

어류 병원성 세균의 MIC 결정을 위한 MIC Panel의 최적화 배양 조건 확립

김예지 · 전려진 · 강미래 · 이다원 · 우수지¹ · 김명석¹ · 정준범*

제주대학교 해양생명과학과, ¹국립수산과학원 병리연구과

Establishing of Optimal Culture Conditions for MIC Panels for MIC Determination of Fish Bacterial Pathogens

Ye Ji Kim, Lyu Jin Jun, Mi Rae Kang, Da Won Lee, Soo Ji Woo¹, Myoung Sug Kim¹ and Joon Bum Jeong*

Department of Marine Life Sciences, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

¹Pathology Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

No established method can be used to select effective antibiotics in antibiotic susceptibility tests for fish bacterial pathogens quickly and accurately. Here, we established the optimal conditions for determining the minimal inhibitory concentration (MIC) of major fish bacterial pathogens (*Streptococcus* spp., *Edwardsiella tarda*, *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp., and *Pseudomonas* spp.) using the KRAQ1 and CAMPY2 panels. The MIC panel used 18 antibiotics of two types and we conducted experiments to establish the optimal culture medium and temperature for each species. The optimal conditions for incubating *Streptococcus* spp. were in cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer (CAMHBT) at 28°C, using 5% lysed horse blood (LHB) as recommended by the Clinical Laboratory Standards Institute. For *Vibrio* spp., the optimal culture conditions were 28°C in CAMHBT supplemented with 1% NaCl. The optimal conditions for culturing *E. tarda*, *Aeromonas* spp., and *Pseudomonas* spp. were in CAMHBT at 28°C.

Keywords: Antibiotics susceptibility testing, KRAQ1 panel, CAMPY2 panel, Fish pathogen, MIC

서론

우리나라의 수산양식업은 경제적 효율성을 위해 고밀도 양식을 추구해 왔으며, 이로 인해 질병의 발생 증가와 빠른 전파의 문제가 발생하였다. 양식현장에서는 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 항생제를 세균성 질병의 치료에 지속적으로 이용해 왔으며, 일부 항생제는 감염성 질병의 예방이나 치료 목적 외에도 사료와 혼합하여 어류의 성장을 촉진하기 위해 사용되어 왔다(Son et al., 2011). 또한 양식장에서는 세균성 질병을 치료하기 위하여 현장 종사자의 임상적 경험을 토대로 항생제를 선택한 후 무분별하게 사용하는 경우가 빈번하다. 이러한 비전문가적인 치료 방법으로 유발되는 항생제 오남용은 세균의 항생제 내성을 증가시켜 치료가 어려워지고, 약물의 잔류로 인한 양식생물의 안전성 및 수산식품의 공중위생학적 안전성에도 심각한 문제를 일으킨다(JSA, 1994; Noga, 1996; Woodward, 1996). 그러므로 양식생물에서 질병이 발생하게 되면 원인이

되는 세균을 분리한 후, 동정된 세균의 항생제 감수성 검사를 실시하여 적절한 항생제를 선택하고 용법과 용량에 맞추어 항생제를 사용하여야 한다. 최근까지 항생제 감수성 검사를 위하여 disk diffusion susceptibility test와 broth microdilution test 등의 방법이 주로 사용되고 있지만, 실험 단계가 복잡하고 시간이 많이 소요된다는 단점이 있다. 지금의 항생제 감수성 검사 방법은 질병이 발생하고 대량 폐사로 인하여 많은 경제적 피해가 발생한 후 결과가 확인되는 경우가 많아 신속하게 적절한 항생제를 처리해야 하는 상황에 비효율적인 측면을 가지고 있다. 따라서 양식생물의 질병 원인을 분석함과 동시에 보다 신속하고 효율적인 방법을 이용하여 항생제 감수성과 내성을 구분할 수 있는 방법이 필요한 실정이다. 다양한 항생제가 농도별로 coating되어 있는 MIC (minimal inhibitory concentration) panel은 간편하고 신속하게 항생제 감수성 검사를 실행할 수 있도록 상품화되어 판매되고 있지만, 현재까지는 인체 및 가축에서 유래된 세균의 조건에 맞추어 연구되고 사용되어 왔다. 그러

*Corresponding author: Tel: +82. 64. 754. 3426 Fax: +82. 64. 756. 3493

E-mail address: jeongjb@jejunu.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.2020.0443>

Korean J Fish Aquat Sci 53(3), 443-450, June 2020

Received 10 March 2020; Revised 11 April 2020; Accepted 22 June 2020

저자 직위: 김예지(대학원생), 전려진(박사후연구원), 강미래(대학원생), 이다원(대학원생), 우수지(연구사), 김명석(연구관), 정준범(교수)

