

양식 넙치에서 *Parvicapsula anisocaudata*의 감염 사례에 대한 보고

김남은 · 김아란 · 노형진 · 강경식 · 김도형[†]

부경대학교 수산생명의학과

A case report of farmed olive flounder *Paralichthys olivaceus* infected with Myxosporean *Parvicapsula anisocaudata*

Nam Eun Kim, Ahran Kim, Heyong Jin Roh, Kyoung Sik Gang and Do-Hyung Kim[†]

Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Parvicapsula anisocaudata, a myxosporean parasite, is presumably one of causative agents of emaciation in olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea. In this study, we report a case of unusual abdominal distension due to exceptionally enlarged liver in farmed olive flounder. For the identification of the causative agent, bacteria and nucleic acids of virus that are possibly present were attempted to isolate from internal organs of five fish sampled from a fish farm in Jeju. Although a few bacterial colonies were isolated from some samples, there was no evidence that fish were primarily affected by virus and/or bacteria. From histopathological analysis, myxosporean were found in almost all internal organs, particularly in the stomach. The causative agent was identified as *P. anisocaudata* by sequencing a part of small subunit rRNA. This study contains a very unusual case of olive flounder heavily and systemically infected with *P. anisocaudata*, showing excessively enlarged liver with a small amount of ascitic fluid.

Key words: Olive flounder, Myxosporean, Abdominal distension, *Parvicapsula anisocaudata*

Parvicapsula 속은 Class Myxozoa (Subclass Myxosporea)에 속하는 점액포자충으로 해산어류 및 소하성어류에서 분리되었으며 현재까지 13종이 보고되었다(Køie, 2003; Køie et al., 2007; Kodádková et al., 2014). 점액포자충이 감염하는 숙주와 장기는 특이적인 것으로 알려져 있다. *Parvicapsula*는 숙주의 비노기계(신장의 tubule 및 방광)나 담낭에 감염되기 때문에 체강기생충(coelozoic parasite)으

로 분류하기도 하며 일부 종은 위새(pseudobranch)나 신장에 감염되어 조직기생충(histozoic parasite)으로 불리기도 한다(Køie, 2003). *Parvicapsula* 속의 종은 모두 어류 유래이나 병원성이 보고된 종은 *P. minibicornis*와 *P. pseudobranchicola* 2종이다. *P. minibicornis*는 미국 북부 태평양 연안의 양식 및 자연에 방류된 연어과 어류(*Oncorhynchus* 속)에 감염되며 주 감염 장기는 신장이다(St-Hilaire et al., 2002; Jones et al., 2003). *P. pseudobranchicola*는 노르웨이의 대서양 연어(*Salmo salar*)에 감염을 일으켜 폐사를 발생시켰으며, 이후 대서양북부와 Brit-

[†]Corresponding author: Do-Hyung Kim
Tel: +82-51-629-5945, Fax: +82-51-629-5945
E-mail: dhkim@pknu.ac.kr

ish columbia의 다른 연어과 어류에서도 보고되었으며 위생조직에 감염되는 특징이 있다(Nylund et al., 2005; 2018).

중국과 한국에서 각각 2000년과 2004년에 양식 산 넙치(*Paralichthys olivaceus*)에서 *P. anisocaudata*의 감염이 최초로 보고되었으나 질병 발생 및 폐사와 관련된 정보는 없었다(Zhao et al., 2000; Cho and Kim, 2004). 이후 제주지역에서 여윌 증상을 나타내는 넙치에서 *P. anisocaudata*가 지속적으로 분리되고 있다고 보고되었다(Kim et al., 2015; Shin et al., 2018). Kim et al. (2015)에 따르면 이 점액포자충은 신장 뿐 만 아니라 간과 장관 등에도 감염되는 것으로 확인되었다.

