

여壼증상 녁치 및 사육수 내 검출된 점액포자충(*Enteromyxum leei* and *Parvicapsula anisocaudata*)의 정량적 분석

이영준 · 전려진 · 김예지 · 한지은 · 이응준 · 정준범[†]

제주대학교 해양생명과학과

Quantitative analysis of myxosporean parasites (*Enteromyxum leei* and *Parvicapsula anisocaudata*) detected from emaciated olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) and rearing water

Young Juhn Lee, Lyu Jin Jun, Ye Ji Kim, Ji Eun Han,
Eung Jun Lee and Joon Bum Jeong[†]

Dept. of Marine Life Sciences, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

Quantitative analysis of myxosporean parasites (*Enteromyxum leei* and *Parvicapsula anisocaudata*) were performed using real-time PCR on the internal organs (head kidney, body kidney, intestine, spleen, brain, liver, heart, muscle, blood, and eye) of emaciated *Paralichthys olivaceus* from farm-A. The highest DNA copy number of *E. leei* was shown in the intestine (1.3×10^8 copies/mg tissue) of emaciated *P. olivaceus* and DNA copy number in the other internal organs (1.3×10^3 ~ 4.6×10^5 copies/mg tissue) showed lower than in intestine. From the result of real-time PCR for *P. anisocaudata*, it was considered mildly infected, due to the low DNA copy numbers of the head kidney (1.3×10^3 copies/mg tissue) and body kidney (9.1×10^3 copies/mg tissue). In order to investigate whether myxosporean parasites can be detected in a non-invasive way, quantitative analysis of *E. leei* and *P. anisocaudata* from rearing water of three farms were performed by real-time PCR. The DNA copy number of *E. leei* from rearing water of farm-A and farm-B were 8×10^4 and 5×10^5 copies/L, respectively. However, it was not detected in farm-C. For *P. anisocaudata* from rearing water, farm-A, farm-B and farm-C showed 0, 2.0×10^6 and 5.1×10^6 copies/L, respectively.

Key words: Emaciation, Real-time PCR, *Enteromyxum leei*, *Parvicapsula anisocaudata*

서 론

제주 지역의 양식넙치에서 복부팽만, 눈의 함몰 및 두개골의 돌출, 어체중 감소 등의 증상을 보이

다가 폐사에 이르는 여壼증이 발생하고 있으며, 2016년부터 2017년까지 제주넙치의 여壼증에 의한 폐사율이 10.3%로 피해가 높게 나타났다(Shim *et al.*, 2019). 여壼증을 일으키는 원인체에 관한 연구가 다양하게 진행되고 있지만, 아직 원인체에 대한 명확한 관계는 밝혀지지 않았으며(Kim *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2012; Sekiya *et al.*, 2016;

[†]Corresponding author: Joon Bum JEONG
Tel: +82-64-754-3426
E-mail: jeongjb@jejunu.ac.kr

Kim *et al.*, 2015a, 2015b, 2017; Kim and Jeong, 2018; Shin *et al.*, 2018), 여윌증에 대한 세부적인 연구와 대책 마련이 필요한 실정이다. 해산어 양식에서 여윌증 발생은 일본의 자주복 (*Takifugu rubripes*)에서 처음 보고되었으며(Tun *et al.*, 2000), 이후 넙치(*Paralichthys olivaceus*), 참돔(*Pagrus major*), 강담돔(*Oplegnathus punctatus*) 등을 포함한 다양한 어종에서 여윌증 발생이 보고되었다(Yasuda *et al.*, 2005; Yanagida *et al.*, 2008). 한국에서 넙치의 여윌증 발생은 2007년부터 주로 제주 지역에서 지속적으로 발생해 왔다. 여윌증의 원인체로서 점액포자충이 제시되고 있으며, 일본에서는 넙치의 *Enteromyxum leei*, 자주복의 *E. figu* 및 *Leptotheca figu*가 대표적으로 보고되고 있다(Yasuda *et al.*, 2005; Yanagida *et al.*, 2004; Ogawa and Yokoyama, 2001). 국내의 여윌증 발생과 관련하여 *E. leei*를 포함하여 *Parvicapsula* sp.에 관한 조사도 이루어져 왔으며, 2010년부터 2013년까지 여윌증 모니터링을 통해 여윌증상 넙치와 *Parvicapsula* sp.의 검출률 사이의 상관관계 분석이 보고되었다(Kim *et al.*, 2015b).

