



## ***Streptococcus parauberis* PH0710에 감염된 강도다리(*Platichthys stellatus*)에 대한 항생제 Enrofloxacin의 유효성 및 안전성 조사**

주민수 · 김보성\* · 김도형\*\* · 서정수\*\*\* · 권문경\*\*\*\* · 지보영\*\*\*\* · 박찬일†  
경상대학교(학생) · \*부경대학교(학생) · \*\*부경대학교(교수) · \*\*\*국립수산과학원(연구사) · \*\*\*\*국립수산과학원(연구관) · †경상대학교(교수)

### **The efficacy and Safety of Enrofloxacin Antibiotics to *Streptococcus parauberis* PH0710 Infected Starry Flounder (*Platichthys stellatus*)**

Min-Soo JOO · Boseong KIM\* · Do-Hyung KIM\*\* · Jung-Soo SEO\*\*\* ·  
Mun-Gyeong KWON\*\*\*\* · Bo-Young JEE\*\*\*\* · Chan-Il PARK†

Gyeongsang National University(student) · \*Pukyong National University(student) ·

\*\*Pukyong National University(professor) · \*\*\*National Institute of Fisheries Science (researcher) ·

\*\*\*\*National Institute of Fisheries Science(senior researcher) · †Gyeongsang National University(professor)

#### **Abstract**

Starry flounder (*Platichthys stellatus*) is distributed in the North Pacific and is cultured in Korea. The abuse of antibiotics caused the emergence of resistant bacterial strains, and now more effective antibiotics are needed. Enrofloxacin, which is veterinary antibiotics, has good effects on fishery bacteria and can be prescribed and purchased by veterinarians. But it is illegal to prescribe and sell by the fisheries disease managers. In order to utilize available antibiotics and prevent illegal use of veterinary medicines, it is necessary to recommend effective dose and administration methods determined based on the research. The enrofloxacin was intramuscularly injected at different concentrations in the starry flounder infected with *Streptococcus parauberis*. In addition, enrofloxacin was administered by different methods to investigate the therapeutic effect of each administration method. In order to evaluate the safety of antibiotics, blood, muscle, kidney and liver were excised and histopathologic examination and hematological analysis were performed. The appropriate concentration of enrofloxacin is 5 mg/kg, and oral administration was found to be effective. Serological analysis showed that AST levels increased on day 1 after high-dose injection, and enrofloxacin also showed weak toxicity to the tissues of the starry flounder. These results could be used as basic data for the application of enrofloxacin antibiotics in the fisheries disease management. After that, the fisheries disease managers will be able to prescribe and sell enrofloxacin antibiotics.

**Key words : Enrofloxacin, Starry flounder, *Streptococcus parauberis*, Efficacy, Safety**

#### **I. 서론**

강도다리, *Platichthys stellatus*는 가자미목 가자

미과의 어류이며 미국 서부 연안과 Bering 해로  
부터 동해에 이르는 북태평양에 넓게 분포하고  
수심 80-350 m 정도의 부드러운 모래질이 분

† Corresponding author : 055-772-9153, vinus96@hanmail.net

※ 이 논문은 부경대학교 자율창의학술연구비(2016년)에 의해 연구되었음.

포한 해역에서 많이 서식한다. 일반적으로 몸길이가 30-40 cm 정도로 자라며, 저염분에 대한 저항성이 강해 강물이 유입되는 기수 지역에서도 서식하며 주로 12월에서 1월 사이에 산란한다(Kramer et al., 1995; Orcutt, 1950). 우리나라의 경우 강도다리 양식어가 수가 늘어나고 있는 추세이며 상업적 가치가 높아지고 있다.

수산 양식업은 전 세계적인 식량산업으로 급성장하였고 수산생물의 생산량이 증가하고 있지만 양식장 환경 낙후, 과밀사육 등으로 인한 질병 발생이 증가하였다. 양식장에서는 세균성 질병에 의한 어류의 폐사를 감소시키기 위해 질병 예방과 치료의 목적으로 주로 수산용 동물용 의약품을 사용하고 있다. 수산용 의약품은 감염성 질병의 치료제로 널리 쓰이고 있으며 주요 국가와 제약회사에서는 각 항생제의 용량 및 용법을 제시하고 있다. 따라서 항생제의 사용 설명서에 따른 사용은 수산생물의 질병을 효과적으로 치료하여 건강한 수산생물의 생산성 증대에 기여할 수 있다.

하지만 적절한 세균학적 검사 없이 항생제를 무분별하게 오남용하여 기존의 항생제에 대해 저항성을 가지는 항생제 내성 균주가 출현하게 되었다(Lalumera et al., 2004; Smith et al., 1994). 수산용 의약품에 내성을 가지는 균주를 억제하기 위해서는 새로운 의약품을 사용하여야 한다. 현재 축산업에서 사용되고 있는 동물용 의약품 중 어류 세균에도 좋은 치료 효과를 나타내는 항생제들은 수의사로부터 처방받고 구매하여야 사용할 수 있다. 하지만 이 동물용 의약품은 어종별, 항생제별로 적절한 용량 및 용법이 정해져 있지 않으며, 수산질병관리사를 통한 처방 및 구매는 불법인 상황이다. 그런데, 일부 양식 어가에서 수산질병관리사로부터 처방을 받고 구매를 하는 사례가 발생하고 동물용 의약품을 불법적으로 사용하게 됨으로써 양식생물의 안정성 및 수산 식품의 공중위생학적 안전성에 심각한 문제를 야기하게 되었다. 더욱이 수산용 의약품의 사용 현황

파악 및 오남용 방지를 위한 체계화된 모니터링 프로그램 부재로 사용량과 그 범위가 파악되지 않고 있는 실정이다.

Enrofloxacin은 현재 동물용 의약품으로 사용되고 있으며, 주로 소, 돼지, 닭, 칠면조 등의 호흡기, 소화기 등의 감염 치료제이다. Enrofloxacin은 플루오르퀴놀론계 2세대 항생물질로써 그람 음성 세균과 mycoplasma에 강한 활성을 나타내고 그람 양성 세균에는 중등도의 활성을 나타낸다(Brown, 1996; Greene and Budsberg, 1993). Enrofloxacin은 DNA gyrase의 활성을 저해함으로써 세균의 DNA 합성을 차단하여 살균 작용을 나타낸다. Enrofloxacin은 경구 투여와 비 경구 투여(근육 주사, 침지 등) 모두 양호한 흡수율을 나타내기 때문에(Escribano et al., 1996; Tyczkowska et al., 1989) 사료나 식수에 혼합하여 경구 투여하는 경우가 많다. 그러나 국내에서 수산용으로는 사용이 금지된 의약품으로 알려져 있다.

세균성 질병에 감염된 어류를 치료하기 위해 oxytetracycline, potentiated sulfonamide뿐 아니라 특히 oxolinic acid를 많이 사용해 왔지만(Austin et al., 1983), 어류 양식에서 이러한 항생제들에 대한 내성 균주가 출현하게 되었다(Hasting and McKay, 1987). 그리고 enrofloxacin은 어류 세균 감염을 치료함에 있어서 oxolinic acid보다 더 효과적이라고 보고되어 있다(Bragg and Todd, 1988; Stamm, 1989; Tsoumas et al., 1989). 이러한 이유 때문에 일부 양식어가에서 enrofloxacin을 어류에 부적절하게 사용하는 경우가 발생하고 있다.

동물용 의약품의 불법 사용을 차단하기 위해서는 해당 약품에 대한 어종별 감수성 시험 및 효능 연구를 바탕으로 결정된 투약 권장 농도를 제시하고, 또한 양식 어업인이 자신의 양식장에서 사용한 약품의 사용 일지 작성을 법적으로 의무화해야 할 것이며, 수산질병관리사나 수의사 등의 처방전에 의한 약품 구입이 반드시 수반되는 양식 어류의 치료행위가 이루어져야 한다.