한국에서 넙치의 여윌증은 2007년부터 주로 제주 지역에서 지속적으로 발생하고 있다. 어류 여윌증은 대부분 점액포자충이 그 원인인 것으로 알려져 있다. 일본 넙치의 *Enteromyxum leei*, 자주복 (Tiger puffer)의 *Enteromyxum fugu* 및 *Leptotheca fugu*가 대표적인 예이다(Yasuda et al., 2005; Yanagida et al., 2004; Ogawa and Yokoyama, 2001). 여윌 증상을 나타내는 한국 넙치에서도 *Enteromyxum leei*(Shin et al., 2018, Sekiya et al., 2016)가 검출되는 것으로 나타나 우리나라 넙치 여윌증의 원인은 두 가지 이상인 것으로 생각된다. 본 연구에서는 극심한 복부팽만 증상을 보이는 양식 넙치로부터 *P. anisocaudata*를 검출 및 동정하였으며, 감염 개체의 병리조직학적 변화를 조사하였고 그 내용을 본 논문을 통해 보고하고자 하였다.

재료 및 방법

병어 샘플링

2015년 11월 제주도 소재의 넙치 양식장에서 수집한 병어를 살아있는 상태로 실험실로 운반하여 정밀 조사를 실시하였다. 매우 극심한 복부팽만 증상을 나타내는 7마리의 넙치(평균 체장= 11.3±3.89 cm)를 조사하였다. 모든 어류는 샘플링 전에 MS-222로 마취하였으며 외부 증상 관찰 후 개복하여 내부 증상을 관찰하고 신장, 비장 및 복수를 무균적으로 채취하여 1% NaCl이 첨가된 BHIA (Brain heart infusion agar, Oxoid)에 도말하여 28°C에서 24

시간 동안 배양하였다. 세균이 배양된 경우 우점종의 16S rDNA 염기서열을 분석하였다. 바이러스 검사를 위해 OIE 매뉴얼(OIE, 2017)에 따라 상기의 동일한 조직 시료로부터 RNA를 분리하여 바이러스성출혈성패혈증 (Viral hemorrhagic septicemia; VHS)의 원인체인 VHS virus (VHSV)의 존재를 확인하였다. 조직병리학적 시험을 위하여 넙치로부터 간, 아가미, 신장, 비장, 위 및 장 조직을 10% 중성 포르말린(pH 7.2-7.4)에 고정하였다. 이후 파라핀 포매하고 섹션을 제작하여 H&E 염색하였다.

점액포자충의 동정

Myxosporean의 동정을 위해 *P. anisocaudata*와 *E. leei*를 타겟으로 하는 특이프라이머를 이용하여 장기별 감염 여부를 확인하였다. 넙치 5마리로부터 간, 신장, 아가미, 위, 장 조직을 적출하여 Genomic DNA는 Accuprep™ Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer Corp., Daejeon, Korea)를 사용하여 DNA를 분리하였다. DNA는 NanoVue system (GE Healthcare Europe, Munich, Germany)으로 정량하여 장기별 DNA는 50 ng이 되도록 하였다. AccuPower™ PCR premix (Bioneer Corp., Taejeon, Korea)와, Myxosporean에 속하는 종의 small subunit (SSU) rRNA를 타겟으로 하는 MyxospecF(5'-TTCTGCC CTATCAACTWGTG-3'), MyxospecR(5'-GGTTTC NCDGRGGGMCCAAC-3')(Fiala, 2006), *P. anisocaudata*에 대한 특이프라이머 EM-F(5'-CAACCGC AATGTGTTTACTC-3'), EM-R(5'-CCAAACAACC TGCCACAATG-3') (Kim et al., 2015)과 *E. leei*에 대한 특이프라이머 MM18S-F(5'-CTGGTTGATTC TGCCAGTGGTC-3'), MM18S-R(5'-CGGTACTAG CGACGGGCG-3') (Palenzuela et al., 2002)를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 산물은 1% agarose gel에서 전기영동 후 Gel Doc™ 2000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA)으로 이미지 화하여 amplicon의 일치 여부를 확인하였다. PCR 산물 중 양성 밴드는 AccuPrep™ PCR purification kit(Bioneer Corp., Taejeon, Korea)로 분리하여 sanger sequencing 방법으로 염기서열을 얻었으며 NCBI BLAST program으로 blast를 수행하여 일치 여부를 확인하였다.

