

Tiamulin⁰이 *Streptococcus parauberis* HFTC0083에 감염된 강도다리(*Platichthys stellatus*)에 미치는 영향

주민수¹ · 김보성² · 김도형² · 서정수³ · 권문경³ · 지보영³ · 박찬일^{1*}

¹경상대학교 해양과학대학 해양생명과학과

²부경대학교 수산생명의학과

³국립수산과학원 수산방역과

Effects of Tiamulin on Starry Flounder, *Platichthys stellatus* Infected with *Streptococcus parauberis* HFTC0083

Min-Soo Joo¹, Boseong Kim², Do-Hyung Kim², Jung-Soo Seo³, Mun-Gyeong Kwon³, Bo-Young Jee³, Chan-Il Park^{1*}

¹Institute of Marine Industry, Department of Marine Biology and Aquaculture, College of Marine Science, Gyeongsang National University, Gyongsangnam-do 53064, Korea

²Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

³Aquatic Life Disease Control Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

Corresponding Author

Chan-Il Park

Institute of Marine Industry, Department of Marine Biology and Aquaculture, College of Marine Science, Gyeongsang National University, Gyongsangnam-do 53064, Korea

E-mail : vinus96@hanmail.net

Received : May 21, 2019

Revised : May 23, 2019

Accepted : June 11, 2019

수산 양식 산업에서 발생하는 다제내성균에 의한 질병을 통제하기 위해 기존에 사용하던 수산용 의약품 대신 어류에 사용이 금지된 동물용 의약품 사용이 증가하고 있다. 그 중, 티아물린은 그람 양성균에 효과적인 항균성을 나타내기 때문에 일부 양식 어가에서 불법적으로 사용되고 있다. 불법적 사용을 막기 위해서는 티아물린의 수산동물에 대한 연구를 통해 수의사나 수산질병관리사의 처방전에 따라 수산생물의 치료행위가 수반되어야 한다. 연쇄구균에 감염된 강도다리에 대해 티아물린을 5, 10, 15 mg kg⁻¹의 농도로 근육주사 하였으나 치료 효과가 나타나지 않았고 15, 30 mg kg⁻¹의 농도로 경구투여 하였으나 마찬가지로 치료 효과가 미비하였다. 안전성 확인을 위해 30, 60 mg kg⁻¹의 농도로 근육주사와 경구투여한 경우 항생제의 독성에 의한 폐사가 발생하였고 따라서 연쇄구균에 감염된 강도다리에 티아물린으로 항생제 치료를 하는 것은 부적절하다고 할 수 있다.

In order to control disease caused by multi-drug resistant bacteria in the aquaculture, the use of veterinary antibiotics, which are prohibited to fish, is increasing, instead of the existing fisheries antibiotics. Among them, tiamulin is illegally used in some cultured fish because it exhibits effective antibacterial activity against Gram-positive bacteria. To prevent unauthorized use, treatment of fish should be accompanied by a prescription from veterinarians or fisheries disease managers through research on fish of tiamulin. Tiamulin was injected intramuscularly at 5, 10 and 15 mg kg⁻¹ for the *streptococcus*-infected starry flounder, but did not show any therapeutic effect. Oral administration at a concentration of 15 and 30 mg kg⁻¹ was similarly ineffective. The concentrations of 30 and 60 mg kg⁻¹ resulted in death due to toxicity of antibiotics. Therefore, it is inappropriate to treat antibiotics with *streptococcus*-infected starry flounder.

Keywords: Tiamulin(티아물린), Starry flounder(강도다리), *Streptococcus parauberis*(연쇄구균), Efficacy(유효성), Safety(안전성)

서론

전 세계적으로 양식 산업이 급성장함에 따라 양식 생물의 질병 발생도 증가하게 되었고 양식 현장에서 수산용 의약품의 사용 빈도 또한 증가하고 있다. 수산용 의약품의 오·남용으로 인해 내성균이 출현하게 되고(Smith et al., 1994) 양식 생물의 안전성과 수산식품의 공중위생학적 안전성에 심각한 문제를 일으키기도 한다(Katz and Brady, 2000). 기존의 수산용 의약품에 내성을 가지는 균주를 억제하기 위해서는 새로운 의약품을 사용하여야 한다. 현재 포유류나 가금류에 사용하고 있는 동물용 의약품들 중에서 어류에 질병을 일으키는 세균에도 좋은 치료 효과를 나타내는 항생제들은 수의사로부터 처방 받고 구매하여 어류에도 사용할 수 있다. 하지만 이 동물용 의약품들은 어종별, 항생제별로 적절한 용량과 용법이 정해져 있지 않고, 수산질병관리를 통한 처방과 구매가 불법인 상황이다. 그럼에도 불구하고, 일부 양식 어가에서 불법적으로 동물용 의약품을 사용하는 사례가 발생하고 있다.