연쇄구균병은 담수와 해수의 다양한 어류에서

발병하며, 주요 원인체로는 *Lactococcus garvieae*, *S. iniae*, *S. parauberis* 등이 알려져 있다(Austin and Austin, 1999; Kitao, 1993; Kusuda and Salati, 1993). 수년 전부터는 *S. iniae*에 의한 피해보다 *S. parauberis*에 의한 피해가 더 빈번하게 발생하고 있으며 양식 넘치뿐만 아니라 양식 강도다리에도 발병하고 있다(Woo and Park, 2013). *S. parauberis*에 감염된 어류는 외부 증상으로 출혈 및 농양을 동반한 안구 돌출, 체색 흑화 등이 나타나고 내부 증상으로는 비장 및 간 비대, 복부와 복벽의 점상출혈 등이 나타난다고 알려져 있다(Doménech et al., 1996). *S. parauberis* PH0710에 감염된 양식 강도다리의 경우 안구돌출, 안구 주변 농양 및 출혈, 복부 팽만 등의 외부 증상과 간의 출혈 및 울혈 등의 내부 증상이 나타났고 조직학적 소견으로는 간 조직 전체의 심한 괴사, 염증반응 및 농양형성 등의 증상이 나타났다고 보고된 바 있다(Cho et al., 2008).

이번 연구에서는 우리나라의 강도다리 양식 현장에서 발생하는 주요한 질병인 연쇄구균병에 대한 치료제로써 불법 사용되고 있는 enrofloxacin의 유효성 및 안전성에 관한 연구를 수행하였다. 이를 통해 연쇄구균병에 효과적인 치료농도와 투여 방법을 제공함으로써 양식 현장에 바로 적용 가능한 자료로 역할을 하며 이 항생제가 국내 수산용 의약품으로의 허가를 필요로 할 시 안전성, 유효성 심사의 기초 자료로써도 사용할 수 있도록 하고자 한다. 또한, 수산 동물용 의약품으로 허가가 이루어진 후 수의사뿐만 아니라 수산질병 관리사도 처방과 판매를 할 수 있도록 하는 데에 그 목적이 있다.

## II. 조사방법 및 내용

### 1. 사용 균주

경상북도 포항 소재의 육상수조식 양식장에서 연쇄구균병에 감염된 강도다리로부터 분리된 *S.*

*parauberis* PH0710 균주를 분양받아 사용하였다(Cho et al., 2008). 사용 균주의 배양은 1% NaCl이 첨가된 Brain Heart Infusion Agar (BHIA; Difco., USA) 증균 배지를 사용하여 27°C에서 24시간 배양하였고 배양된 균주는 인위 감염 실험에 사용하였다. 균주는 실험에 사용될 때까지 -80°C에 보존하였다.

<Table 1> Specific primer for *S. parauberis* detection

Primer	Sequences (5'→3')	Target gene	Product size (bp)	Ref.
Spa2152	TTTCGCTCTGA GGCAATGTTG	23s rRNA	718	Mata et al., 2004
Spa2870	GCTTCATATA TCGCTATACT			

### 2. 균주

-80°C에 보관되어 있던 *S. parauberis* PH0710 균주는 특이적인 primer (<Table 1>)를 이용한 polymerase chain reaction (PCR)로 해당 균종을 확인하였으며, 이후 진행된 실험에서 인위 감염 후 폐사한 모든 개체의 신장과 비장으로부터 균을 재 분리하여 동정하였고 실험 종료 후 생존 개체들에서 분리된 균 또한 확인하였다. PCR 조건은 94°C에서 2분간 initial denaturation 하고, 후에 92°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 90초를 1회로 하여 총 25회 반응시켰으며, 마지막으로 72°C에서 5분간 final extension 하였다.

### 3. Enrofloxacin의 유효성 조사 및 안전성 검사

#### 가. 실험어

실험어는 경상북도 포항 소재의 한 양식장에서부터 구입한 강도다리로 *S. parauberis*에 감염된 이력이 없는 것을 사용하였다. 투약 농도별 실험에 사용된 강도다리는 평균 체장 19 ± 1.28 cm, 평균 체중 95 ± 13.6 g이었으며 투약 방법별 실험

험과 안전성 검사에 사용된 강도다리는 평균 체장  $17.6 \pm 1.31$  cm, 평균 체중  $82.5 \pm 15.7$  g 이었다. 실험에 사용하기 전 일주일간 250 L의 유수식 수조에 순치하였다. 수조의 유수량은 수조 당 1.44 L/min이었고 지속적인 유수를 통하여 수질을 유지하였다.

#### 나. 사용 항생제

Enrofloxacin은 (주)대한뉴팜에서 제조한 엔로신 50주(본제 1 mL 당 50 mg 함유)를 사용하였다.

#### 다. 투약 농도별 유효성 조사

강도다리에 대한 enrofloxacin의 투약 농도별 유효성을 알아보기 위하여 인위 감염 시킨 후 항생제 농도별 각 그룹의 폐사율을 확인하였다. 음성 대조군, 양성 대조군, 2.5 mg/kg, 5 mg/kg의 네 가지 구간에 각 10마리의 강도다리를 분배하였다. 수조의 수온을 24-25°C로 유지하였으며 인위 감염을 위해 *S. parauberis* PH0710 균주를  $1.5 \times 10^4$  CFU/fish의 농도로 100  $\mu$ L를 피하 주사하였다. 실험군은 세균 접종 1일 후에 enrofloxacin을 체중(kg) 당 각각 2.5 mg, 5 mg이 되도록 멸균한 증류수에 희석하여 1 mL 멸균주사기로 등 근육에 100  $\mu$ L 주사하였고 실험의 정확성을 위해 3반복 실시하였다. 음성 대조군은 세균 접종 대신 phosphate buffered saline (PBS)를 피하 주사하고 1일 후에 항생제 대신 증류수를 근육주사하였으며 양성 대조군은 세균 접종 1일 후에 항생제 대신 증류수를 근육주사하였다. 인위 감염 후 2주간 폐사율을 관찰하였다. 인위 감염 후 15일째에 각 실험수조의 생존한 개체를 마취시킨 후 해부하고 실험어의 신장을 0.1 g (mL) 채취하여 마쇄한 후 PBS에 현탁하여 단계 희석하고 BHIA 배지에 도말하여 세균 수 및 감염률을 확인하였다.

#### 라. 투약 방법별 유효성 조사

Enrofloxacin의 강도다리에 대한 투약 방법별 유효성을 알아보기 위하여 인위 감염 시킨 후 항생제 투여 방법별 각 그룹의 폐사율을 확인하였다. 음성 대조군, 양성 대조군, 근육 주사, 경구

투여(5 mg/kg, 10 mg/kg)의 네 가지 구간으로 나누어 각 구간 당 10마리의 강도다리를 분배하였다. 실험어를 분배한 후 수온을 24-25°C로 유지하였으며 인위 감염을 위해 *S. parauberis* PH0710 균주를  $1.5 \times 10^4$  CFU/fish의 농도로 100  $\mu$ L를 피하 주사하였다. 근육주사 실험군은 세균 접종 1일 후에 enrofloxacin을 체중(kg)당 5 mg이 되도록 멸균한 증류수에 희석하여 100  $\mu$ L씩 등 근육에 주사하였으며 경구 투여 실험군은 세균 접종 1일 후에 enrofloxacin을 어체중(kg)당 5 mg 또는 10 mg이 되도록 zonde를 사용하여 직접 위장 내로 주사하였다. 1일 1회, 총 10일간 투여하였고 실험의 정확성을 위해 3반복 실시하였다. 음성 대조군은 PBS를 피하 주사하고 1일 후에 증류수를 근육주사하였으며 양성 대조군은 세균 접종 1일 후에 증류수를 근육주사하였다. 인위 감염 후 20일간 관찰하며 폐사율을 확인하였으며 21일째에 각 실험수조의 생존 개체를 마취시킨 후 해부하고 실험어의 신장을 0.1 g (mL) 채취하여 마쇄한 후 PBS에 현탁하여 단계 희석하고 BHIA 배지에 도말하여 세균 수 및 감염률을 확인하였다.