기존에 알려진 *Parvicapsula* 종들과의 계통분석을 위해 18S rRNA gene 염기서열을 얻기 위하여 EIRB1(5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAG-3')과 EIRB10(5'-CTTCCGCAGGTTACCTACGG-3') 프라이머 세트(Barta et al., 1997)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 또한 계통분석을 위하여 GenBank에 등록된 *Parvicapsula* 속 11종의 18S SSU rDNA 염기서열을 얻었으며 Outgroup로 사용된 종은 *Tetracapsuloides bryosalmonae* 이었다(Nylund et al., 2005). 사용된 각 종의 Accession no.는 Table 1에 나타났다. 계통수는 MEGA 7 프로그램의 Maximum likelihood 방법을 이용하여 작성하였으며 1,000 회 반복하여 bootstrap value 값을 구하였다.

결과 및 고찰

샘플링된 모든 넙치의 공통적인 외부증상으로 는 두드러지는 복부팽만이 확인되었다(Fig. 1). 내부증상으로는 아가미 빈혈, 간의 비대와 탈색이 가장 뚜렷했으며, 일부 개체에서 경미한 투명한 복수(5/7개체)와 신장 및 비장의 비대(4/7개체)가 관찰되었다. 또한 위와 유문수에 두드러지는 출혈 증상

Table 1. 18S SSU rDNA sequences of *Parvicapsula* spp. used in this study

Accession number	species
AF201375.1	<i>Parvicapsula minibicornis</i>
AY308481.1	<i>Parvicapsula pseudobranchicola</i> T01-01
AY584190.1	<i>Parvicapsula unicornis</i>
AY584191.1	<i>Parvicapsula asymmetrica</i>
DQ231038.1	<i>Parvicapsula minibicornis</i>
DQ515821.1	<i>Parvicapsula kabatai</i>
EF429096.1	<i>Parvicapsula limandae</i>
EF429097.1	<i>Parvicapsula bicornis</i>
EF431928.1	<i>Parvicapsula spinachiae</i>
HQ624978.1	<i>Parvicapsula</i> sp.
KF874229.1	<i>Parvicapsula irregularis</i>
KF874230.1	<i>Parvicapsula petuniae</i>
KU377575.1	<i>Parvicapsula anisocaudata</i> SMK-2015
KY341924.1	<i>Parvicapsula anisocaudata</i>
MF161398.1	<i>Parvicapsula curvatura</i> SPS-2018
U70623.1	<i>Tetracapsuloides bryosalmonae</i>
-	<i>Parvicapsula anisocaudata</i> JF2016

도 확인되었다(5/7개체).

병어로부터 병원체 검사를 실시한 결과, 비장, 신장 및/또는 복수에서 *Vibrio scopthalmi* (검출률 = 약 86% (6/7 개체))와 *V. harveyi* (검출률 = 100% (7/7개체))가 분리되었으나 감염 정도는 미미하여 (10 colony 미만) 분리된 병원성 세균이 관찰된 증상의 주 원인은 아닌 것으로 판단하였다 (data not shown). 그리고 모든 실험 개체에서 VHSV 또한 검출되지 않았다.

병리조직학적 시험 결과 조직에서 기생충 포자가 확인되었으며(Fig. 2) 그 형태가 myxosporean과 유사하였다. 먼저 Myxosporean 특이프라이머로

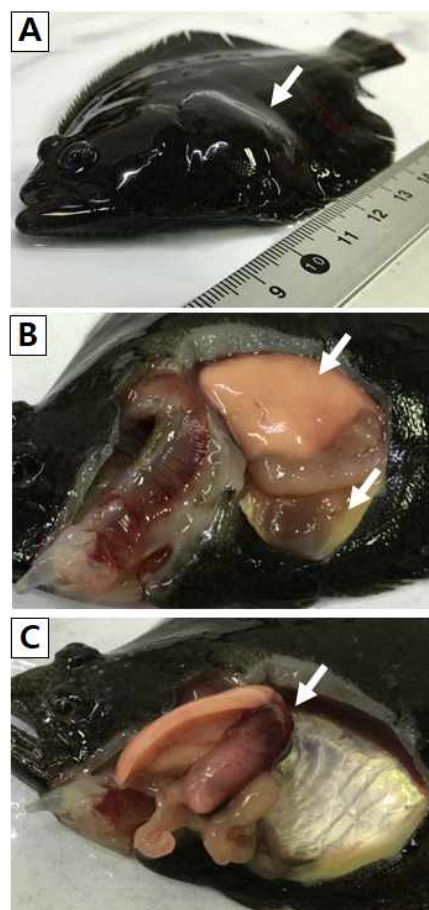


Fig. 1. Infected olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) showing severe distended abdomen (A), notably caused by hypertrophied liver (B), and hemorrhages in the stomach (C).

