

## 관상용 금붕어(*Carassius auratus*)의 비결핵항산균 감염증에 관한 고찰

이남실 · 송준영\* · 최혜승\*\* · 김아란†

국립수산과학원(연구원) · \*†국립수산과학원(연구사) · \*\*국립수산과학원(연구관)

### Mycobacteriosis Caused by Non-tuberculous Mycobacteria in Ornamental Goldfish (*Carassius auratus*)

Nam-sil LEE · Junyoung SONG\* · Hye-sung CHOI\*\* · Ahran KIM†

National Institute of Fisheries Science(researcher) · \*†National Institute of Fisheries Science(senior researcher) · \*\*National Institute of Fisheries Science(chief researcher)

#### Abstract

In October 2021, goldfish (*Carassius auratus*) that reared in an aquarium continued to die and the cause analysis has begun. For diagnosis, biological, molecular and histopathological analysis were conducted, and samples are divided with symptomatic and asymptomatic objects. The 16s rRNA target region was identified from tissue (kidney+spleen) sample of asymptomatic fish, and the sequenced result shown 100% homology with *Mycobacterium fortuitum*. In histopathological studies, various size of granuloma and inflammatory regions are observed in kidney tissue of all tested fish, and acid-fast bacteria staining positive reactions are observed inside or outside the granuloma. In order to diagnose mycobacteriosis, accurate preparation is required along with various diagnostic methods, and more attention is needed in handling aquarium fish management to prevent mycobacteriosis.

**Key words :** Goldfish, Granuloma, Mycobacteriosis, Non-tuberculous mycobacteria:NTM

#### I. 서론

마이코박테리아(*Mycobacteria*)는 비운동성의 그람 양성, 간균으로 항산성세균(Acid Fast Bacteria: AFB)이다. 이들은 사람과 동물에 결핵을 일으키는 결핵균군(*Mycobacterium tuberculosis* complex; MTBC)과 비결핵성 항산균(Non-tuberculous mycobacteria: NTM)으로 구분하고 있는데, 토양이나 물과 같은 자연계에 흔히 존재하는 NTM은 환경적 기회감염균으로 면적이 약해진 인간과 동물에서 광범위

하게 검출되며 최근까지 분류 보고된 NTM은 140종 이상이다(Porvaznik et al., 2016). 어류 및 양서류에서 감염증을 나타내는 마이코박테리아는 이 NTM에 속하며(Falkinham, 2021; Novotny et al., 2010; Willson et al., 2013; Barrows et al., 2017), 150종 이상의 다양한 담수와 해수 어종에서 검출되고 이들이 감염증을 유발하거나 높은 비율의 폐사를 나타내기도 한다(Adams et al., 1996; Austin and Austin, 2007; Chinabut, 1999; Jacobs et al., 2009). 담수 어류인 잉어(*Cyprinus*

† Corresponding author : 051-720-2482, [arkim110@korea.kr](mailto:arkim110@korea.kr)

\* 이 논문은 국립수산과학원 수산생물 질병 특성 연구(R2022070)에 의해 연구되었음.

*carpio*)에서 마이코박테리아의 감염사례가 처음 알려지면서(Bataillon et al., 1997) 이 후 *Mycobacterium chelonae*, *M. fortuitum* 그리고 *M. marinum*이 관상어류를 포함한 다양한 어종에서 흔하게 감염증을 일으키는 주요 3종으로 알려져 있으며(Gauthier and Rhodes, 2009; Pate et al., 2005; Prearo et al., 2004; Talaat et al., 1997), 이외에도 다양한 종이 검출되어 분류되고 있다(Gcebe et al., 2018).

2021년 10월 중순에 판매용으로 사육되던 금붕어(*Carassius auratus*) 가운데 한 개의 수조에서 약 1개월 전부터 지속적으로 폐사가 나타나기 시작하였다. 외관상으로 병적 증상이 없어 그 원인을 알아보기 위해 살아 남아있는 개체들을 연구실로 이송하여 검사를 실시하였으며, 마이코박테리아에 감염된 것을 확인하였다. 본 연구에서는 이번 금붕어에서 나타난 비결핵항산균 감염증에 관한 검사 결과를 지금까지 다양한 어종에서 나타나는 비결핵 항산균과 병리조직학적 측면에서 그 특징에 차이점이 있는지를 비교하고, 원인세균의 검출과 관련된 문제점을 고찰하고자 하였다.

## II. 연구 방법

### 1. 조사 대상

2021년 10월에 관상용 금붕어를 판매용으로 사육하던 한 개의 수조시설(110L용량, 유리 수조, 저면여과방식)에서 지속적으로 폐사가 발생하여 원인분석을 위하여 같은 수조 내에 최종적으로 생존한 어체 7마리를 대상으로 질병 검사를 실시하였다. 금붕어는 평균 체장  $8.64 \pm 1.23$  cm, 평균 체중  $9.07 \pm 3.43$  g으로 외부소견은 꼬리지느러미의 피하에 약한 출혈 증상 이외에는 확인되지 않았다. 그러나 복강을 열었을 때 장기들 사이의 장간막에 작은 결절이 관찰되는 개체가 확인되어([Fig. 1]) 결절이 없는 무증상어와 결절이 확인되

는 증상어로 구분하여 일반적인 미생물학적, 분자학적 검사법을 사용한 미생물감염에 대한 검사와 병리조직학적 검사를 실시하였다(<Table 1>).



