

# *Streptococcus parauberis*의 디스크 확산법 결과에 대한 Epidemiological Cut-off Value의 설정

천원경 · 이윤항 · 김윤재 · 노형진 · 김아란 · 김남은 · 서정수<sup>1</sup> · 권문경<sup>1</sup> · 이지훈<sup>1</sup> · 김도형\*

부경대학교 수산생명의학과, <sup>1</sup>국립수산과학원 방역과

## Epidemiological Cut-off Values Generated for Disc Diffusion Data from *Streptococcus parauberis*

Won-kyong Chun, Yoonhang Lee, Yoon-Jae Kim, Heyong Jin Roh, Ahran Kim, Nameun Kim, Jung-Soo Seo<sup>1</sup>, Mun-Gyeong Kwon<sup>1</sup>, Ji Hoon Lee<sup>1</sup> and Do-Hyung Kim\*

Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

<sup>1</sup>Aquatic Life Disease Control Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

Streptococcosis caused by *Streptococcus parauberis* is a very important disease in farmed olive flounder *Paralichthys olivaceus*. For most fish pathogens, including *S. parauberis*, there are no analytical criteria to distinguish antibiotic-susceptible strains from antibiotic-resistant strains. In this study, epidemiological cut-off ( $CO_{WT}$ ) values were generated to classify 75 strains of *S. parauberis* isolated from 1999 to 2018 as wild type (WT) and non-wild type (NWT) using disc diffusion data and normalized resistance interpretation (NRI) analysis. The susceptibility of the isolates to 16 antibiotics was evaluated using CLSI guideline M42-A. The wild-type cut-off values for amoxicillin, erythromycin, oxytetracycline, and florfenicol for *S. parauberis* were  $\geq 35$ , 31, 28, and 27 mm, respectively. The NWT ratios of *S. parauberis* strains to treatment with GEN, FFC, ENR, SXT, EFT, VAN, and CHL were 17% or less, indicating that these antibiotics may be used to treat streptococcosis caused by *S. parauberis*. For recent *S. parauberis* isolates, the NWT ratios for AMX, ERY, OTC and FFC are much higher than for strains isolated from 1999-2007. The  $CO_{WT}$  data from this study will assist aquatic animal disease professionals in prescribing appropriate antibiotics for the treatment of streptococcosis caused by *S. parauberis*, which will help reduce the misuse and abuse of antibiotics in the aquaculture sector.

Key words: *Streptococcus parauberis*, Antimicrobial susceptibility testing, CLSI protocols, Disc diffusion, Epidemiological cut-off values

### 서 론

우리나라 양식 넙치 생산량은 2017년 기준 전체 수산 양식 생산량의 약 48%를 차지하고 있다(KOSTAT, 2017). 연쇄구균병은 국내 양식 넙치에 가장 큰 피해를 일으키는 세균성 질병으로서 *Lactococcus garviae*, *Streptococcus iniae* 및 *Streptococcus parauberis*가 그 원인이었으나, 2000년대 중반 이후로는 대부분이 *S. parauberis*에 의한 질병으로 보고되고 있다(Baeck et al., 2006; Park et al., 2016). 양식 현장에서는 연쇄구균병의 예

방을 위해 백신이 사용되고 있으나 최근 들어 그 효과는 이전보다 다소 감소한 것으로 알려져 있다. 최근 연구(Kanai et al., 2009; Kanai et al., 2015)에 의하면 *S. parauberis*의 혈청형은 4개 이상이 존재하는 것으로 밝혀져 백신 제작에 사용된 균주의 혈청형과 예방효과 간에 연관성이 있을 것으로 추정된다. 우리나라 양식 넙치의 연쇄구균병 치료를 위해 사용되는 항생제는 amoxicillin (AMX), florfenicol (FFC), ampicillin (AMP), erythromycin (ERY) 등이 있으며 이 중 AMX, FFC 및 ERY가 가장 널리 사용되는 것으로 알려져 있다(Kwon et al., 2014;

