

뱀장어 병어로부터 분리한 *Edwardsiella tarda*의 약제내성

최민순 · 최상훈 · 박관하 · 장선일* · 윤창용** · 조정근** · 송희종**

군산대학교 해양산업대학 수족병리학과

*수산진흥원 청평내수면 연구소

**전북대학교 수의과대학

군산근교의 양만장에서 에드워드병에 이환된 뱀장어로부터 총 96균주의 *E. tarda* 균을 분리한 후 이들 분리균의 약제감수성 검사를 실시하고 아울러 내성균의 내성인자 전달 시험을 실시하였다. 공시한 모든 균주는 SM, AK, NF 및 GM등에는 100% 감수성을 보였으나, 대부분의 균주가 SD(86균주), AM(84균주), PM(80균주), NA(67균주), OT(44균주) 및 OA(37균주) 등의 내성을 보였다. 내성유형은 20유형으로서 거의 모든 균주가 2제 이상의 다제내성을 보였으며, 그중 SD-AM-PM-NA-OA(16균주), SD-AM-PM-NA(14균주), SD-AM-PM-NA-OT-OA(12균주), SD-AM-PM-OT(10균주) 및 SD-AM-PM-NA-OT(8균주) 유형등이 고빈도로 출현하였다. 내성균주의 내성인자 전달 빈도는 94균주중에서 78균주가 단계에서 6제까지의 다제내성인자의 전달을 보였다. 그중 AM 및 AM-PM-NA유형(8균주), PM,SD 및 AM-SD유형(6균주), AM-PM, PM-SD 및 AM-SD-OT유형(4균주)등이 고빈도 출현을 보였다. 이러한 결과는 양만장에서 다양한 항균제를 사용하였기 때문에 다제내성현상이 확산되어진 것으로 사료된다.

Key words : *Edwardsiella tarda*, Drug resistance, R plasmid, Cultured eels

가온식 양식장의 뱀장어 에드워드병이 어체의 크기 및 계절에 관계없이 연중 지속적으로 발병하여 경제적으로 많은 손실을 초래한다(Chun 1988 ; Choi and Kim 1994 ; Aoki *et al.*, 1981). 이 병의 원인체인 *E. tarda*균은 기회감염균으로서 선별시 뱀장어 및 사육수의 혼입에 따른 균의 확산이 용이하기 때문에 본증을 근절시키기가 매우 어렵다(Aoki *et al.*, 1987 ; 1989).

통상적으로 이 병의 치료 및 예방을 위해서 실시하고 있는 방법으로는 항균 및 화학요법에 의존하고 있는 실정이나, 무분별한 항균제의 남용 및 오용 등으로 인한 내성균의 출현 특히 다제내성균의 증가로 인하여 예방 및 치료에 커다란 어려움을 겪고 있는 실정이다(Aoki *et al.*, 1981 ; 1987 ; Chun, 1988 ; Choi and Kim 1994).

이에, 저자들은 뱀장어의 에드워드병에 대한 적절한 예방 및 치료약제 선발을 위해 이 병에 이환된 어체로부터 *E. tarda*균을 분리하고 이들 분리균의 항균제 감수성 검사와 내성인자 전달시험을 실시하였던 바 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

공시균주의 분리 및 동정

군산 일원의 가온 양만장에서 사육중인 뱀장어를 대상으로 에드워드병을 보이는 어체를 실험실로 운반한 다음 신장으로 부터 균을 순수분리하여 Wyatt 등(1979)의 방법에 준하여 *E. tarda* 균을 동정하여 공시하였다.

공시항균제

공시한 항균제로는 nalidixic acid(NA), gentamicin(GM), streptomycin(SM), norfloxacin(NF), ampicillin(AM), oxytetracycline(OT), penicillin(PM), amikacin(AK), sulfadimethoxine(SD) 및 oxolinic acid(OA) 등의 10종의 약제(Sigma)를 사용하였다. 이때 각각의 약제를 적당한 용매로 용해시킨 후 멸균 증류수로 희석하여 사용하였다(Choi and Kim, 1994).

