

시마연어, *Oncorhynchus masou*에서 분리된 아니사키스 속 선충 3기 유충의 분자생물학적 방법을 이용한 동정

전찬혁 · Eko Setyobudi · 김정호†

강릉원주대학교 생명과학대학 해양생명공학부 해양자원육성전공

Molecular identification of Anisakid worm third stage larvae isolated from masou salmon *Oncorhynchus masou*

Chan-Hyeok Jeon, Eko Setyobudi and Jeong-Ho Kim*

Faculty of Marine Bioscience and Technology, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, 210-702, Korea

Anisakid nematodes third stage larvae were isolated from the muscles of masou salmon (*Oncorhynchus masou*). Fish were purchased from Jumunjin fishery market in Gangneung. Four Anisakid third stage larvae were isolated from 4 fish. Molecular identification of the isolated worms was conducted by PCR-RFLP analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer region and direct sequencing of mitochondrial DNA *cox2* gene. As results, all the tested individual worms were identified as *Anisakis simplex* (sensu stricto). This is the first report of molecular detection of anisakid worms in salmonid fishes in Korea.

Key words : *Anisakis simplex* (s.s.), *Oncorhynchus masou*, Masu salmon, PCR-RFLP, Mitochondrial *cox2* gene

아니사키스 과 (Family Anisakidae)에 속하는 선충류로는 Genus *Anisakis*, *Contracaecum*, *Pseudoterranova*, *Hysterothylacium* 등이 있으며, 이 중 아니사키스 속 (Genus *Anisakis*) 선충은 고래목에 속하는 해산포유류의 위에서 성숙한 성충이 산란하면, 알이 분변과 함께 해수에 방출되어 알에서 부화한 유충을 각각류가 일차적으로 섭취한다. 이후, 각각류 체내에서 3기 유충으로 변태하고, 감염된 각각류를 포식한 해산어류나 오징어 체내에서 대기하고 있다가 종숙주의 위 혹은 장 내에서 성충으로 변태, 성숙하는 복잡한 생활

사를 가진다 (D'Amelio *et al.*, 2009).

아니사키스 과 선충의 종숙주는 고래, 돌고래, 바다표범, 물개 등의 해양포유류들이 대부분이며, 대기숙주로는 대구목, 농어목, 청어목 등의 경골어류 뿐 아니라 연골어류, 두족류 등에서도 보고되어 광범위한 숙주 범위를 가져, 생태학적 관점에서 명확하지 않은 부분이 존재한다 (D'Amelio *et al.*, 2009; Smith and Wootten, 1978).

사람의 아니사키스 감염증은 일본 및 유럽을 중심으로 전 세계적으로 보고되고 있다 (Chai *et al.*, 2005). 주로 아니사키스 속 선충에 감염된 해산어류나 두족류 등을 생식하거나 불충분하게 조리하여 섭취할 경우 우발적으로 인간에 감염되어 아니사키스 감염증

†Corresponding Author : Jeong-Ho Kim

Tel : +82-33-640-2851

Fax : +82-33-640-2340

Email : jhkim70@gwnu.ac.kr

(anisakiasis), 알러지 반응 등을 유발시키는 것으로 알려져 있어 식품위생학적 측면에서도 매우 중요하기 때문에 (Audicana *et al.*, 2008), 명확한 진단을 위해서 Genus *Anisakis* 선충의 정확한 동정은 매우 중요하다.

아니사키스 속에 속하는 선충의 분류법에는 형태학적, 혈청학적, 분자생물학적 방법 등이 있는데, 전통적인 형태학적 분류법에 따르면 아니사키스 속 선충은 ventriculus의 길이, mucron의 존재 여부에 따라 type I, type II로 나누어서 분류되며 (Berland, 1961), 국내와 일본에서는 주로 type I 이 널리 분포한다고 알려져 있다 (Kim *et al.*, 1988, 1990; Umehara *et al.*, 2006).