\*Corresponding author: Tel: +82. 51. 629. 5945 Fax: +82. 51. 629. 5938

E-mail address: dhkim@pknu.ac.kr



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2019.0382>

Korean J Fish Aquat Sci 52(4), 382-388, August 2019

Received 14 May 2019; Revised 10 June 2019; Accepted 6 August 2019

저자 직위: 천원경(대학원생), 이윤항(대학원생), 김윤재(대학원생), 노형진(대학원생), 김아란(대학원생), 김남은(대학원생), 서정수(연구사), 권문경(연구관), 이지훈(연구사), 김도형(교수)

Jee et al., 2014). 이미 넙치에서 AMX의 약동력학적 연구가 수행되었으며(Seo et al., 2015; Kim et al., 2015), 최근 Lim et al. (2017)은 AMX을 40 mg/kg body weight fish의 농도로 근육 주사하였을 때 *S. parauberis*에 의한 연쇄구균병에 유효하다고 하였다. Lim et al. (2017)의 연구에서 사용한 10개의 *S. parauberis* 균주는 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC; µg/mL) 값이 모두 0.5이하로 나타나 AMX을 근육 주사하면 감수성이 있을 것으로 추정된다. 또한 넙치 연쇄구균병의 치료를 위해 AMX의 경구투여도 행해지는 점과 위에 기술된 항생제 종류 이외에도 사용될 가능성이 있다. 그러므로 최근에 분리된 *S. parauberis* 균주에 대해 AMX을 비롯하여 다양한 항생제에 대한 감수성 패턴의 분석을 하게 되면 유효한 항생제를 추정할 수 있다.

국제 표준 항생제 감수성 시험(antimicrobial susceptibility testing) 방법인 clinical and laboratory standards institute (CLSI) 가이드라인에 따르면 감수성과 내성을 구분할 수 있는 해석기준(Interpretive criteria)은 어병세균 중에서 *Aeromonas salmonicida* 한 종에 대해서만 설정되어 있다(CLSI, 2014). 이미 Kwon et al. (2016) 연구에서도 지적하였듯이 치료 효과의 의미를 내포하는 “clinical breakpoint”는 많은 비용과 시간이 소요되므로 normalized resistance interpretation (NRI) 방법을 이용하여 epidemiological cut-off values (wild-type cut-off values;  $CO_{WT}$ )을 구함으로써 야생형(wild type; WT)과 비야생형(non-wild type; NWT) 집단으로 구분할 수 있다. 따라서  $CO_{WT}$ 에 의해 구분된 WT와 NWT의 비율을 토대로 유효한 항생제를 추정하는데 도움이 될 수 있다(Smith, 2012; Kwon et al., 2016). Kronvall (2003)이 개발한 NRI 방법은 특히 어병세균의  $CO_{WT}$ 의 설정 연구에 빈번히 적용되고 있다. 지금까지 *A. salmonicida* (Smith et al., 2007), *Vibrio anguillarum* (Smith and Christofilogiannis, 2007), *Streptococcus phocae* (Avenida-Herrera et al., 2011), *Flavobacterium psychrophilum* (Henriquez-Núñez et al., 2012), *Vibrio ichthyenteri* (Lee et al., 2012), *Weissella* sp. (Figueiredo et al., 2012), *Vibrio ordalii* (Poblete-Morales et al., 2013), *Edwardsiella tarda*, *Vibrio harveyi* (Lim et al., 2016), *Piscirickettsia salmonis* (Henriquez et al., 2016), *Photobacterium damsela* (Kwon et al., 2016) 및 *Edwardsiella piscicida* (Kim et al., 2018)에 대한 특정 항생제의  $CO_{WT}$ 가 설정되었다. 최근에 개발된 NRI 방법(Smith and Kronvall, 2015; Kronvall and Smith, 2016)은 수산생물로부터 분리되는 어병세균의 배양온도와 시간을 고려하여  $CO_{WT}$ 가 설정되도록 설계되어 더욱 정밀하고 객관적인 분석이 가능해졌다고 볼 수 있다. 그러므로 본 연구에서는 우리나라에서 분리된 *S. parauberis* 75개 균주를 이용하여 디스크확산법의 결과를 NRI 분석(Kronvall and Smith, 2016)을 통해  $CO_{WT}$ 를 설정하고 wild type (WT)과 non wild-type (NWT)을 구분하여 NWT의 분포를 분석하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주

본 연구에 사용된 *Streptococcus parauberis*는 1999년부터 2018년에 제주도, 경북, 완도, 포항, 영덕, 울진, 해남 등의 양식 넙치 및 강도다리로부터 분리한 총 75균주이다(Table 1). 수집한 균주는 항생제 감수성 시험 수행 전에 1%의 NaCl이 첨가된 brain heart infusion agar (BHIA)배지에 접종하여 28°C에서 18-24시간 배양을 한 후 실험에 사용하였다.