#### 마. 안전성 검사

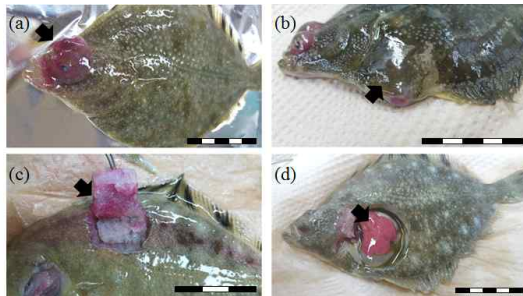
Enrofloxacin이 어체에 미치는 영향을 확인하기 위해 병리조직학적 검사와 혈액학적 검사를 통해 안전성을 확인하였다. 총 세 가지 구간으로 나누어 각 구간 당 20마리의 실험어를 분배하고 수온을 24-25°C로 유지하였다. 멸균 증류수를 100  $\mu$ L만큼 등 근육에 주사한 대조군, enrofloxacin을 5 mg/kg의 농도로 100  $\mu$ L 근육 주사한 실험군, 25 mg/kg의 농도로 100  $\mu$ L 근육 주사한 실험군으로 나누어 실험을 진행하였다. 증류수와 항생제를 주사한 후 1, 2, 5, 10, 20일째에 각각의 수조에서 3마리씩 무작위로 선택하여 마취시킨 후 미부정맥으로부터 혈액을 채취하였고 해부를 통해 간, 신장, 근육(항생제 주사부위)을 적출하였다. 채취한 혈액은 혈청을 분리하여 혈청 분석기(FUJI DRI-CHEM 4000i, Japan)로 Aspartate

aminotransferase (AST)를 분석하였다. 도출된 결과들 사이의 유의차는 one-way analysis of variance (ANOVA) test로 검정하였다. 적출한 조직은 10% 중성 포르말린으로 전 고정하고 해당 시료를 세절하여 동일한 고정액에 후 고정하였다. 이후 70%에서 100% 에탄올로 순차적인 탈수, xylene으로 투명화, paraplant로 치환 과정을 통하여 각 장기를 4 µm 두께로 절편 제작하여 H&E 염색을 실시하였다. 그 후에 염색된 장기 절편들을 광학 현미경상에서 400배율로 관찰하였다.

### III. 결 과

#### 1. *S. parauberis* PH0710에 감염된 강도다리의 증상

강도다리를 *S. parauberis* PH0710 균주로 인위 감염 시킨 후 폐사한 개체들로부터 나타난 증상으로는 외부적으로 안구돌출, 안구 주변 출혈([Fig. 1-a]), 복부팽만([Fig. 1-b]), 근육 내 출혈([Fig. 1-c]), 등의 증상이 나타났으며 내부적으로는 간의 충혈 및 울혈([Fig. 1-d]), 비장의 비대 등의 증상이 나타난 것을 확인할 수 있었다.



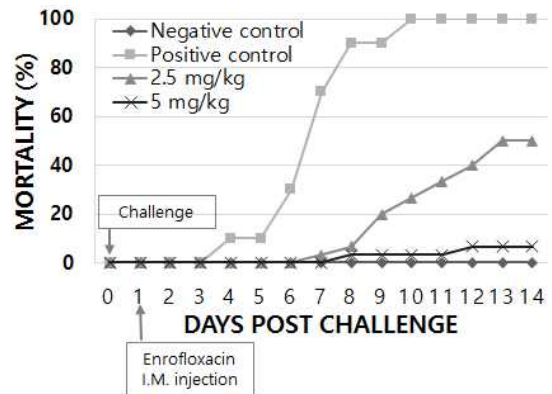
[Fig. 1] Clinical signs of *S. parauberis* PH0710 infected starry flounder, *Platichthys stellatus*. Scale bar is 1 cm per square.

#### 2. Enrofloxacin의 유효성 및 안전성 조사

가. 투약 농도별 유효성 조사

##### (1) 누적 폐사율

최초 폐사는 인위 감염 후 2일째에 양성 대조군에서 발생하였으며 최종 누적 폐사율은 100%였다. 인위 감염 후 7일째부터 2.5 mg/kg 구간에서 폐사가 발생하기 시작하여 3 개의 반복 수조 모두 최종 누적 폐사율은 50%로 확인되었다. 5 mg/kg에서는 한 수조에서만 인위 감염 후 8일째에 폐사가 발생하여 최종 누적 폐사율 6.6%로 나타났다. 음성 대조군에서는 폐사율이 0%로 확인되었다([Fig. 2]).



[Fig. 2] Determination of cumulative mortality from each concentration of enrofloxacin against starry flounder infected with *S. parauberis* PH0710.

##### (2) 생존 개체 내 세균수 측정

실험 후 신장 내 세균수를 측정된 결과, 두 가지 실험군 모두 감염된 개체가 나타나지 않았다 (<Table 2>).

#### 나. 투약 방법별 유효성 조사

##### (1) 누적 폐사율

최초 폐사가 나타난 구간은 감염 후 4일째에 양성 대조군이었고, 최종 누적 폐사율은 100%였다. 감염 후 9일째부터 근육주사 구간에서 폐사하기 시작하여 최종 누적 폐사율은 20%로 나타났다. 두 가지의 경구 투여 그룹에서는 폐사가 발생하지 않았다. 음성 대조군에서는 폐사율이 0%로 확인되었다([Fig. 3]).

<Table 2> The cumulative mortality, infection rate and relative survival rate of efficacy studies in *S. parauberis* PH0710 infected starry flounder by enrofloxacin dosing concentration

Group	Con (-)	Con (+)	2.5 mg/kg	5 mg/kg
Cumulative mortality (%)	0 (0/10)	100 (10/10)	50 (15/30)	6.6 (2/30)
Relative survival rate (%)	100	0	50	93
Infection rate (%) in survival fish	0 (0/0)	-	0 (0/15)	0 (0/28)

(2) 생존 개체 내 생균수 측정

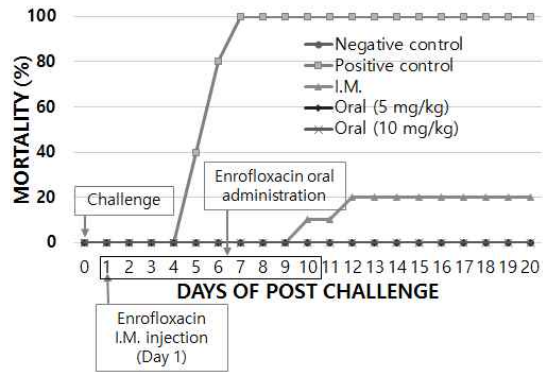
실험 후 신장 내 세균수를 측정한 결과, 근육 주사한 실험군의 감염률은 12.5%로 나타났고 경구 투여한 실험군은 두 그룹 모두 감염률이 0%로 확인되었다(<Table 3>).

다. 안전성 검사

(1) 혈청 내 AST 수치 변동

항생제를 등 근육에 농도별로 주사한 지 1일째에 가장 높은 농도인 25 mg/kg 그룹의 AST 수치가 대조군과 5 mg/kg 그룹의 수치에 비해 약 4배 이상 높게 나타난 것을 확인할 수 있었다. 그 이후 2일째에 다시 대조군, 5 mg/kg 그룹의 수치와

비슷한 수치로 회복되었고 마지막 20일째까지 그 수치를 유지하였다([Fig. 4]).