Type I 에 속하는 대표적인 종으로는 *Anisakis simplex* complex, *Anisakis ziphidarum*, *Anisakis typica* 등이 있는데, 그 중 *A. simplex* complex에 속하는 3종 (*Anisakis simplex sensu stricto*, *Anisakis pegreffii*, *Anisakis complex C*)들은 서로 형태학적으로 매우 유사하여 종 수준에서 각각의 차이를 동정하기가 어려우며, 혈청학적 분류법에서는 다른 선충류들과의 교차 반응에 의해 오진단이 나타날 수 있는 단점을 가지고 있다 (Iglesias *et al.*, 1996). 그러므로, 최근에는 빠르고 정확하게 아니사키스 속 선충을 동정할 수 있는 SSCP (Single-strand Conformational Polymorphism), Multiplex PCR, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), direct sequencing 등의 분자생물학적 방법들이 도입되어 사용되고 있는 추세이다 (D'Amelio *et al.*, 2000; Nadler *et al.*, 2005; Umehara *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2007).

하지만 국내에서 아니사키스 속 선충의 어류 감염에 관한 보고는 대부분 형태학적 분류 방법에 국한되어 있으며, 국내에서 연어과 어류에 감염된 아니사키스 속 선충 역시 형태학적 방법을 이용한 제한적 동정에 그치고 있다 (Kim *et al.*, 1988; Seo *et al.*, 2010).

따라서, 본 연구에서는 국내에서 포획되는 연어과 어류 중 시마연어, *Oncorhynchus masou*에서 분리된 아니사키스 속 선충의 3기 유충을 PCR-RFLP와 direct sequencing 방법을 이용하여 동정하였다.

재료 및 방법

샘플처리

2006년 1월 강원도 주문진 어시장에서 구입한 시마연어 4마리 (평균체장 : 35.9 cm, 평균체중 : 575.2 g) 중 2마리의 근육에서 각각 2개체의 아니사키스 속 유충을 분리하여 총 4개체를 실험에 사용하였다.

핵산추출

분리된 유충을 새로운 eppendorf tube에 옮겨 담고, PBS 500 μ l를 첨가하여 3회 세척 후 Wasko *et al.* (2003)에 의해 수정된 phenol-chloroform 방법에 따라 Genomic DNA를 분리하였다. 즉, 500 μ l의 TNE-digestion buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 125 mM NaCl; 10 mM EDTA pH 8.0; 0.5% SDS; 4 M urea)를 이용하여 유충을 균질화시킨 뒤, 1 μ l의 RNase (10 mg/ml, NEB)를 첨가하여 42°C에서 한 시간 반응시킨 후에 5 μ l의 proteinase K (10 mg/ml, Invitrogen)를 첨가하여 60°C에서 overnight 시켰다. 그 후 phenol : chloroform: isoamyl alcohol (25 : 24 : 1 saturated with 10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA. Bioneer)을 1:1 비율로 첨가하여 15분간 반응시킨 후 13,000 rpm으로 5분간 원심 분리한 상층액에 1 M NaCl과 2배 부피의 냉각한 absolute ethanol을 첨가하여 다시 13,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 70% ethanol로 세척하였고 pellet은 100 μ l의 TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 1mM EDTA pH 8.0)로 mixing 하여, Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, USA)을 사용하여

DNA의 농도와 순도를 측정 후 template로 사용하였다.

PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 분석

D'Amelio *et al.* (2000)이 rDNA의 ITS region (ITS1-5.8S-ITS2)을 바탕으로 제작한 A (5'-GTCGAA TTCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA-3') 와 B (5'-GCCGGATCCGAATCCTGGTTAGTTTCTTTTC CT-3') primer를 사용하여 *AccuPower* PCR premix tube (Bioneer, Korea)에 template 1 μ l를 첨가한 후, PCR machine (PTC-200, Bio-Rad, USA)을 이용하여 94°C 40초, 54°C 40초, 72°C 90초를 30 cycle 반복하는 조건으로 PCR을 실시하였다.