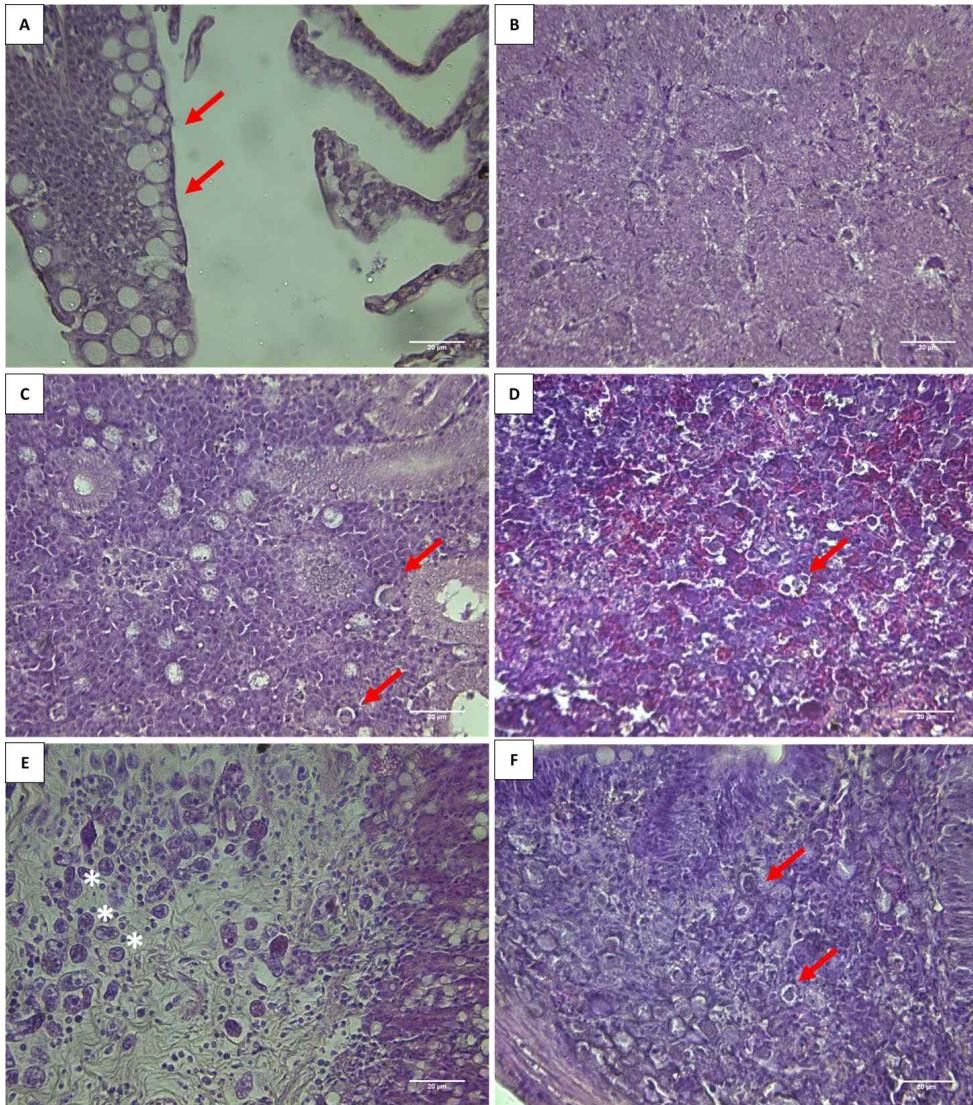


Fig. 2. Histopathological changes in olive flounder infected with *Pavicapsula anisocaudata*. The myxosporean was found in all the tested organs. Notably, a large number of myxospores were found in the submucosa in stomach (asterisks). Notice that vacuolation was observed in the kidney, spleen, intestine and gills due to *P. anisocaudata*, and some vacuoles in the kidney, spleen and intestine (arrows) contained the parasite. (A) Gill; (B) Liver; (C) Kidney; (D) Spleen (E) Stomach; (F) Intestine. H&E stain, X400 magnification.