Parvicapsula sp.는 숙주의 비뇨기계(신장의 tubule 및 방광)나 담낭에 감염되기 때문에 체강기생충(coelozoic parasite)으로 분류되기도 하며, 일부 종은 위새(pseudobranch)나 신장에 감염되어 조직기생충(histozoic parasite)으로 불리기도 한다(Køie, 2003). 중국과 한국에서 각각 2000년과 2004년에 양식산 넙치(*P. olivaceus*)에서 *Parvicapsula 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 보고되었으며(Kim *et al.*, 2015a; Shin *et al.*, 2018), Kim (2015a)등에 따르면 이 점액포자충은 신장뿐만 아니라 간과 장관 등 다른 조직에서도 발견되는 것으로 확인되었으며, 추후 연구에서는 *P. anisocaudata*에 대한 정량적 분석을 통한 조직별 감염 정도를 보고하였다(Kim & Jeong, 2018).

국내에서는 여윌 증상을 보이는 양식넙치를 대

상으로 병원체를 검사하였을 때, *E. leei* 및 *P. anisocaudata*가 검출된다는 결과가 지속적으로 보고되어 왔다(Shin *et al.*, 2018; Sekiya *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2018). 본 연구에서는 여윌증상을 보이는 넙치를 대상으로 각 조직별 *E. leei* 및 *P. anisocaudata*에 의한 감염 정도를 real-time PCR법으로 분석하고자 하였으며, 감염 수조의 사육수를 여과하여 점액포자충을 분리한 후 real-time PCR법으로 정량하여 비침습적 여윌증 진단법으로서 사용 가능한지를 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

감염어 검사

제주 지역에서 여윌증상을 보이는 양식장(farm-A)의 넙치(36.6 cm, 420 g)와 해당 수조의 사육수를 채집하여 실험실로 이송하였으며, PCR 검사를 통해 *E. leei* 및 *P. anisocaudata*에 복합감염되어 있다는 것을 확인하였다. 감염 넙치 한 마리를 대상으로 11 종류의 조직(두신, 체신, 장, 근육, 아가미, 심장, 혈액, 뇌, 간, 비장 및 눈) 부위를 각각 분리하였고, 분리한 조직은 *E. leei* 및 *P. anisocaudata*에 의한 감염정도를 분석하기 위한 실험에 사용하였다.

감염 사육수 검사

제주 지역에서 여윌증상을 보이는 넙치양식장(farm-A, farm-B 및 farm-C)의 사육수 2 L를 각각 채수하여 저온 상태로 실험실로 운송 후, 150 µm mesh를 이용해 큰 부유물들을 걸러준 뒤, 걸러진 사육수를 진공여과시스템을 이용해 5µm membrane filter (Whatman, Germany)에 통과시켰다. 그 후, membrane filter를 50 mL conical tube에 넣은 뒤 멸균된 phosphate buffered saline (PBS) 용액 6 mL를 넣어주고 강하게 vortex시켜 filter에 붙은 기생충을 탈락시켰다. 탈락과정이 끝난 용액을 microtube에 나누어 담고, 1,800 × g, 10분간 원심분리하여 pellet을 한 개의 microtube로 모은 후, DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen Hilden, Germany)를 이용하여 total DNA를 분리하였다.

DNA 분리

E. leei 및 *P. anisocaudata*에 의한 복합감염이 확인된 양식장의 넵치 한 마리를 해부하여 11종류의 조직(두신, 체신, 장, 근육, 아가미, 심장, 혈액, 뇌, 간, 비장 및 눈)을 적출하였고, DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen Hilden, Germany)를 사용하여 total DNA를 각각 분리하였다. 50 mg 또는 50 µL로 정량한 각 조직에 ATL buffer 180 µL와 proteinase K 20 µL를 첨가하여 56°C에서 조직이 용해될 때까지 반응시켰다. 반응이 끝난 뒤 AL buffer 200 µL를 첨가하여 10분간 반응시켰다. 반응 후 100% ethanol 200 µL를 첨가하여 spin column에 옮겨 6,000 × g, 1분간 원심분리하였다. Column을 새로운 tube로 옮겨준 후 AW1 buffer 500 µL를 넣어 6,000 × g에서 1분간 원심분리하였고, AW2 buffer 500 µL를 넣어 20,000 × g, 3분간 원심분리하여 세척과정을 거쳤다. 그 후 column을 microtube로 옮겨준 뒤 AE buffer 50 µL를 이용하여 최종적으로 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA는 실험 전까지 -80°C에 보관하였다.