증폭된 단편들은 제한효소 *Taq* I, *Hha* I 및 *Hinf* I 을 사용하여 처리하였고, 증폭된 DNA 5 μ l를 각각의 제한효소로 처리하였다. 제한효소 (NEB, USA)는 manual에 따라 *Taq* I 는 65°C에서, *Hha* I 와 *Hinf* I 는 37°C에서 60분간 각각 반응시킨 후 2% agarose gel을 사용하여 결과물을 전기 영동한 후 UV transilluminator 상에서 확인하였다.

mtDNA cox2 (mitochondrial cytochrome oxidase 2) gene을 이용한 Direct sequencing 및 계통분석

Nadler and Hudspeth (2000)에 의해 제작된 mtDNA cox2 영역을 encoding 하는 211 (5'-TTTCTAGTT ATATAGATTGRITTYAT-3') 과 210 (5'-CACCAACT CTAAAAATTATC-3') primer를 사용하여 94°C 40초, 42°C 40초, 72°C 60초를 30 cycle 반복하는 조건으로 PCR을 한 뒤, 증폭된 산물은 *AccuPrep* gel purification kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 agarose gel로부터 밴드를 정제하였다. 정제 후 ABI Prism 3730 XL DNA Analyzer (PE Applied Biosystems, NICEM at Seoul

National University, Korea)를 사용하여 염기서열을 결정하였다 (genbank accession number: HM437219). 결정된 염기서열은 Blast search (NCBI, USA)를 이용하여 genbank에 등재된 기존에 알려진 아니사키스 속 선충의 sequence data와 조합한 뒤, PHYLIP phylogeny program (version 3.67 package) (Felsenstein, 2007)을 이용하여 consensus tree를 제작하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 국내에서 포획 가능한 연어과 어류 중 시마연어 4마리를 대상으로 아니사키스 속 선충의 3기 유충 4마리를 근육에서 분리하였다. 앞서 Kim *et al.* (1990)의 연구에서는 12마리의 시마연어에서 아니사키스 속 type I 선충 유충의 기생률이 100%, 평균 기생 개체수는 10.17이었으며, Suzuki *et al.* (2001)은 34마리의 일본산 시마연어에서 기생률 73.5%, 평균 2.6 개체의 아니사키스 속 type I 선충을 보고하였다. 한편, 국내에 서식하는 연어, *Oncorhynchus keta*의 경우, Kim *et al.* (1990)이 7마리의 연어에서 기생률 100%, 평균 28.9 개체의 아니사키스 속 type I 선충 유충을 보고하였으며, Suzuki *et al.* (2001)은 50개체의 연어에서 기생률 92%, 평균 12개체의 아니사키스 속 type I 선충을 보고하였다. 조사한 시마연어의 개체수가 상대적으로 적으므로 직접적인 비교는 쉽지 않지만, 다른 연구 결과들과 종합하여 볼 때 시마연어가 연어에 비해 감염률에서는 큰 차이가 없으나 개체당 감염수는 적은 경향이 있는 것으로 추정된다.

형태학적 분류상 type I 에 속하는 *Anisakis simplex* complex (*Anisakis simplex sensu stricto*, *Anisakis pegreffii*, *Anisakis simplex* C)는 유전학적인 구조, 생활사, 지리학적 분포 등이 다르므로 정확한 동정이 필수

적이며 (D'Amelio *et al.*, 2000), *A. simplex* (s.s.)는 아니사키스속의 다른 선충에 비해 *in vitro*에서 조직 침투력이 높아 인체에 감염했을 때에 병원성이 다를 수 있다는 연구보고도 있어 (Suzuki *et al.*, 2010), 식품위생학적 관점에서도 정확한 동정은 매우 중요하다.

하지만 현재까지 국내에서 아니사키스 속 선충 유충의 동정에는 형태학적 방법이 주로 사용되어 왔으며 (Kim *et al.*, 1988; Woo and Kim, 2000), 최근에 PCR-RFLP법을 이용하여 제한효소 절단패턴을 비교, 분석하기 시작하였다 (Kang *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009). 최근에는 mitochondria에 존재하는 *cox2* (cytochrome oxidase 2) 유전자를 direct sequencing하여 종을 동정하는 방법도 사용되고 있다 (D'Amelio

et al., 2009). 본 연구에서는 PCR-RFLP 뿐만 아니라 mitochondrial DNA *cox2* gene을 direct sequencing하여 아니사키스 속 선충을 동정하였다.