[Fig. 1] White nodules observed on surface of visceral organs(arrow; nodule).

### 2. 미생물 감염에 대한 질병 검사

세균성 질병 진단을 위해 개체마다 비장과 신장을 무균적으로 적출하여 일반배지인 Tryptic soy agar (TSA, Difco) 평판배지에 도말하여 26°C에서 24시간 배양 후 세균집락의 형성유무를 관찰하였다. 해부시 장간막에 흰색 결절이 확인된 개체를 대상으로 부가적으로 결핵균 배양을 위한 Middlebrook7H10 agar 사면배지(Difco)와 3% Ogawa medium 사면배지(아산제약주)에 37°C에서 10일간 배양하였다. 배양된 세균과 검체 조직(신장, 비장, 결절)의 핵산추출에는 Patho Gene-spin DNA/RNA extraction kit (iNtRON)를 사용하였다. 배지에서 순수분리된 세균의 핵산검사는 27F와 1492R primer set을 사용한 16s rRNA에 대한 합성부위의 염기서열 분석으로 확인하였으며(Frank et al. 2008), 조직에서 추출된 핵산을 대상으로 *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus parauberis*, *S.iniae* 그리고 *Edwardsiella tarda*의 감염여부 확인을 위한 신속 다중 진단키트(NIFS, 2017) 검사를 실시하였다.

바이러스성 질병 진단에는 담수어류에서 나타나는 주요 3종 (Infectious hematopoietic necrosis virus; IHNV, Koi herpesvirus; KHV, Spring viraemia of carp virus; SVCV)을 대상으로 하였으

며 검사를 위해 조직에서 추출된 핵산으로 IHNV는 G gene 693bp (Emmenegger et al., 2000)을, KHV는 TK gene 409bp (Bercovier et al., 2005) 그리고 SVCV는 G gene 606bp (Stone et al., 2003)에 대하여 PCR (Polymerase chain reaction) 검사를 실시하였다.

해부시 내장의 표면에서 관찰된 흰색 결절로 마이코박테리아 감염이 의심되어 육안적으로 결절이 없는 무증상어와 결절이 확인되는 증상어로 나누어 조혈조직(신장+비장)과 결절을 채취하여 마이코박테리아 16s rRNA에 대한 PCR검사를 실시하였다. Myco 16s F (285F)와 Myco 16s R (264R) primer set을 사용하여 1st PCR을 실시하고, 이 합성물을 주형으로 다시 Myco 16s NF와 Myco 16s NR primer set으로 2nd PCR을 실시하였다. 사용된 primers와 PCR 조건에 대한 정보는 <Table 2>에 나타내었다(Kirschner et al., 1993; Stany and Pavlik, 2012).

### 3. 병리조직학적 검사

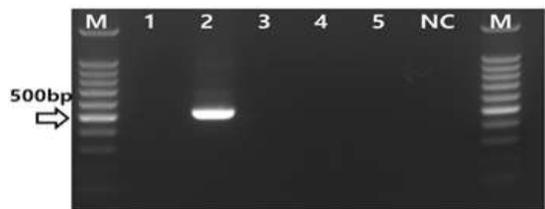
병리조직학적 검사를 위하여 해부와 동시에 아가미, 간, 비장, 신장, 심장, 소화관 및 주위 연결된 장간막 조직의 일부를 적출하여 10% 중성완충포르말린 고정액에 고정하였으며, 48시간 이내에 세절하여 재고정, 수세, 탈수, 투명화, 파라핀 침투 과정을 거쳐 조직 절편 제작을 위한 파라핀 블럭을 만들고 이를 조직절편기(HistoCore MULTICUT, Leica)를 사용하여 4µm 두께로 박절하여 슬라이드 글라스에 부착시켜 오븐건조(45°C, 8시간) 후, H&E (Hematoxylin and Eosin) 염색과 항산균 염색을 위한 Fit's AFB 염색법(Crowder and Taylor, 1996; Cabic et al., 2018)을 실시하여 조직염색표본을 만들어 광학현미경(Axio A1, ZEISS)으로 관찰하고 소프트웨어(ZEN 2.3, ZEISS)를 사용하여 이미지를 얻었다.