나 다양한 환경 조건을 요구하는 수산생물에서 분리한 세균은 배양조건이 다르기 때문에 동일한 방법을 적용하기에는 적합하지 않다. 또한 국외기관인 clinical and laboratory standards institute (CLSI, 2020)와 european committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST, 2020)에서 발간한 인체 및 가축에서 분리한 세균의 항생제 감수성 검사 표준 방법에서 권장되는 배양조건은 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 16-20시간 동안 배양하는 것이지만, 어병세균은 이러한 배양조건이 적합하지 않다. 이전의 연구에서 어병세균의 항생제 검사를 위한 표준방법(CLSI, 2006; CLSI, 2014a)으로서 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, $28 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 24-28시간 배양을 권장한다고 명시되어 있지만, 다양한 어병세균에 대한 명확한 조건을 제시하고 있지 않으며 실험실에서 많이 사용하고 있는 Mueller-Hinton broth (MHB, Difco, Detroit, MI, USA) 배지의 활용성에 관한 연구도 부족한 실정이다.

본 연구에서는 수산용 항생제들이 96 well plate에 coating 된 Sensititre™ KRAQ1, CAMPY2 panel (TREK Diagnostic system, East Grinstead, UK)을 이용하여, 어류에서 분리한 세균 중에 대한 MIC 분석을 실시하고 효율적인 항생제 감수성 검사를 위한 최적화 조건을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 균주

어류에서 분리되는 대표적인 병원성 세균인 *Streptococcus* spp., *Edwardsiella tarda*, *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp. 및 *Pseudomonas* spp.를 본 연구에 사용하였다. *Streptococcus* spp.와 *E. tarda*, *Vibrio* spp.의 경우, 넙치 병어로부터 균을 직접 분리하여 이용하였으며, *Aeromonas* spp.와 *Pseudomonas* spp.는 국립수산과학원 병리연구과로부터 분양을 받아서 본 실험에 사용하였다. 세균은 2%의 NaCl이 첨가된 tryptic soy broth (TSB, Difco, Detroit, MI, USA) 배지상에서 증식되었으며, 균의 구분을 위해 선택배지인 thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS) agar (Difco, Detroit, MI, USA), Salmonella Shigella (SS) agar (MB cell, Seoul, Korea)와 감별배지인 blood agar (KOMED, Seongnam, Korea)에 도말하고, 27°C 에서 18-24시간 배양하여 균의 집락 형성 및 형태를 확인하였다. *E. tarda* 균주의 구분을 위해 선택배지인 SS 배지에서 검은색 집락을 형성하는 것으로 규정하였고, *Vibrio* spp. 균주는 구분을 위해 비브리오 선택배지인 TCBS 상에서 초록색 또는 노란색 집락을 형성한 것으로 규정하였다. 실험균은 보존을 위해 20% glycerol (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 첨가한 후 실험에 사용하기 전까지 -80°C 에서 보관하였다.

균주의 동정

세부적인 균 동정은 polymerase chain reaction (PCR) 방법을 통해 확인하였다. PCR을 위한 template DNA는 Higene™ Ge-

nomics DNA prep kit (BIOFACT, Daejeon, Korea)를 사용하여 분리하였다. 먼저 DNA의 추출을 위하여, 균을 TSB에 접종하고 27°C 에서 18-24시간 배양한 후 배양액 1.5 mL를 microtube에 넣고, 10,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 pellet을 수집하였다. Cell re-suspension solution 300 μL 를 넣어 pellet을 현탁시킨 후, lysozyme 2 μL 를 첨가하여 37°C 에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하고, cell lysis solution 300 μL 를 넣어 pellet을 현탁시킨 다음 RNase A 1.5 μL 를 첨가하여 37°C 에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 실온에서 식힌 후에 protein precipitation solution 100 μL 를 넣고, 강하게 vortex하여 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상층액은 100% isopropanol 300 μL 가 들어있는 새 microtube에 넣고 50회 inverting하여 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 80% ethanol로 2번 세척하고, 15분간 상온에서 건조시킨 후, DNA hydration solution 50 μL 를 넣고 5초간 vortex하여 DNA를 추출하였다. 분리된 DNA는 실험에 사용하기 전까지 -20°C 에서 보관하였다(Lee et al., 2017). 세균 동정을 위한 PCR 방법은 이전의 연구논문을 참고하여 수행하였다(Woo et al., 2006; Demircan and Candan, 2006; Sakai et al., 2007; Kim et al., 2014; Kim et al., 2015).

MIC panel을 이용한 항생제 감수성 검사

MIC panel을 이용한 항생제 감수성 검사 방법은 국립수산과학원 병리연구과에서 설계하였고, Thermo사에서 제작한 KRAQ1 panel의 oxytetracycline, ceftiofur, flumequine, enrofloxacin, neomycin, ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, doxycycline, trimethoprim/sulfamethoxazole 및 sulfisoxazole 10종과 CAMPY2 panel의 azithromycin, ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin, florfenicol, gentamicin, nalidixic acid 및 tetracycline 8종을 사용하였다(Table 1).