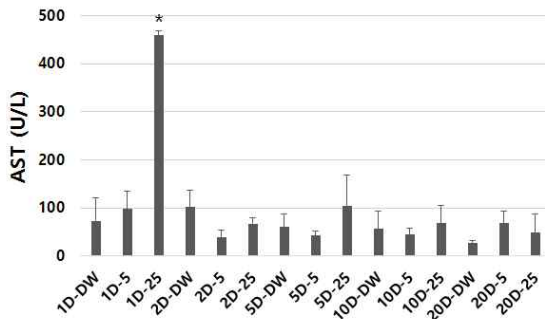
[Fig. 3] Determination of cumulative mortality from each administration method of enrofloxacin against starry flounder infected with *S. parauberis* PH0710.

(2) 근육주사 후 조직 안전성 검사

모든 시간대별 구간에서 대조군을 포함한 대부분의 개체가 지방간이 관찰되는 것을 확인할 수 있었으며 유의적인 차이를 확인할 수 없었다 ([Fig. 5, 6, 7, 8, 9]). 또한 모든 구간에서 근육 조직에 염증 및 괴사가 관찰되었으나([Fig. 5]), 대조군은 주사 2일차부터 근육 조직이 회복된 모습을 보였으며([Fig. 6-c, f, i]), 5 mg/kg 농도로 근육 주사한 실험군은 주사 5일차부터 근육 조직이 회복되는 모습을 보였고([Fig. 7-l, r]) 10일차 이후부터는 완전히 회복되는 것이 확인되었다([Fig. 8-l, o, r]).

<Table 3> The cumulative mortality, infection rate and relative survival rate of efficacy studies in *S. parauberis* PH0710 infected starry flounder by enrofloxacin administration method

Group	Con (-)	Con (+)	I.M.	Oral 5 mg/kg	Oral 10 mg/kg
Cumulative mortality (%)	0 (0/10)	100 (10/10)	20 (2/10)	0 (0/30)	0 (0/30)
Relative survival rate (%)	100	0	80	100	100
Infection rate (%) in survival fish	0 (0/0)	-	12.5 (1/8)	0 (0/30)	0 (0/30)



[Fig. 4] AST values in the plasma of the starry flounders that were injected I.M. with enrofloxacin at each concentration.

이에 비해 25 mg/kg의 농도로 근육 주사한 실험군의 근육조직은 20일차에도 염증이 완전히 회복되지 않은 것을 확인할 수 있었다([Fig. 9-A]). 저농도 및 고농도 항생제 투여 실험군의 신장 조직에서 주사 후 1일차부터 사구체신염이 나타났고([Fig. 5-n, t, w, z]), 10일차까지 회복되지 않는 모습을 보이다가([Fig. 8-k, n, w, z]), 20일차에는 회복된 것으로 확인되었다([Fig. 9]).

#### IV. 고찰

이번 연구에서 *S. parauberis* PH0710 균주에 감염된 강도다리로부터 다양한 병적 증상이 나타나는 것을 확인할 수 있었으며([Fig. 1]) 이는 지난 2007년 동해안의 강도다리 양식장에서 발생한 *S. parauberis* PH0710 감염 증상과 일치했다(Cho et al., 2008). 또한 *S. parauberis*를 주사한 강도다리에서 인위 감염 초기인 3-5일째에 급격한 폐사가 진행된 것을 확인할 수 있었으며 7-8일 후부터는 100%의 폐사율을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. Cho et al.(2008)의 인위감염 실험에서 수온 22℃일 때  $4.2 \times 10^3$ ,  $4.2 \times 10^4$ ,  $4.2 \times 10^5$  CFU/Fish의 농도에서 모두 60%의 폐사율이 나타났으며 결과적으로 강도다리는 *S. parauberis*에 대한 저항성이 매우 낮은 것으로 사료된다.

강도다리에 대한 enrofloxacin의 적정 농도를 알아보기 위해 인위 감염 시킨 강도다리에 항생제를 농도별로 주사하였다. 그 결과 5 mg/kg의 농도가 유효하게 나타나([Fig. 2], <Table 2>) enrofloxacin 항생제는 강도다리 연쇄구균에 대해 효과적이라는 것을 확인하였다. Kim et al.(2006)의 보고에 따르면 enrofloxacin이 어병 세균에 대해 기존의 항생제보다 효과적인 활성을 나타낸다고 하였으며 여러 가지 *S. parauberis* 균주에 대한 디스크 확산법과 최소억제농도(minimal inhibitory concentration, MIC) 값을 조사해 본 결과 대부분의 균주에 대한 저지대가 26-32 mm에 걸쳐 형성되었고 MIC<sub>50</sub>값은 0.25 µg/mL 이하로 나타났다. *S. parauberis* PH0710 균주에 대한 저지대는 32 mm였고 MIC 값은 0.1875 µg/mL로 나타나 실험 농도인 5 mg/kg이 MIC 값의 약 37배에 해당하는 농도였다(data not shown). 약물의 활성이 나타나려면 MIC 값의 10-100배(Widmer, 2001)의 농도가 일반적인 범위인 점을 감안했을 때 이번 연구를 통해 도출된 결과는 적절한 농도인 것을 알 수 있다.

항생제 투약 방법별 유효성의 차이를 알아보기 위하여 음성 대조군, 양성 대조군, 근육 주사, 경구 투여 그룹으로 나누어 실험을 진행하였으며 근육 주사한 그룹의 폐사율은 20%, 경구 투여한 그룹의 폐사율은 0%로 나타났다([Fig. 3]). 이번 연구의 실험 방법은 이전에 보고된 논문을 참고하였고 zonde를 이용하여 보다 정량적인 실험을 진행할 수 있었다(Kim et al., 2006; Somjetlertcharoen, 2001). Enrofloxacin은 경구 투여나 비 경구 투여 방법 모두 좋은 흡수율을 나타내고 높은 생체 이용률을 보이며 대사산물인 ciprofloxacin과 함께 항균작용을 하는 것으로 알려져 있다(Brown, 1996; Escibano et al., 1997; Tyczkowska et al., 1989). Enrofloxacin을 경구 투여했을 경우 담수어 60-70%, 해수어 50-60%로 좋은 흡수율을 나타낸다고 보고되어 있다(Kim, 2006). 해수어의 경우 삼투 조절을 위해 해수를

지속적으로 삼키게 되는데 해수는 담수에 비해 pH와 양이온 함량이 더 높다. 이러한 조건에서 quinolone은 이온화되고 양이온과 함께 복합체를 이루어 생체 이용률이 감소하게 되기 때문에 담수어종에 비해 해수어종이 더 낮은 흡수율을 나타내게 된다(Burka et al., 1997; Ingebrigtsen, 1991). 근육주사 실험군의 폐사율은 20%로 나타났고 생존한 개체의 감염률은 12.5%로 확인되었지만 두 가지 경구 투여 그룹에서 폐사는 나타나지 않았으며 감염률 또한 0%로 확인되었다. 10일간 지속된 enrofloxacin의 경구 투여 때문에 폐사율에 차이가 생긴 것으로 보이며, 경구 투여 방법이 효과적이라는 것을 확인하였다.