PCR

여崈증상 넵치 및 사육수를 대상으로 *E. leei* 및 *P. anisocaudata*에 의한 감염 검사를 위해 PCR 방법을 사용하였다. *E. leei*의 검출을 위한 EL-F/EL-R primer set (1,468 bp) 및 *P. anisocaudata*의 검출을 위한 EM-F/EM-R primer set (812 bp)를 각각 사용하여 PCR을 실시하였다(Table 1). Microtube에 1 µM의 각 primer, 2.5 mM의 각 dNTP, 10 × IP-Taq

Buffer, 2.5 U IP-Taq DNA polymerase (LaboPass™ IP-Taq 500 unit 2.5U/µL, COSMO genetech) 및 template DNA로서 추출된 핵산을 첨가한 후 distilled water로 PCR 혼합물의 최종 volume이 20 µL가 되게 하였다. PCR 조건으로 95°C에서 3분간 pre-denaturation시킨 후, 95°C에서 30초 denaturation, 60°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, SYBR® Safe gel stain 10,000X in DMSO (Invitrogen)이 첨가된 1% agarose gel 상에서 전기영동한 후, UV 검출기를 이용하여 PCR 생성물을 확인하였다.

Real-time PCR

Real-time PCR 분석을 위한 표준검량곡선을 만들기 위해 *E. leei*의 주형 DNA가닥을 주형으로 하여 N-EL-F/N-EL-R primer set를 사용하여 PCR을 진행하였고, *P. anisocaudata*의 경우 EM-F/EM-R primer set를 사용하여 PCR을 진행하였다(Table 1). 생성된 각각의 PCR product를 pGEM-T Easy vector (promega, USA)에 cloning시켰고, competent cell DH5α 균주에 transformation시켰다. 그 후, 각각의 plasmid DNA를 분리하였고, 분리된 plasmid DNA의 절대표준농도(absolute standard concentration)를 계산하였다. *E. leei* 및 *P. anisocaudata* 유전자의 클론으로부터 각각 2.08 × 10¹¹ copies/g 및 2.11 × 10¹¹ copies/g 농도의 plasmid DNA를 확

Table 1. Primers used in this study

Target	Primer	Oligonucleotide sequences (5' to 3')	Expected size	Function	Reference
<i>E. leei</i>	EL-F	GATGAAACTGCGAAGCGCTC	1,468 bp	For PCR	Kang <i>et al</i> (2020)
	EL-R	CACAAGTTGATGACTTGCGC			
<i>P. anisocaudata</i>	EM-F	CAACCGCAATGTGTTTACTC	812 bp	For PCR	Kim <i>et al</i> (2015)
	EM-R	CCAAACAACCTGCCACAATG			
<i>E. leei</i>	ELNMF	CGGTGACGCCAATCCGTG	198 bp	for Real-time PCR	Shin <i>et al</i> (2018)
	MyNMR	GACGGTATCTGATCGTCTTCGA			
<i>P. anisocaudata</i>	EMRT-F	CGATACATGTTGGTTCGAC	147 bp	for Real-time PCR	Kim & Jeong (2018)
	EMRT-R	CGAATCGCATTAATTATC			

보하였다. 확보된 plasmid DNA는 10배씩 단계 희석하여 real-time PCR 분석을 위한 표준검량곡선을 구하는데 사용하였다. Real-time PCR 분석을 위하여 기존에 보고된 ELNMF/MyNMR primer set (*E. leei*) 및 RTEM-F/RTEM-R primer set (*P. anisocaudata*)를 사용하였으며(Table 1), LightCycler® Nano SW1.0 (Roche,USA)을 사용하여 정량 분석을 실시하였다. Microtube에 SensiMixPlus SYBR (Roche, USA) 10 µL, forward primer와 reverse primer를 각각 1 µM을 첨가하였고 주형 DNA로서 plasmid DNA 또는 추출한 total DNA를 사용하였으며 증류수로 최종용량이 20 µL가 되도록 하였다. Real-time PCR의 조건으로는 95°C에서 10분간 post extension을 거쳤으며, 95°C에서 20초, 60°C에서 20초, 72°C에서 20초의 반응을 1 cycle로 하여 45 cycles를 반응시켰다.