1% NaCl이 첨가된 tryptic soy agar (TSA, Difco, Detroit, MI, USA)에서 순수 배양된 세균의 colony를 멸균 loop를 이용하여 3-5개를 취한 후, 1% NaCl이 첨가된 distilled water에 희석하여 0.5 McFarland (1.5×10^8 CFU/mL)가 되도록 Sensititer™ Nephelometer (TREK Diagnostic system, Cleveland, OH)로 농도를 맞추었다. 농도를 맞춘 균액은 최적화 조건 확립을 위해 균종별로 설정한 조건에 맞춰 각각의 broth배지에 100 μL 씩 넣었다(Table 2). *Streptococcus* spp.의 경우, CLSI에서 제시한 기준에 따라 5%의 lysed horse blood (LHB)가 첨가된 cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer (CAMHBT) 배지에 1% NaCl의 첨가 유무를 다르게 하여 실험을 진행하였고, MHB 배지에서 배양했을 때 MIC 값의 차이점을 확인하고자 하였다. *E. tarda*, *Vibrio* spp. 그리고 *Aeromonas* spp.는 CAMHBT 배지, 1% NaCl이 첨가된 CAMHBT 배지 그리고 1% NaCl이 첨가된 MHB에서 배양하였다. *Pseudomonas* spp.의 경우는 CAMHBT 배지에서 22°C , 28°C 및 35°C 의

조건으로만 실험을 진행하였다. 준비된 균액을 96 well panel에 100 µL씩 분주한 후 kit well 전용 필름으로 sealing하고 panel을 각 조건에 맞는 배양온도에서 24시간 배양하였다. 배양된 panel을 Sensititer™ Manual Viewbox를 이용하여 육안으로 관찰하였을 때, 충분한 성장저해가 일어나 투명한 상태로 남아 있는 well 중 가장 적은 양의 항생제를 포함하는 well의 항생제 농도를 최소억제농도(MIC)로 결정하였다.

Table 1. Range of concentrations used for minimal inhibitory concentration (MIC) determination by sensititre panels

Antimicrobial subclass	Antimicrobial agents (Abbreviation)	Test range (µg/mL)
(A) KRAQ1 panel		
Tetracyclines	Oxytetracycline (OXY)	0.25-256
Cephalosporins	Ceftiofur (XNL)	0.03-64
Fluoroquinolones	Flumequine (FLUQ)	0.12-128
	Enrofloxacin (ENRO)	0.03-32
Aminoglycosides	Neomycin (NEO)	0.5-64
Penicillins	Ampicillin (AMP)	1-256
β-lactam/β lactamase-inhibitor combination	Amoxicillin/clavulanic acid (AUG2)	1/0.5-256/128
Tetracyclines	Doxycycline (DOX)	0.25-64
	Trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT)	0.12/2.38-16/304
Sulfonamides	Sulfisoxazole (FIS)	16-1024
(B) CAMPY2 panel		
Macrolides	Azithromycin (AZI)	0.015-64
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin (CIP)	0.015-64
Lincosamides	Clindamycin (CLI)	0.03-16
Macrolides	Erythromycin (ERY)	0.03-64
Phenicol	Florfenicol (FFN)	0.03-64
Aminoglycosides	Gentamicin (GEN)	0.12-32
Quinolones	Nalidixic acid (NAL)	4-64
Tetracyclines	Tetracycline (TET)	0.06-64

Table 2. Culture conditions and medium for representative bacterial species

Species	<i>Streptococcus</i> spp.				<i>E. tarda</i> , <i>Vibrio</i> spp., <i>Aeromonas</i> spp.			<i>Pseudomonas</i> spp.
	KRAQ1, CAMPY2				KRAQ1, CAMPY2			KRAQ1, CAMPY2
Medium	CAMHBT ¹ +5% LHB ²	CAMHBT	CAMHBT +1% NaCl	MHB ³ +1% NaCl	CAMHBT	CAMHBT +1% NaCl	MHB +1% NaCl	CAMHBT
Culture temperature	22°C				22°C			22°C
	28°C	28°C	28°C	28°C	28°C	28°C	28°C	28°C
	35°C	35°C	35°C	35°C	35°C	35°C	35°C	35°C

¹CAMHBT, Cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer. ²LHB, Lysed horse blood. ³MHB, Mueller-Hinton broth. *Incubation time, 24h.

결 과

균의 동정

본 연구에서 PCR을 통해 연쇄구균의 동정을 실시한 결과, *S. parauberis* 3균주, *S. iniae* 2균주로 확인되었다. *E. tarda* 균주는 선택배지인 SS 배지 상에서 검은색 집락이 형성되었으며, 정확한 동정을 위한 PCR 결과에서도 동일한 결과가 나타났다. 이전 Demircan and Candan (2006), Kim et al. (2014), Kim et al. (2015)의 방법을 참고하여 각 비브리오 균주에 대한 세부적인 동정을 실시한 결과, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, *Vibrio* sp. 및 *V. harveyi*로 동정되었고, 해당 균주를 본 실험에 사용하였다(Table 3).