### 항생제 감수성 시험

항생제 감수성시험은 수산용 항생제 감수성 시험 표준 프로토콜 CLSI M42-A (CLSI, 2006)에 따라 디스크 확산법(Disk diffusion test)을 실시하였다. 간략히 실험 방법을 서술하면, 균주를 먼저 28°C에 18-24시간 배양을 한 후  $2 \times 10^8$  CFU/mL의 농도로 희석시킨 후에 멸균 면봉을 사용하여 5% sheep blood가 첨가된 mueller-hinton agar (MHA) 배지 전체에 도말하고 항생제 디스크를 눌러 붙인 후 28°C에 배양하였다. 배양 24-28시간 후에 항생제 디스크 주변에 세균의 생장이 억제된 투명한 영역의 지름을 측정하여 결과로 사용하였으며 억제대 영역이 나타나지 않는 경우 항생제 디스크 지름인 6 mm로 표기하였다. Quality control (QC)용 균주는 CLSI M42-A (CLSI, 2006)의 제시된 방법에 따라 *Escherichia coli* ATCC 25922와 *Aeromonas salmonicida* ATCC 33658을 사용하였다. 이번 연구에 사용된 항생제는 Oxoid™에서 구입하였으며 총 16가지로 다음과 같다. ampicillin (AMP), amoxicillin (AMX), amoxicillin-clavulanic (AMC), doxycycline (DOX), oxytetracycline (OTC), cephalexin (CFL), cefuroxime (CXM), ceftiofur (EFT), enrofloxacin (ENR), erythromycin (ERY), clindamycin (CLI), trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT), gentamicin (GEN), vancomycin (VAN), florfenicol (FFC), chloramphenicol (CHL) (Table 2).

### Epidemiological cut-off value의 설정

Epidemiological cut-off value (ECOFF) [또는 Wild-type cut-off values ( $CO_{WT}$ )]는 Kronvall and Smith (2016)의 NRI 분석을 통하여 그 값을 구하였다. Wild type의 정규화된(normalized) zone 크기의 평균값과 표준편차는 정규화된 축적 빈도수의 probit을 이용하여 계산되었다.  $CO_{WT}$ 은 Kronvall and Smith (2016)의 방법에 따라 평균값에서 표준편차의 2.5배를 뺀 값으로 설정하였다.

## 결과 및 고찰

세균감염의 치료제로서 항생제는 매우 효과적이지만 부적절한 약물의 선택과 사용은 내성 세균의 발생을 증가시킬 수 있는

므로(Aoki et al., 1990), 치료효과 가능성이 높은 유효한 항생제를 선택하는 것은 매우 중요하다고 할 수 있다. Lim et al. (2016)은 세균성 질병을 치료를 하기 전에 병원균의 분리와 확보된 최소 수십 개의 균주의 항생제 감수성 시험 결과를 이용하여 WT과 NWT 균주를 구분하고 그 비율을 근거로 유효한 항생제를 선택하는 것은 유용하고 중요하다고 하였다. 이는 수산양식 현장에서 약물의 오남용을 줄이는데 도움이 될 수 있기 때문이다. OIE aquatic code (수산위생규약)에서 제시되어 있는 ‘항생제 사용의 모니터링 및 예찰 프로그램’에는 생성된 항생제 감수성 시험 데이터를 해석하기 위해 역학적 wild type 기준값( $CO_{WT}$ )을 사용해야 한다고 권고하고 있다.