강도다리에 대한 enrofloxacin의 안전성을 알아보기 위해 강도다리의 등 근육에 항생제를 농도별로 주사하고 시간별로 샘플링 하였다. 혈청으로부터 AST 수치를 확인하였고 항생제 주사 1일차에 25 mg/kg 구간에서 대조군과 5 mg/kg 실험군에 비해 4배가량 높은 수치를 나타내는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). AST는 전신의 세포에 분포하는데 심장, 간, 신장, 적혈구, 근육 등에 분포하며 특히 간과 심장에 고농도로 존재하고 세포 장애 정도와 비교적 상관성이 좋으며 급성 심근경색, 감염, 담즙 분비 정지, 간 경변, 근위축 등의 이상이 생길 시에 높은 수치를 나타내어 골격의 근육, 신장, 체장의 임상지표로도 사용한다(Cho et al., 2009; Kim, 2009)고 알려져 있다. 또한 AST 수치는 간질환 이외에 근육 손상, 심근경색, 용혈성 질환 등에서도 단독으로 상승한다고 보고된 바 있다(Kim, 2009). 이번 연구결과에서 1일차에 고농도의 enrofloxacin을 주사한 실험군의 AST가 높게 나타난 것은 높은 농도의 항생제에 의해 간이나 신장 혹은 근육 세포에 손상이 가게 되었기 때문인 것으로 생각된다. 하지만 그 이후 2일차부터 다시 대조군과 같은 정상적인 수치가 나타났다. 강도다리에 enrofloxacin을 저농도와 고농도로 근육 주사한 실험군의 신장에서 1일차에 사구체신염이 발생하였고(Fig. 5), 20일차

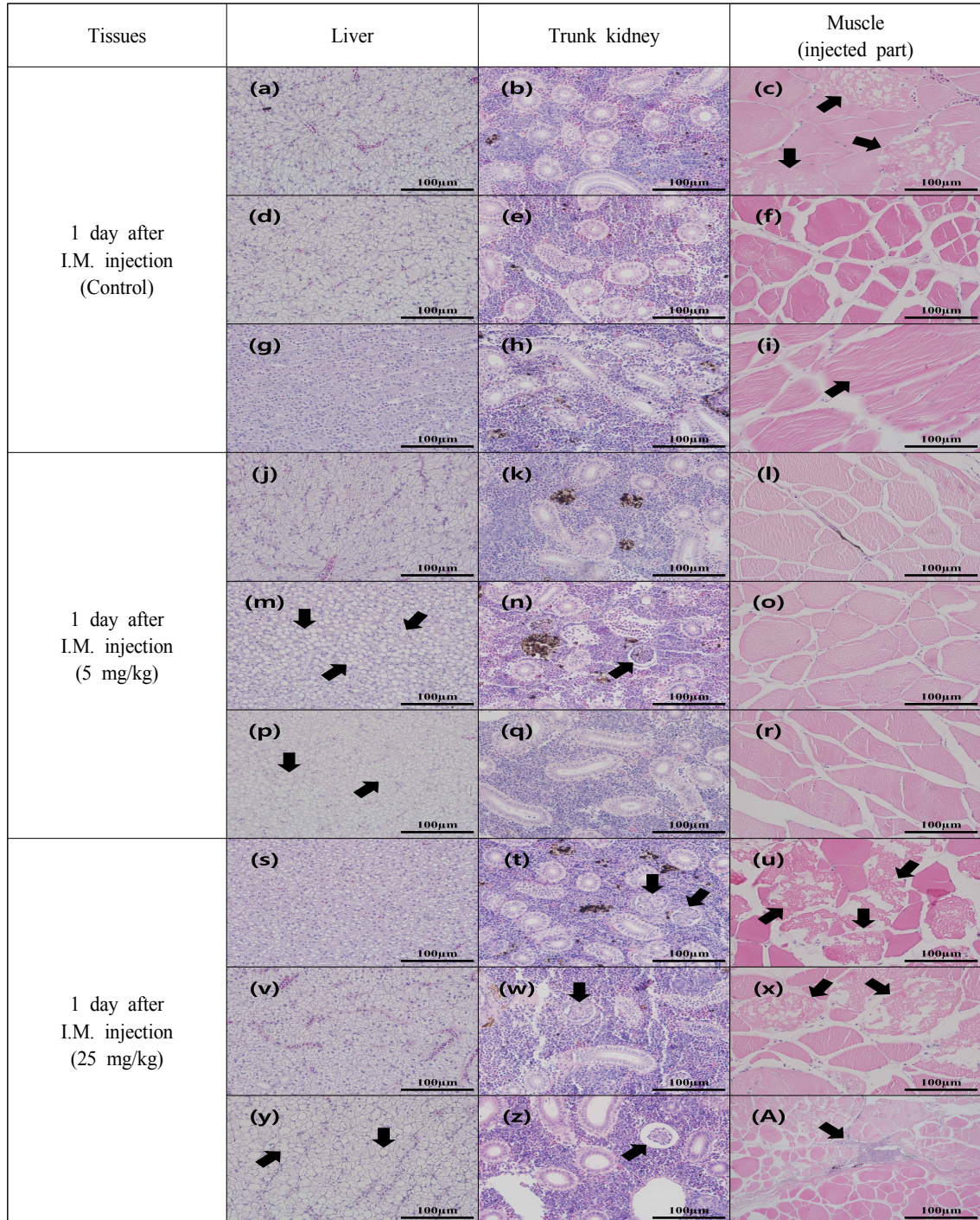
의 신장 조직 관찰 결과 서서히 회복되고 있는 모습을 확인할 수 있었다(Fig. 9). 근위 세뇨관은 독소가 사구체에 의해 여과된 후 독소와 접촉하는 첫 번째 부위이기 때문에 독성 물질로 인한 손상이 쉽게 일어날 수 있다고 알려져 있다(Solez, 1984). 따라서 신장은 약물 독성에 대한 표적 조직이 될 수 있고 신장 손상의 정도는 독성 물질의 종류와 투여량에 따라 달라진다. 어류에서 항생제에 의한 사구체신염이나 세뇨관 병변에 대해 여러 종에서 보고되어있다 (Augusto et al., 1996; Reimschuessel and Williams, 1995; Reimschuessel et al., 1996). 주사 후 1일차에 대조군에서 근육 조직 손상이 확인되었는데 이는 증류수 투여에 의한 삼투압 차이에 의해 조직이 영향을 받은 것으로 생각된다(Fig. 5-c, i). 항생제를 주사한 후 저농도와 고농도 실험군의 근육 조직에서 괴사와 염증이 발생하여 저농도 구간에서는 10일차에 회복되었고(Fig. 8-l, o, r) 고농도 구간에서는 20일차 까지 회복되지 않는 것이 확인되었다(Fig. 9-A). 이전 연구에서 가금류에 주사한 enrofloxacin에 의해 근육 조직의 괴사가 발생한 사례가 있으며(Keith and Adam, 2017) 이러한 문제를 해결하기 위해 주사용 enrofloxacin 보다는 경구투여용 enrofloxacin으로 전환해야 할 것이다.