MIC panel의 최적화 배양 조건

주요 어병세균 25균주를 대상으로 18종 수산용 항생제에 대한 다양한 환경 조건하에서의 실험결과를 비교한 결과, 각 균주에 대한 MIC panel의 최적화 배양 조건을 결정할 수 있었다(Table 4). *S. parauberis*-3 균주의 doxycycline 결과를 확인하면, 5% LHB를 첨가하고 28°C에서 배양한 panel에서는 MIC 값이 16 µg/mL로 명확하게 나타났다. 나머지 8가지의 다른 조건에서는 탁도가 불분명해 값을 결정하기가 어려운 경우가 있었고, 8-16 µg/mL의 MIC 값을 보였다(data not shown). *S. parauberis* 중 한 균주는 1% NaCl의 첨가 유무에 따라 다른 환경조건에 비하여 neomycin의 MIC 값이 3-4배 정도 차이를 보이는 경우가 있었다. *Streptococcus* spp. 5균주 모두에 대한 MIC 값을 분석한 결과, 5% LHB를 첨가하고 28°C에서 배양하는 것이 가장 최적화 조건인 것으로 확인되었으며, 이는 CLSI에서 권고하는 사항과 동일하다. *E. tarda*의 경우도 연쇄구균과 유사하게 MIC 값이 조건에 따라 큰 차이를 보이지는 않았으나 28°C에서 배양한 panel에서 다른 조건들에 비하여 명확한 MIC 값을 보였다.

Vibrio spp.는 1% NaCl을 첨가한 조건의 panel에서 bottom이 더 명확하게 나타났으며, 염분에 민감한 *Vibrio* spp.는 CLSI에서 권고한 1% NaCl이 들어간 CAMHBT 배지를 이용하는 것이 MIC 값 분석에 가장 적절한 것으로 확인되었다. 온도 설정

실험에서는 *Vibrio* sp. 균주가 35°C의 조건하에서 전혀 배양되지 않았으므로, 35°C는 *Vibrio* spp.의 배양 조건에 적합하지 않은 것으로 판명되었다. 그러므로, *Vibrio* spp.는 1% NaCl을 첨가한 CAMHBT 배지를 이용하여 실험을 실시하고 28°C에서 panel을 배양하는 것으로 최적화 조건을 설정하였다.

Aeromonas spp.는 6가지 조건을 달리하여 실험을 실시하였으며, 모든 조건에서 유사한 MIC 값을 나타내었지만, *A. sobria*는 35°C에서 배양한 panel에서는 세균이 배양되지 않았다. 그러므로, 35°C의 배양 조건을 제외시켰으며, 1% NaCl 첨가 유무와 22°C, 28°C의 조건에서 측정된 MIC 값을 비교한 결과, 1% NaCl이 첨가된 결과에서는 특정 항생제에 상이한 값이 확인되는 경우도 있었으며, 22°C에 배양한 panel은 세균의 탁도가 명확하지 않아 적절한 조건이 아닌 것으로 확인되었다.

Pseudomonas spp. 균주는 온도 설정 조건에 대해서만 실험을 진행하였으며, 22°C, 28°C 및 35°C 모두에서 유사한 값을

확인할 수 있었으나, 가장 명확한 bottom을 나타낸 것은 28°C에서 배양한 panel이었다. 이와 같은 결과를 바탕으로 *E. tarda*, *Aeromonas* spp. 그리고 *Pseudomonas* spp.는 CAMHBT 배지를 이용하여 28°C에서 배양하는 것으로 최적화 조건을 설정하였다(Table 4). 최적화된 조건을 적용하여 확인한 MIC값은 Table 5와 Table 6에 나타내었다.

고 찰

수산업에서는 양식현장에서 연중 발생하는 연쇄구균병, 에드워드병, 비브리오병 등과 같은 세균성 질병에 의한 피해를 막고 생산성 향상을 위한 수단으로서 항생제를 사용한다. 현재 국내에서 승인된 수산용 항생·항균물질은 36종으로 다양한 항생제를 양식장에서 사용하고 있으며(NIFS, 2018), 제주지역에서의 수산용 항생제 사용량은 2012년도에는 35톤이었지만 2015년도에는 48톤으로 약 13톤 증가하였다(Kim et al., 2019). 이와