본 연구에서 사용된 *S. parauberis* 75개 균주의 항생제별 억제대 크기(mm)는 Table 2에 나타내었다. QC균주인 *E. coli* ATCC 25922와 *A. salmonicida* ATCC 33658의 억제대 크기는 CLSI M42-A (2006)에서 제시한 억제대 범위 내에 있음을 확인하였다. 본 연구에서는 16개의 항생제에 대한 *S. parauberis* 75개 균주의 억제대 지름(mm)을 이용하여 NRI 분석을 진행하였다. NRI 분석 결과와 각 항생제에 대한  $CO_{WT}$ 와 WT 수 및 표준편차는 Table 3에 나타내었다. 이번 NRI 분석 결과  $CO_{WT}$ 는 AMP, AMX, AMC, DOX, OTC, CFL, CXM, EFT, EFT, ENR, ERY, CLI, SXT, GEN, VAN, FFC 및 CHL에서 각각 35, 35, 36, 25, 28, 29, 36, 30, 24, 31, 30, 22, 15, 21, 27 및 24로 나

타났다(Table 3). 이미 서론에서 언급하였듯이 NRI 방법은 어병세균 종에 널리 유용하게 이용되고 있다(e.g., Kwon et al., 2016). 최근에 개발된 NRI 방법(Kronvall and Smith, 2016)은 배양 온도에 따라 구분하여 분석할 수 있어 그 정확도가 기존 방법에 비해 좀 더 높아졌다고 판단된다. 수산동물에서 분리된 세균의  $CO_{WT}$ 를 설정할 때 더 많은 균주를 확보할수록 더 정밀한  $CO_{WT}$ 를 얻을 수 있으며, 적어도 30개의 WT을 포함해야 한다고 하였다(Smith et al., 2009; CLSI, 2011). 본 연구에서 사용한 모든 항생제에 대해 WT 수가 30개 이상이므로  $CO_{WT}$ 의 추정치가 적합하다고 판단된다.

사용한 항생제에서 AMP, AMX, AMC, DOX, OTC 및 ERY는 NWT의 비율이 각각 47, 49, 48, 49, 51 및 51%로 나타나 이 항생제에 의한 연쇄구균병의 치료 효과는 중등도의 수준일 것으로 추정된다. 특히 국내에서 연쇄구균병의 치료에 AMX, ERY 및 FFC를 많이 사용하는데(Jee et al., 2014), 이번 연구 결과를 통해 FFC에 대한 *S. parauberis* 균주의 NWT 비율은 11%인데 비해 AMX과 ERY에 대한 NWT 비율은 약 50%로 나타나 상대적으로 FFC에 의한 치료가능성은 높을 것으로 추정된다. 그 외 GEN, FFC, ENR, SXT, EFT, VAN, CHL에 대한 *S. parauberis* 균주의 NWT 비율이 17%이하로 나타나 연쇄구균병에 대한 치료의 성공을 보여주고 있다. 넓치의 *S. parauberis*에 의한 연쇄구균병은 매우 중요한 질병임에도 불구하고 이 병

Table 1. *Streptococcus parauberis* strains used in this study

Isolate code	Isolation source	Isolation location	Isolation year
KSP44-46 (n=3)	Olive flounder	Jejudo	1999
KSP47	Olive flounder	Gyeongsangbuk-do	1999
KSP1-4 (n=4)	Olive flounder	Jejudo	2003
KSP5-10 (n=6)	Olive flounder	Jejudo	2004
KSP11-21 (n=11)	Olive flounder	Jejudo	2005
KSP22-23 (n=2)	Olive flounder	Haenam	2005
KSP24-43 (n=20)	Olive flounder	Wando	2005
PH0710-0711 (n=2)	Starry flounder	Pohang	2007
SpOF3k, 04151K, 04161K (n=3)	Olive flounder	Geojedo	2013
HFTC0023, HFTC0059-0060, HFTC0063-0064 (n=5)	Olive flounder	Pohang	2014
HFTC0076	Starry flounder	Yeongdeok	2014
HFTC0083	Starry flounder	Yeongdeok	2015
HFTC0086, HFTC0091 (n=2)	Starry flounder	Ulsan	2015
HFTC0157	Starry flounder	Pohang	2015
HFTC0237	Starry flounder	Yeongdeok	2015
SPOF18J1-J11 (n=11)	Olive flounder	Jejudo	2018
SPOF18G1	Starry flounder	Ulsan	2018