## III. 연구 결과

### 1. 미생물 감염에 대한 검사 결과

검체 7마리 가운데 복강 내 장기표면에 흰색 결절이 없었던 무증상어 2마리와 유증상어 2마리를 대상으로 검사를 실시하였다(<Table 1> 참조). 일반배지 및 결핵균 분리용 배지에 배양한 결과, 배양된 4마리 중 3마리에서 TSA 배지와 Middlebrook7H10 배지에서 세균집락(2~5 colonies/plate)이 확인되었으며, 같은 형태의 세균집락을 구분하여 3종을 순수분리하고 이들을 대상으로 16s rRNA에 해당하는 PCR검사를 실시하여 염기서열을 분석한 결과, 한 종류의 colony가 *Aeromonas veronii*와 100%의 상동성을 나타내었으며 나머지는 *Corynebacterium* sp. 또는 Uncultured bacteria와 95% 전후의 상동성으로 확인되었다. 어병세균 4종에 대한 신속진단 kit 검사에서는 모두 음성이었으며, 3종 바이러스에 대한 PCR검사에서도 모두 음성이었다.

마이코박테리아 감염을 확인하기 위한 2nd PCR 검사에서는 육안적으로 결절이 없었던 2번 개체의 조혈조직(신장+비장)을 마쇄하여 추출한 핵산에서 밴드가 확인되었으며([Fig. 2]), 염기서열 분석결과 *Mycobacterium fortuitum* (GenBank MN513221.1)와 100% 일치하였다.



[Fig. 2] Gel loading results of 2nd step PCR products. Lane1; no.1 spleen+kidney, lane2; no.2 spleen+kidney, lane3; no.4 spleen+kidney+nodule, lane4; no.4 spleen+kidney, lane5; no.7 nodules, M:marker, NC: negative control, arrow: position of 500bp.

## 2. 병리조직학적 검사 결과

병리조직학적 검사는 무증상어 1마리와 유증상어 2마리를 대상으로 실시하였다(<Table 1> 참조). 육안으로 확인된 흰 결절은 장간막 조직 내 형성된 육아종에 의한 것으로, 췌장조직 주변의 혈관과 지방조직 사이의 염증세포 증가와 육아종이 관찰되었다(Fig. 3A)]. 이들 개체의 신장에는 유상피층과 섬유세포층이 두껍게 형성된 육아종이 다수 관찰되었고, 신장의 조직표본 전체에 다양한 크기의 육아종과 괴사 부위를 확인할 수 있었다(Fig. 3B)]. 또한 무증상어의 신장조직 내에서도 형성 초기의 소형 육아종과 세포 변성 부위가 다수 관찰되었으며, 조혈조직 내 마크로파지 응집소도 많은 부위에서 확인되었다(Fig. 3C)].

장기 내 명확한 육아종 형성은 신장에서만 관찰되었다. 비장과 간에서는 매우 드물게 작은 크기의 초기 육아종 형태나 마크로파지 응집체가 관찰되었으나 심장, 소화관 그리고 아가미 조직에서는 육아종은 관찰되지 않았다. 신장조직의 항산균 염색표본에서 육아종 내부와 외부에서 짙은 분홍색의 염색성이 관찰되었다(Fig. 3D)]. 소화관의 점막고유층(Fig. 3E)]과 아가미 일차새엽 중심부 결합조직 및 상피세포층에서 염증세포 침윤이 관찰되었고(Fig. 3F)], 간에서는 혈관 주위로 염증세포 침윤과 간세포 전반에 변성(Fig. 3G)]이 있었다. 심장의 심근 변성과 위축이 조직 전반에서 확인되었다(Fig. 3H)].