Table 3. List of bacterial strains used in this study

Bacteria	Year	Location	Host fish	Source
<i>Streptococcus parauberis</i> -1	2019			
<i>S. parauberis</i> -2	2019			
<i>S. parauberis</i> -3	2019	Jeju	Olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i>	This study
<i>S. iniae</i> -1	2015			
<i>S. iniae</i> -2	2015			
<i>Edwardsiella tarda</i> -1	2019			
<i>E. tarda</i> -2	2019			
<i>E. tarda</i> -3	2019	Jeju	Olive flounder <i>P. olivaceus</i>	This study
<i>E. tarda</i> -4	2015			
<i>E. tarda</i> -5	2015			
<i>Vibrio alginolyticus</i>	2018			
<i>V. anguillarum</i>	2013			
<i>V. parahaemolyticus</i>	2013	Jeju	Olive flounder <i>P. olivaceus</i>	This study
<i>Vibrio</i> sp.	2015			
<i>V. harveyi</i>	2015			
<i>Aeromonas caviae</i>	2018	Jeonnam	Eel <i>Anguilla japonica</i>	NIFS ¹ , 18FBACa0003
<i>A. hydrophila</i>	2018	Jeonnam	Eel <i>A. japonica</i>	NIFS, 18FBAbhy0003
<i>A. sobria</i>	2019	Gangwon	Rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	NIFS, 19FBASo0001
<i>A. veronii</i>	2018	Busan	Eel <i>A. japonica</i>	NIFS, 18FBABVe0001
<i>A. salmonicida</i>	2018	Gyeonggi	Masu salmon <i>Oncorhynchus masou masou</i>	NIFS, 18FBASa000
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	2015	Sacheon	-	NIFS, FPa4754
<i>P. monteilii</i>	2015	Jeju	Olive flounder <i>P. olivaceus</i>	NIFS, FPa4827
<i>P. fluorescens</i>	-	Jeju	Olive flounder <i>P. olivaceus</i>	NIFS, FP6086
<i>P. protegens</i>	2016	Gyeongbuk	Freshwater fish	NIFS
<i>P. putida</i>	2019	Yeosu	Korean Rockfish <i>Sebastes schlegelii</i>	NIFS, 19FBPPU0001

¹NIFS, National Institute of Fisheries Science, Korea.

같이 수산생물의 생산량 증가와 함께 질병 발생이 증가하면서 항생제의 사용량도 매년 증가하고 있는 추세이다. 의약품의 사용량이 증가함에 따라 오남용으로 인한 위험성이 고조되고 있

으나, 즉시 항생제의 사용을 줄이는 것은 불가능하기 때문에 현재로서는 유효 항생제를 용법과 용량에 맞도록 사용하는 것이 최선의 방법이다. 세균의 신속한 동정과 항생제 감수성 검사는 양식현장에서 항생제를 선택하는데 있어서 중요한 역할을 한다. 질병의 원인 세균을 동정하고 항생제 감수성 검사 시간을 단축하는 것은 광범위 항생제를 경험적으로 투여하는 대신 해당 균에 대하여 효과가 검증된 항생제를 효율적이고 신속하게 투여할 수 있도록 한다.

이전의 연구에 사용했던 항생제 감수성 검사 중 broth microdilution test의 방법은 단계별로 희석한 항생제와 균 배양액을 96 well plate에 넣고 배양한 후 균의 증식 여부에 따른 액체배지의 혼탁도를 육안으로 확인하여 균이 자라지 않는 최소농도를 MIC값으로 판독한다. Broth microdilution test 방법에 비하여 간편하며 이전부터 많이 사용된 disk diffusion test의 방법은 희

Table 4. Optimized culture conditions of MIC panel for representative bacterial species

Species	Culture conditions
<i>Streptococcus</i> spp.	CAMHBT ¹ +5% LHB ² , 28°C
<i>Edwardsiella tarda</i>	CAMHBT, 28°C
<i>Vibrio</i> spp.	CAMHBT+1% NaCl, 28°C
<i>Aeromonas</i> spp.	CAMHBT, 28°C
<i>Pseudomonas</i> spp.	CAMHBT, 28°C

¹CAMHBT, Cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer. ²LHB, Lysed horse blood. *Incubation time, 24h.

Table 5. MIC results for representative fish pathogenic bacteria in optimized culture conditions of the KRAQ1 panel determined in this study