Table 2. Distribution zone diameters (mm) for 75 strains of *Streptococcus parauberis*

Zone diameter (mm)	Number of isolates															
	AMP	AMX	AMC	DOX	OTC	CFL	CXM	EFT	ENR	ERY	CLI	SXT	GEN	VAN	FFC	CHL
6					28			1		18	4	2				
7					1	1				2						
8										1				1		
9				1						2						
10					4					2			2			
11				1	1					1						
12				3	1						2		2			
13				10	1						2					
14				8		2							3			
15				6							1		5			
16				5							2		5			
17				1				1			2	1	16			
18							1		1		1	2	8			
19				1							5	1	14	3		
20		2							1	1		2	14	3		
21		2							1	3	1	5	3	10	1	
22	1	1				3		1	4			5	1	9		
23	1			1		2		1	3	1	1	9		6	1	
24	1	6				5		1	4		1	4		10	1	
25	7	10	1			7		1	6		2	12		13	1	1
26	2	4		2	1	7	3	1	4	1		7	1	12	4	5
27	3	1		2	1	5	2	1	2		1	11		7	1	5
28	2			2	3	2	4	2	6		1	8			7	5
29		1	2	4	1	4	2	2	2	1	2	3			2	8
30	9	3	5	7	3		5	7	12	5	4	3	1		7	12
31	4	4	8	4	5		5	1	9	1	6			1	8	9
32	3	3	9	8	10	3	3	10	13	1	3				16	10
33	1		5	7	6	3	3	1	4		3				9	7
34	1		4		5		6	5		5	13				4	7
35		1	2		2	6		6		7	7				11	3
36		3	1	1	2	10	2	7	1	7	7					2
37	1	3	1	1		5		4		7	3				1	1
38	2	8	4			3	1	9	1	5					1	
39	6	8	5			2	2	8	1	3						
40	12	6	10			5	5	2			1					
41	1	8	8				2			1						
42	6		6				8	3								
43	5	1	2				5									
44	5		1				7									
45	1						2									
46			1				4									
47							3									
48	1															

Abbreviations for antibiotic agent are as in the materials and methods. Areas highlight in grey indicate the range of zones for isolates categorized as WT. Penicillin (AMP, ampicillin; AMX, amoxicillin; AMC, amoxicillin-clavulanic); Tetracyclines (DOX, doxycycline; OTC, oxytetracycline); Cephalosporins (CFL, cephalexin; CXM, cefuroxime; EFT, ceftiofur); Fluoroquinolones (ENR, enrofloxacin); Macrolides (ERY, erythromycin); Lincosamides (CLI, clindamycin); Sulfonamides (SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole); Aminoglycosides (GEN, gentamicin); Glycopeptide antibiotic (VAN, vancomycin); Amphenicols (FFC, Florfenicol; CHL, chloramphenicol).

원체에 대한 항생제 감수성 시험 결과와 패턴 분석에 관한 연구는 매우 부족하다. 최근 Lee et al. (2018)은 여러 어병세균 종에 대한 quinolone, sulfonamide, tetracycline, penicillin계 항생제의 디스크확산법 시험 결과 분석시 감수성과 내성을 구분하는 기준의 부재로 인해 억제대 형성이 안 된 균주만을 내성으로 간주할 수 밖에 없었으며, erythromycin에 대해서는 CLSI M100 (CLSI, 2017)의 기준에 따라 13 mm 이하로 형성된 균주를 내성으로 간주하였다. 그러나 Lee et al. (2018)이 참조한 기준은 인체 병원체인 *Staphylococcus* 종에 적용되는 기준으로 세균종이 다른 경우에 적용하는 것은 부적절한 것으로 판단된다.

