

국내 여윌 넙치에서 검출된 점액포자충 *Parvicapsula* sp.의 정량적 분석

김승민* · 정준범[†]

제주대학교 해양의생명과학부

*주식회사 우진비엔지

Quantitative analysis of a myxosporean parasite, *Parvicapsula* sp. detected from emaciated olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea

Seung Min Kim* and Joon Bum Jeong[†]

Faculty of Marine Biomedical Science, Jeju National University

*Central Research Institute, Woo Gene

Quantitative analysis of a myxosporean parasite, *Parvicapsula* sp. in internal organs (kidney, intestine, spleen, brain and liver) from non-emaciated (farm-A) or emaciated (farm-B and farm-C) olive flounder *Paralichthys olivaceus* were performed by real-time PCR. The highest DNA copy number (1.7×10^7 copies/mg tissue) was detected in kidney of the emaciated olive flounder from farm-C, while the DNA copy number was below detection limit in all the organs of the olive flounder from farm-B. There was not positive result in all of organs from olive flounder in farm-A. PCR and histopathological analysis were also performed using the same specimen and showed same results as those by real-time PCR.

Key words: *Parvicapsula* sp., *Paralichthys olivaceus*, Real-time PCR

양식 해산어에서의 여윌증 발생은 일본의 자주복(*Takifugu rubripes*)에서 처음 보고되었으며(Tun et al., 2000, 2002), 이후 넙치(*Paralichthys olivaceus*), 참돔(*Pagrus major*), 강담돔(*Oplegnathus punctatus*) 등을 포함한 다양한 어종에서 여윌증 발생이 보고되어 왔다(Yasuda et al., 2005; Yanagida et al., 2008). 병어는 안구함몰, 두부돌출 및 체중 감소 등의 증상을 나타내다가 폐사하는 것으로 보고되었으며, 일본에서는 여윌증의 원인체로서 점액포

자충류에 속하는 *Enteromyxum leei*가 제시되고 있다(Yasuda et al., 2005; Ishimatsu et al., 2007; Yanagida et al., 2008).

국내에서는 주력 양식 품종인 넙치에서 여윌증이 발생하여 매년 심각한 경제적 손실을 유발시키고 있지만, 여윌증에 대한 특성 분석과 대책마련에 대해서는 더욱 연구가 필요한 상황이다. Kim et al. (2015a)은 일본에서 보고된 *E. leei*의 PCR 검사법을 국내의 많은 여윌증상을 보이는 넙치들에 적용하였지만 검출되지 않는 것을 확인하였고, 국내의 여윌증 발생의 원인은 *E. leei* 이외의 다른 점액포자충일 가능성을 제시하였다. 국내의 여윌증상 넙치

[†]Corresponding author: Joon Bum Jeong
Tel: +82-64-754-3426, Fax: +82-64-756-3493
E-mail: jeongjb@jejunu.ac.kr

로부터 검출된 점액포자충의 3,362 bp 길이의 염기서열을 분석한 결과, 계통분류학적 분석에 의하여 *Parvicapsula* sp.로 동정되었다(accession number: KT321705). 또한, 국내 넙치양식장에서의 여윌증 진단법으로서 EM-F/EM-R primer set를 사용한 PCR 방법을 개발하였고, cohabitation 실험을 통하여 전염이 되는 것을 확인하였다(Kim et al., 2015a). 국내의 넙치양식장을 대상으로 2010년부터 2013년까지 여윌증 모니터링을 실시하였고, 여윌증상 넙치와 점액포자충의 검출률 사이의 상관관계를 분석하였다(Kim et al., 2015b). 여윌증상을 보이는 넙치를 대상으로 혈액학적인 감염 특성이 분석되었고(Kim et al., 2017), 2014년부터 2015년까지 제주도 60개소의 넙치양식장을 대상으로 정기적인 여윌증 모니터링을 실시하였다(Kim et al., 2018). 총 520회의 샘플링을 통하여 넙치의 크기 및 시기에 따른 *Parvicapsula* sp.의 검출률이 분석되었고, 넙치의 여윌 정도에 따른 분석을 통하여 여윌증상 넙치로부터 *Parvicapsula* sp.가 공통적으로 검출된다는 것을 검증하였다(Kim et al., 2018).