약제 감수성 시험

약제감수성시험은 한천희석법으로 실시하였다. 즉 Brain-heart infusion agar(BHIA, Difco Lab, pH 7.2) 배지에 제대 배양한 분리균주를 brain heart infusion broth(BHIB, Difco Lab, pH 7.2)에서 18시간 배양한 대수증식기의 균주를 약제가 첨가된 Mueller-Hinton agar(MHA, Difco Lab, pH 7.2) 평판배지에 접종, 35°C에서, 48시간 배양한 다음 발육하지 않으면 감수성, 발육하면 내성으로 판정하였으며 동시에 내성균의 분포 및 다제내성 빈도를 파악하였다.

내성전달시험에 사용한 배지 및 균주

BHIB를 증균배지로 사용하였으며 공여균으로는 항균제 감수성검사 결과 내성균주를, 수용균으로는 *E. coli* JM 109균주를 사용하였다. 선택배지는 공시항생제중 필요에 따라 내성을 보인 1제를 함께 첨가한 MacConkey agar(MA, Difco Lab., pH 7.2)를 사용하였다.

약제내성전달시험

BHIB의 증균배지에 18시간 배양한 공여균과 수용균의 균액을 1:4의 비율로 혼합하여 18시간 배양하였다. 내성을 전달받은 수용균을 검출하기 위하여 내성을 보인 1제의 항균제를 첨가한 선택배지에 접종하였으며 48시간 배양후 이 배지상에서

증식하면 약제내성전달 양성으로 판정하였다.

결 과

Table 1. Drug resistance of *E. tarda* isolated from diseased eel

Antibiotics	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Resistant strains	
		No.*	percentage
SD	300	86	90
AM	10	84	88
PM	10	80	83
NA	30	67	70
OT	30	44	46
OA	2	37	39
SM	10	0	0
AK	30	0	0
NF	10	0	0
GM	10	0	0

Abbreviation : SD, sulfadimethoxine ; AM, ampicillin ; PM, penicillin G ; NA, nalidixic acid ; OT, oxytetracycline ; OA, oxolinic acid ; SM, streptomycin ; AK, amikacin ; NF, norfloxacin ; GM, gentamicin ; * : The total number of tested strains was ninety six.

분리균주의 약제내성율

뱀장어로부터 분리한 96균주의 *E. tarda*에 10종의 항균제에 대한 감수성 검사를 실시한 성적은 Table 1과 같다. SD(90%), AM(88%), PM(83%), 및 NA(70%)등에는 고빈도의 내성율을 보였으며, OT(46%) 및 OA(39%)등에는 중등도의 내성율을 보였다. 한편 SM, AK, NF 및 GM등에는 전혀 내성을 보이지 않았다.

항균제 내성유형

항균제의 내성유형은 Table 2와 같다. 즉 내성유

Table 2. Multiple drug resistance patterns of *E. tarda* isolated from diseased eels

Resistance patterns	Incidence of resistance patterns	
	No. of Individual strains(%)	Group(%)*
AM	1(1)	1(1)
AM-PM	4(4)	9(10)
SD-AM	4(4)	
SD-OA	1(1)	
AM-PM-NA	3(3)	10(11)
SD-PM-NA	3(3)	
SD-AM-PM	2(2)	
SD-PM-OT	1(1)	
SD-NA-OT	1(1)	
SD-AM-PM-NA	14(15)	33(35)
SD-AM-PM-OT	10(11)	
SD-AM-NA-OT	3(3)	
SD-PM-NA-OT	3(3)	
SD-AM-PM-OA	2(2)	
SD-NA-OT-OA	1(1)	
SD-AM-PM-NA-OA	16(19)	29(30)
SD-AM-PM-NA-OT	8(8)	
SD-AM-NA-OT-OA	3(3)	
SD-AM-PM-OT-OA	2(2)	
SD-AM-PM-NA-OT-OA	12(13)	12(13)
Total 20patterns	94(100)	94(100)

Abbreviation : Refer to Table 1. * : summed up resistant strains as group based on the number of drugs.

Table 3. Frequency of transferred R plasmid in resistant strains

Antibiotics	No. of tested resistant strains*	Resistance transferred strains
		No.(%)
AM	84	50(60)
PM	80	43(54)
SD	86	38(44)
NA	67	29(43)
OA	37	16(43)
OT	44	18(41)

Abbreviation : Refer to Table 1.