Table 3. Summary of the results of NRI analysis

Antibiotics	<i>Streptococcus parauberis</i> (n=75)		
	CO <sub>WT</sub> (mm)	Sd <sup>1</sup>	WT <sup>2</sup>
AMP	≥35	2.42	40
AMX	≥35	1.90	38
AMC	≥36	1.85	39
DOX	≥25	2.46	38
OTC	≥28	1.96	37
CFL	≥29	3.13	41
CXM	≥36	2.78	41
EFT	≥30	2.67	63
ENR	≥24	2.63	65
ERY	≥31	2.00	37
CLI	≥30	1.64	47
SXT	≥22	1.90	62
GEN	≥15	1.48	68
VAN	≥21	1.49	68
FFC	≥27	2.55	67
CHL	≥24	2.84	75

Abbreviations for antibiotic agent are as in the materials and methods. <sup>1</sup>Standard deviation of the normalized distribution of WT observations. <sup>2</sup>Number of isolates categorized by the application of the relevant CO<sub>WT</sub> value. AMP, ampicillin; AMX, amoxicillin; AMC, amoxicillin-clavulanic; DOX, doxycycline; OTC, oxytetracycline; CFL, cephalexin; CXM, cefuroxime; EFT, ceftiofur; ENR, enrofloxacin; ERY, erythromycin; CLI, clindamycin; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; GEN, gentamicin; VAN, vancomycin; FFC, Florfenicol; CHL, chloramphenicol.

Table 4. Ratio of non-wild strains of *Streptococcus parauberis*

Isolation year	Number of strains	Ratio (%) of NWT			
		AMX	ERY	OTC	FFC
1999 - 2007	49	22%	49%	31%	0%
2013 - 2018	26	100%	100%	88%	31%

NWT, non-wild type; AMX, amoxicillin; ERY, erythromycin; OTC, oxytetracycline; FFC, Florfenicol.

본 연구에서 도출된 결과를 이용하여 분리 유래 및 지역별 분석을 진행하려 했으나 연도에 따라 확보된 균주의 수가 동일하지 않아 관련 분석은 부적절하다고 판단하였다. 그러나 본 연구에서 발견된 흥미로운 점은 최근 5년 이내에 분리된 *S. parauberis* 균주의 일부 항생제에 대한 NWT의 비율이 1999-2007년 사이에 분리된 균주에서 나타난 NWT의 비율에 비해 현저히 높은 것을 확인할 수 있었다(Table 4). 이전 연구(Meng et al., 2009; Park et al., 2009)는 *tet* (s)와 *erm* (B) gene의 내성 관련 유전자 조합이 일부 *S. parauberis* 균주에 존재하고 있어 각각 erythromycin과 tetracycline에 대해 내성을 나타낸다고 보고하였다. 본 연구에서 사용한 *S. parauberis* 균주 또한 페니실린계, 테트라사이클린계 및 마크로라이드계의 항생제에 대해 NWT로 분류되어 이전 연구 결과와 유사한 것을 확인할 수 있었다.

본 연구는 우리나라의 수산양식에서 연쇄구균병의 원인균 중 하나인 *S. parauberis*에 대한 항생제 감수성 패턴에 대한 기초 자료와 항생제별 WT과 NWT의 구분을 위한 기준을 제공하고자 하였다. 현재 *S. parauberis*에 대한 감수성 또는 내성을 구분할 수 있는 해석기준이 설정되어 있지 않아 항생제 감수성 시험 결과에 따른 균주의 구분이 어려운데 NRI 방법은 어병세균에 대한 항생제별 기준값을 제시하고 감수성 시험 결과를 비교하여 적절한 항생제를 선택할 수 있다는 점에서 매우 중요한 역할을 할 것으로 판단된다. 최근 분리된 균주가 다양한 항생제에 NWT로 분류되는 것으로 보아 수산 양식 현장에서 보다 신중한 항생제의 사용이 필요할 것으로 보인다.

## 사 사

본 연구는 국립수산과학원 수산과학연구소(R2019058)에 의해 이루어진 연구이며 지원에 감사드립니다.