PCR-RFLP 분석에서는 PCR product를 제한효소 *Taq* I 과 반응시킨 결과, 430, 400 bp 크기를 가지는 분절이 확인되었으며, *Hha* I 과 반응시킨 결과에서는 550, 430 bp의 분절이 확인되었고, *Hinf* I 에서는 620, 250 bp의 분절이 각각 확인되었다 (Fig. 1). 이러한 결과는 *Anisakis simplex* (sensu stricto)의 특징적인 PCR-RFLP 패턴이며, 기존의 다른 연구들과도 동일한 결과를 나타내었다 (D'Amelio *et al.*, 2000; Umehara *et al.*, 2006).

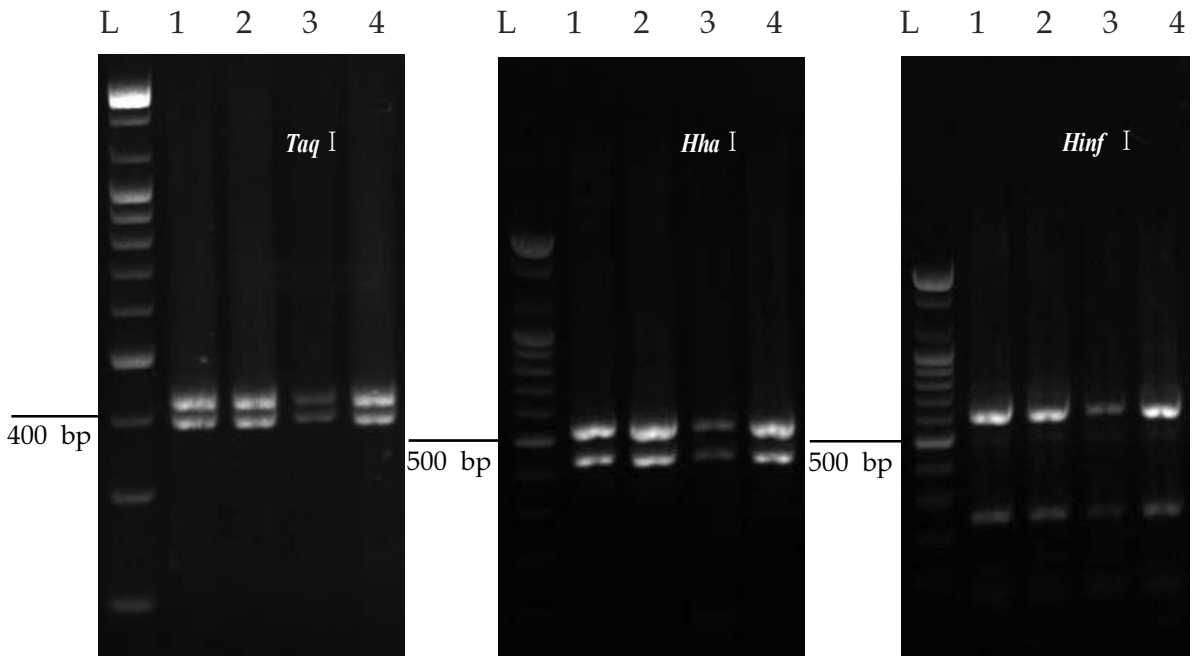


Fig. 1. RFLP profiles obtained by digestion of ITS amplicons with *Taq* I, *Hha* I and *Hinf* I restriction enzymes. L, 100 bp DNA ladder; lane 1-4 : isolated samples.

한편, mitochondrial DNA *cox2* gene을 이용한 PCR 결과에서는 629 bp의 단일 밴드를 확인할 수 있었으며 (Fig. 2), PCR product를 direct sequencing을 통해 기존에 알려진 아니사키스 속 선충의 시퀀스들과 함께 계통수를 작성하여 비교분석한 결과, 대서양연어, *Salmon salar*와 연어, *Oncorhynchus keta*에서 분리, 등록된 *Anisakis simplex* (*sensu stricto*)의 시퀀스 (GQ338433, EU413959)와 각각 937과 976의 높은 bootstrap value가 나타나 본 연구에서 분리된 아니사키스속 선충도 *Anisakis simplex* (*sensu stricto*)로 동정할 수 있었다 (Fig. 3).