PCR한 결과는 사용한 병어(5 마리)에서 모두 양성을 나타내었다(data not shown). Myxospec 프라이머는 *Pavicapsula*, *Enteromyxum*, *Ceratomyxa*, *Myxidium* 및 *Kudoa* clade에 속한 점액포자충 SSU rRNA의 증폭에 사용되었다(Fiala, 2006). 그러나 *Enteromyxum leei* 는 검출되지 않았으나 5개의 샘플에서

오직 *Parvicapsula anisocaudata*만 에 대한 PCR 반응에서 양성을 나타내었다(Fig. 3). PCR amplicon의 염기서열 분석 결과 기존의 *P. anisocaudata*과 100% 일치하였고 여러 *Parvicapsula* 종 간의 계통발생학적 분석 결과에서도 *P. anisocaudata* (KY 341924.1, KU377575.1)와 클러스터링 되는 것을 확

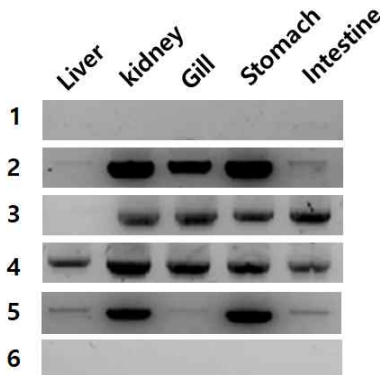


Fig. 3. PCR reaction for the detection of *P. anisocaudata* in different organs in infected fish. Five fish samples (from no.1 to 5) from a fish farm in Jeju island, and 1 healthy fish (no. 6) from University aquarium were used to detect *P. anisocaudata*. Note that infection degree is varying from very weak reaction (detected only in the intestine of no. 1 sample) to strong reactions in all the organs (no. 4 sample).

인하였다(Fig. 4).

PCR을 이용한 장기별 감염도를 확인한 결과 감

염 정도가 약한 개체의 경우 장에서만 검출되는 반면(Fig. 3, 1번) 감염이 심한 경우 모든 장기에서 검출되었다(Fig. 3, 4번). 본 연구의 병리조직학적 시험 결과에서도 본 병원체가 시험된 모든 조직에 감염되어 있음이 확인되었다. 본 연구에서 관찰된 감염은 *P. anisocaudata*가 넙치의 조직 기생(histozoic)으로 특히 위의 점막하조직에 집중되어 있었으며 출혈을 동반하는 특징이 있었다. 또한 각 장기의 조직병리학적 시험 결과 특징적으로 신장, 장 및 아가미에서 공포(vacuolation)가 확인되었다. 대부분의 공포는 비어 있었으나 신장과 장에서는 공포 내 원형 또는 난원형의 포자가 함께 있는 것이 확인되었다(Fig 2). 본 연구에서 *P. anisocaudata*가 아가미, 위의 점막하조직 등 조직 내에 감염된 것을 통해 *Ceratomyxa*와 유사한 생활사를 가지며 (Molnar, 1994) 혈액을 통한 순환계를 통해 발달하여 전신적인 감염을 일으켜 복부팽만의 특이한 증상을 일으킨 것으로 추측된다. 이전 보고(Kim et al., 2015; Shin et al., 2018)와는 다른 증상 및 감염의 양상을 나타내므로 정확한 감염 경로 및 생활사