Optimizing Conditions	Bacteria	Antibiotics (KRAQ1 panel)									
		OXY	XNL	FLUQ	ENRO	NEO	AMP	AUG2	DOX	SXT	FIS
CAMHBT ¹ +5% LHB ² 28°C	<i>S. parauberis</i> -1	256	2	128	0.25	8	< 1	< 1/0.5	16	0.5/9.5	> 1024
	<i>S. parauberis</i> -2	256	2	64	0.5	16	< 1	< 1/0.5	16	0.5/9.5	> 1024
	<i>S. parauberis</i> -3	128	2	64	0.5	8	< 1	< 1/0.5	16	0.5/9.5	> 1024
	<i>S. iniae</i> -1	< 0.25	0.06	64	0.5	32	< 1	< 1/0.5	< 0.25	< 0.12/2.38	> 1024
	<i>S. iniae</i> -2	0.5	< 0.03	32	0.25	32	< 1	< 1/0.5	< 0.25	< 0.12/2.38	> 1024
CAMHBT 28°C	<i>E. tarda</i> -1	< 0.25	0.06	2	0.25	4	< 1	2/1	1	< 0.12/2.38	> 1024
	<i>E. tarda</i> -2	0.5	0.25	2	0.25	2	2	2/1	1	< 0.12/2.38	> 1024
	<i>E. tarda</i> -3	< 0.25	0.25	2	0.25	4	4	4/2	1	< 0.12/2.38	< 16
	<i>E. tarda</i> -4	256	0.12	2	0.5	2	2	4/2	64	> 16/304	> 1024
	<i>E. tarda</i> -5	256	0.12	8	8	4	> 256	8/4	> 64	> 16/304	> 1024
CAMHBT +1% NaCl 28°C	<i>V. alginolyticus</i>	0.5	2	0.5	0.5	8	> 256	8/4	< 0.25	< 0.12/2.38	32
	<i>V. anguillarum</i>	< 0.25	< 0.03	< 0.12	< 0.03	8	16	16/8	< 0.25	< 0.12/2.38	32
	<i>V. parahaemolyticus</i>	128	1	4	0.5	4	4	8/4	8	< 0.12/2.38	1024
	<i>Vibrio</i> sp.	0.5	0.25	0.5	0.12	16	> 256	32/16	< 0.25	< 0.12/2.38	512
	<i>V. harveyi</i>	0.5	2	128	16	8	> 256	16/8	< 0.25	0.25/4.75	> 1024
CAMHBT 28°C	<i>A. caviae</i>	256	16	> 128	> 32	16	> 256	32/16	32	> 16/304	> 1024
	<i>A. hydrophila</i>	256	16	> 128	32	16	> 256	32/16	> 64	> 16/304	> 1024
	<i>A. sobria</i>	16	0.25	0.5	0.12	2	128	8/4	1	< 0.12/2.38	< 16
	<i>A. veronii</i>	64	1	0.25	0.25	4	> 256	16/8	8	< 0.12/2.38	> 1024
	<i>A. salmonicida</i>	< 0.25	4	< 0.12	< 0.03	4	> 256	16/8	< 0.25	< 0.12/2.38	< 16
CAMHBT 28°C	<i>P. plecoglossicida</i>	4	32	16	0.5	1	> 256	64/32	2	16/304	> 1024
	<i>P. montellii</i>	4	32	8	1	1	256	64/32	2	16/304	> 1024
	<i>P. fluorescens</i>	1	64	8	0.5	1	> 256	> 256/128	1	8/152	1024
	<i>P. protegens</i>	4	64	8	1	2	> 256	256/128	4	8/152	1024
	<i>P. putida</i>	2	32	8	2	2	256	64/32	1	16/304	> 1024

¹CAMHBT, Cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer. ²LHB, Lysed horse blood. *OXY, oxytetracycline; XNL, ceftiofur; FLUQ, flumequine; ENRO, enrofloxacin; NEO, neomycin; AMP, ampicillin; AUG2, amoxicillin/clavulanic acid; DOX, doxycycline; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; FIS, sulfisoxazole.

석한 균주를 배지에 도말하고 항생제 disk를 고착시킨 후 균의 증식 억제대를 판독한다(NIFS, 2017). Broth microdilution test 방법은 다양한 항생제를 직접 단계희석하여 농도별로 96 well plate에 넣어야 하는 번거로움이 있으며, 실험균의 탁도를 맞출 때 분광광도계를 이용하기 때문에 실험의 준비 과정이 복잡하다는 단점이 있다. MIC panel을 사용한 broth microdilution test 방법은 항생제가 coating되어 나오는 제품으로 항생제 감수성 검사 시간을 단축시킬 수 있을 뿐만 아니라, 연구자에 의한 분석 절차를 줄여서 실험적 오류를 최소화시킬 수 있다. 또한, 신속하고 정확한 결과를 제공할 수 있으므로, 양식현장에 더욱 효율적인 분석방법이 될 수 있을 것이다.

현재로서는 어병세균에 대한 정확한 배양조건에 대한 정보가

부족한 실정이며, 본 연구에서는 최대한 많은 세균에 동일한 조건이 적용될 수 있는 범위에서 실험을 진행하여 조건이 설정된 후에도 실험이 간편하게 진행될 수 있도록 최적화 배양 조건을 확립하고자 하였다. *Streptococcus* spp.는 5% LHB를 첨가한 CAMHBT 배지, *Vibrio* spp.는 1% NaCl을 첨가한 CAMHBT 배지, *E. tarda*, *Aeromonas* spp. 그리고 *Pseudomonas* spp.는 CAMHBT 배지를 이용하여 KRAQ1 panel과 CAMPY2 panel에 접종하고 28°C에서 24시간 배양하여 결과를 확인하는 것으로 최적화 조건을 설정하였다.

본 연구를 통하여 확립한 배양 조건을 검증하기 위하여, MIC panel의 실험에 사용한 균주 중 *S. parauberis* 3균주와 *E. tarda* 3균주를 disk diffusion test로 실험을 실시한 후 비교 분석하였다.

