~40개 정도의 균 집락에 대하여 동정한 결과, 7월 하순에는 *Citrobacter freundii*, 8월 중에는 *Pasteurella multocida*, 9월 초에는 *Morganella morganii*가 50% 이상의 우점종이었다(Table 3). 구충제 투여 후에도 폐사율이 증가하여, 세균 검출 후 1 : 100으로 희석한 Oxytetracycline (이화팜텍(주), 한국)을 양식장에 살포하였다. 그 결과 폐사율은 현저하게 감소하기 시작하였으나, 9월 말까지는 계속되었으며, 시간이 경과함에 따라 점차 안정화 되었다.

고 찰

개구리의 세균성 질환의 원인균은 다양하지만, 그 임상적, 병리학적 증상은 거의 유사하게 보고되고 있으며, 다수의 잠재적인 병원성 원인균들이 폐사체, 병든 개체 또는 건강한 개구리에서도 분리되고 있다

(Mauel 등, 2002; Schadich 등, 2010; Hird 등, 1983). 한편 바이러스, 과밀사육, 스트레스, 비위생적인 환경은 개구리의 면역기능을 억제하여 세균성 감염을 일으킬 수 있으며(Mauel 등, 2002), 이 외에도, *Taenia crassiceps*와 *Heligmosomoides polygyrus*에 지속적으로 감염된 mouse가 비감염 mouse보다 *Streptococcus pneumoniae* 감염에 대한 감수성이 크게 증가하며 (Apiwattanakul 등, 2014), *Strongyloides stercoralis*에 중 감염 되었을 경우 패혈증 등의 다양한 원인에 의하여 동물이 폐사할 수 있음이 보고되고 있어(Patterson-Kane 등, 2001), 양서류에서도 기생충 감염으로 인한 속발성 세균 감염 발생 가능성이 있음을 시사하고 있다.

본 증례에서 정선의 양식장에서는 양식장 바닥에서 1~5 mm 크기의 실벌레들의 다수 출현과 함께 일일 폐사율이 급격히 증가하기 시작하였으며, 양식장 사육자들의 품고에 따르면 폐사 초기 개구리의 흉강 및 복강 내에서 양식장 바닥의 실벌레와 동일한 크기와 모양의 선충류로 추정되는 기생충이 발견되었다. 병증을 보이거나 폐사한 개구리들은 폐허탈과 실질 소실이라는 공통된 장기 병변을 나타내었다. 폐사 후기에는 양식장 환경에서 육안적으로 확인 가능하였던 크기의 실벌레 개체 수는 크게 줄어들었으나, 자유생활사 중인 *Rhabditoidea*류로 추정되는 선충 유충이 다수 발견되었다. 충주의 양식장에서는 폐사 초기 개구리의 부검 결과, 정선의 양식장과 마찬가지로, 폐허탈과 실질 소실 소견을 보였으며, 위장관 내에서 다수의 선충 성충, 유충 및 함미자충이 발견되었으며, 구충제 살포 후 증가하였던 일일 폐사율이 세균 검출 시기 전까지는 감소하기 시작하였다. 따라서 본 증례의 두 개구리 양식장에서의 폐사의 시작은 기생충(선충) 감염 때문이라고 추정가능하며, 선충의 크기, 숙주의 폐 실질 파괴와 기생충이 체강 및 장관 내에서 발견된 점, 체외 배설 전 장관 내에서 충란의 이른 부화, 자유생활사와 기생생활사를 동시에 갖는 것으로 추정되는 선충의 생활환 등으로 미루어 보아, *Rhabdias* spp.에 감염되었을 가능성이 높다고 여겨진다.

개구리에서 기생생활사와 자유생활사를 동시에 가지는 선충류로는 *Rhabdias* spp.와 *Strongyloides* spp.가 있으며, 이들은 숙주의 피부를 뚫고 침투하여, 폐와 위장관을 이행하며 기생한다(Densmore 등, 2007). 이중, *Rhabdias* spp.는 근막을 거쳐 체강 속에서 성충이 되고, 폐에 최종적으로 침입하여 폐혈관의 혈액 및