본 연구에서는 여윌증상을 보이는 넙치를 대상으로 각 장기 별 *Parvicapsula* sp.에 의한 감염정도를 real-time PCR 방법을 통하여 분석하고 주요 감염 표적장기를 밝히고자 하였으며, 일반적인 PCR 법 및 병리조직학적인 분석법을 동일한 장기 조직을 대상으로 동시에 실시하여 3가지 진단법에서 동일한 결과가 나타나는지를 확인하고, 여윌증 진단을 위하여 가장 효율적인 방법을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

실험어

제주도에서 여윌증상을 보이지 않는 양식장(farm-A), 여윌증상을 보이는 양식장(farm-B), 그리고 심각한 여윌증상과 함께 대량폐사가 발생한 양식장(farm-C)으로부터 각각 넙치를 5마리씩 채집하여 실험실로 이송하였고, 모든 개체의 *Parvicapsula* sp. 및 *E. leei*에 의한 감염유무를 PCR 방법으로 확인하였으며, 그 중 각 양식장 별로 한 마리씩의 넙치를 대상으로 신장, 장, 비장, 뇌 및 간 조직을 적

출하여 각 장기 별 *Parvicapsula* sp.의 감염정도 분석을 위한 실험(PCR, Real-time PCR 및 병리조직학적 검사)에 사용하였다.

DNA 추출

적출한 신장, 장, 비장, 뇌 및 간 조직으로부터 각각의 DNA를 분리하기 위하여, DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen Hilden, Germany)를 사용하였다. 먼저 각 조직의 10 mg에 ATL buffer 180 µl와 proteinase K 20 µl를 첨가하여 56°C에서 조직이 녹을 때까지 반응시켰다. 반응 후, AL buffer 200 µl를 넣어 섞은 다음 ethanol 200 µl를 더하여 spin column에 옮겨 6,000 x g (gravity)에서 1분간 원심분리하였다. Column을 새로운 tube로 옮긴 후 AW1 buffer 500 µl와 AW2 buffer 500 µl를 이용하여 세척과정을 거친 후, AE buffer 30 µl를 첨가하여 최종적으로 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA는 실험 전까지 -80°C에 보관하였다.

PCR

PCR 분석을 위하여 Kim et al. (2015a)이 *Parvicapsula* sp. 검출을 위하여 제시한 primer set (Table 1), 그리고 *E. leei* 검출을 위한 primer set (Yasuda et al., 2005)를 각각 사용하였다. Microtube에 1µM의 각 primer, 2.5 mM의 각 dNTP, 10 × G-Taq Buffer, 2.5 U G-Taq DNA polymerase (Gene Pro Thermal Cycler Cosmo, Korea) 및 template DNA로서 추출된 핵산을 첨가한 후 distilled water로 PCR 혼합물의 최종 volume이 20 µl가 되게 하였다. PCR 조건은 95°C에서 3분간 pre-denaturation 시킨 후, 95°C에서 30초 denaturation, 55°C에서 30초 annealing, 72°C에서 30초 extension의 반응을 1회로 하여, 35회 반복하여 반응시켰다. 그리고, 72°C에서 7분간 post-extension시켰다. PCR 후 증폭된 산물은 1 × TAE buffer를 전기영동을 위한 완충액으로 하여, 0.5 µg/µl EtBr이 첨가된 1% agarose gel 상에서 전기영동한 후, UV 검출기를 이용하여 PCR 생성물을 관찰하였다.