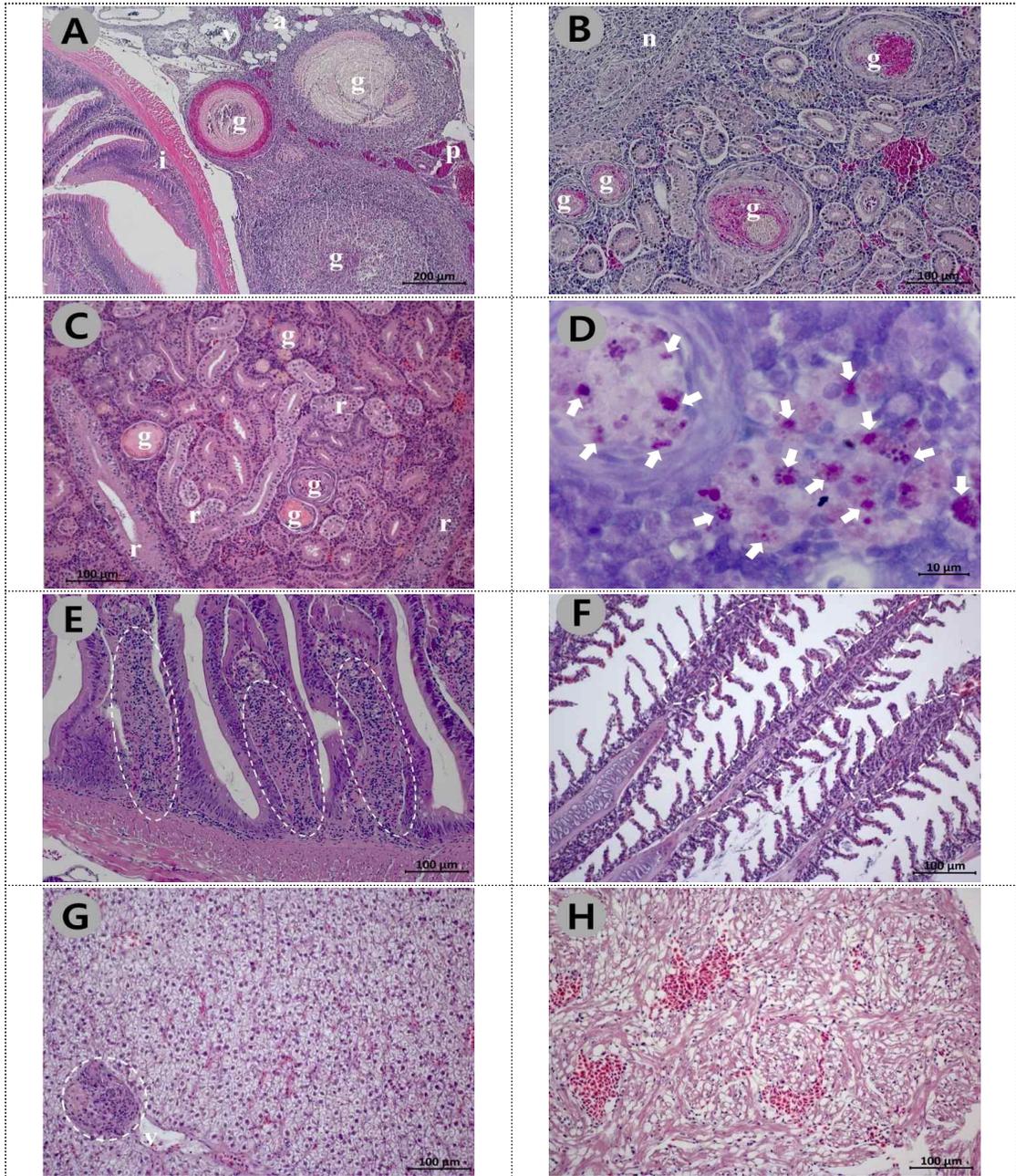
<Table 1> Information about sample fish and used diagnostic methods

No.	Length (cm)	Weight (g)	White nodule	Bacterial culture	Rapid diagnosis kit	PCR for virus analysis	PCR for NTM*	Histological analysis
1	10.7	13.25	-	T	○	○	○	×
2	8.9	9.75	-	T	○	○	○	○
3	8.8	8.67	-	-	×	×	×	×
4	9.4	13.49	+(1)	T,M,O	○	○	○	○
5	8.2	8.19	+(2)	-	×	×	×	×
6	7.5	5.13	-	-	×	×	×	×
7	7	4.99	+(3)	T,M,O	○	○	○	○

\*; Non-tuberculous mycobacteria, -; no gross finding, +(1);white nodules in surface of mesentery, spleen enlargement, +(2); congestion at caudal fin, +(3); scoliosis, white nodules in kidney and surface of mesentery, T; TSA medium culture, M; Middlebrook7H10 medium culture, O; Ogawa medium culture, ○;used, ×; not used

<Table 2> Information about PCR primer sets and PCR conditions used for mycobacteria identification

Gen e	Primer set	PCR condition
16S rRNA	Myco16s F 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	denature 94°C 1min, annealing 68°C 3min, 39cycles. (Kirschner et al., 1993; Stany and Pavlik, 2012)
	Myco16s R 5'-TGCACACAGGCCACAAGGGA-3'	
2nd step	Myco16s NF 5'-CTTAACACATGCAAGTCGAAC-3'	95°C for 5min,[95°C for 1min-60°C for 45s-72°C for 1min]×30cycles,72°C for 1min (Stany and Pavlik, 2012)
	Myco16s NR 5'-TTTCACGAACAACGCGACAA-3'	



[Fig. 3] Histopathological features of asymptomatic(no.2) and symptomatic(no.4) goldfish. A:Mesenteric membrane around intestine of fish no.4, B:Kidney of fish no.4, C:Kidney of fish no.2, D:Kidney of fish no.4, E:Intestine of fish no.2, F:Gill of fish no.2, G:Liver of fish no.4, H:Heart of fish no.4. (a; adipose tissue, i; intestine, g; granuloma, n; necrotic region, p; pancreatic tissue, r; renal tubule, v; vessel, arrow; acid-fast bacteria in macrophage, white circle; infiltration of inflammatory cells, A~C&E~H are H&E staining, D is Acid-fast bacteria staining, Scale bars size are indicated in figures.