폐실질을 영양 공급원으로 하여 성적으로 성숙한, 알을 낳을 수 있는 3~6 mm 크기의 성충(gravid adult)으로 자라나 충란을 낳는다(Langford, 2010). 충란은 폐에서 위장관으로 이동되어, 충분히 발육된 상태로 분변을 통해 외부로 배설되는데, 충란의 발육속도가 빠르면 흉강이나 위장관 내에서도 부화할 수 있다. 이는, 강원도 정선 양식장의 개구리에서 관찰할 수 있었던 심한 폐 실질 파괴와 허탈(Fig. 2), 개구리 체강 내에서 *Rhabdias* spp. 성충 크기의 선충이 발견되었다는 사육자의 품고, *Rhabdias* spp.의 주 침입부위인, 바닥과 닿아 있는 둔부의 탈색반(Fig. 1)과 서혜부의 알리지양 변화, 양식장 바닥에서 발견된 다수의 *Rhabditoidea*류 유충(Fig. 4), 충북 충주 양식장의 개구리 장관 내에서 발견된 함미자충란과 선충 유충(Fig. 6) 발견 소견과 일치한다 그리고, 정선 양식장에서는 8월 말까지는 구충제를 살포하지 않았음에도 불구하고, 양식장 바닥 내 실벌레의 개체수가 자연적으로 확연히 줄어들었는데, 이는 *Rhabdias* spp.가 matricial endotoky 방식을 세대번식에 이용하고 있는 점 (Langford, 2010)을 고려하면 설명 가능하다. 그러나 *Rhabdias* spp. 검출을 위한 ITS5와 1500R primer를 이용한 PCR에서, 개구리 체내에서는 의심 밴드가 검출되지 않았다. 이러한 결과는 정선 지역의 양식장에서 개구리를 채집하여 검사에 공시한 시기가 9월 중순, *Rhabdias* spp.의 감염이 시작된 후 약 3개월 정도 되는 시점으로, 자유생활사와 기생생활사를 선택할 수 있는 *Rhabdias* spp.의 숙주 내 기생생활의 주기가 감염이 시작된 1~2개월 이후에 끝이 나는 점을 고려할 때(Langford, 2010), 기생충이 자유생활사로 변환되었거나, 충주 지역의 양식장에서 구충제를 살포한 8월 이후에 개구리의 장관에서 기생충이 발견되지 않고 있음(Table 3)을 미루어 보아, 9월 초 구충제의 살포가 개구리 체내 기생충의 제거에 효과가 있었기 때문이라고 생각한다. Patterson-Kane 등(2001)의 *Strongyloides stercoralis*에 감염된 개구리에 대한 보고에 따르면, 본 증례에서 정선 지역 양식장의 개구리들에서 관찰된 복부 피부의 황색화와 소수의 개체에서 발견된 장관 용모 상피의 증생 및 용모의 변성(Fig. 2L)으로 미루어, *Strongyloides* spp. 감염 역시 배제할 수는 없을 것으로 생각된다.

한편, 충주의 개구리 장관 내에서는 수컷과 hermaphrodite의 이종교배(outcrossing)로 추정되는 모습이 관찰되었는데(Fig. 7C), 이는 선충류 중 *Rhabdias ranarum*를 포함한 몇몇 *Rhabdias*종들이 드물게 선택하

는 번식방법이다(Weeks 등, 2006; Weeks, 2012). *Rhabdias* spp.는 숙주 안에서 hermaphrodite로 성장하여 교미 없이, 스스로 알을 성숙시켜 부화(self-fertilization)시킬 수 있는데, 본 증례에서는 수컷과 hermaphrodite이 숙주 내에서 함께 발견되어, 이에 대하여는 더 많은 연구가 필요할 것으로 여겨진다. 만약, 이 후에 북방산개구리 양식장에서 본 증례와 같은 폐사가 재발할 경우에는 보다 정확한 종 동정이 반드시 수행되어야 할 것이라 생각한다.

기생충의 중감염은 숙주의 면역력에 영향을 미쳐 세균 등 이차적 병원체의 감염을 초래할 수 있는데 (Patterson-Kane 등, 2001), 피부로 침투한 선충류가 피부 방어막을 무너뜨리고, 체내를 이행하며 폐 등 각종 장기에 손상을 초래하기 때문에 그로 인한 2차 감염을 일으킬 수 있을 것이다. 본 증례에서도 폐사 중기 이후의 개구리들은 Red leg syndrome (개구리의 세균성 패혈증)과 유사한 외부 소견을 보였고, 조직 검사에서도 패혈증 유사 소견(Fig. 2)이 관찰되었다. 그리고, 충주의 북방산개구리 양식장에서도 구충제를 투여한 후 폐사율이 일시적으로 감소하였지만, 세균이 검출되기 시작하는 시점과 일치하여 일일 폐사율이 다시 급증하였다(Table 3).