Real-time PCR

Real-time PCR 분석을 위하여 *Parvicapsula* sp.의

Table 1. Primers used in this study

Primer	Oligonucleotide sequences	Expected size	Function
EM-F	5'-CAACCGCAATGTGTTTACTC-3'	812 bp	for PCR
EM-R	5'-CCAAACAACCTGCCACAATG-3'		
EMRT-F	5'-CGATACATGTTGGTCGAC-3'	147 bp	for Real-time PCR
EMRT-R	5'-CGAATCGCATTAATTATC-3'		

28S rDNA 부위로부터 RTEM-F (5'-GGATACATGTGGTCGAC-3') / RTEM-R (5'-CGAATCGCATTAATTATC-3') primer set를 제작하였고(Table 1), DNA의 정량을 위해 LightCycler® Nano SW1.0 (Roche, USA)을 사용하였다. Microtube에 SensiMixPlus SYBR (Roche, USA) 10 µl, forward와 reverse primer 각각 1 µM, 주형 DNA로서 plasmid DNA 또는 추출된 핵산을 첨가한 후 증류수로 PCR 혼합물의 최종량이 20 µl가 되도록 하였다. Real-time PCR의 조건은 95°C에서 10분간 반응한 후, 95°C 20초, 60°C 20초, 72°C 20초의 반응을 1회로 하여 45회를 반응시켰다. Real-time PCR 분석을 위한 표준검량곡선을 작성하기 위하여, *Parvicapsula* sp.의 Genomic DNA를 주형으로 하여 EM-F/EM-R primer set를 사용해 PCR을 실시하였고, 생성된 PCR 결과물을 pGEM-T Easy vector (promega, USA)에 cloning하여, competent cell DH5α 균주에 transformation시킨 후, plasmid DNA를 분리하였다. 분리된 plasmid DNA는 절대표준농도(absolute standard concentration)를 계산하여, 유전자의 클론으로부터 1.6×10^{11} copies/g 농도의 plasmid DNA를 확보하였고, 확보된 plasmid를 10배씩 단계 희석하여 real-time PCR 분석을 위한 표준검량곡선을 구하는데 사용하였다. 모든 시료는 2회 반복 실험 후, 평균값으로 나타내었다.

병리조직학적 검사

적출한 신장, 장, 비장 및 간 조직을 Bouin's solution에 24시간 동안 고정한 후 70% EtOH를 사용하여 탈수하였다. 이후 파라핀 침투를 시키고(Leica EG 1150HC, Germany), 포매기(Leica Jung 820, Germany)를 사용하여 포매시켰다. 그 후, 마이크로 톱으로 4-5 µm 두께의 절편을 잘라 유리슬라이드에 부착시켜 건조시켰다. 제작된 조직표본은 hae-

matoxylin과 eosin (H&E)으로 염색시킨 후, 광학현미경(Zeiss LT60, Germany)으로 검경하였다.

결 과

PCR 분석 결과

실험실로 이송한 모든 개체의 *Parvicapsula* sp. 및 *E. leei*에 의한 감염유무를 PCR 방법으로 확인하였다. EM-F/EM-R primer set (Kim et al., 2015a)를 사용한 PCR 결과, farm-B 및 farm-C의 넙치 모두에서 양성반응을 보였고, farm-A의 넙치에서는 모두 음성반응이 나타났으며, *E. leei* 검출을 위하여 보고된 primer set (Yasuda et al., 2005)를 사용한 PCR에서는 모든 양식장의 넙치에서 음성반응을 보였다(data not shown). 여윌증상을 보이지 않는 양식장(farm-A), 그리고 여윌증상을 보이는 양식장(farm-B 및 farm-C)의 넙치 한 마리씩을 대상으로 신장, 장, 비장, 뇌 및 간 조직을 각각 적출하여 EM-F/EM-R primer set를 이용하여 PCR을 실시한 결과, farm-A의 넙치에서는 검사한 모든 장기에서 음성 결과를 보였고, farm-B의 넙치에서는 간을 제외한 모든 장기에서 양성 결과를 보였으며, 가장 심각한 여윌증상을 보였던 farm-C의 넙치에서는 모든 장기에서 양성 결과를 나타내었다(Table 1 & Fig. 1).