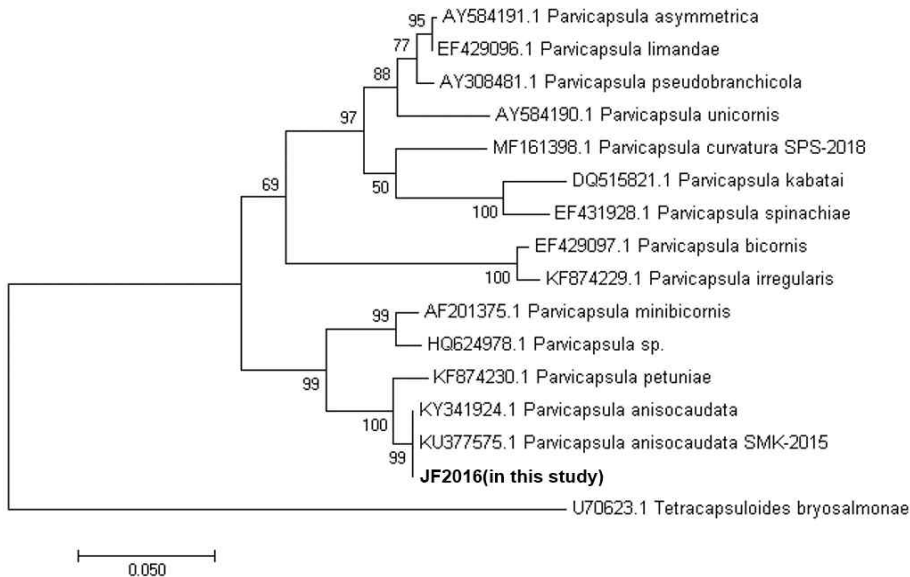


Fig. 4. Phylogenetic tree constructed with Maximum likelihood method. Branch supports were obtained by 1000 bootstrap replicates with random sequence additions. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. *Tetracapsuloides bryosalmonae* was used as an outgroup. All positions with less than 95% site coverage were eliminated. There were a total of 1047 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7.

를 구명할 필요가 있는 것으로 판단된다.

본 연구에서 확인된 결과를 종합하여 볼 때, *P. anisocaudata*에 감염된 넙치는 극심한 간의 비대 증상을 나타내고 위 점막하 조직에 감염되는 특징은 이전의 보고된 케이스와는 다소 다른 독특한 감염 상태인 것으로 판단된다. 최근 연구(Shin et al., 2018)에서 한국의 양식 넙치의 여윌증의 원인체로 *P. anisocaudata*와 *E. leei*를 지목하였고 후자의 연관성이 훨씬 더 높은 것으로 결론을 짓고 있다. 물론 이번 연구에서 사용된 병어 개체는 뚜렷한 여윌 증상이 관찰되지 않았으나 위 점막 하조직 등에서 고농도로 분포하는 것으로 보아 여윌증과의 연관성을 완전히 배제할 수는 없을 것으로 보인다. 점액포자충의 경우 치료가 어려우므로 향후 감염 양식장에서의 감염경로 확인을 통해 본 병원체의 예방을 위한 연구도 병행되어야 할 것으로 판단된다.