## V. 결론

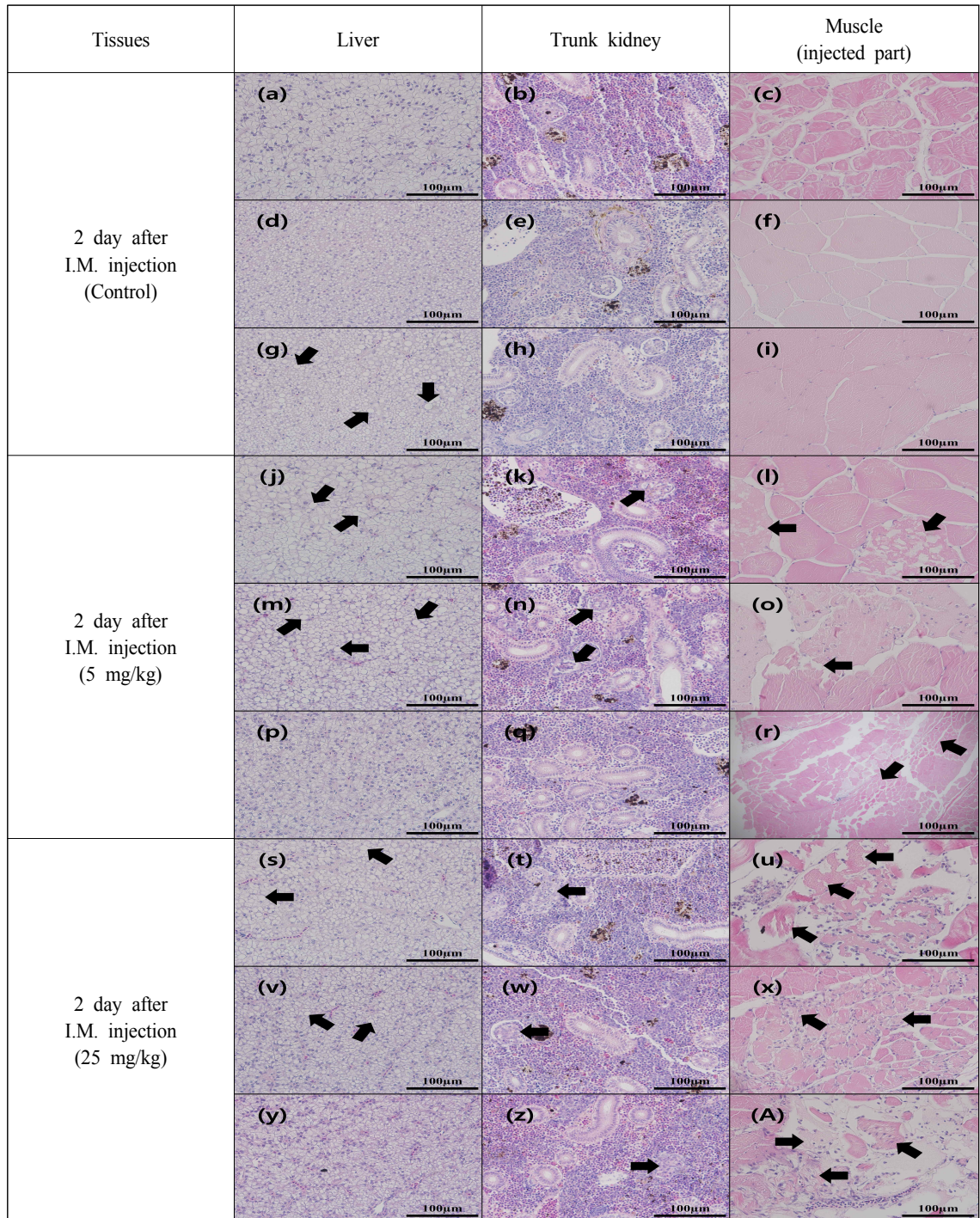
결과적으로 이번 연구에서 enrofloxacin의 강도다리에 대한 유효성 및 안전성 검증을 통해 연쇄구균병에 효과적인 치료방법을 제공하였으며 이는 양식 현장에 바로 적용 가능한 자료로 사용될 수 있다. 또한 이 항생제가 국내 수산 동물용 의약품으로의 허가 요청 시 필요한 기초 심사 자료로서 역할을 할 수 있을 것이고 허가된 후에는 수의사뿐만 아니라 수산질병관리사 또한 처방 및 판매를 할 수 있을 것으로 생각된다.



*Streptococcus parauberis* PH0710에 감염된 강도다리 (*Platichthys stellatus*)에 대한 항생제 Enrofloxacin의 유효성 및 안전성 조사

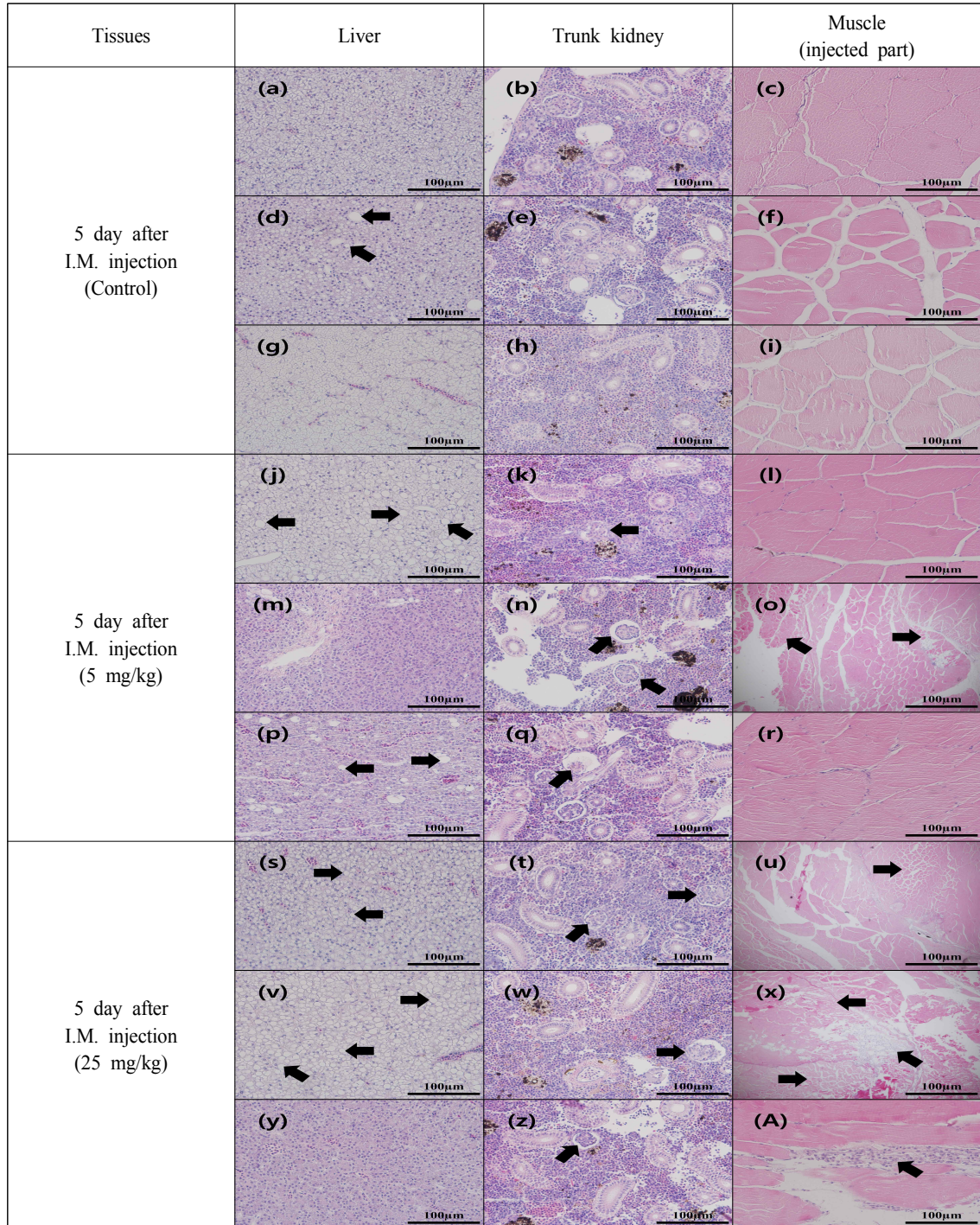


[Fig. 5] Pathological results of liver, trunk kidney and muscle (injected part) after enrofloxacin injection by each concentration (1 day after injection)