#### IV. 결론

어류에서 분리되는 마이코박테리아는 비결핵성 항산균으로 이들은 배양시 균 집락의 성장 속도에 따라 크게 Slow-growing mycobacteria (SGM)와 Rapidly growing mycobacteria (RGM)로 나뉘며 SGM은 세균 배양시 색소형성 특성에 따라 다시 3개의 types으로 나뉜다(Runyon, 1959). *M. fortuitum*은 RGM에 속하며 어류에서는 네온테트라(*Paracheirodon innesi*)에서 처음 분리되었고(Ross and Brancato, 1959), 이 후 다양한 어종이 숙주로 알려졌다(Gauthier and Rhodes, 2009). 최근, 유전학적 분류를 기반으로 *M. fortuitum*은 *Mycobacterium fortuitum*으로 부르도록 하였으나(Gupta et al., 2018; Oren and Garrity, 2015) 현재까지 *M. fortuitum*과 혼용되고 있다.

어류에 나타나는 마이코박테리아 감염증은 여염, 비늘탈락, 체표궤양 또는 출혈과 같은 외부 증상이 나타나기도 하지만 외관상 특이한 증상 없이 복강 내 장기에 육아종이 형성되기도 한다(Gcebe et al., 2018; Francis-Floyd, 2011; Gauthier and Rhodes, 2009). 본 연구에서 세균배양으로 어류질병과 관련된 세균으로 *A. veronii*가 검출되기는 하였지만 배양된 colony의 수가 많지 않았고, 또한 이들 감염으로 인해 나타나는 전형적인 증상인 표피궤양이나 출혈 증상은 어떤 개체에서도 확인되지 않았다. 금붕어에 대한 *A. veronii*의 감염실험에서도 독성이 강하지 않은 것으로 나타났다(Shameena et al., 2020). 따라서 이번 폐사의 원인은 내장표면에 결절을 형성하고 병리조직학적 검사에서 신장에 심한 육아종 병변을 일으킨 마이코박테리아에 의한 것으로 판단되었다.

마이코박테리아의 감염으로 조직 내 육아종이 형성되는 경우, 아가미를 비롯해 간, 비장, 생식소에까지 육아종을 형성하기도 하지만(Chinabut, 1999; Noga, 2010), 본 조사에서 확인된 *M. fortuitum*에 의한 감염증은 특히 신장에서 육아종

과 조직괴사가 뚜렷하게 관찰되었으며, 해부시 육안으로 흰 결절이 확인되는 경우는 소화관 주변의 장간막에 형성된 육아종에 의한 것임을 확인하였다. 간에서는 혈관 주변에 드물게 작은 크기의 육아종 초기의 형태가 관찰되었지만 대부분 세포침윤과 마크로파지의 응집이 관찰되었고, 비장에서는 협조직 확대와 적혈구 침윤과 Melanomacrophage centers (MMCs)의 형성이 두드러졌다. 신장조직에 형성된 육아종 내 응집된 마크로파지에서 진한 항산성 염색 양성이 관찰된 것은 감염증이 장기간 진행되어 세균을 탐식한 다수의 마크로파지가 조직 내 결집되었기 때문으로 보이며, 장간막에 생긴 결절은 원인세균의 감염이 장기간 지속되어 혈관과 지방조직이 많이 분포된 췌장 조직 주변에 형성된 육아종에 숙주의 조직반응이 일어나 형성된 것으로 보인다. 이러한 식세포의 증가와 활발한 움직임으로 나타나는 염증반응은 마이코박테리아 감염증에서 나타나는 대표적인 현상이라 볼 수 있다(Chinabut, 1999). Talaat et al.(1999)이 금붕어를 대상으로 *M. fortuitum*을 고농도( $>10^8$  cfu) 주사한 감염실험에서, 주사 후 2주 만에 복막염이 관찰되고, 4주 후에 만성 육아종의 형성이 관찰되었다는 사례도 있다.

질병의 진단에는 다양한 검사방법을 사용한다. 단일 검사법만으로도 진단이 가능지만, 많은 경우 정확한 진단을 위해 다양한 검사방법을 함께 시행한다. 특히 세균성 질병의 경우 원인 세균을 배양하는 것은 이후 연구를 위해서도 매우 중요하다. 이번 사례의 경우, 해부시 육안관찰에서 흰 결절이 확인되어 마이코박테리아의 감염을 의심하고 이들 세균의 배양에 사용되는 Middlebrook 7H10 배지와 Ogawa 배지에 세균을 배양하고자 하였으나 배양이 이루어지지 않았고, 육안적으로 결절이 없어 일반배지에서만 배양을 실시한 무증상 개체에서 PCR검사로 *M. fortuitum*이 확인되어 후속 연구에 어려움을 가져온 사례가 되었다. 결절이 확인되었던 개체에서 마이코박테리움에 대한 PCR검사가 원활하지 못했던 이유에 대해서는,

대부분 육안적으로 결절이 형성된 개체는 세균감염 이후 시간이 지난 만성감염 개체이므로 다양한 시료에 공용으로 사용되는 핵산추출 키트로는 두꺼운 육아종을 형성한 시료로부터 세균의 핵산을 효율적으로 분리해 내지 못했을 가능성이 높았을 것으로 추정된다(Bocart et al. 1992). 그러나 육안으로 결절이 확인되지 않았던 개체의 병리조직학적 검사에서 세균감염에 의한 신장조직의 변성과 초기 육아종 형성이 확인되었고, 항산성세균 염색으로 양성을 확인하였다. 또한, 이 시료에서 추출한 핵산의 PCR검사와 염기서열 분석에서 *M. fortuitum* 감염을 확인함에 따라 질병의 원인세균을 특정할 수 있었다.