점액포자충 관찰

*E. leei*에 의한 감염이 확인된 넙치(farm-A)의 장 조직으로부터 점액포자충을 분리하기 위해, 감염어를 해부하여 장을 분리하고 세로로 절개하였다. 그 후, 메스로 장 내막을 긁어 *E. leei*를 microtube에 모으고, 염색 후 점액포자충을 관찰하였다. 점

액포자충을 염색하기 위해, 0.05% neutreal red & 0.05% methylene blue 액을 1:1로 혼합하였으며, 혼합된 염색액은 점액포자충액과 다시 1:1로 혼합한 뒤 35°C에서 10분간 염색을 진행하였다. 염색이 끝난 뒤 광학현미경을 사용하여 포자를 관찰하였다.

결 과

점액포자충 감염 검사

제주 지역에서 여嵬증상을 보이는 양식장(farm-A)의 넙치를 대상으로 *E. leei* 및 *P. anisocaudata*에 의한 감염 유무를 PCR법으로 확인한 결과, 2종의 점액포자충 모두에 의해 복합감염되어 있는 것으로 분석되었다(Table 2 & 3). 감염어의 11 종류의 조직 중에서 *E. leei*는 장 및 근육에서, *P. anisocaudata*는 두신 및 체신 조직에서 각각 PCR 양성반응을 나타내었고, 나머지 조직에서는 음성으로 나타났다. Farm-A의 감염 사육수를 대상으로 PCR을 실시한 결과, *E. leei*는 양성, *P. anisocaudata*는 음성 반응을 나타내었다(Table 2 & 3).

점액포자충 정량 분석

여嵬증상을 보이는 양식장(farm-A) 넙치의 11

Table 2. The DNA copy numbers of *E. leei* in each internal organ of emaciated olive flounder from farm-A and rearing water from farm-A, farm-B, farm-C

Aquafarm	Organ	Result		
		Real-time PCR (copies/mg tissue)	PCR	Ct
Farm-A	H.K	1.3×10^3	-	29.6
	B.K	1.4×10^3	-	29.6
	Intestine	1.3×10^8	+	13
	Muscle	4.6×10^5	+	21
	Brain	1.1×10^4	-	26.6
	Blood	1.0×10^4	-	26.7
	Gill	1.8×10^4	-	25.9
	Spleen	9.3×10^3	-	26.9
	Heart	7.5×10^4	-	23.9
	Liver	4.2×10^4	-	24.7
	Eye	1.1×10^5	-	23.2
	Rearing water	8×10^4 (copies/L)	-	28.5
Farm-B	Rearing water	5×10^5 (copies/L)	+	25.6
Farm-C	Rearing water	-	-	-

+, positive; -, negative

Table 3. The DNA copy numbers of *P. anisocaudata* in each internal organ of emaciated olive flounder from farm-A and rearing water from farm-A, farm-B, farm-C

Aquafarm	organ	Result		
		Real-time PCR (copies/mg tissue)	PCR	Ct
Farm-A	H.K	1.3×10^3	+	37.5
	B.K	9.1×10^3	+	34
	Intestine	-	-	-
	Muscle	-	-	-
	Brain	-	-	-
	Blood	-	-	-
	Gill	-	-	-
	Spleen	-	-	-
	Heart	-	-	-
	Liver	-	-	-
	Eye	-	-	-
	Rearing water	-	-	-
Farm-B	Rearing water	2.0×10^6 (copies/L)	+	32
Farm-C	Rearing water	5.1×10^6 (copies/L)	+	30