Pleuromutilin은 담자균류인 *Pleurotus mutilus*에서 처음 발견되었고(Kavanagh et al., 1951), pleuromutilin으로부터 반합성된 tiamulin은 세균 ribosome의 50S subunit을 타겟으로 하여 peptidyl transferase center에서 세포벽 합성을 억제하여 정균활성을 나타낸다고 알려져 있다(Bøsling et al., 2003). Tiamulin은 *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. meleagridis* 그리고 *M. iowae*와 같은 *Mycoplasma* 균주들에 강한 항균활성을 나타내며 그람 양성균에도 좋은 항균성을 나타내지만 그람 음성균에는 비교적 약한 활성을 나타낸다(Werner et al., 1978; Messier et al., 1990). Tiamulin은 돼지와 가금류의 이질, 폐렴, mycoplasma 감염에 대한 치료제로써 축산 농가에서 주로 사용되고 있으며, 돼지의 장관 전염병으로써 대장의 염증과 혈액성 하리가 특징인 돈적리에 효과적이다.

*Streptococcus parauberis*는 우리나라 강도다리 양식 현장에서 여름철 고수온기에 많은 피해를 입히는 원인 균주로써(Woo and Park, 2013) *S. parauberis*에 감염된 어류는 외부 증상으로 출혈과 농양을 동반한 안구 돌출, 체색 흑화 등이 나타나고 내부 증상으로는 비장과 간의 비대, 복부와 복벽의 점상출혈 등이 나타난다고 알려져 있다(Doménech et al., 1996).

이번 연구에서는 우리나라의 강도다리 양식 현장에서 발생하는 주요한 질병인 연쇄구균병에 대한 치료제로써 tiamulin의 유효성과 안전성에 관한 연구를 수행하였다. 연쇄구균에 감염된 강도다리에 다양한 농도별, 방법별로 항생제를 투여하여 나타나는 치료 효과를 확인하였으며, 고농도로 tiamulin을 투여하여 강도다리의 내부 조직에 항생제가 어떤 영향을 미치는지 확인하여 수산용 항생제로써의 적용가능성을 검토해 보았다.

재료 및 방법

1. 실험어

강도다리는 경상북도 포항 소재의 한 양식장으로부터 구입하였으며 *S. parauberis*에 감염된 이력이 없는 것을 사용하였다. 농도별 근육주사 실험에 사용된 강도다리는 평균 체장 12.3 ± 0.8 cm, 평균 체중 38.2 ± 2.3 g이었으며 농도별 경구투여 실험과 근육주사와 경구투여 후 안전성 검사에 사용된 강도다리는 평균 체장 10.5 ± 0.7 cm, 평균 체중 29.6 ± 1.3 g이었다. 실험에 사용하기 전 일주일간 250 ℓ의 유수식 수조에 순치하였다. 수조의 유수량은 수조 당 1.44 l/min이었고 지속적인 유수를 통하여 수질을 유지하였다.

2. 항생제

근육주사용 tiamulin은 엘캄코바이오사의 바이오-티아물린 10% 주(본제 1 ml 중 tiamulin hydrogen fumarate 100 mg 함유)를 사용하였으며 경구투여용 tiamulin은 (주)우진B&G의 데나가드39(본제 1 kg 중 tiamulin hydrogen fumarate 39 g 함유)를 사용하였다.

3. 균주

2015년에 경상북도 영덕의 한 양식장에서 연쇄구균에 감염된 강도다리로부터 분리된 *S. parauberis* HFTC0083 균주를 사용하여 인위감염 실험을 진행하였다. 사용 균주는 1% NaCl이 첨가된 Brain Heart Infusion Agar (BHIA; Difco, USA) 증균 배지를 사용하여 27°C에서 24시간 배양하였고 배양된 균주는 인위감염에 사용하였다. 균주는 실험에 사용될 때까지 -80°C에 보관하였다. 인위감염 후 폐사하는 개체의 신장과 비장으로부터 균을 재 분리하여 동정하기 위해 특이적인 primer (Mata et al., 2004)를 이용한 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 동정하였으며 PCR 조건은 94°C에서 2분간 initial denaturation 하고, 후에 92°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에 1분 30초를 1회로 하여 총 25회 반응시켰으며, 마지막으로 72°C에서 5분간 final extension 하였다(Table 1).

4. 근육주사의 농도별 유효성 조사

강도다리에 대한 tiamulin의 근육주사 농도별 유효성을 확인하기 위하여 Joo et al. (2019)의 연구에서 기술한 방법을 참고하여 실험을 진행하였다. 실험 수온은 24~25°C를 유지하였으며, PBS에 현탁시킨 *S. parauberis* HFTC0083 균주를 어체 당 3×10^3 CFU의 농도로 100 µl를 피하주사 하여 인위감염을 실시하였다. 인위감염을 실시한 지 24시간 후에 주사용 tiamulin을 어체중(kg) 당 각각 5, 10, 15 mg이 되도록 PBS에 희석하여 100 µl를 등근육에 주사하였

Table 1. Specific primers for *S. parauberis* detection

Primer	Sequences (5' → 3')	Target gene	Product size (bp)
Spa2152	TTTCGTCTGAGGCAATGTTG	23s rRNA	718
Spa2870	GCTTCATATATCGCTATACT		

다. 음성 대조구는 세균 접종 대신 PBS를 동량 피하주사하고 24시간 후에 항생제 대신 PBS를 동량 근육주사 하였다. 양성 대조구는 인위감염을 실시하였고 24시간 후에 항생제 대신 PBS를 동량 근육주사 하였다. 대조구는 각각 12마리, 실험구는 각각 24마리의 강도다리를 사용하였다. 인위감염 후 2주간 폐사율을 관찰하였으며 15일째에 각 실험 수조의 생존한 개체들을 마취시킨 후 해부하고 신장을 0.1 g (ml) 적출한 뒤 PBS와 함께 마쇄하여 단계 희석하고 BHIA 배지에 도말하여 감염률을 확인하였다.