세균 배양에서 모든 마이코박테리아 균주가 동일한 배양조건(시료종류, 배지성분, 온도, 시간, CO<sub>2</sub>공급 등)에서 배양이 이루어지지 않을 가능성이 있어 다양한 배양조건을 고려하여야 했으나 (Stephenson et al., 2019; Buijtsels and Petit, 2005; Preece et al., 2016) 이에 대한 섬세한 준비가 미흡하였고, 감염조직을 이용한 핵산추출에서 마이코박테리아의 핵산추출에 유리한 방법(Amaro et al., 2008; Amita et al., 2002)을 사용하지 않고 일반적인 세포와 조직에 공용되는 키트를 이용하는 과정에서 원인세균의 핵산추출에 민감성이 떨어져 원인분석에 혼돈을 가져왔던 점은 이후 NTM 감염증에 대한 진단을 위해 염두에 두어야 할 부분이다.

의학계에서는 16S rRNA 유전자를 활용한 NTM 진단에 대한 민감성, 정확성 그리고 신속성을 조사하기 위해 10년 동안 임상데이터를 다른 진단 방법과 비교하여 설명하였지만, 아직도 일부 정확도에서 기대에 못 미치는 부분이 있어 개선에 대한 필요성을 언급하고 있다(Simon et al., 2019). 이는 NTM 감염에 대한 진단결과가 항상 일관되게 나타나지 않는다는 것을 알 수 있으며, 진단에서 발생할 수 있는 문제를 해결하는 방법으로 다양한 진단법의 교차적 시행이 중요하다는 것을 설명해 준다.

최근 미국 핏삽 7군데의 관상어에서 3년 동안 마이코박테리아 감염을 조사한 연구결과에 따르면, 대상어 총 107마리 가운데 85마리에서 마이코박테리아가 분리되었으며 이들 중 60.9%가 *M. fortuitum* 혹은 그 그룹(*M. fortuitum group* 과 *M. fortuitum GT*)으로 확인될 정도로 만연되어 나타나고 있고, 인체 감염균과 무관하지 않음을 고려하여 판매용 어류의 핸들링에 주의가 필요함을 보고하고 있다(Kušar et al., 2017). 또한, 최근 보고된 *M. fortuitum*의 유전체 역학연구에서 이들 세균은 항생제저항성유전자의 저장고 역할을 하고 있으며 이러한 유전적 특징은 전 세계적으로 기회감염균으로서 살아남을 수 있게 해주는 힘이 되고 있다는 것이다(Morgado et al., 2021). 임상 의학과 더불어 어류의 세균 감염증 치료에서도 큰 영향을 미칠 수 있는 *M. fortuitum*과 같은 NTM에 관한 연구는 이후로도 지속적으로 관심을 가지고 진행되어야 할 과제로 여겨진다.

## References

- Adams A, Thompson KD, McEwan H, Chen S-C and Richards RH(1996). Development of monoclonal antibodies to Mycobacterium spp. isolated from Chevron snakeheads and Siamese fightingfish. *Journal of Aquatic Animal Health* 8(3), 208~215. [http://doi.org/10.1577/1548-8667\(1996\)008<0208:DOMATM>2.3.CO;2](http://doi.org/10.1577/1548-8667(1996)008<0208:DOMATM>2.3.CO;2)
- Amaro A, Duarte E, Amado A, Ferronha H and Botelho A.(2008). Comparison of three DNA extraction methods for Mycobacterium bovis, Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium subsp. avium. *The Society for Applied Microbiology. Letters in Applied Microbiology* 47(1), 8~11. <http://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2008.02372.x>
- Amita J, Vandana T, Guleria RS and Verma RK(2002). Qualitative evaluation of mycobacterial DNA extraction protocols for polymerase chain reaction. *Molecular Biology Today*, 3, 43~50.
- Austin B and Austin DA(2007). *Bacterial Fish*