본 증례에서 패혈증에 걸린 개구리 혈액내에서 발견된 세균은 주로 환경성유래균으로, 강원도 정선에서는 *Citrobacter* sp. (*C. freundii* 포함), *Cupriavidus* sp. (*C. metallidurans* 포함), *Acinetobacter* sp. 등 총 18종의 세균이(Table 2), 충북 충주에서는 *Citrobacter freundii*, *Pasteurella multocida*, *Morganella morganii*가 개구리로부터 분리되었다(Table 4). 그 중, *Cupriavidus metallidurans*, *Ewingella americana*, *Shewanella aquimarina*, *Pseudoalteromonas* spp.는 본 증례 이전에는 개구리에서 잠재적 병원체로서 검출 보고가 없었던 세균이다. 환경성 세균인 *Citrobacter freundii*는 중국 왕도롱뇽(*Andrias davidianus*)에서 병원체로서 검출되었다는 보고(Gao 등, 2012) 외에도, 사람의 수막염을 일으켰다는 보고가 있으며(Chuang 등, 1999), *Cupriavidus metallidurans* 역시, 사람의 패혈증 원인체로 검출 보고가 있어(Langevin 등, 2011), 개구리에서의 패혈증 원인체로서 검출된 본 증례를 뒷받침하고 있다.

본 증례에서는 개구리에 치명적인 *Ranavirus*나 항아리곰팡이의 감염은 없었으며, 부검소견, 조직병리학적 소견, 구충제와 항생제의 살포로 인한 사육 안정화, 품고 등을 고려할 때, 자유생활사와 기생생활사를 함께 가지는 *Rhabditoidea*류의 감염과 그로 인한

여 속발된 세균성 패혈증이 대량폐사의 원인으로 판단된다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 본 증례와 같이 제한된 공간에서 높은 개체 밀도로 개구리를 인공 사육하는 양식장에서는 기생충에 대한 주기적인 구제와 더불어 2차적인 세균성 패혈증의 발생을 예방하기 위한 보다 철저한 위생관리가 필요할 것으로 생각된다.

결론

북방산개구리 양식장(강원 정선, 충북 충주)의 개구리에서 2012년 6월 말부터 9월까지 각각 70%, 50% 이상의 대량 폐사가 발생하였다. 병증을 보이는 개구리는 침울, 우둔 및 개구 증상이 있었으며, 공격자세를 취하는 이상행동을 나타내었다. 외부소견으로는 발바닥이 붉게 종대 되었고, 발가락은 괴사되어 탈락하였으며, 복부가 황색으로 변색되었고, 서혜부 및 허벅지 안쪽 피부의 충혈과 더불어 오돌토돌한 소결절이 나타났다. 다수의 개체에서 탈장도 관찰되었다. 부검소견으로 대부분의 개체에서 폐 실질은 확인되지 않을 정도로 파열되었고, 다량의 혈액성 복수, 황갈색 또는 회색의 간 변성, 심근 쇠약 및 장막 충혈 등이 나타났다. 조직소견으로는 간에서 염증세포에 의한 세포 탐식소견 및 간세포 괴사 소견을 나타내었으며, 폐포 중격은 파열되었으며 일부 폐 조직에서는 화생이 관찰되었다. 신장에서는 심한 울혈과 네프론의 괴사, 원위세뇨관의 초자양 물질이 발견되었으며, 일부 소장 용모상피는 과성장과 더불어 분기상을 나타내었고 끝이 뭉툭해졌다. 각 실질장기 조직에서 염증세포의 침윤이 확인되었으며, 심장, 간, 폐, 비장, 신장, 피부, 척추단면에서 MMC가 관찰되었다. 북방산개구리 양식장에서 폐사가 발생한 초기에 함미자충란 및 유충이 장관 내에서 발견되었고, 폐사 후기에는 *Rhabdioidea*로 추정되는 자유생활사의 선충류 유충이 토양에서 검출되었다. 본 증례의 개구리 혈액내에서 검출된 세균은 주로 환경성유래균으로, 강원도 정선에서는 *Citrobacter* spp., *Cupriavidus* spp., *Acinetobacter* spp. 등 총 18종의 세균이, 충청북도 충주에서는 *Citrobacter freundii*, *Pasteurella multocida*, *Morganella morganii*가 분리되었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 본 증례의 북방산개구리 폐사는 선충류의 중감염으로 인한 호흡장애,

영양부전 등에 의하여 시작되었으며, 다양한 세균의 감염에 의한 속발성 패혈증이 발생하면서 대량폐사로 이어진 것으로 판단된다.