5. 경구투여의 농도별 유효성 조사

강도다리에 대한 tiamulin의 경구투여 농도별 유효성을 확인하기 위하여 Joo et al. (2019)의 연구에서 기술한 방법을 참고하여 실험을 진행하였다. 실험 수온과 인위감염 조건은 근육주사 농도별 유효성 확인 실험과 같은 조건으로 진행되었다. 앞선 실험에서 결정된 최적 농도와 2배 농도로 설정하여 실험을 진행하였다. 인위감염을 실시한 지 24시간 후에 경구투여용 tiamulin을 어체중(kg) 당 각각 15, 30 mg이 되도록 PBS에 희석하였고 100 µl를 zonde를 사용하여 5일간 1일 1회 경구투여 하였다. 각 실험구 당 20마리의 강도다리를 사용하였다. 인위감염 후 2주간 폐사율을 관찰하였으며 15일째에 생존한 개체들의 감염률을 확인하였다.

6. 근육주사와 경구투여 후 강도다리의 안전성 분석

Tiamulin이 어체에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Joo et al. (2019)의 연구에서 기술한 방법을 참고하여 병리조직학적 분석을 진행하였다. PBS를 100 µl 근육주사 또는 경구투여한 대조구, 근육주사용 tiamulin을 PBS에 희석하여 15, 30, 60 mg kg⁻¹의 농도로 100 µl 근육주사한 세 가지 실험구와 경구투여용 tiamulin을 PBS에 희석하여 15, 60 mg kg⁻¹의 농도로 100 µl 경구투여한 두 가지 실험구로 나누었고 각 실험구 당 20마리의 실험어를 사용하였다. 근육주사는 1회 실시하였으며 24시간 동안 나타나는 폐사율을 확인하였다. 경구투여는 5일간 1일 1회 투여하였으며 경구투여하지 0(대조구), 1, 2, 4, 7, 14, 21일 후에 각 수조에서 3마리씩 무작위로 선택하여 마취하고 해부하여 간, 신장, 근육 조직을 적출하였다. 적출한 조직을 10% 중성 포르말린 용액에 전 고정하였고 세절한 후 동일한 고정액에 후 고정하였으며 70%에서 100% 에탄올로 순

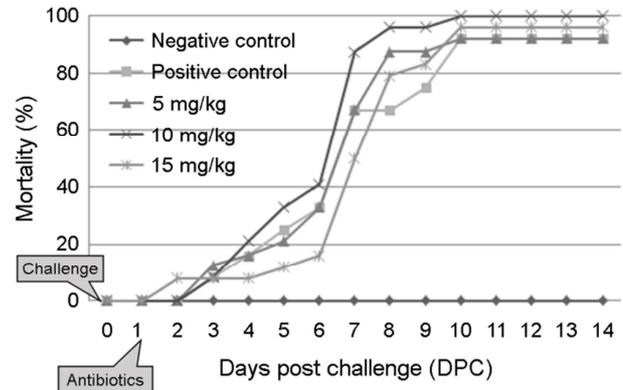


Fig. 1. Determination of cumulative mortality from each concentration of intramuscular injection of tiamulin against starry flounder infected with *S. parauberis* HFTC0083.

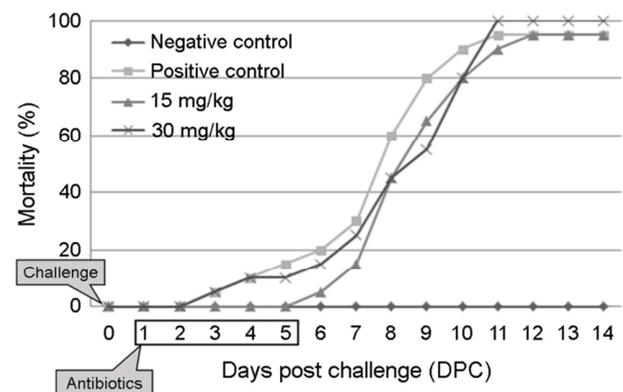


Fig. 2. Determination of cumulative mortality from each concentration of oral administration of tiamulin against starry flounder infected with *S. parauberis* HFTC0083.

차적인 탈수, xylene으로 투명화, paraplast로 치환 과정을 통하여 각 장기를 4 µm 두께로 절편 제작하여 H&E 염색을 실시하였다. 그 후에 염색된 장기 절편들은 광학 현미경상에서 400배율로 관찰하였다. 관찰하여 나타나는 병적 증상은 정도에 따라 정상, 경도, 중등도, 심도로 구분하였다.