Real-time PCR 분석 결과

여윌증상을 보이지 않는 양식장(farm-A), 그리고 여윌증상을 보이는 양식장(farm-B 및 farm-C)의 넙치로부터 적출된 신장, 장, 비장, 뇌 및 간 조직을 사용하여, 각 장기 별 *Parvicapsula* sp. DNA의 양적 분석을 real-time PCR 방법으로 실시한 결과, 가장 많은 병원체의 DNA가 검출된 장기는 신장이었으며, 그 다음 장, 비장, 뇌 및 간 등의 순서로 나타났

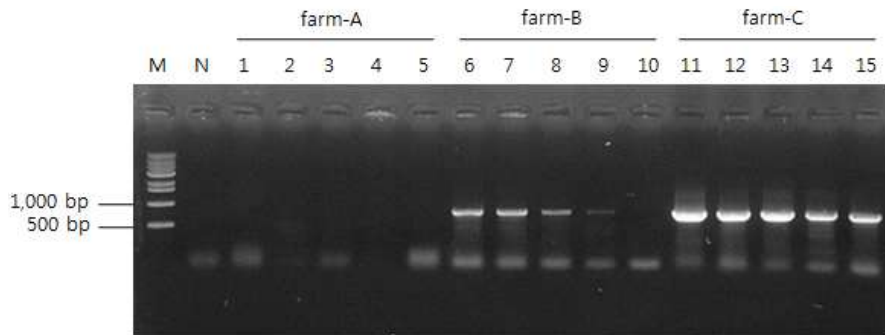


Fig. 1. PCR amplification using the EM-F/EM-R primer set from total nucleic acids of each internal organ from non-emaciated (farm-A) or emaciated (farm-B and farm-C) olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Lanes 1, 6 and 11, kidney; lane 2, 7 and 12, intestine; lanes 3, 8 and 13, spleen; lanes 4, 9 and 14, brain; lanes 5, 10 and 15, liver; N, negative control; M, 1 kb DNA ladder.

다(Table 2). 여웬증상을 보이지 않았던 farm-A의 넙치에서는 모든 장기에서 음성 결과를 보였고, 여웬증상을 보였던 farm-B의 넙치에서는 8.1×10^2 copies/mg (간)~ 5.6×10^5 copies/mg (신장)으로 분석되었고, 여웬증상이 가장 심각하게 나타났던 farm-C의 넙치에서는 3.2×10^5 copies/mg (간)~ 1.7×10^7 copies/mg (신장)으로 다른 양식장의 넙치에 비하여

모든 장기에서 가장 높은 수치를 보였다(Table 2).

병리조직학적 분석 결과

여웬증상을 보이지 않는 양식장(farm-A), 그리고 여웬증상을 보이는 양식장(farm-B 및 farm-C)의 넙치로부터 적출된 신장, 장, 비장 및 간 조직을 고정하였고, H&E 염색을 통한 병리조직학적 분석

Table 2. Comparison of the DNA copy numbers of *Parvicapsula* sp. in each internal organ from non-emaciated (farm-A) or emaciated (farm-B and farm-C) olive flounder *Paralichthys olivaceus* by real-time PCR

Aquafarm	Organ	Result		
		Real-time PCR (copies/mg tissue)	PCR	Histopathological examination
farm-A	kidney	N	N	N
	intestine	N	N	N
	spleen	N	N	N
	brain	N	N	NT
	liver	N	N	N
farm-B	kidney	5.6×10^5	P	P
	intestine	2.4×10^5	P	P
	spleen	2.0×10^5	P	P
	brain	7.8×10^4	P	NT
	liver	8.1×10^2	N	P
farm-C	kidney	1.7×10^7	P	P
	intestine	3.9×10^6	P	P
	spleen	1.0×10^6	P	P
	brain	4.7×10^5	P	NT
	liver	3.2×10^5	P	P