References

- Barta, J. R., Martin, D. S., Liberator, P. A., Dashkevich, M., Anderson, J. W., Feighner, S. D., Elbrecht, A., Perkins-Barrow, A., Jenkins, M. C. and Danforth, H. D.: Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. *The Journal of Parasitology*, 262-271, 1997.
- Cho, J. B. and Kim, K. H.: Light and electron microscopical observations of *Parvicapsula anisocaudata* (myxosporea: Parvicapsulidae) from urinary system of cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Fish Pathology*, 17(3), 179-189, 2004.
- Cho, J. B., Lee, M. K., Huh, M. D. and Kim, K. H.: Co-infection of two myxosporean parasites-*Parvicapsula anisocaudata* and an unidentified myxosporean-in the kidney of cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Fish Pathology*, 18(2), 119-124, 2005.
- Fiala, I.: The phylogeny of Myxosporea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis. *International Journal for Parasitology*, 36, 1521-1534, 2006.
- Jones, S. R., Prosperi-Porta, G., Dawe, S. C. and Barnes, D. P.: Distribution, prevalence and severity of *Parvicapsula minibicornis* infections among anadromous salmonids in the Fraser River, British Columbia, Canada. *Diseases of Aquatic Organisms*, 54(1), 49-54, 2003.
- Kim, S. M., Jun, L. J., Park, M. A., Jung, S. H., Jeong, H. D. and Jeong, J. B.: Characterization of the Myxosporean parasite isolated from emaciated olive flounders *Paralichthys olivaceus* on Jeju Island. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48(3), 337-345, 2015.
- Kodádková, A., Dyková, I., Tým, T., Ditrich, O. and Fiala, I.: Myxozoa in high arctic: Survey on the central part of Svalbard archipelago. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3(1), 41-56, 2014.
- Køie, M.: *Parvicapsula spinachiae* n. sp. (myxozoa, parvicapsulidae) in *Spinachia spinachia* (L.) (teleostei, gasterosteidae) from Denmark. *Parasitology Research*, 90(6), 445-448, 2003.
- Køie, M., Karlsbakk, E. and Nylund, A.: *Parvicapsula bicornis* n. sp. and *P. limandae* n. sp. (myxozoa, parvicapsulidae) in pleuronectidae (teleostei, heterosomata) from Denmark. *Diseases of Aquatic Organisms*, 76(2), 123-129, 2007.
- Molnár, K.: Comments on the host, organ and tissue specificity of fish myxosporeans and on the types of their intrapiscine development. *Parasitol Hung*, 27, 5-20, 1994.
- Nylund, A., Karlsbakk, E., Sæther, P. A., Koren, C., Larsen, T., Nielsen, B. D., Brøderud, A. E., Høstlund, C., Fjelløy, K. R. and Lervik, K.: *Parvicapsula pseudobranchicola* (myxosporea) in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*: Tissue distribution, diagnosis and phylogeny. *Diseases of Aquatic Organisms*, 63(2-3), 197-204, 2005.
- Nylund, A., Hansen, H., Brevik, Ø. J., Hustoft, H., Markussen, T., Plarre, H. and Karlsbakk, E.: Infection dynamics and tissue tropism of *Parvicapsula pseudobranchicola* (myxozoa: Myxosporea) in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Parasites and Vectors*, 11(1), 17, 2018.
- Ogawa, K. and Yokoyama, H.: Emaciation disease of cultured tiger puffer *Takifugu rubripes*. *Bulletin of National Research Institute of Aquaculture, Supplement*, (5), 65-70, 2001.
- OIE, International Office of Epizootics. Aquatic Animal Health Standards Commission. Manual of diagnostic tests for aquatic animals, Chapter 2.3.10. Viral haemorrhagic septicaemia, Office international des épizooties, 2017.
- Palenzuela, O., Redondo, M. and Alvarez-Pellitero, P.

- : Description of *Enteromyxum scopthalmi* gen. nov., sp. nov.(myxozoa), an intestinal parasite of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) using morphological and ribosomal RNA sequence data. Parasitology, 124(4), 369-379, 2002.
- Sekiya, M., Setsuda, A., Sato, H., Song, K. K., Han, J. K., Kim, G. J. and Yeo, I. K. : *Enteromyxum leei* (myxosporea: Bivalvulida) as the cause of myxosporean emaciation disease of farmed olive flounders (*Paralichthys olivaceus*) and a turbot (*Scophthalmus maximus*) on jeju island, korea. Parasitology Research, 115(11), 4229-4237, 2016.
- Shin, S. P., Sohn, H. C., Jin, C. N., Kang, B. J. and Lee, J. : Molecular diagnostics for verifying an etiological agent of emaciation disease in cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus* in korea. Aquaculture, 493, 18-25, 2018.
- St-Hilaire, S., Boichuk, M., Barnes, D., Higgins, M., Devlin, R., Withler, R., Khattra, J., Jones, S. and Kieser, D. : Epizootiology of *Parvicapsula minibicornis* in fraser river sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (walbaum). Journal of Fish Diseases, 25(2), 107-120, 2002.
- Yanagida, T., Nomura, Y., Kimura, T., Fukuda, Y., Yokoyama, H. and Ogawa, K. : Molecular and morphological redescrptions of enteric myxozoans, *Enteromyxum ieei* (formerly *Myxidium* sp. TP) and *Enteromyxum fugu* comb. n.(syn. *Myxidium fugu*) from cultured tiger puffer. Fish Pathology, 39(3), 137-143, 2004.
- 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 Pathology, 40(4), 175-180, 2005.
- Zhao, Y., Ma, C. and Song, W. : Description of two new species of *Parvicapsula* shulman, 1953 (myxosporea: Parvicapsulidae) parasitic in the urinary bladder of marine fishes, *Paralichthys olivaceus* and *Kareius bicoloratus*, from the coast of the yellow sea, china. Acta Protozoologica, 39(2), 157-162, 2000.

Manuscript Received : Nov 25, 2018

Revised : Dec 8, 2018

Accepted : Dec 9, 2018