결 과

1. 근육주사의 농도별 유효성

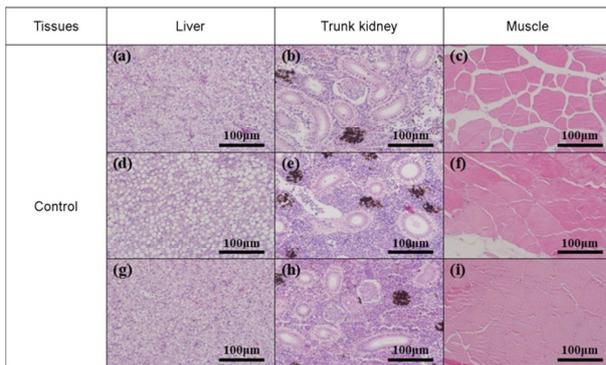
최초 폐사는 15 mg kg⁻¹ 실험구에서 발생하였고 day post challenge (DPC) 1에서 8.3%의 폐사율을 보였다. 양성 대조구와 5 mg kg⁻¹ 실험구의 최종누적폐사율은 92%로 나타났고 10 mg kg⁻¹ 실험

Table 2. The cumulative mortality and infection rate in survival fish of efficacy studies of injection method in *S. parauberis* HFTC0083 infected starry flounder by tiamulin dosing concentration

Group	Con (-)	Con (+)	5 mg kg ⁻¹	10 mg kg ⁻¹	15 mg kg ⁻¹
Cumulative mortality (%)	0	92	92	100	96
Infection rate (%) in survival fish	0 (0/10)	0 (0/2)	0 (0/2)	-	0 (0/1)

Table 3. The cumulative mortality and infection rate in survival fish of efficacy studies of oral administration method in *S. parauberis* HFTC0083 infected starry flounder by tiamulin dosing concentration

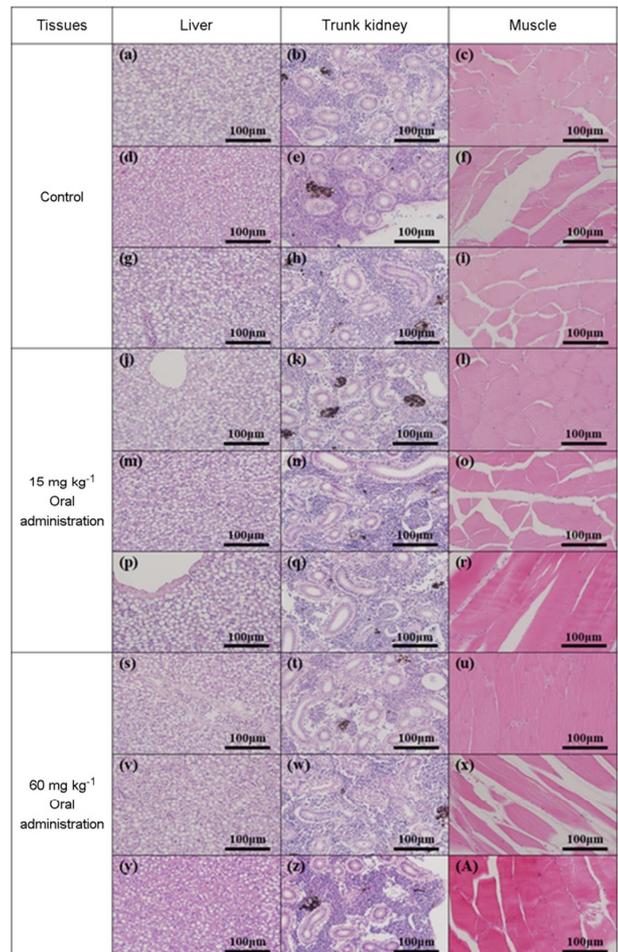
Group	Con (-)	Con (+)	15 mg kg ⁻¹	30 mg kg ⁻¹
Cumulative mortality (%)	0	95	95	100
Infection rate (%) in survival fish	0 (0/10)	100 (1/1)	0 (0/1)	-

**Fig. 3.** Pathological results of liver, trunk kidney and muscle after tiamulin oral administration by each concentration (0 day after injection).

험구의 폐사율은 100%, 15 mg kg⁻¹ 실험구의 폐사율은 96%로 확인되었다. 음성 대조구에서는 15일간 폐사가 나타나지 않았다(Fig. 1). 실험 종료 후 생존한 개체들의 감염률 확인 결과, 감염된 개체는 없었다(Table 2).

2. 경구투여의 농도별 유효성

최초 폐사는 양성 대조구와 30 mg kg⁻¹ 실험구에서 발생하였다. 양성 대조구와 15 mg kg⁻¹ 실험구의 최종누적폐사율은 95%로 나타났고 30 mg kg⁻¹ 실험구의 경우 100%의 폐사율이 확인되었다. 음성 대조구에서는 15일간 폐사가 나타나지 않았다(Fig. 2). 실험 종료 후 생존한 개체들의 감염률 확인 결과, 양성 대조구에서는 100%로 나타났고 음성 대조구와 15 mg kg⁻¹ 실험구는 0%로 확인되었다(Table 3).