P, positive; N, negative; NT, not tested

을 실시하였다. 그 결과, farm-A의 넙치에서는 모든 장기에서 정상적인 형태가 확인되었고(Fig. 2, (1)), 여윌증상을 보였던 양식장의 넙치에서는 모든 조사대상 장기에서 4~9 μm 크기의 원형 또는 난원형의 포자가 관찰되었다(Fig. 2, (2)&(3)). 또한, 신장 부위에서는 기부골절, 사구체, 핵의 파괴와 일부 변형체(plasmodia)가 관찰되었으며, 장에서는 장 상피세포와 상피세포를 지지하는 결합조직, 비장에서는 동맥이 분지된 모세혈관과 혈구세포들의 변형체, 간 부위에서는 담관공 및 세동맥에서 포자가 형성되어 있는 것을 관찰하였고, 심한 경우 조직의 탈락 및 파괴가 관찰되었다(Fig. 2, (2)&(3)). 또한, farm-B보다 심각한 여윌증상을 보였던 farm-C의 넙치에서 더 많은 포자가 관찰되었다.

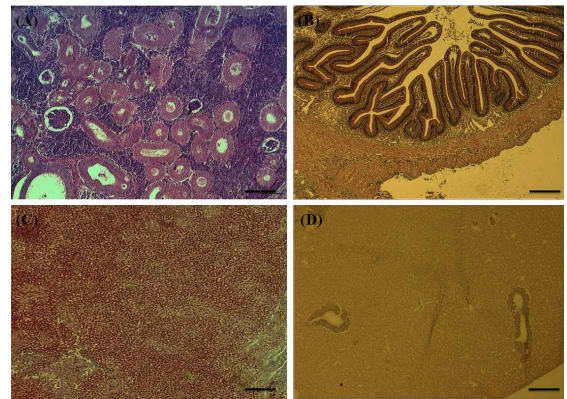
고 찰

전 세계적으로 어류 기생충에 의한 피해가 확산됨에 따라, 감염을 줄이기 위해 종묘생산 단계에서부터 노력을 기울이고 있지만, 완전히 차단하는 것은 현재로서는 불가능한 것으로 알려져 있다. 또한, 기생충 검출을 위한 microscopy, immunoassay 및 western blotting 시험법은 감염초기 및 잠복성의 기생충 질병을 신속 진단하는데 어려움이 있으며, 이와 같은 단점을 보완하기 위한 방법 중 하나로 PCR을 이용한 검출법이 사용되고 있다(Yasuda et al., 2005). 일반적인 PCR법은 주로 PCR 반응 후 agarose gel 상에서 전기영동을 통한 확인 과정이 필요하고, 감염 정도를 조사할 수 있는 양적 분석이 어렵기 때문에, 신속하면서 병원체의 정량적인 검출이 가능한 real-time PCR 방법이 어류 질병 진단을 위하여 종종 사용되고 있다(OIE, 2018).

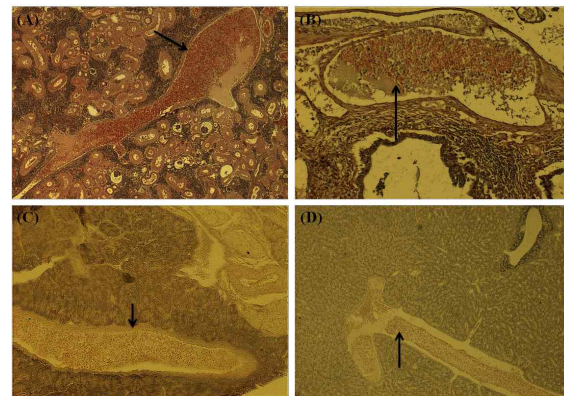
본 연구에서는 여윌증상을 보이는 넙치로부터 주요감염 표적장기를 포함하여 *Parvicapsula* sp.에 의한 각 장기 별 감염 정도를 분석하고자 하였고, 이를 위하여, 동일한 감염 조직을 대상으로 real-time PCR법, PCR법 및 병리조직학적 분석 방법을 적용하여, 각각의 진단 방법에 의한 결과들을 비교 분석하였다.

먼저 넙치의 여윌증 진단을 위하여, Kim et al.