Table 4. Frequency of transferred R plasmid in *E. tarda* isolated from diseased eels

Resistance patterns transferred	Incidence of transferred pattern	
	No. of Individual strains(%)	Group(%)*
MONE	14(15)	14(11)
AM	8(9)	22(23)
PM	6(6)	
SD	6(6)	
OA	1(1)	
OT	1(1)	
AM-SD	6(6)	21(22)
PM-SD	4(4)	
AM-PM	4(4)	
AM-NA	2(2)	
PM-OA	1(1)	
SD-NA	1(1)	
PM-NA	1(1)	
PM-OT	1(1)	
SD-OT	1(1)	
AM-PM-NA	8(9)	23(25)
AM-SD-OT	4(4)	
AM-NA-OT	2(2)	
AM-PM-SD	1(1)	
AM-OA-OT	1(1)	
AM-SD-OA	1(1)	
AM-NA-OA	1(1)	
PM-SD-OT	1(1)	
PM-SD-OA	1(1)	
PM-NA-OA	1(1)	
PM-SD-NA	1(1)	
SD-OA-OT	1(1)	
AM-PM-NA-OA	3(3)	10(11)
AM-PM-SD-NA	2(2)	
PM-SD-NA-OT	2(2)	
AM-PM-NA-OT	1(1)	
AM-PM-SD-OT	1(1)	
AM-SD-OA-OT	1(1)	
AM-PM-SD-NA-OA	3(3)	3(3)
AM-PM-SD-NA-OA-OT	1(1)	1(1)
Total 35 patterns	94(100)	94(100)

Abbreviation : Refer to Table 1. * : Refer to Table 2.

형은 20유형으로서 대부분의 균주에서 2제 이상의 다제성을 보였으며, 그중 SD-AM-PM-NA-OA(16균주), SD-AM-PM-NA(14균주), SD-AM-PM-NA-OT-OA(12균주), SD-AM-PM-OT(10균주) 및 SD-AM-PM-NA-OT(8균주) 유형등이 고빈도 출현을 보였다.

약제별 내성인자 전달율

공시 내성균주의 내성인자 전달 빈도는 Table 3과 같다. 즉 AM(60%), PM(54%), SD(44%), NA(43%), OA(43%) 및 OT(41%)순으로 내성인자의 전달을 보였다.

내성인자의 전달유형

내성인자의 전달유형은 Table 4와 같다. 즉 총 35유형으로서 단계에서 6제까지 내성인자의 전달을 보였다. 그중 1-4제의 내성인자전달이 76균주로 전체의 81%를 차지하였으며 또한 5-6제의 내성인자의 전달도 4균주(4%)나 되었다. 한편 AM 및 AM-PM-NA유형이 각각 8균주(9%), PM, SD 및 AM-SD유형이 각각 6균주(6%), AM-PM, PM-SD 및 AM-SD-OT유형이 각각 4균주(4%)순으로 비교적 높은 내성인자 전달율을 보였다.

고 찰

에드워드병에 이환된 양식뱀장어로 부터 *E. tarda* 균을 분리한 후 SD, AM, PM, NA, OT, OA, SM, AK, NF 및 GM등의 약제에 대한 *in vitro*에서 약제감수성 검사를 실시하였던 바 SM, AK, NF 및 GM등에는 탁월한 감수성을 보였지만 OT 및 OA 등에는 39-46%로 중등도의 내성을 SD, AM, PM 및 NA등에는 70-90%의 고빈도의 내성을 보였다. 이와같은 결과는 항생제 사용빈도에 비례하여 내성현상이 증가되었다는 보고 등(Aoki *et al.*, 1981; 1987; Sugita *et al.*, 1989; Grave *et al.*, 1990)으로 미루어 군산 근교의 양만장에서도 SD, AM, PM,

NA, OT 및 OA등의 약제를 고빈도로 사용하였기 때문에 이들 약제에 대해서 높은 내성율을 보이는 것으로 추정된다. 더우기 공시한 대부분의 균주에서 4제 이상의 약제에 대해 다제내성을 보이는 균주가 전체의 79%를 차지 하였으며, 주로 SD-AM-PM-NA, SD-AM-PM-OT, SD-AM-PM-NA-OA, SD-AM-PM-NA-OT 및 SD-AM-PM-NA-OT-OA유형등이 고빈도의 출현을 보여 다제내성의 심각성을 보였다. 이러한 다제내성균의 출현은 항생제의 부적절한 사용, 빠른 교체 및 사료내의 첨가등의 경로를 통한 각종 항균제에 대한 지속적인 노출이 주요한 원인이라는 보고 등(Cravedi *et al.*, 1980; Grave *et al.*, 1990; Bjorkrond *et al.*, 1990)으로 미루어 볼때 앞으로 무분별한 수산약제의 사용규제 방안이 검토되어야 할 것으로 사료된다.