## References

- Aoki T, Takami K and Kitao T. 1990. Drug resistance in a non-hemolytic *Streptococcus* sp. isolated from cultured yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Dis aquat Org 8, 171-177. <http://doi.org/10.3354/dao008171>.
- Avendaño-Herrera R, Molina A, Magariños B, Toranzo AE and Smith P. 2011. Estimation of epidemiological cut-off values for disk diffusion susceptibility test data for *Streptococcus phocae*. Aquaculture 314, 44-48. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.01.049>.
- Baek GW, Kim JH, Gomez DK and Park SC. 2006. Isolation and characterization of *Streptococcus* sp. from diseased flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju Island. J Vet Sci 7, 53-58. <https://doi.org/10.4142/jvs.2006.7.1.53>.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2006. Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals; Approved Guideline. CLSI document M42-A. Clinical and Laboratory Standards

- Institute, Wayne, Pennsylvania, U.S.A.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2011. Generation, presentation and application of antimicrobial susceptibility test data for bacteria of animal origin: a report. Clinical and laboratory standards institute document X08-R. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, U.S.A.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; Second informational supplement. CLSI document VET03/VET04-S2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, U.S.A.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2017. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. CLSI document M100-S28. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, U.S.A.
- Figueiredo HCP, Costa FAA, Leal CAG, Carvalho-Castro GA and Leite RC. 2012. *Weissella* sp. outbreaks in commercial rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Brazil. *Vet Microbiol* 156, 359-366. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.11.008>.
- Henríquez P, Kaiser M, Bohle H, Bustos P and Mancilla M. 2016. Comprehensive antibiotic susceptibility profiling of Chilean *Piscirickettsia salmonis* field isolates. *J Fish Dis* 39, 441-448. <https://doi.org/10.1111/jfd.12427>.
- Henríquez-Núñez H, Evrard O, Kronvall G and Avendaño-Herrera R. 2012. Antimicrobial susceptibility and plasmid profiles of *Flavobacterium psychrophilum* strains isolated in Chile. *Aquaculture* 354, 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.034>.
- Jee BY, Shin KW, Lee DW, Kim YJ and Lee MK. 2014. Monitoring of the mortalities and medications in the inland farms of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, in South Korea. *J Fish Pathol* 27, 77-83. <https://doi.org/10.7847/jfp.2014.27.1.077>.
- Kanai K, Tu C, Katayama N and Suga K. 2015. Existence of subserotypes in *Streptococcus parauberis* serotype I. *Japanese Soc Fish Pathol* 50, 75-80. <https://doi.org/10.3147/jsfp.50.75>.
- Kanai K, Yamada M, Meng F, Takahashi I, Nagano T, Kawakami H, Yamashita A, Matsuoka S, Fukuda Y, Miyoshi Y, Takami I, Nakano H, Hiraie T, Shutou K and Honma T. 2009. Serological differentiation of *Streptococcus parauberis* strains isolated from cultured Japanese flounder in Japan. *Japanese Soc Fish Pathol* 44, 33-39. <https://doi.org/10.3147/jsfp.44.33>.
- Kim A, Lim Y, Kim N, Luan Nguyen T, Roh HJ, Park CI, Han HJ, Jung SH, Cho MY, Kim DH and Smith P. 2018. A comparison of genotypic and phenotypic methods for analyzing the susceptibility to sulfamethoxazole and trimethoprim in *Edwardsiella piscicida*. *Microb Drug Resist* 24, 1226-1235. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0137>.
- Kim JS, Lee JH, Lee SJ and Park KH. 2015. Pharmacokinetics of amoxicillin after intramuscular injection at different temperatures to cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J Fish Pathol* 28, 43-51. <https://doi.org/10.7847/jfp.2015.28.1.043>.
- KOSTAT (Statistics Korea). 2017. Republic of Korea: Survey on the status of fish culture. 2017, Media release, Statistics Korea webpage, KOSIS. Retrieved from <http://kostat.go.kr/portal/eng/index.action> on May 08, 2019.
- Kronvall G and Smith P. 2016. Normalized resistance interpretation, the Nri method: Review of Nri disc test applications and guide to calculations. *Apmis* 124, 1023-1030. <https://doi.org/10.1111/apm.12624>.
- Kronvall G. 2003. Determination of the real standard distribution of susceptible strains in zone histograms. *Internat J Antimic Agent* 22, 7-13. [http://doi.org/10.1016/s0924-8579\(03\)00107-9](http://doi.org/10.1016/s0924-8579(03)00107-9).
- Kwon MG, Hwang JY and Jung SH. 2014. The Efficacy and safety on combination vaccines: *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus iniae* and *S. parauberis*, in Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J Fish Mari Sci Edu* 26, 1193-1200. <https://doi.org/10.13000/JFMSE.2014.26.6.1193>.
- Kwon MG, Lim YJ, Kim MS, Seo JS, Kim DH. 2016. Epidemiological cut-off values generated for disc diffusion data from *Photobacterium damsela*. *Korean J Fish Aquat Sci* 49, 838-844. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2016.0838>.
- Lee DC, Han HJ, Choi SY, Kronvall G, Park CI and Kim DH. 2012. Antibigrams and the estimation of epidemiological cut off values for *Vibrio ichthyenteri* isolated from larval olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 342, 31-35. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.02.011>.
- Lee DW, Jun LJ, Kim SM and Jeong JB. 2018. Analysis of erythromycin resistance gene in pathogenic bacteria isolates from cultured Olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Jeju. *Korean J Fish Aquat Sci* 51, 397-403. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2018.0397>.
- Lim JW, Jung MH, Jung SJ, Kim DH, Park KH and Kang SY. 2017. The efficacy of amoxicillin sodium against streptococcosis in cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus* and its pharmacokinetics. *J Vet Pharmacol Ther* 40, 77-87. <https://doi.org/10.1111/jvp.12321>.
- Lim YJ, Kim DH, Roh HJ, Park MA, Park CI and Smith P. 2016. Epidemiological cut-off values for disc diffusion data generated by standard test protocols from *Edwardsiella tarda* and *Vibrio harveyi*. *Aquaculture Int* 24, 1153-1161. <https://doi.org/10.1007/s10499-016-9977-0>.
- Meng F, Kanai K and Yoshikoshi K. 2009. Characterization of drug resistance in *Streptococcus parauberis* isolated from Japanese flounder. *Japanese Soc Fish Pathol* 44, 40-46. <https://doi.org/10.3147/jsfp.44.40>.