(1)



(2)



(3)

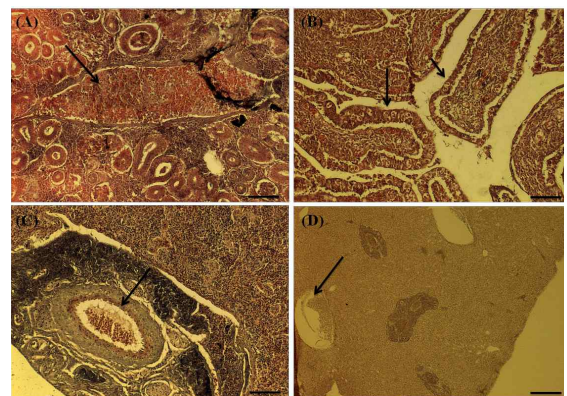


Fig. 2. Histopathological findings in internal organs from non-emaciated or emaciated olive flounder *Paralichthys olivaceus*. (1), farm-A; (2), farm-B; (3), farm-C; (A), kidney; (B), intestine; (C), spleen; (D), liver. H&E stain, Bar=20 μm .

(2015a)이 보고한 EM-F/EM-R primer set를 사용한 PCR 방법을 통하여(Table 1), 각 양식장들의 넙치를 대상으로 여윌증 진단을 실시하였고, PCR 양성 반응을 보인 넙치 양식장들에서는 전형적인 여윌증상이 나타났으며, PCR 음성 반응을 보인 넙치 양식장에서는 여윌증상이 없는 것을 확인하였다. 여윌증상을 보이는 넙치의 신장에서 다른 장기들에 비하여 PCR band가 상대적으로 가장 진하게 나타났으며, 감염 정도에 따라 차이는 있지만, 장, 비장, 뇌 및 간에서도 *Parvicapsula* sp.의 DNA가 검출되는 것을 확인하였다(Fig. 1). 이러한 결과는 여윌증에 감염된 넙치를 대상으로 신장, 장, 비장, 뇌, 간 및 아가미를 적출하여 PCR 진단을 실시한 결과, 아가미를 제외한 모든 장기에서 양성반응을 보였다는 이전의 결과와 일치한다(Kim et al., 2015a). 병원체에 의한 각 장기 별 감염 정도를 분석하기 위하여 real-time PCR 방법을 실시하였다. 여윌증상을 보이는 넙치로부터 검출된 812 bp의 PCR 생성물을 클로닝시킨 후, plasmid DNA를 분리하여 real-time PCR 실험에서의 standard curve 제작을 위한 표준시료로 사용하였다. 각 장기 별 감염 정도를 real-time PCR법으로 확인한 결과, PCR 법에 의한 결과와 마찬가지로 *Parvicapsula* sp.의 DNA는 신장에서 가장 높은 수치를 나타내었다. Farm-B 넙치의 경우, 간에서 PCR 음성반응을 보였지만, 병리조직학적인 관찰 및 real-time PCR에서 양성반응이 나타난 것을 확인하였으며, 이러한 결과는 일반적인 PCR을 통해 *Parvicapsula* sp.의 감염을 확인하기 위해서는 일정량 이상의 병원체 DNA가 존재해야 되는 것으로 판단된다. 동일한 DNA 시료를 사용한 PCR 및 real-time PCR의 결과를 볼 때, 일반적인 PCR 방법에 비하여 real-time PCR 방법의 검출 감도는 상대적으로 매우 높은 것으로 나타났다(Table 2). 동일한 조직 장기들을 대상으로 병리조직학적 분석도 동시에 수행하였으며, 뇌 조직은 분자생물학적 분석을 위하여 모두 사용되어 이를 제외한 신장, 장, 비장 및 간 조직을 대상으로 분석이 이루어졌다. 그 결과, 여윌증상을 보이는 넙치의 모든 조사 대상 장기에서 다수의 포자가 관찰되었다(Fig. 2).