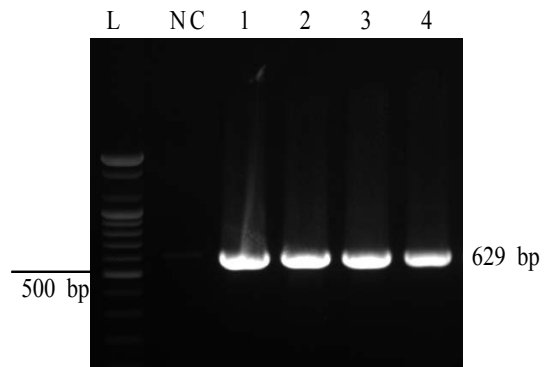


Fig. 2. PCR products of mtDNA *cox2* gene amplification of *Anisakis* worms isolated from masou salmon *Oncorhynchus masou*. L, 100 bp DNA ladder; lane NC, negative control; lane 1-4, isolated samples.

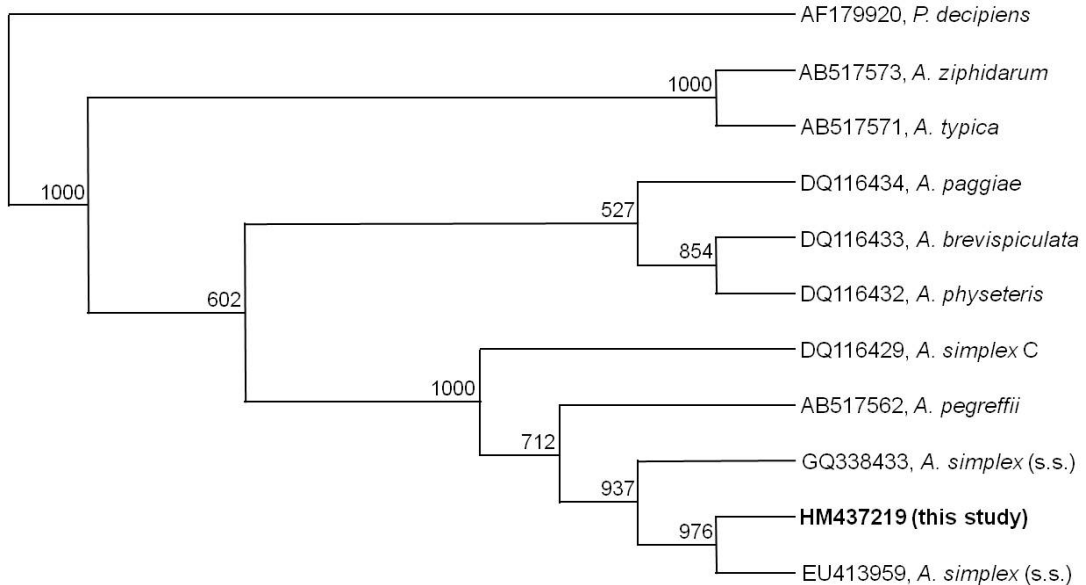


Fig. 3. Phylogenetic tree of *Anisakis* worms based on mtDNA *cox2* gene sequences. Ten *Anisakis* Genbank sequences including the sequence in this study were used for phylogenetic analysis and the *Pseudoterranova decipiens* sequence was used as the outgroup. Analysis was performed using the PHYLIP phylogeny program (version 3.67 package). The bootstrap values were determined with the CONSENSE program.

아니사키스 속 선충 유충은 갑각류 등의 중간숙주를 거쳐 어류에 감염되므로 주로 자연산 해산어류에 감염되고, 인공사료를 섭취하는 양식산 해산어류에서는 거의 검출되지 않는 것으로 알려져 있으며,

대서양 연어, *Salmon salar*, 은연어, *Oncorhynchus kisutch* 등의 연어과 어류에서도 동일한 연구 보고가 있다 (Deardorff and Kent, 1989). 또한 아니사키스속 선충 유충의 감염은 붕장어, 고등어, 참조기, 갈치

등 대부분의 해산 어류에서는 근육보다 내장기관에 더 많이 감염되는 것으로 알려져 있으나 (Kim *et al.*, 1988; Song and Hwang, 1992), 연어과 어류에서는 내장기관에서보다 근육에서 더 많이 검출되고 있어 (Deardorff and Kent, 1989; Kim *et al.*, 1990; Suzuki *et al.*, 2001), 자연산 연어과 어류의 생식시 충분한 주의가 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2005년도 강릉대학교 학술연구조성비 지원에 의하여 수행되었습니다.