최근 뱀장어 유래의 *E. tarda* 균에서 tetracycline, chloramphenicol 및 sulfonamide등의 다제내성인자 전달능을 갖는 균주의 급속한 확산현상이 세균성 질병의 치료를 어렵게 만드는 주요한 요인이라고 보고되었다(Aoki *et al.*, 1981; 1989; McPhearson *et al.*, 1991). 본 연구에서 AM, SD, NA, OA 및 OT등의 약제에 대한 내성인자의 전달율이 40-80%를 보였다. 더우기 AM-SD, AM-PM, PM-SD, AM-SD-OT 및 AM-PM-NA 유형등의 다제내성인자 전달율이 50%이상 이 나타났으며 비교적 내성율이 높은 약제일수록 내성인자의 전달이 높게 이루어 짐을 알수 있었다. 이러한 결과로 볼 때 뱀장어 사육시 비단 에드워드병 뿐만아니라 다른 세균성 질병의 예방 및 치료에도 많은 어려움이 예상된다. 그러므로 이러한 다제내성균의 확산을 방지하기 위해서는 치료약제 선택시 신중을 기하며 충분한 기간을 두고 치료하는 것은 물론 적절한 용량을 사용하도록 해야만 할 것이다. 그러나 무엇보다도 사육조 및 기구등의 위생환경면에도 많은 관심을 기울여서 가능한 한 약제의 사용을 최소화 하도록 하여야 할 것이다.

한편, 뱀장어 양식장에서 세균성 질병의 예방 및

치료등의 목적으로 널리 이용되고 있는 OT, NA 및 OA등에 대한 내성균의 출현 빈도 및 내성인자의 출현율이 비교적 높게 나타난 결과는 타 보고자들의 결과들(Endo *et al.*, 1973; Aoki *et al.* 1989)과 일치하고 있다. OA나 NA에 대한 내성발현의 기전은 이들 약제의 살균 기전상의 저해효소인 DNA-gyrase 변이와 OT 내성 균주에서 OA에 대한 교차내성인자(37 Kd)의 존재에 따른 세포막의 투과성 감소에 기인되는 것으로 보고되고있다(Dubnau *et al.*, 1986; Gutmann *et al.*, 1985; Yamagishi *et al.*, 1986). 그러므로 본 실험의 결과도 같은 기전에 의해서 내성율이 비교적 높게 나타난 것으로 사료되지만 앞으로 이에 대한 정확한 연구가 수행되어져야 하리라 사료된다.