**Fig. 4.** Pathological results of liver, trunk kidney and muscle after tiamulin oral administration by each concentration (1 day after injection).

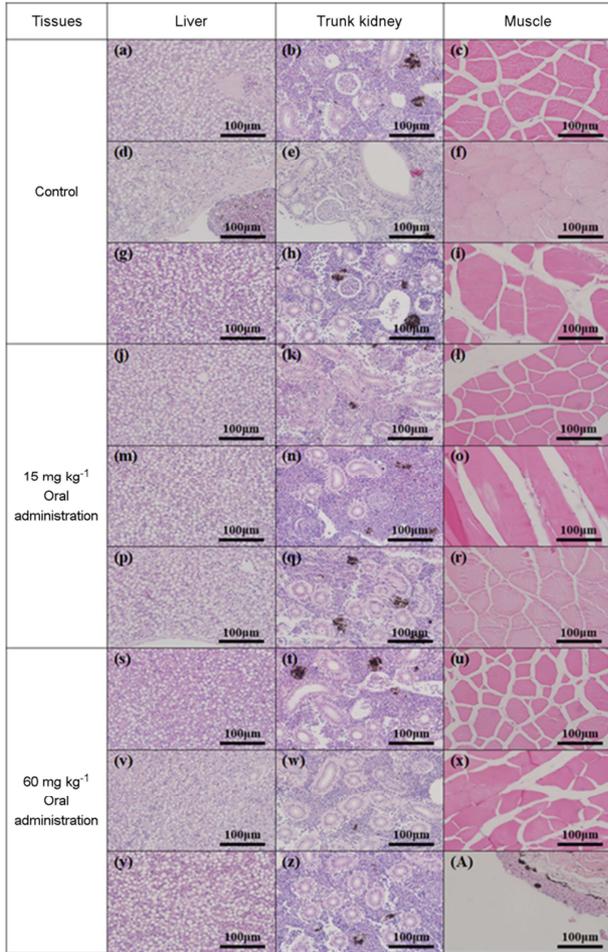


Fig. 5. Pathological results of liver, trunk kidney and muscle after tiamulin oral administration by each concentration (2 day after injection).

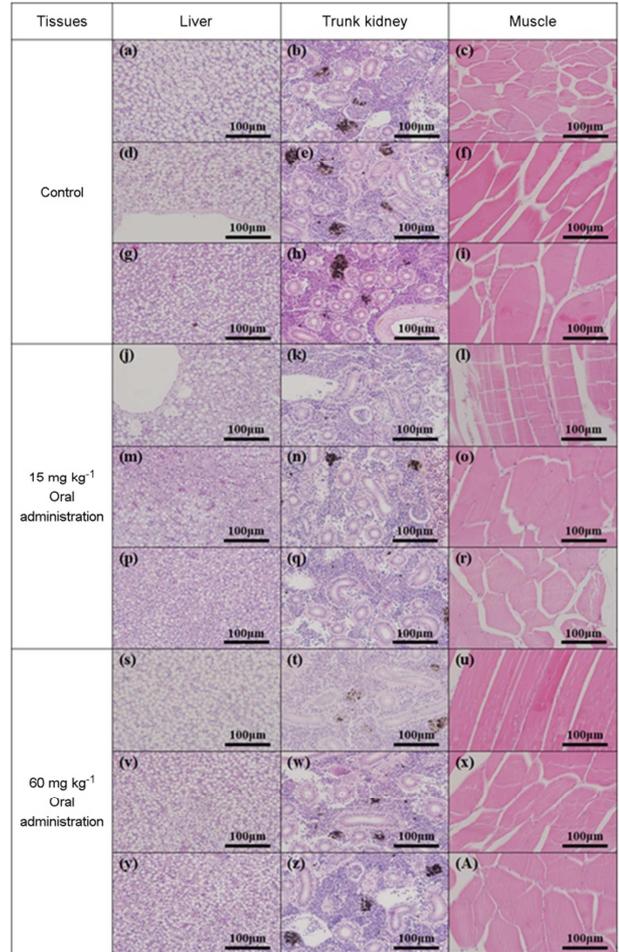


Fig. 6. Pathological results of liver, trunk kidney and muscle after tiamulin oral administration by each concentration (4 day after injection).

