

## 어류 혈액 염색에 Differ-Quick kit의 적용 가능성 검토

박성우 · 유진하<sup>o</sup> · 김동완 · 김병호\*

군산대학교 수산생명의학과, \*군산대학교 해양생명과학부

### 서론

Diff-Quick kit는 말라리아 원충의 검사용 시약으로 개발되었으며, 고정액과 용액 I (호산성 염색액) 및 용액II (호염기성 염색액)의 3종류로 구성되어 있다.

Diff-Quick염색성은 뛰어난 뿐만 아니라 염색액간에 세척이 필요 없이 최종적으로 증류수에 세척하기만 하면 된다. 따라서 실제의 염색 소요시간이 매우 짧기 때문에 임상진단용으로 사용되고 있다.

본 연구에서는 시판의 Diff-Quick kit를 어류 혈액의 염색에 적용하기 위한 최적의 염색시간, 반복사용 가능성 및 세척수에 따른 염색성이 변화를 조사하여 최적 염색조건을 설정하고자 실시하였다.

### 재료 및 방법

군산대학교 연구실에서 순치 사육중인 뱀장어 5마리를 사용하여 염색조건을 설정하였다. 뱀장어는 채혈하기 전 Park (1996)의 방법에 따라 24시간전에 *Salmonella abortusequi*의 리포다당 (Lipopolysaccharide, LPS, Sigma)를 멸균생리식 염수에 현탁시킨 LPS액 (0.1mg/ml) 또는 *Edwardsiella tarda* 포르말린 사균 (10mg/ml)을 복강에 0.1 ml 주사하였다. 뱀장어는 멸균플라스틱 주사기를 사용하여 동맥구에서 채혈하였다. 채혈한 혈액은 May-Grunwald Giemsa염색을 실시하고, 일부는 Hemacolor와 Diff-Quick (Sysmex Co., Japan)염색을 실시하였다. 염색시간, 세척수 및 사용빈도에 따른 염색성의 변화를 비교하였다.

뱀장어이외의 어류는 메기, 금붕어, 잉어 및 틸라피아의 말초혈액의 도말표본을 Diff-Quick kit로 염색성을 관찰하였다. 또한 파라핀 조직절편에 대한 염색성을 알아보고 세균의 단염색에 활용하여 현미경으로 검경하였다.

### 결과 및 요약

May-Grunwald Giemsa염색, Hemacolor 및 Diff-Quick kit로 염색한 뱀장어 말

초혈액의 염색상은 May-Grunwald Giemsa 염색이 핵, 세포질 및 과립의 염색성의 구분이 분명하고 가장 좋은 결과를 나타내었다. Diff-Quick 염색은 핵의 염색성이 불량하여 핵내에 미염색의 부분도 남아있었다.

염색시간에 따른 염색상의 변화는 핵과 세포질이 완전히 염색되며, 세포질의 호염기성은 증가하지만 과립구의 과립은 여전히 불선명하였다. 염색시간을 5-10초간 염색하였을 때는 백혈구의 세포질의 호염기성이 약화되어 호중구내의 과립의 관찰은 불가능하나 단구의 세포질이 염색됨으로 단구와 호중구의 구분은 가능하였다. 새로운 염색약과 약 40배 정도를 염색하고 보존하였던 염색액을 사용하여 염색한 결과는 적혈구 및 백혈구의 염색성에는 차이가 없었다. 세척액에 따른 염색성의 변화는 5-10초간 염색하고 이온 교환수로 염색하였을 때는 적혈구와 백혈구의 핵 염색이 양호하고 세포질내의 과립도 잘 보존됨과 동시에 혈구의 구분도 가능하였다.

뱀장어이외의 메기, 금붕어, 잉어 및 틸라피아의 말초혈액을 Diff-Quick kit 결과는 이들 어류의 말초혈액도 뱀장어와 마찬가지로 적혈구 및 백혈구의 핵과 세포질의 염색이 양호하였으며, 백혈구의 과립도 잘 보존되어 백혈구의 구분도 가능하였다. 한편 조직절편을 각 염색액에 25초간 염색하였을 때 조직의 구조는 HE 염색에 비해 선명하지 못하지만 핵과 세포는 구분이 가능하였고, 혈관내의 혈구는 잘 염색되었다. 점액세포는 공포로 연결세포의 염색질은 염색되지 않았지만 핵은 염색되었고, 결합조직은 호염기성으로 염색되는 경향이였다. 세균을 염색하였을 때는 청색으로 염색되는 것과 염색되지 않는 것이 있었으며, 염색된 것도 활발히 움직이고 있어 형태의 관찰은 곤란하였지만 세균의 존재는 확인할 수 있었다(미제시).

## 참고 문헌

- Liyanage, Y. S., Yokoyama, H., and Wakabayashi, H.: Dynamics of experimental production of *Thelohanellus hovorkai* (Myxozoa: Myxosporea) in fish and oligochaete alternate hosts. *J. Fish Dis.*, 26: 575-582, 2003.
- Park, S.-W.: Changes in the number and PAS reaction of neutrophils from the kidney and peripheral blood of eel (*Anguilla japonica*) intraperitoneally injected with pathogenic fish bacteria and foreign materials. *Kunsan Natl. Univ. Fish. Sci. Res.*, 12: 125-137, 1996
- Parsons, H., Nowak, B., Fisk, D., and Powell, M.: Effectiveness of commercial freshwater bathing as a treatment against amoebic gill disease in Atlantic salmon. *Aquaculture*, 195: 205-210, 2001.
- Tun, T., Ogawa, K., and Wakabayashi, : Pathological changes induced by three myxosporeans in the intestine of cultured tiger puffer, *Takifugu rubripes* (Temminck and Schlegel). *Fish Pathol.*, 25: 63-72, 2002
- Tun, T., Yokoyama, H., Ogawa, K., and Wakabayashi, H.: Myxosporeans and their hyperparasitic microsporeans in the intestine of emaciated tiger puffer. *Fish Pathol.*, 35: 145-156, 2000
- Yasuda, H., Ooyama, T., Iwata, K., Tun, T., Yokoyama, H., and Ogawa, K.: Fish to fish transmission of *Myxidium* spp. (Myxozoa) in cultured tiger puffer suffering from emaciation disease. *Fish Pathol.*, 37: 29-33: 2002.