감사의 글

This work was supported by Eco-Innovation 416-111-012, Korea.

참 고 문 헌

- 정아람, 양호진, 백혜준, 고영민, 이 항, 민미숙. 2010. 향아리 곰팡이에 감염된 양서류의 국내 분포 현황. 양서류과 종류학회지 2:9-15.
- Annis SL, Dastoor FP, Ziel H, Daszak P, Longcore JE. 2004. A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. J Wildl Dis 40: 420-428.
- Apiwatanakul N, Thomas PG, Kuhn RE, Herbert DR, McCullers JA. 2014. Helminth infections predispose mice to pneumococcal pneumonia but not to other pneumonic pathogens. Med Microbiol Immunol [Epub ahead of print]. doi:10.1007/s00430-014-0344-3.
- Borneman J, Haratin RJ. 2000. PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. Appl Environ Microbiol 66: 4356-4360.
- Chuang YC, Chang WN, Lu CH. 1999. Adult *Citrobacter freundii* meningitis: case report. Changgeng Yi Xue Za Zhi 22: 649-653.
- Densmore CL, Green DE. 2007. Diseases of Amphibians. ILAR J 48: 235-254.
- Gao Z, Zeng L, Meng Y, Liu X, Zhang B. 2012. Isolation and identification of *Citrobacter freundii* from diseased giant salamander, *Andrias davidianus*. Wei Sheng Wu Xue Bao 52: 169-176.
- Glorioso JC, Amborski RL, Ambors GF. 1974. Microbiological studies on septicemic bullfrogs (*Rana catesbeiana*). Am J Vet Res 35: 1241-1245.
- Green SL, Bouley DM, Tolwani RJ, Waggie KS, Lifland BD, Otto GM, Ferrell JE Jr. 1999. Identification and management of an outbreak of *Flavobacterium meningosepticum* infection in a colony of South African clawed frogs (*Xenopus laevis*). J Am Vet Med Assoc 214: 1833-1888.
- Hird DW, Diesch SL, McKinnell RG, Gorham E, Martin FB, Meadows CA, Gasiorowski M. 1983. *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas hydrophila* in Minnesota frogs and tadpoles (*Rana pipiens*). Appl Environ Microbiol 46: 1423-1425.
- Kim S, Sim MY, Eom AH, Park DS, Ra NY. 2009. PCR detection of Ranavirus in Gold-spotted pond frogs (*Rana plancyi chosonica*) from Korea. Korean J Environ Biol 27: 110-113.
- Langevin S, Vincelette J, Bekai S, Gaudreau C. 2011. First case of invasive human infection caused by *Cupriavidus metallidurans*. J Clin Microbiol 49: 744-745.
- Langford GJ. 2010. Ecology and relationships of *Rhabdias* spp. (nematoda: *Rhabdiasidae*) from North American amphibians and reptiles. Dissertations and thesis in biological sciences, University of Nebraska-Lincoln. <http://digitalcommons.unl.edu/bioscidiss/10>.
- Massoni R, de Mesquita AJ, Fleury LF, de Brioto WM, Nunes IA, Robert J, Morales H, Coelho AS, Barthasson DL, Galli L, Catroxo MH. 2009. Mass mortality associated with a frog virus 3-like Ranavirus infection in farmed tadpoles *Rana catesbeiana* from Brazil. Dis Aquat Organ 86: 181-191.
- Mauel MJ, Miller DL, Frazier KS, Murray EH. 2002. Bacterial pathogens isolated from cultured bullfrogs (*Rana catesbeiana*). J Vet Diagn Invest 14: 431-433.
- Miller D, Gray M, Storfer A. 2011. Ecopathology of ranaviruses infecting amphibians. 3: 2351-2373.
- Patterson-Kane JC, Eckerlin RP, Lyons ET, Jewell MA. 2001. Strongyloidiasis in a Cope's grey tree frog (*Hyla chrysoscelis*). J Zoo Wildl Med. 32: 106-110.
- Schadich E, Cole ALJ. 2010. Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* to Brown Tree Frogs (*Litoria ewingii*). Comp Med 60: 114-117.
- Weeks SC. 2012. The role of androdioecy and gynodioecy in mediating evolutionary transitions between dioecy and hermaphroditism in the animalia. Evolution 66: 3670-3686.
- Weeks SC, Benvenuto C, Reed SK. 2006. When males and hermaphrodites coexist: a review of androdioecy in animals. Integr comp biol 46: 449-464.