3. 근육주사와 경구투여 후 강도다리의 안전성

근육주사 24시간 후 30 mg kg⁻¹ 실험구의 폐사율은 25%로 나타났고 60 mg kg⁻¹ 실험구의 폐사율은 60%로 나타났다(data not shown). 경구투여한 실험구에서는 60 mg kg⁻¹ 실험구에서 3일차에 1마리, 4일차에 2마리의 폐사가 발생하였다. 조직검사 결과 모든 실험구에서 지방간이 관찰되었고(Fig. 3-9) 신장에서는 모든 실험구에서 전반적으로 경도의 조혈활성이 나타났고(Fig. 3-9) 15 mg kg⁻¹ 실험구에서는 1일차(Fig. 4-q), 2일차(Fig. 5-k)에서 중등도의 조혈활성이 관찰되었다. 60 mg kg⁻¹ 실험구에서는 1일차(Fig. 4-t, w)와 4일차(Fig. 6-w, z), 7일차(Fig. 7-t, w, z), 14일차(Fig. 8-t), 21일차(Fig. 9-z)에서 중등도의 조혈활성이 나타났다. 또한 신장에서 전반적으로 경도의 세뇨관 위축이 나타났으며 15 mg kg⁻¹ 실험구에서는 1일차(Fig. 4-n, q)와 14일차(Fig. 8-k), 21일차(Fig. 9-t)에서 중등도

의 세뇨관 위축이 나타났고 60 mg kg⁻¹ 실험구에서는 1일차(Fig. 4-w)와 2일차(Fig. 5-t), 7일차(Fig. 6-t, z)에서 중등도의 세뇨관 위축이 확인되었다. 그리고 신장에서 전반적으로 중등도의 reticuloendothelial system (RES) 활성이 확인되었다. 근육에서는 모든 실험구에서 특별한 증상이 발견되지 않았으며 유의적인 차이가 관찰되지 않았다.

고 찰

이번 연구에서는 *S. parauberis*에 의한 연쇄구균병에 걸린 강도다리에 대한 tiamulin 주사제의 유효 농도를 확인해 보기 위해 5 mg kg⁻¹, 10 mg kg⁻¹, 15 mg kg⁻¹의 농도로 설정하여 시험하였다. 농도 설정은 둔적리가 발병한 돼지에 대한 tiamulin 주사치료에 관한 연구(Burch et al, 1983)에서 설정한 실험 농도 10 mg kg⁻¹,

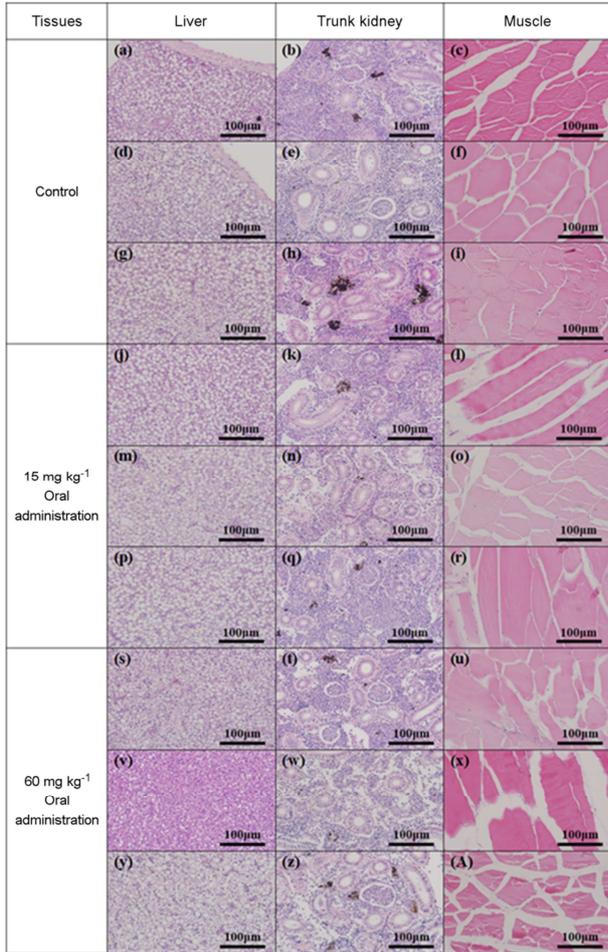


Fig. 7. Pathological results of liver, trunk kidney and muscle after tiamulin oral administration by each concentration (7 day after injection).

15 mg kg⁻¹과 제조사의 제품 사용기준인 10 mg kg⁻¹을 참고하였다. *In vitro*에서 *S. parauberis* HFTC0083에 대한 tiamulin hydrogen fumarate의 최소억제농도(Minimal inhibitory concentration, MIC) 확인 결과 1 µg ml⁻¹로 강한 감수성을 나타냈지만(data not shown) *in vivo*에서 근육주사와 경구투여 실험 결과에서는 치료 효과가 나타나지 않았다. 시험관 내에서 측정한 MIC로는 생체 내의 반응을 정확하게 예측할 수 없으며 투여한 항생제의 대부분이 체내에서 혈청 단백질과 결합된 상태로 존재하여 일부분만이 조직 내로 확산되는 경우에는 치료 효과를 기대하기 어려운 경우가 있다 (Lee and Shin, 2008).