Table 6. MIC results for representative fish pathogenic bacteria in optimized culture conditions of the CAMPY2 panel determined in this study

Optimizing Conditions	Bacteria	Antibiotics (CAMPY2 panel)							
		AZI	CIP	CLI	ERY	FFN	GEN	NAL	TET
CAMHBT ¹ +5% LHB ² 28°C	<i>S. parauberis</i> -1	> 64	0.25	4	> 64	1	2	> 64	> 64
	<i>S. parauberis</i> -2	> 64	0.5	> 16	> 64	1	2	> 64	> 64
	<i>S. parauberis</i> -3	> 64	0.5	4	> 64	1	2	> 64	> 64
	<i>S. iniae</i> -1	0.12	1	0.06	< 0.03	1	8	> 64	0.25
	<i>S. iniae</i> -2	0.12	0.5	0.06	0.06	1	8	> 64	1
CAMHBT 28°C	<i>E. tarda</i> -1	16	0.06	> 16	16	0.5	1	32	0.5
	<i>E. tarda</i> -2	32	0.12	> 16	64	0.5	2	> 64	1
	<i>E. tarda</i> -3	32	0.12	> 16	64	1	2	> 64	1
	<i>E. tarda</i> -4	> 64	0.06	> 16	> 64	0.5	2	64	> 64
	<i>E. tarda</i> -5	16	1	> 16	32	0.5	1	64	> 64
CAMHBT+1% NaCl 28°C	<i>V. alginolyticus</i>	1	0.5	> 16	4	0.5	2	< 4	0.5
	<i>V. anguillarum</i>	1	< 0.015	4	4	0.5	2	< 4	0.25
	<i>V. parahaemolyticus</i>	16	0.06	> 16	> 64	16	2	8	32
	<i>Vibrio</i> sp.	2	0.06	> 16	8	1	8	< 4	1
	<i>V. harveyi</i>	8	16	> 16	16	1	4	> 64	1
CAMHBT 28°C	<i>A. caviae</i>	16	> 64	> 16	64	> 64	1	> 64	> 64
	<i>A. hydrophila</i>	> 64	32	> 16	> 64	> 64	1	> 64	> 64
	<i>A. sobria</i>	0.5	0.06	> 16	1	0.25	0.5	32	8
	<i>A. veronii</i>	2	0.12	> 16	8	0.5	1	> 64	16
	<i>A. salmonicida</i>	4	< 0.015	> 16	16	0.5	2	< 4	0.25
CAMHBT 28°C	<i>P. plecoglossicida</i>	> 64	0.12	> 16	> 64	> 64	0.5	32	4
	<i>P. montellii</i>	> 64	0.25	> 16	> 64	> 64	1	32	4
	<i>P. fluorescens</i>	> 64	0.12	16	> 64	64	0.25	16	2
	<i>P. protegens</i>	> 64	0.12	> 16	> 64	> 64	0.5	32	8
	<i>P. putida</i>	> 64	0.12	> 16	> 64	> 64	1	16	4

¹CAMHBT, Cation-adjusted Mueller-Hinton broth with TES buffer. ²LHB, Lysed horse blood. *AZI, azithromycin; CIP, ciprofloxacin; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; NAL, nalidixic acid; TET, tetracycline.

그 결과, 균의 농도를 정확하게 맞추어 실험이 진행되는 MIC panel과 비교하여 disk diffusion test 방법은 세균의 종류에 따라 균이 평판배지에서 성장하는 속도가 다르게 나타나 생성되는 저지대에 차이를 보이는 경우가 있었다(data not shown). MIC panel을 사용한 분석에서는 결과를 명확하게 확인할 수 있었고 다른 조건에 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

인체나 가축에 질병을 일으키는 세균의 항생제에 대한 감수성과 내성을 구분할 수 있는 해석기준(interpretive criteria)에 관한 연구들은 많이 이루어졌으나, 어류의 세균에 관한 내성 판단을 위한 표준화 작업은 부족한 실정이다. 예를 들어 현재 많은 관련 실험실에서 참고하는 국제 프로토콜인 CLSI 가이드라인 중 VET03/VET04-S2 (CLSI, 2014b)는 어병세균용으로 마련된 국제 표준 방법인데도 불구하고 *A. salmonicida* 한 종에 대해서만 해석기준이 마련되어 있다. 최근 국내에서 수산용 항생제에 대한 내성 기준과 매뉴얼에 대한 연구가 진행되고 있지만 (Chun et al., 2019), 다양한 어병세균을 대상으로 실험이 이루어져 있지 않기 때문에 세균성 질병 발생 시 초기 치료로 적절한 유효 항생제 선택에 어려움이 많다. 또한 이러한 세균종별 항생제 해석기준의 부재로 인하여 내성이 증가되고, 내성균에 의한 치료 실패가 중요한 임상적 문제로써 대두됨에 따라 수산용 항생제에 대한 내성 판정 기준을 명확히 설정할 필요가 있다. 그리고, 세균성 질병의 치료를 위한 항생제 선정과 항생제 내성 연구를 위해 동일한 방법의 검사가 필요하며, 다양한 검사 능력을 갖고 있는 검사자 혹은 연구자가 쉽게 이해하고 실행할 수 있는 검사법의 설정이 필요하기 때문에 본 연구에서의 항생제 panel을 이용한 액체 배지 희석법은 항생제 내성 검사를 위한 표준화된 방법으로 제시될 수 있다. 본 연구에서 확립한 최적화된 조건을 사용하여 많은 균주를 대상으로 신속하고 정확한 MIC값을 분석하고 내성균에 대한 정보를 축적함으로써, 향후 수산생물 병원성 세균에 대한 항생제 내성 판정을 위한 기준 설정이 가능할 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 국립수산물과학원 수산과학연구사업(R2020061)의 지원에 의해 수행되었습니다.