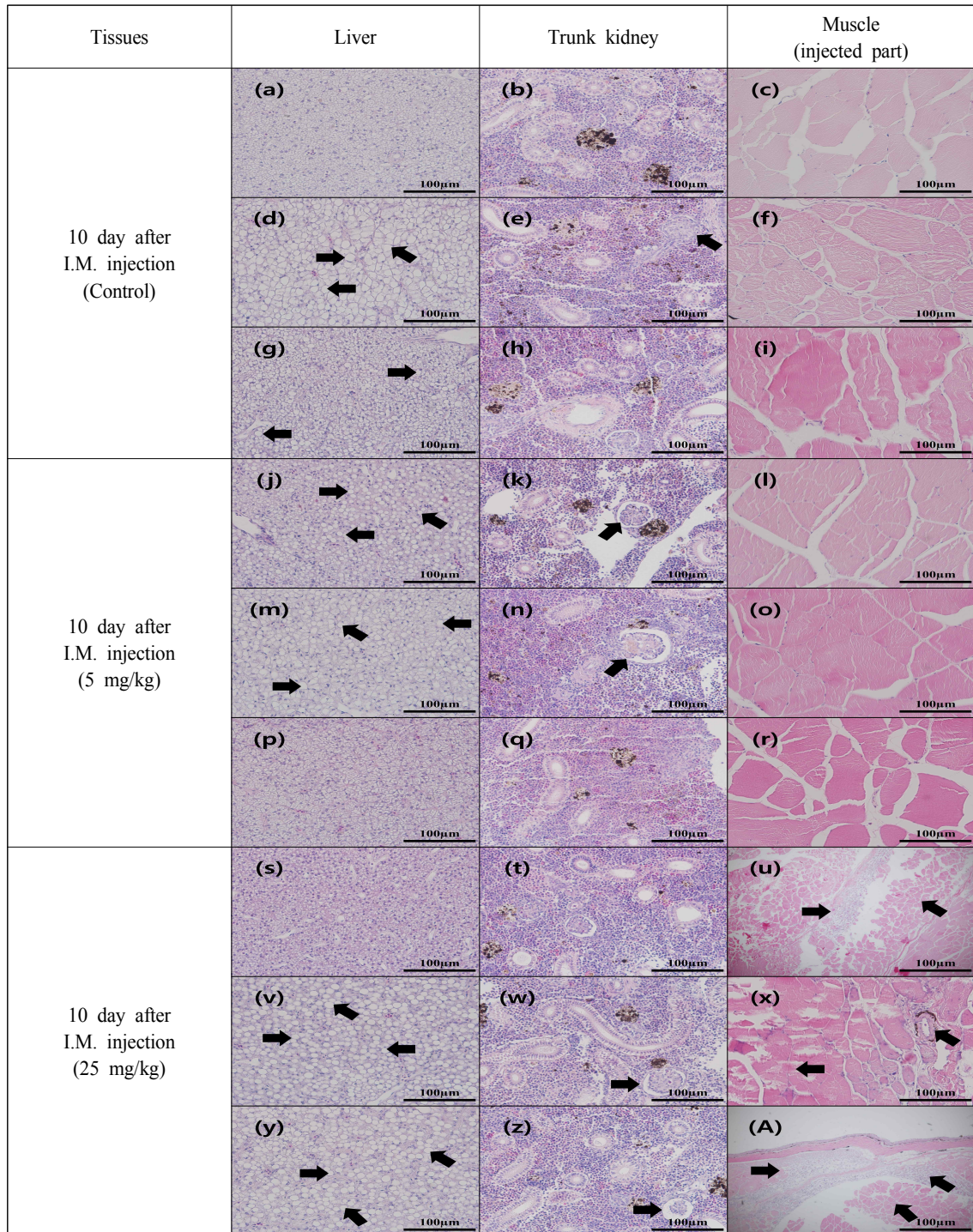


[Fig. 6] Pathological results of liver, trunk kidney and muscle (injected part) after enrofloxacin injection by each concentration (2 day after injection)

*Streptococcus parauberis* PH0710에 감염된 강도다리 (*Platichthys stellatus*)에 대한 항생제 Enrofloxacin의 유효성 및 안전성 조사

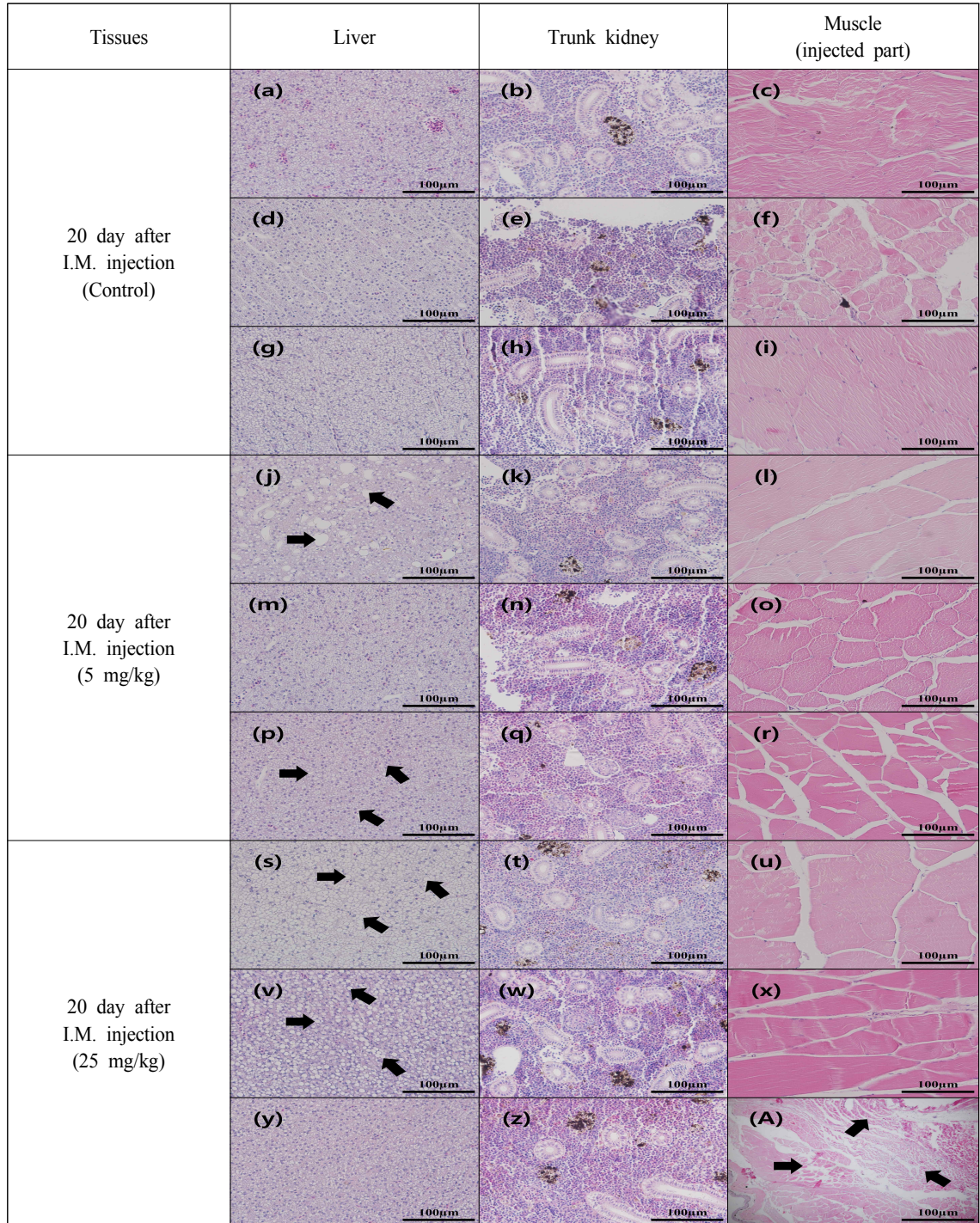


[Fig. 7] Pathological results of liver, trunk kidney and muscle (injected part) after enrofloxacin injection by each concentration (5 day after injection)