- Pathogens, Springer Netherlands, Dordrecht.  
<http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-6069-4>  
 (Accessed 19 April 2016)
- Barrows M, Koepfel K, Michel A and Mitchell E(2017). Mycobacterial Arthritis and Synovitis in Painted Reed Frog(*Hyperolius marmoratus*). *Journal of Comparative Pathology* 156(2-3), 275~280.  
<http://doi.org/10.1016/j.jcpa.2017.01.005>
- Barcovie H, Fishman Y, Nahary R, Sinai S, Zlotkin A, Eyngor M, Gilad O, Eldar A and Hedrick RP(2005). Cloning the koi herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis. *BMC Microbiology* 5, 13  
<http://doi.org/10.1186/1471-2180-5-13>
- Bataillon E, Dubard J, and Terre L(1897). Un nouveau type de tuberculose. *Comptes Rendus des Seances de la Societe Biologie* 49, 446~449.
- Bocart D, Lecossier D, De Lassence A, Valeyre D, Battesti J-P and Hance AJ(1992). A search for Mycobacterial DNA in granulomatous tissue from patients with sarcoidosis using the Polymerase Chain Reaction. *American Review of Respiratory Disease* 145(5),1142~1148.  
<http://doi.org/10.1164/ajrccm/145.5.1142>
- Buijtel PCAM and Petit PLC(2005). Comparison of NaOH-N-acetyl cysteine and sulfuric acid decontamination methods for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Journal of Microbiological Methods* 62(1), 83~88.  
<http://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.01.010>
- Cabic E, Cabid AG, Esposito SM, Dizon F, Quinones GJ and Guia A(2018). Alternative method for histopathological detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae* using a modified Acid-Fast technique. *Philippine Journal of Pathology*.  
<http://doi.org/10.21141/PJP.2018.007>
- Chinabut S(1999). Mycobacteriosis and Nocardiosis. In:WilPTK,Bruno DW(Eds.), *Fish Diseases and Disorders*. CAB International, New York, NY, 319~340.
- Crowder C and Taylor HW(1996). Modified Fite stain for Demonstration of Mycobacterium species in tissue section. *Journal of Histotechnology* 19(2), 133~134.  
<http://doi.org/10.1179/his.1996.19.2.133>
- Emmenegger EJ, Meyers TR, Burton TO and Kurath G(2000). Genetic diversity and epidemiology of infectious hematopoietic necrosis virus in Alaska. *Disease of Aquatic Organisms* 40, 163~176. <http://doi.org/10.3354/dao040163>.
- Falkinham JO III(2021). Ecology of nontuberculous mycobacteria. *Microorganisms* 9, 2262.  
<http://doi.org/10.3390/microorganisms9112262>
- Francis-Floyd R(2011). *Mycobacterial Infections of Fish*; SRAC Publisher: Stoneville, MS, USA, 1~12.
- Frank JA, Reich CI, Sharma S, Weisbaum JS, Wilson BA and Olsen GJ(2008). Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA gens. *Applied and Environmental Microbiology* 74(8), 2461~2470.  
<http://doi.org/10.1128/AEM.02272-07>
- Gauthier DT and Rhodes MW(2009). Mycobacteriosis in fishes; A review. *The Veterinary Journal* 180(1), 33~47.  
<http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.05.012>
- Gcebe N, Michel AL and Hlkwé TM(2018). Non-tuberculous Mycobacterium species causing mycobacteriosis in farmed aquatic animals of South Africa.  
<http://doi.org/10.1186/s12866-018-1177-9>
- Gupta RS, Lo G and Son J(2018). Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus Mycobacterium into an emended genus Mycobacterium and four novel genera. *Front Microbiology* 9, 67.  
<http://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00067>
- Jacobs JM, Stine CB, Baya AM and Kent ML(2009). A review of mycobacteriosis in marine fish. *Journal of Fish Diseases* 32, 119~130.  
<http://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2008.01016.x>
- Kirschner P, Springer B, Vogel U, Meier A, Wrede A, Kiekenbeck M, Bange F-C and Bötger E(1993). Genotypic identification of Mycobacteria by Nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a Clinical Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 2882~2889.  
<http://doi.org/10.1128/jcm.31.11.2882-2889.1993>
- Kušar E, Zajc U, Jenčič V, Očepek M, Higgins J,