References

- Chun WK, Lee YH, Kim YJ, Roh HJ, Kim AR, Kim NE, Seo JS, Kwon MG, Lee JH and Kim DH. 2019. Epidemiological cut-off values Generated for disc diffusion data from *Streptococcus parauberis*. Korean J Fish Aquat Sci 52, 382-388. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2019.0382>.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2006. Method for antimicrobial disk susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals. CLSI document M42-A. CLSI, Wayne, PA, U.S.A.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2014a. Methods for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals. CLSI document VET04-A2. CLSI, Wayne, PA, U.S.A.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2014b. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; Second informational supplement. CLSI document VET03/ VET04-S2. CLSI, Wayne, PA, U.S.A.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2020. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; thirtieth informational supplement. CLSI document M100-ED30. CLSI, Wayne, PA, U.S.A.
- Demircan D and Candan A. 2006. Identification of *Vibrio anguillarum* by PCR (*rpoN* Gene) associated with Vibriosis in marine fish in Turkey. Turk J Vet Anim Sci 30, 305-310.
- EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) web site. 2020. Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method, Version 8.0. Retrieved from https://eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2020_manuals/Manual_v_8.0_EUCAST_Disk_Test_2020.pdf on Jan 10, 2020.
- JSA (the Federal Joint Subcommittee on Aquaculture). 1994. Guide to drug, vaccine, and pesticide use in aquaculture. Texas A&M University, Texas agricultural extension service, B-5085.
- Kim HJ, Ryu JO, Lee SY, Kim ES and Kim HY. 2015. Multiplex PCR for detection of the *Vibrio* genus and five pathogenic *Vibrio* species with primer sets designed using comparative genomics. BMC Microbiol 15, 239. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0577-3>.
- Kim MS, Cho JY and Choi HS. 2014. Identification of *Vibrio harveyi*, *Vibrio ichthyenteri* and *Photobacterium damsela* isolated from olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea by multiplex PCR developed using the *rpoB* gene. J Fish Sci 80, 333-339. <https://doi.org/10.1007/s12562-014-0702-5>.
- Kim YJ, Seo JS, Park JO, Jeong AH and Lee JH. 2019. Monitoring of aquatic medicine managements in South Korea. J Fish Pathol 32, 37-43. <https://doi.org/10.7847/jfp.2019.32.1.037>.
- Lee DW, Jun LJ and Jeong JB. 2017. Distribution of tetracycline resistance genes in pathogenic bacteria isolated from cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Jeju in 2016. JFMSE 29, 834-846. <https://doi.org/10.13000/JFMSE.2017.29.3.834>.
- NIFS (National Institute of Fisheries Science). 2017. Antibiotic resistant bacteria inspection manual (11-1192266-000195-01). GMK communication, Busan, Korea, 34-49.
- NIFS (National Institute of Fisheries Science). 2018. Aquatic medicine catalog. Aquatic Disease Control Division, Busan, Korea, 12-101.
- Noga EJ. 1996. Diagnosis and treatment. In: Fish disease. Mos-

by-Year Book, Inc., St. Louis, MO, U.S.A., 19-215.

- Sakai T, Iida T, Osatomi K and Kanai K. 2007. Detection of type 1 fimbrial genes in fish pathogenic and non-pathogenic *Edwardsiella tarda* strains by PCR. Fish Pathol 42, 115-117. <https://doi.org/10.3147/jsfp.42.115>.
- Son KT, Jo MR, Oh EG, Mok JS, Kwon JY, Lee TS, Song KC, Kim PH and Lee HJ. 2011. Residues of Ampicillin and Amoxicillin in Olive Flounder *Parlichthys oliveceus* Following Oral Administration. Korean J Fish Aquat Sci 44, 464-469. <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2011.0464>.
- Woo SH, Kim HJ, Lee JS, Kim JW and Park SI. 2006. Pathogenicity and classification of streptococci isolated from cultured marine fishes. J Fish Pathol 19, 17-33.
- Woodward KN. 1996. The regulation of fish medicines - UK and European Union aspects. Aquac Res 27, 725-734. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1996.00782..x>.