[Fig. 8] Pathological results of liver, trunk kidney and muscle (injected part) after enrofloxacin injection by each concentration (10 day after injection)

*Streptococcus parauberis* PH0710에 감염된 강도다리 (*Platichthys stellatus*)에 대한 항생제 Enrofloxacin의 유효성 및 안전성 조사



[Fig. 9] Pathological results of liver, trunk kidney and muscle (injected part) after enrofloxacin injection by each concentration (20 day after injection)

## References

- Augusto J, Smith B, Smith S, Robertson J and Reimschuessel R(1996). Gentamicin-induced nephrotoxicity and nephrogenesis in *Oreochromis nilotica*, a tilapia fish. *Dis. Aquat. Org.* 26(1), 49~58.  
<http://dx.doi.org/10.3354/dao026049>
- Austin B and Austin DA(1999). Gram positive bacteria-the lactic acid bacteria. In *Bacteria Fish Pathogens. Diseases of Farmed and Wild Fish*. 3th ed. 16.
- Austin B, Rayment J and Alderman DJ(1983). Control of furunculosis by oxolinic acid. *Aquaculture* 31, 101~108.  
[https://doi.org/10.1016/0044-8486\(83\)90305-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(83)90305-8)
- Bragg RR and Todd JM(1988). In vitro sensitivity to Baytril of some bacteria pathogenic to fish. *Bull. Ass. Fish Pathol.* 8(1), 5~6.  
[https://doi.org/10.1577/1548-8667\(1991\)003<0235:IVAAOS>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(1991)003<0235:IVAAOS>2.3.CO;2)
- Brown SA(1996). Fluoroquinolones in animal health. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 19(1), 1~14.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1996.tb00001.x>
- Burka JF, Hammell KL, Horsberg TE, Johnson GR, Rainnie DJ and Speare DJ(1997). Drugs in salmonid aquaculture - a review. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 20, 333~346.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2885.1997.00094.x>
- Cho MY, Lee JI, Kim MS, Choi HJ, Lee DC and Kim JW(2008). Isolation of *Streptococcus parauberis* from starry flounder, *Platichthys stellatus* Pallas. *J. Fish Pathol.* 21(3), 209~217.
- Doménech A, Fernández-Garayzábal JF, Pascual C, Garcia JA, Cutuli MT, Moreno MA, Collins MD and Dominguez L(1996). Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis*. *J. Fish Dis.* 19, 33~38.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1996.tb00117.x>
- Escribano E, Calpena AC, Garrigues TM, Freixas J, Domenech J and Moreno J(1997). Structure-absorption relationships of a series of 6-fluoroquinolones. *Antimicro. Agen. Chem.* 41, 1996~2000.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.41.9.1996>
- Greene CE, Budsberg SC(1993). Veterinary use of quinolones. In *Quinolone Antimicrobial Agents*. 2nd ed. Eds Hooper, D.C., Wolfson, J.S. American Society for Microbiology 473~484.
- Hastings TS and McCay A(1987). Resistance of *Aeromonas salmonicida* to oxolinic acid. *Aquaculture* 61, 165~171.  
[https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90145-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90145-1)
- Ingebrigtsen K(1991). Factors affecting drug disposition in fish. *Acta Vet. Scand. Suppl.* 87, 44~56.
- Keith A Hnilica and Adam P. Patterson(2017). Small animal dermatology: A color atlas and therapeutic guide. 508~574.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-37651-8.00015-8>
- Kim KY(2009). Current clinical practice : Understanding and application of liver function tests. *Korean J. Med.* 2009. 76(2) 163~168.
- Kim MS, Lim JH, Park BK, Hwang YH and Yun HI(2006). Pharmacokinetics of enrofloxacin in Korean catfish (*Silurus asotus*). *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 29, 397~402.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2006.00783.x>
- Kitao T(1993): Streptococcal infection. In *Bacterial Diseases of Fish*, Inglis, V., Roberts, R.J. and Bromage, N.R. (Editors), Blackwell, Oxford, pp. 196~210.
- Kramer DE, Barss WH, Paust BC and Bracken BE(1995). Guide to northeast pacific flatfishes: families Bothidae, Cynoglossidae, and Pleuronectidae. *Marine Advisory Bulletin* 47, 1~104.
- Kusuda R and Salati F(1993). Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan. *Annu. Rev. Fish Dis.* 3, 9~85.  
[https://doi.org/10.1016/0959-8030\(93\)90029-B](https://doi.org/10.1016/0959-8030(93)90029-B)
- Lalumera GM, Calamari D, Galli P, Castiglioni S, Crosa G and Fanelli R(2004). Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. *Chemosphere* 54, 661~668.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2003.08.001>
- Mata AI, Gibello A, Casamayor A, Blanco MM Domínguez L and Fernández-Garayzábal JF(2004). Multiplex PCR assay for detection of bacterial

- pathogens associated with warm-water Streptococcosis in fish. Appl. Environ. Microbiol. 70, 3183~3187.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.70.5.3183-3187.2004>
- Orcutt HG(1950). The life history of the starry flounder *Platichthys stellatus* (Pallas). Calif. Fish Bull. 78, 25~32.
- Reimschuessel R and Williams D(1995). Development of new nephrons in adult kidneys following gentamicin-induced nephrotoxicity. Ren. Fail. 17(2), 101~106.  
<https://doi.org/10.3109/08860229509026246>
- Reimschuessel R, Chamie SJ and Kinnel M(1996). Evaluation of gentamicin-induced nephrotoxicosis in toadfish. J. Am. Vet. Med. Assoc. 209(1), 137~139.
- Smith P, Hiney MP and Samuelsen OB(1994). Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. Annu. Rev. Fish Dis. 4, 273~313.  
[https://doi.org/10.1016/0959-8030\(94\)90032-9](https://doi.org/10.1016/0959-8030(94)90032-9)
- Solez K(1984). The pathology and pathogenesis of human "acute tubular necrosis", In Solez, K. and Whelton, A. Acute Renal Failure : Correlations Between Morphology and Function. Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 17~42.
- Somjetlertcharoen A(2001). Evaluation of ceftiofur sodium as a chemotherapeutic agent in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Diss faculty of the Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine, Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Stamm JM(1989). In vitro resistance by fish pathogens to aquacultural antibacterials, including the quinolones difloxacin (A-56619) and sarafloxacin (A-56620). J. Aquat. Anim. Health 1, 135~141.  
[https://doi.org/10.1577/1548-8667\(1989\)001<0135:IVRBFP>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(1989)001<0135:IVRBFP>2.3.CO;2)
- Tsoumas A, Alderman DJ and Rodgers C(1989). *Aeromonas salmonicida*: development of resistance to 4-quinolone antimicrobials. J. Fish Dis. 12, 493~507.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1989.tb00560.x>
- Tyczkowska K, Hedeem KM, Aucoin DP and Aronson AL(1989). High performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of enrofloxacin and its primary metabolite ciprofloxacin in canine serum and prostatic tissue. J. Chromatogr. 493, 337~346.  
[https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)82739-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)82739-5)
- Widmer AF(2001). New development in diagnosis and treatment of infection in orthopedic implants. Clin. Infect. Dis. 33, S94~S106.  
<https://doi.org/10.1086/321863>
- Woo SH and Park SI(2013). *Streptococcus parauberis* infection in starry flounder, *Platichthys stellatus*: characterization of innate immune responses following experimental infection. Fish Shellfish Immunol. 35, 413~420.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.04.047>
- 
- Received : 24 January, 2019
  - Revised : 19 February, 2019
  - Accepted : 07 March, 2019