본 연구를 통하여 분석대상 부위 중 넙치의 신장

이 *Parvicapsula* sp.에 의하여 감염되는 가장 주요한 부위라는 것이 밝혀졌고, 그 외 장, 비장, 뇌 및 간에서도 감염이 이루어진다는 것이 확인되었으며, 이것은 PCR, real-time PCR 및 병리조직학적 분석에서 모두 동일한 결과로 나타났다. 특히, 진단에 있어서 가장 민감성이 높게 나타난 real-time PCR 방법은 향후 넙치에서의 여윌증 조기진단 및 여윌증 관련 연구에 있어서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

여윌증상이 나타난 양식장(farm-B 및 farm-C)의 넙치 및 여윌증상이 나타나지 않은 양식장(farm-A) 넙치의 각 내부 장기(신장, 장, 비장, 뇌 및 간)를 대상으로 점액포자충 *Parvicapsula* sp.의 양적 분석을 real-time PCR 방법을 사용하여 각각 실시하였다. 여윌증상을 보였던 farm-C의 넙치 신장에서 가장 높은 DNA copy number (1.7×10^7 copies/mg tissue)를 보였고, farm-B의 넙치에서는 모든 내부 장기에서 낮은 수치가 나타났으며, farm-A의 넙치에서는 모든 내부 장기에서 음성 결과를 나타내었다. 동일한 시료를 사용한 PCR 및 병리조직학적 분석에서도 real-time PCR에서의 결과와 같은 양상을 보였다.

감사의 글

"이 논문은 2017년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. NRF-2017R1A2B4011136)."

References

- Cohen, M., Harrison, P.F. and Lederberg, J. Antimicrobial Resistance: Issues and Options. Division of Health Sciences Policy, pp. 41, 1998.
- Ishimatsu, A., Hayashi, M., Nakane, M. and Sameshima, M. Pathophysiology of cultured tiger puffer *Takifugu rubripes* suffering from the myxosporean emaciation disease. Fish Pathol., 42, 211-217, 2007.
- Kim, S.M., Jun, L.J., Park, M.A., Jeong, H.D. and Jeong, J.B. Characterization of the myxosporean parasite

- isolated from emaciated olive flounders *Paralichthys olivaceus* on Jeju island. Korean J. Fish. Aquat. Sci., 48(3), 337-345, 2015a.
- Kim, S.M., Jun, L.J., Park, M.A., Jung, S.H., Jeong, H.D. and Jeong, J.B. Monitoring of emaciation disease in cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Jeju (2010-2013), Korea. Korean J. Fish. Aquat. Sci., 48(5), 719-724, 2015b.
- Kim, S.M., Jun, L.J., Lee, D.W., Park, H.K., Kim, J.S. and Jeong, J.B. Hematological analysis and non-specific immune responses of emaciated olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea. J. Fish. Mar. Sci. Edu., 29(6), 1758-1767, 2017.
- Kim, S.M., Jun, L.J., Lee, D.W., Park, H.K., Jeong, H.D., Kim, J.S. and Jeong, J.B. Monitoring of emaciation disease in culture *Paralichthys olivaceus* of Jeju island during 2014-2015. Fish. Aquat. Sci., 21(17), 1-7, 2018.
- OIE, International Office of Epizootics. Aquatic Animal Health Standards Commission. Manual of diagnostic tests for Aquatic animals Office international des epizooties, 2018.
- Tun, T., Yokoyama, H., Ogawa, K. and Wakabayashi, H. Myxosporeans and their hyperparasitic microsporeans in the intestine of emaciated tiger puffer. J. Fish Pathol. 35, 145-156, 2000.
- Yanagida, T., Palenzuela, O., Hirae, T., Tanaka, S., Yokoyama, H. and Ogawa, K. Myxosporean emaciation disease of cultured red sea bream *Pagrus major* and spotted knifejaw *Oplegnathus punctatus*. Fish Pathol. 43(1), 45-48, 2008.
- Yasuda, H., Ooyama, T., Nakamura, A., Iwata, K., Palenzuela, O. and Yokoyama, H. Occurrence of the myxosporean emaciation disease caused by *Enteromyxum leei* in cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish Pathol., 40, 175-180, 2005.

Manuscript Received : Nov 5, 2018

Revised : Dec 3, 2018

Accepted : Dec 10, 2018