참 고 문 헌

- Aoki, T. and Kitao, T. : Drug resistance and transferable R plasmid in *Edwardsiella tarda* in fish culture ponds. *Fish. Pathol.*, 15 : 277-281, 1981.
- Aoki, T., Sakaguchi, T. and Kitao, T. : Multiple drug resistant plasmid from *Edwardsiella tarda* in culture ponds. *Nippon Suisan Gakkashi*, 53 : 1821-1825, 1987.
- Aoki, T., Kitao, T. and Fukudome, M. : Chemotherapy against infection with multiple drug resistant strains of *Edwardsiella tarda* in cultured eel. *Fish Pathol.*, 34(3) : 161-168, 1989.
- Bjorklund, H., Bonerstam, J., Bylund, G. : Residues of oxytetracycline in wild fish and sediments from fish farms. *Aquaculture*, 86 : 359-367, 1990.
- Choi, M. S. and Kim, Y. G. : Antibiotic resistance and R plasmids in *Edwardsiella tarda* from eel culture ponds. *J. Fish. Pathol.*, 7(1) : 37-46, 1994.
- Chun, S. K. : Detection and control of bacterial diseases of cultured fishes in Korea, *Bull. Kor. Soc. Fish Pathology*, 1 : 1, 5-30, 1988.
- Cravedi, J. P., Choubert, G. and Delous, G. : Digestibility of chloramphenicol, oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout and influence of these antibiotics on lipid digestability. *Aquaculture*, 60 : 133-141, 1987.
- Dubnau, D. and Monod, M. : The regulation and evolution of MLS resistance. in antibiotic resistance genes : Ecology : transfer and repression. pp.369-387, Cold-Spring Harbor Lab., 1986.
- Endo, T., Ogishima, K., Hayasaki, H., Kaneko, S. and Ohshima, S. : Application of oxolinic acid as a chemotherapeutic agent for treating infectious disease in fish. I. Antibacterial activity, chemotherapeutic effect and pharmacokinetic effect of oxolinic acid in fish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 39 : 165-171, 1973.
- Grave, K., Engelstad, M., Soli, N. E. and Hastein, T. : Utilization of antibacterial drugs in salmonid farming in Norway during 1980-1988, *Aquaculture*, 86 : 347-358, 1990.
- Gutmann, L., Williamson, R., Moreau, N., Kitzis, M. D., Collatz, E., Acar, J. F. and Goldstein, F. W. : Cross resistance to nalidixic acid, trimethoprim, and chloramphenicol associated with alterations in outer membrane proteins of klebsiella, Enterobacter, and Serratia. *J. Inf. Dis.*, 151 : 501-507, 1985.
- McPheatson, R. M., Depaola, A., Zywno, S. R., Motes, M. L., Jr. and Guarino, A. M. : Antibiotic resistance in Gram negative bacteria from cultured catfish and culture ponds. *Aquaculture*, 99 : 203-211, 1991.
- Sugita, H., Miyajima, C., Fukumoto, M., Koyama, H. and Deguchi, Y. : Effect of oxolinic acid on fecal microflora of goldfish(*Carassius auratus*), *Aquaculture*, 80 : 163-174, 1989.
- Yamagishi, J., Yoshida, H., Yamayoshi, M. and S. Nakamura. : Nalidixic acid-resistant mutations of the GyrB gene of *Escherichia coli*. *Mol. Genet.*, 204 : 367-373, 1986.
- Wyatt, L. E., Nickelson, R. I. I. and Vanderzant, C. : *Edwardsiella tarda* in fresh water catfish and their environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39(4) : 710-714, 1979.

Survey of drug resistance in *Edwardsiella tarda* isolated from diseased eels(*Anguilla japonica*)

Min-Soon Choi, Kwan-Ha Park, Sang-Hoon Choi, Seon-il Jang*
Chang-Yong Yoon**, Jeong-Gon Cho** and Hee-Jong Song**

Dept. of Fish Pathology, Kunsan National University, Chonbuk 573-400, Korea

*Aquaculture Division, Chugok pyung Fisheries Research Institute, National

Fisheries Reserach & Development Agency, Korea **Dept. of Veterinary

Medicine, Chonbuk National University, Chunju 560-756, Korea

Ninety-six isolates of *Edwardsiella tarda* recovered from outbreaks of Edwardsiellosis in cultured eels(*Anguilla japonica*) in Kunsan, were examined for drug susceptibility, distribution and transferabilities of R plasmid. All of the *E. tarda* isolates examined were sensitive to gentamicin(GM), streptomycin(SM), norfloxacin(NF), and amikacin(AK). But most isolates were resistant to sulfadimethoxine(SD, 86 strains), ampicillin(AM, 84 strains), penicillin G(PM, 80 strains), nalidixic acid(NA, 67 strains), oxytetracycline(OT, 44 strains), and oxolinic acid(OA, 37 strains). Twenty different combinations of drug resistance patterns were observed : the frequently encountered pattern was SD-AM-PM-NA-OA(16 strains), SD-AM-PM-NA(14 strains), SD-AM-PM-NA-OT-OA(12 strains), SD-AM-PM-OT(10 strains), and SD-AM-PM-NA-OT(8 strains). Transferable R plasmids were found out to be carried in 78 out of 94 resistant strains, indicating that these isolates carry conjugally transferable R plasmids associated with single or multiple drugs. The frequently observed transferable R plasmids were AM(8 strains), AM-PM-NA(8 strains), Am-SD(6 strains), PM(6 strains), and SD(6 strains) These results suggest that high dose of various antibacterials might have already been introduced to eel culture system leading to the acquirement of multi-drug resistance to wide range of antibacterials.

Key words : *Edwardsiella tarda*, Drug resistance, R plasmid, Cultured eels