+, positive; -, negative

종류 조직에 대하여 *E. leei*의 정량 분석을 실시한 결과, 장 조직에서 1.3×10^8 copies/mg으로 가장 높은 DNA copy 값을 나타내었다(Table 2). 나머지 조직 부위에서도 $1.3 \times 10^3 \sim 4.6 \times 10^5$ copies/mg의 값을 보여 검사한 모든 종류의 조직에서 *E. leei*의 DNA가 검출되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 해당 넙치의 사육수를 대상으로 real-time PCR을 실시한 결과, 8×10^4 copies/L 값을 나타내었다. *P. anisocaudata*의 정량 분석 결과, 두신과 체신에서 $1.3 \times 10^3 \sim 9.1 \times 10^3$ copies/mg 값을 보였고, 사육수를 포함한 나머지 조직에서는 검출되지 않았다(Table 3). 제주 지역에서 여崈증상을 보이는 farm-B 및 farm-C의 사육수를 대상으로 두 점액포자충에 대한 real-time PCR을 실시한 결과, farm-B에서는 *E. leei* (5×10^5 copies/L)와 *P. anisocaudata* (2.0×10^6 copies/L) 모두 검출되었고, farm-C에서는 *P. anisocaudata* (5.1×10^6 copies/L) 한 종류만 검출되는 것을 확인하였다(Table 2&3). 여崈증 진단에 있어서 PCR법에 비하여 real-time PCR법의 sensitivity가 더 높은 것으로 분석되었다.

광학현미경 관찰

Farm-A의 넙치의 장 조직에서 분리한 점액포자

충액을 0.05% neutreal red & 0.05% methylene blue 액과 1:1로 혼합하여 염색을 진행하고 광학현미경으로 관찰한 결과, *E. leei* 포자의 존재가 확인되었다(Fig. 1). Real-time PCR 분석 결과, 신장 조직에서 *P. anisocaudata* 양성 반응이 나타났지만 DNA copy number가 적어 경증 감염으로 추정되며, 현미경 관찰에서 *P. anisocaudata*는 관찰되지 않았다(data not shown).

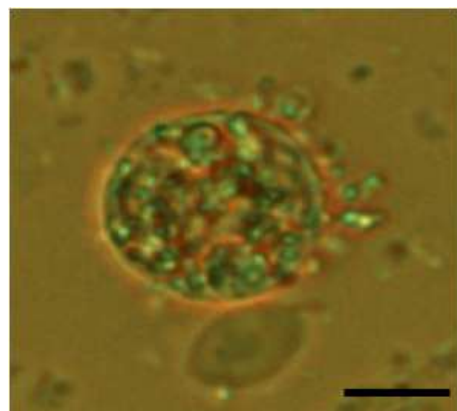


Fig. 1. *E. leei* was isolated from intestine of emaciated olive flounder and stained with neutral red & methylene blue. Scale bar = 10 µm.

고 찰

전 세계적으로 어류 기생충에 의한 피해가 확산함에 따라, 종묘생산 단계에서부터 감염을 줄이기 위한 노력이 시도되고 있지만 완전히 차단하는 것은 현재로서는 어려운 것으로 알려져 있다. 기생충 검출을 위한 microscopy, immunoassay 및 western blotting 시험법은 감염초기 및 잠복성 기생충 질병을 진단하는데 있어 어려울 수 있으며, 이러한 단점을 보완하기 위한 방법 중 하나로 PCR을 이용한 검출법이 일반적으로 사용되고 있다(Yasuda *et al.*, 2005). 일반적인 PCR 방법은 PCR 반응 후 agarose gel 상에서 전기영동을 통해 밴드 확인 과정이 필요하고, 감염 정도를 정량적으로 조사하기 어렵기 때문에, 최근 신속하면서 병원체의 정량적인 검출이 가능한 real-time PCR 방법이 어류의 질병 진단을 위해 사용되고 있다(OIE, 2018). 본 연구에서는 여嵬증상을 보이는 넙치(farm-A)로부터 11 종류의 조직(두신, 체신, 장, 근육, 아가미, 심장, 혈액, 뇌, 간, 비장 및 눈)을 분리하여 PCR 및 real-time PCR 방법으로 *E. leei* 및 *P. anisocaudata*에 의한 감염정도를 분석하였다. Yasuda (2005) 등의 보고와 마찬가지로, 장 조직(1.3×10^8 copies/mg)이 *E. leei*에 의한 감염의 주요한 표적 부위인 것으로 분석되었고, 그 다음으로 근육과 눈에서도 높은 수치로 검출되었으며, 분석대상인 나머지 모든 조직 부위에서도 *E. leei*가 검출되는 것을 확인하였다. 또한, 해당 넙치의 사육수에서도 *E. leei*가 PCR법 및 real-time PCR법 (8×10^4 copies/L) 모두에서 양성반응을 보였고, 이 결과는 감염된 넙치뿐만 아니라 감염 사육수를 시료로 사용했을 때도 여嵬증 검사가 가능하며, 향후 넙치 친어에 대한 비침습적 여嵬증 검사의 적용 가능성을 시사하고 있다. Farm-A의 넙치에서 *P. anisocaudata*는 신장 조직에서만 낮은 농도로 검출되었고, 사육수를 포함한 나머지 종류의 조직에서는 음성반응을 나타내었다. 여嵬증상이 심한 넙치의 신장, 장, 비장, 뇌 및 간 등의 조직으로부터 *Parvicapsula* sp.가 $3.2 \times 10^5 \sim 1.7 \times 10^7$ copies/mg의 매우 높은 농도로 검출되었다는 보고가 있었고(Kim and Jeong, 2018), 이로 볼 때 farm-A의 넙치는 *P. anisocaudata*에 의