- Žolnir-Dovč M and Pate M(2017). Mycobacteria in aquarium fish: results of a 3-year survey indicate caution required in handling pet-shop fish. *Journal of Fish Diseases* 40(6), 773~784.  
<http://doi.org/10.1111/jfd.12558>
- Morgado S, Ramos NV, Freitas F, Fonseca EL and Vicente AC(2021). *Mycolicibacterium fortuitum* genomic epidemiology, resistome and virulome. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 116, e210247.  
<http://doi.org/10.1590/0074-02760210247>
- NIFS(National Institute and Fisheries Sciences). (2017). Development of diagnostic kit for three bacterial disease in olive flounder.  
<http://doi.org/10.23000/TRKO201700007563>
- Noga EJ(2010). Problem 55: Mycobacteriosis. In: *Fish Disease Diagnosis and Treatment, 2<sup>nd</sup> edition*, Ames, IA:Wiley-Blackwell Publishing, 204~208.
- Novotny L, Halouzka R, Marlova L, Vartosova L, Slany M, et al(2010). Morphology and distribution of granulomatous inflammation in freshwater ornamental fish infected with mycobacteria. *Journal of Fish Diseases* 33(12), 947~955.  
<http://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01202.x>
- Oren A and Garrity GM(2015). Validation list no.164. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 2017~2025.  
<http://doi.org/10.1099/ij.s.0.0000317>
- Pate M, Jencic V, Zolnir-Dovc M and Ocepek M(2005). Detection of mycobacteria in aquarium fish in Slovenia by culture and molecular methods. *Disease of Aquatic Organisms* 64, 29~35.  
<http://doi.org/10.3354/dao064029>
- Porvaznik I, Solovič I and Mokry J(2016). Non-Tuberculous Mycobacteria: Classification, diagnostics and Therapy. *Adv Exp. Medicine biology-Neuroscience and Respiration* 27, 19~25.  
[http://doi.org/10.1007/5584\\_2016\\_45](http://doi.org/10.1007/5584_2016_45)
- Prearo M, Zanoni, RG, Campo Dall'Orto B, Pavoletti E, Florio D, Penati V and Ghittino C(2004). Mycobacterioses: emerging pathologies in aquarium fish. *Veterinary Research Communications* 28 (Suppl. 1), 315~317.
- Preece CL, Perry A, Gray B, Kenna DT, Jones AL, Cummings SP, Robb A, Thomas MF, Brodrie M, O'Brien CJ, Bourke SJ and Perry JD(2016). A novel culture medium for isolation of rapidly-growing mycobacteria from the sputum of patients with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* 15(2), 186~191.  
<http://doi.org/10.1016/j.jcf.2015.05.002>
- Ross AJ and Brancato FP(1959). *Mycobacterium fortuitum* Cruz from the tropical fish, *Hyphessobrycon innesi*. *Journal of Bacteriology* 78, 392~395.  
<http://doi.org/10.1128/jb.78.3.392-395.1959>
- Runyon EH(1959). Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med Clin N Am*, 3(1), 273~290.
- Shameena SS, Kumar K, Kumar S1, Kumar S2 and Rathore G(2020). Virulence characteristics of *Aeromonas veronii* biovars isolated from infected freshwater goldfish(*Carassius auratus*). *Aquaculture* 518, 734819.  
<http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734819>
- Simon A, Onya O, Mazza-Stalder J, Nicod L, Gilbert G and Ktia J(2019). Added diagnostic value of 16S rRNA gene pan-mycobacterial PCR for nontuberculous mycobacterial infections: a 10-year retrospective study. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 38, 1873~1881.  
<http://doi.org/10.1007/s10096-019-03621-z>
- Stany M and Pavlik I(2012). Molecular detection of nontuberculous mycobacteria: advantages and limits of a broad-range sequencing approach. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 22, 268~276.  
<http://doi.org/10.1159/000342517>
- Stephenson D, Perry A, Appleby MF, Lee D, Davison J, Johnston A, Jones AL, Nelson A, Bourke SJ, Thomas MF, De Soyza A, Lordan JL, Lumb J, Robb AE, Samuel JR, Walton KE and Perry JD(2019). An evaluation of methods for the isolation of nontuberculous mycobacteria from patients with cystic fibrosis, bronchiectasis and patients assessed for lung transplantation. *BMC Pulmonary Medicine* 19, 1~12.  
<http://doi.org/10.1086/s12890-019-0781-2>
- Stone DM, Ahne W, Denham KL, Dixon PF, Liu CT-Y, Sheppard AM, Taylor GR and Way K(2003). Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of

carp virus and pike fry rhabdovirus isolates reveals four genogroups. *Disease of Aquatic Organisms* 53, 203~210.

<http://doi.org/10.3354/dao053203>

Talaat AM, Reimschuessel R and Trucksis M. (1997). Identification of mycobacteria infecting fish to the species level using polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Veterinary microbiology* 58(2-4), 229~237.

[http://doi.org/10.1016/s0378-1135\(97\)00120-x](http://doi.org/10.1016/s0378-1135(97)00120-x)

Talaat AM Trucksis M, Kane AS and Reimschuessel R(1999). Pathogenicity of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium smegmatis* to goldfish, *Carassius auratus*. *Veterinary Microbiology* 66(2), 151~164.

[http://doi.org/10.1016/s0378-1135\(99\)00002-4](http://doi.org/10.1016/s0378-1135(99)00002-4)

Willson SJ, Kaufman MG, Merritt RW, Williamson HR, Malakauskas DM and Benbow ME(2013). Fish and amphibians as potential reservoirs of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer disease. *Infection Ecology and Epidemiology* 3, 19946.

<http://dx.doi.org/10.3402/iee.v3i0.19946>

- 
- Received : 30 September, 2022
  - Revised : 18 November, 2022
  - Accepted : 25 November, 2022