Tiamulin의 강도다리에 대한 안전성을 확인하기 위해 주사제로 강도다리의 등근육에 15, 30, 60 mg kg⁻¹의 농도로 주사하였고 30, 60 mg kg⁻¹ 실험구에서는 주사 후 10분 이내에 주사 부위의 피부가 검게 변색되는 것을 관찰할 수 있었으며(Supplementary Fig. 1)

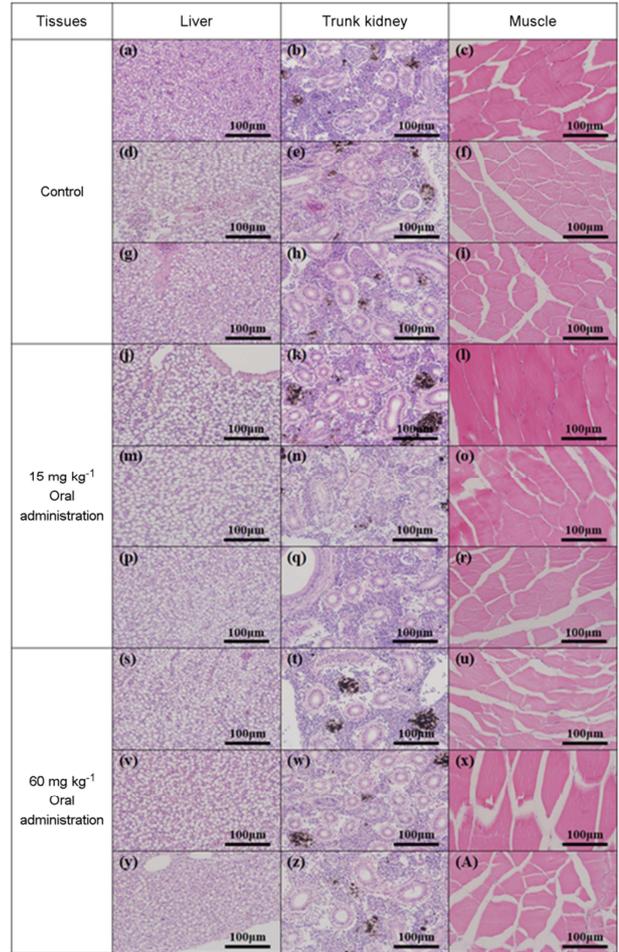


Fig. 8. Pathological results of liver, trunk kidney and muscle after tiamulin oral administration by each concentration (14 day after injection).

주사 후 3시간 이내에 각각 25%, 60%의 폐사가 나타난 것을 확인할 수 있었다. 또한 경구투여용 항생제를 5일간 15, 60 mg kg⁻¹의 농도로 투여하였을 때 60 mg kg⁻¹의 실험구에서 총 3마리의 폐사가 발생하였고, 병원체 감염 여부를 확인해 본 결과 감염되지 않은 것으로 확인되었기 때문에 고농도의 항생제 투여로 인한 폐사로 생각된다. 그리고 병리조직학적 검사 결과 전체 실험구에서 지방간이 관찰되었고, 신장의 경우 모든 실험구에서 전반적으로 약한 조혈활성과 세뇨관 위축이 나타났으며 중증도의 RES 활성이 확인되었다. 돼지의 경우 tiamulin 주사제(Denagard 10% injection, Premier Shukuroglou, Athens, Greece)를 과다투여하면 타액 분비, 구토 방향감각 상실, 간장 경련 등을 일으킬 수 있다고 명시되어 있다. 이외에도 European Medicines Agency (1999)의 연구에 따르면, 간 중량 증가나 지방 축적이 발생하거나, 신근장애, 저칼슘혈증, 심실 빈맥성 부정맥 등의 증상에 대한 지표인 QT interval의

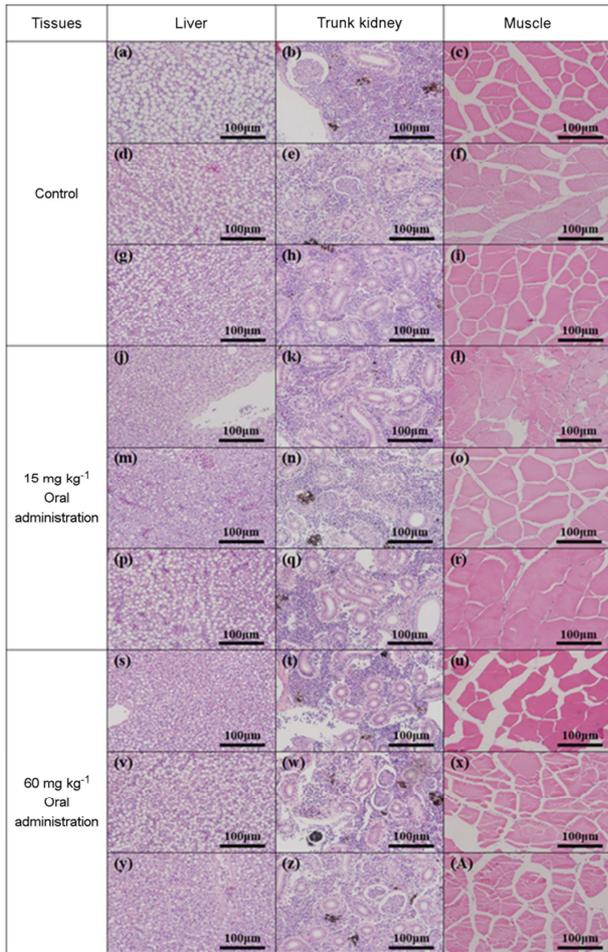


Fig. 9. Pathological results of liver, trunk kidney and muscle after tiamulin oral administration by each concentration (21 day after injection).