해 경증 감염되었고, *E. leei*에 의해서는 중증 감염된 것으로 판단된다.

Do (2016)등은 점액포자충 *Kudoa setempunctata*의 포자를 확인하는 방법으로 사용되는 Hoechst 33342 염색법, propidiumiodide를 사용한 염색법과 비교하기 위한 neutral red & methylene blue (NR & MB) 염색법을 제시하였다. Hoechst33342 (또는 SYTO®9)와 propidiumiodide를 사용한 방법은 형광현미경을 통하여 확인 가능한 방법으로 그 결과의 정확도는 높으나, 형광현미경과 같은 관찰에 필요한 고가의 장비가 갖추어져 있지 않을 때, 실험실에서 확인할 수 있는 방법이 없다. 본 연구에서는 이를 개선하기 위한 방법 중 하나인 NR & MB 염색법을 이용하여 *E. leei*의 포자 형태를 관찰할 수 있었다.

Sohn (2021)등에 의하면 계절별 사육수 검사를 통해 *E. leei*의 감염에 대한 상관관계를 분석하였고, 4월~5월 사육수에서 *E. leei*가 검출되면 1~2개월 후에 장 조직 내에서 *E. leei*가 검출되었다고 보고하였다. 제주 지역에서 여嵬증상을 보이는 넙치 양식장(farm-A, farm-B 및 farm-C)의 사육수를 시료로 하여 두 종류의 점액포자충 진단검사를 실시한 결과, farm-A에서는 *E. leei* (8×10^4 copies/L) 한 종류만 검출되었고, farm-B에서는 *E. leei* (5×10^5 copies/L)와 *P. anisocaudata* (2.0×10^6 copies/L) 두 종류 모두 검출되었으며, farm-C에서는 *P. anisocaudata* (5.1×10^6 copies/L) 한 종류만 검출되었다. *E. leei* 및 *P. anisocaudata*에 의해 복합 감염된 경우는 제주 지역에서 여嵬증상을 보이는 넙치양식장에서 빈번하게 나타나고 있다. 점액포자충의 단독 감염과 비교하여 복합 감염된 양식장에서의 여嵬 정도, 누적폐사율, 사료량 감소율, 감염 지속기간 및 피해범위 등에 대한 세부적인 자료들을 축적하고 비교 분석할 필요가 있는 것으로 사료된다. Farm-A에서 여嵬증상을 보인 넙치의 11종류 조직 시료와 사육수를 대상으로 한 real-time PCR 분석 결과, 12개 검사대상 시료 모두에서 *E. leei* 양성 반응을 나타내었지만, 동일한 시료를 사용한 일반 PCR 결과에서는 장 및 근육 조직 등 2개의 시료에서만 양성 반응을 보였다. 본 연구의 여嵬증 진단에 있어서 real-time PCR법의 sensitivity는

일반 PCR법에 비하여 더 높은 것으로 조사되었고, 점액포자충의 검출 유무 뿐만 아니라 병원체의 정량 분석에 의해 감염 정도를 파악할 수도 있어 넙치양식 현장에 대한 여윌증 진단법으로서 더욱 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

감사의 글

이 논문은 2021년 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임(넙치 SPF(특정 병원체 무감염) 종자생산 기술개발).