- Park SB, Nho SW, Jang HB, Cha IS, Kim MS, Lee WJ and Jung TS. 2016. Development of three-valent vaccine against streptococcal infections in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 461, 25-31. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.04.022>.
- Park YK, Nho SW, Shin GW, Park SB, Jang HB, Cha IS, Ha MA, Kim YR, Dalvi RS, Kang BJ and Jung TS. 2009. Antibiotic susceptibility and resistance of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus parauberis* isolated from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Vet Microbiol* 136, 76-81. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.10.002>.
- Poblete-Morales M, Irgang R, Henríquez-Núñez H, Toranzo AE, Kronvall G and Avendaño-Herrera R. 2013. *Vibrio ordalii* antimicrobial susceptibility testing Modified culture conditions required and laboratory-specific epidemiological cut-off values. *Vet Microbiol* 165, 434-442. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.04.024>.
- Seo JS, Jeon EJ, Jung SH, Park MA and Kim NY. 2015. Pharmacokinetics of amoxicillin trihydrate in cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J Vet Pharmacol Ther* 38, 86-92. <https://doi.org/10.1111/jvp.12155>.
- Smith P and Christoflogiannis P. 2007. Application of normalised resistance interpretation to the detection of multiple low-level resistance in strains of *Vibrio anguillarum* obtained from Greek fish farms. *Aquaculture* 272, 223-230. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.07.232>.
- Smith P and Kronvall G. 2015. Effect of incubation temperature and time on the precision of data generated by antibiotic disc diffusion assays. *J Fish Dis* 38, 629-636. <https://doi.org/10.1111/jfd.12278>.
- Smith P, Douglas I, McMurray J and Carroll C. 2009. A rapid method of improving the criteria being used to interpret disc diffusion antimicrobial susceptibility test data for bacteria associated with fish diseases. *Aquaculture* 290, 172-178. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.02.017>.
- Smith P, Ruane NM, Douglas I, Carroll C, Kronvall G and Fleming GT. 2007. Impact of inter-lab variation on the estimation of epidemiological cut-off values for disc diffusion susceptibility test data for *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture* 272, 168-179. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.07.216>.
- Smith P. 2012. Antimicrobial resistance: complexities and difficulties of determination. Improving biosecurity through prudent and responsible use of veterinary medicines in aquatic food production, 99-118. Retrieved from <http://www.fao.org/3/ba0056e/ba0056e.pdf#page=117> on May 07, 2019.