연장(Nachimuthu et al., 2012)과 심한 저칼륨 혈증, 동성맥, heart block을 야기할 수 있는 double peaked T-waves의 증가(Lionte et al., 2012) 등의 증상이 발생할 수 있다. 조혈활성은 평소에는 휴지기였다가 혈중 내에 세균이나 약물이 침투하게 되었을 때 활성이 나타난다. 특히 항생제의 부작용으로 인해 빈혈, 혈소판 감소, 백혈구 감소 등이 발생할 수 있으며 항생제 투여를 중단하게 되면 회복을 하기 위해 조혈활성이 나타날 수 있다(Josefsdottir et al., 2017). 세포질이 넓어지고 대식세포의 활성화가 이루어지는 현상을 RES 활성이라고 하며 조직에서 거즈모양으로 나타난다. RES 활성이 나타나는 조직에는 대식세포 등과 같은 포식세포들이 항진하고 있고 조직에서 흰색으로 나타난다. 또한 혈중 내에 세균 감염이나 항생제 같은 약물에 의해 활성화 될 수 있다고 알려져 있다. 세뇨관이 공포화 된 것은 세뇨관에 직접적인 독성이 영향을 미쳤기 때문이며 이 또한 항생제에 의해 손상을 입은 것으로 생

각된다.

결론적으로, tiamulin은 연쇄구균에 감염된 강도다리에 대한 치료 효과가 미비하며 일정 수준 이상의 농도에서 숙주에 대한 강한 독성반응을 일으켜 숙주를 폐사로 이르게 하는 부작용이 심각하였다. 따라서 연쇄구균에 감염된 강도다리에는 적합한 항생제라고 볼 수 없다고 생각된다.

사 사

이 논문은 2019년 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임(스마트 수산양식 연구센터).

참고문헌

Bøsling J, Poulsen SM, Vester B, Long KS. 2003. Resistance to the peptidyl transferase inhibitor tiamulin caused by mutation of ribosomal protein L3. *Antimicrob. Agents Chemother* 47: 2892-2896.

Burch DGS. 1983. Tiamulin injection for the treatment of swine dysentery. *Vet Record* 113: 236-237.

Doménech A, Fernández-Garayzábal JF, Pascual C, Garcia JA, Cutuli MT, Moreno MA, Collins MD, Dominguez L. 1996. Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis*. *J Fish Dis* 19: 33-38.

European agency for the evaluation of medicinal products, veterinary medicines and information technology unit; committee for veterinary medicinal products: tiamulin, summary report (1). European Medicines Agency (EMA). P.3, EMEA/MRL/578/99-FINAL.

Joo MS, Kim BS, Kim DH, Seo JS, Kwon MG, Jee BY, Park CI. 2019. The efficacy and safety of enrofloxacin antibiotics to *Streptococcus parauberis* PH0710 infected starry flounder (*Platichthys stellatus*). *J Fish Mar Sci Educ* 31: 459-473.

Josefsdottir KS, Baldrige MT, Kadmon CS, King KY. 2017. Antibiotics impair murine hematopoiesis by depleting the intestinal microbiota. *Blood* 129: 729-739.

Katz SE, Brady MS. 2000. Antibiotic residues in food and their significance. *Food Biotechnol* 14: 147-171.

Kavanagh F, Hervey A, Robbins WJ. 1951. Antibiotic substances from basidiomycetes: VIII. *Pleurotus multilus* (Fr.) SACC. and *Pleurotus passeckerianus* pilat. *Proc Natl Acad Sci USA* 37: 570-574.

Lee DG, Shin HH. 2008. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibiotics: General concepts and recent advances. *Infect Chemother* 40: 140-147.

- Lionte C, Bologna C, Sorodoc L. 2012. Toxic and drug-induced changes of the electrocardiogram. *Advances in Electrocardiograms-Clinical Applications* 15: 271-296.
- Mata AI, Gibello A, Casamayor A, Blanco MM, Domínguez L, 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.
- Messier S, Higgins R, Moore C. 1990. Minimal inhibitory concentrations of five antimicrobials against *Treponema hyodysenteriae* and *Treponema innocens*. *J Vet Diagn Invest* 2: 330-333.
- Nachimuthu S, Assar MD, Schussler JM. 2012. Drug-induced QT interval prolongation: mechanisms and clinical management. *Ther Adv Drug Saf* 3: 241-253.
- Smith P, Hiney MP, 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.
- Werner H, Laber G, Schutze E, Krasemann C. 1978. *In vitro* activity of tiamulin (81.723 HFU), a new pleuromulin derivative, against clinically significant anaerobes. *J Antibiot* 31: 756-760.
- Woo SH, 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.

Supplementary



Supplementary Fig. 1. Skin appearance of starry flounder immediately after intramuscular injection of tiamulin at a concentration of 30, 60 mg kg⁻¹.