References

- 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*. J. Fish Pathol., 17(3): 179-189, 2004.
- Choi, H.S., Jun, L.J., Kim, S.M., Jeong, H.D., Kim, Y.K., Lim, H.Y., Yeo, I.K. and Jeong, J.B.: Clinical features of fish with pathogens isolated from emaciated olive flounder *Paralichthys olivaceus*. J. Fish Pathol., 25(2): 67-76, 2012.
- Do, J.W., Moon, S.H., Kim, M.J., Cho, M.Y., Jung, S.H. and Lee, N.S.: A distinguishing staining methods for vitality of *Kudoa* (*Kudoa septempunctata*) spores in muscle of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). J. Fish Mar. Sci. Edu., 28(6): 1822-1827, 2016.
- Kang, M.R., Kim, Y.J., Jun, L.J., Kim, S.M., Kim, S.H., Han, S.R. and Jeong, J.B.: Therapeutic study of myxosporean emaciation disease of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju using toltrazuril. J. Fish Pathol., 33(1): 55-62, 2020.
- Kim, Y.K., Jeong, J.B., Lee, M.K., Park, S.I., Park, M.A., Choe, M.K. and Yeo, I.K.: Pathophysiology of olive flounder *Paralichthys olivaceus* suffering from emaciation. J. Fish Pathol., 24(1): 11-18, 2011.
- 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. and Jeong, J.B.: Quantitative analysis of a myxosporean parasite, *Parvicapsula* sp. detected from emaciated olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea. J. Fish Pathol., 31(2): 101-107, 2018.
- Kim, N.E., Kim, A.R., Roh, H.J., Gang, K.S. and Kim, D.H.: A case report of farmed olive flounder *Paralichthys olivaceus* infected with Myxosporean *Parvicapsula anisocaudata*. J. Fish pathol., 31(2): 123-129, 2018.
- Koie, M.: *Parvicapsula spinachiae* n. sp. (myxozoa, parvicapsulidae) in *Spinachia spinachia* (L.) (Teleostei, Gasterosteidae) from denmark. Parasitol. Res., 90(6): 445-448, 2003.
- 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 Office international des epizooties, 2018.
- Sekiya, M., Setsuda, A., Sato, H., Song, K.C., 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. Parasitol. Res., 115(11): 4229-4237, 2016.
- Shim, J.D., Hwang, S.D., Jang, S.Y., Kim, T.W. and Jeong, J.M.: Monitoring of the mortalities in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) farms of Korea. J. Fish Pathol., 32(1): 29-35, 2019.
- Shin, S.P., Jin, C.N., Sohn, H.C. and Lee, J.H.: *Parvicapsula curvatura* n. sp. in cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus* and phylogenetic characteristics of the genus *Parvicapsula*. Dis. Aquat. Org., 130(3): 199-207, 2018.
- Sohn, H.C., Jin, C.N., Kang, B.J., Shin, S.P. and Lee, J.H.: Infection dynamics of *Enteromyxum leei* (Myxozoa, Myxosporea) in culture water and its effects on cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel). J. Fish Dis., 44(9):

- 1475-1479, 2021.
- Tun, T., Yokoyama, H., Ogawa, K. and Wakabayashi, H.: Myxosporeans and their hyperparasitic microsporeans in the intestine of emaciated tiger puffer. *Fish Pathol.*, 35(3): 145-156, 2000.
- 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.
- 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.
- Yanagida, T., Nomura, Y., Kimura, T., Fukuda, Y., Yokoyama, H. and Ogawa, K.: Molecular and morphological redescription of enteric myxozoans, *Enteromyxum leei* (formerly *Myxidium* sp. TP) and *Enteromyxum fugu* comb. n. (syn. *Myxidium fugu*) from cultured tiger puffer. *Fish Pathol.*, 39(3): 137-143, 2004.
- Zhao, Y., Chenglum, M.A. 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. Protozool.*, 39: 157-162, 2000.

Manuscript Received : Nov 21, 2021

Revised : Nov 29, 2021

Accepted : Nov 29, 2021