참고문헌

- Audicana, M. T. and Kennedy, M.W.: *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. Clin. Microbiol. Rev., 21(2): 360-379, 2008.
- Berland, B.: Nematode from some Norwegian marine fishes.: Sarsia 2., 1-50, 1961.
- Chai, J.Y., Murrell, K. D. and Lymbery A. J.: Fish-borne parasitic zoonosis: Status and issues. Int. J. Parasitol., 35: 1233-1254, 2005.
- D'Amelio, S., Mathiopoulos, K.D., Santos, S.P., Pugachev, O.N., Webb, S.C., Picanco, M. and Paggi, L.: Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda; Ascaridoidea) defined by polymerase chain reaction-base restriction fragment length polymorphism. Int. J. Parasitol., 30: 223-226, 2000.
- D'Amelio, S., Busi, M., Ingrassio, S., Paggi, L. and Giuffra, E.: *Anisakis*. In : Liu D Y (ed) Molecular detection of foodborne pathogens. CRC Taylor and Francis Press, 2009. pp 757-768.
- Deardorff, T.L. and Kent, M.L.: Prevalence of larval *Anisakis simplex* in pen-reared and wild-caught salmon (Salmonidae) from Puget Sound, Washington. J. Wildlife. Dis., 25: 416-419, 1989.
- Iglesias, R., Leiro, J., Ubeira, F.M., Santamarina, M.T., Navarrete, I. and Santamarina, M.L.: Antigenic cross-reactivity in mice between third-stage larvae of *Anisakis simplex* and other nematodes. Parasitol. Res., 82: 378-381, 1996.
- Felsenstein, J.: PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.67. Dept of Genetics, Univ of Washington, Seattle, 2007.
- Kang, J.H., Lee, M.H., Lee, K.B. and Choi, C.S.: Comparison of macroscopic inspection and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) for the detection of *Anisakis simplex* complex J. Fd Hyg. Safety., 23(4): 314-318, 2008. (In Korean with english summary)
- Kim, K.H., Joo, K.H., Lee, J.S. and Rim, H.J.: Morphological classification and infection rate of Anisakid larvae in marine fishes. Kor. J. Rural. Med., 13(1): 32-40, 1988. (In Korean with english summary)
- Kim, K.H., Joo, K.H. and Rim, H.J.: A study about infection state of anisakid larvae and parasitic helminths in salmon (*Oncorhynchus keta*) and sea trout (*Oncorhynchus masou*) which caught from Taean port Kangwon Do. Kor. J. Rural Med., 15(2): 27-32, 1990. (In Korean with english summary)
- Kim, S.M., Cho, M.K., Yu, H.S., Cha, H.J. and Ock, M.S.: Application of the 18S ribosomal DNA (rDNA) PCR-RFLP technique for the differential diagnosis

- of anisakidosis. J. Life Sci., 19(9): 1328-1332, 2009 (In Korean with english summary)
- Nadler, S.A. and Hudspeth, D.S.S.: Phylogeny of the Ascaridoidea (Nematoda: Ascaridida) based on three genes and morphology: hypotheses of structural and sequence evolution. J. Parasitol., 86: 380-93, 2000.
- Nadler, S.A., D'Amelio, S., Dailey, M.D., Paggi, L., Siu, S. and Sakanari, J.A.: Molecular phylogenetics and diagnosis of *Anisakis*, *Pseudoterranova*, and *Contracaecum* from northern Pacific marine mammals. J. Parasitol., 91: 1413-1429, 2005.
- Smith, J.W. and Wootten, R.: *Anisakis* and anisakiasis. Adv. parasitol., 16: 93-163, 1978.
- Song, S.B. and Hwang E.G.: Infection status of larval anisakids in *Astroconger myriaster* collected from the Southern Sea near Pusan. Kor. J. Parasitol., 30(4): 263-267, 1992. (In Korean with english summary)
- Seo, J.S., Jun, E.J., Jung, S.H., Kim, M.S., Park, M.A., Lee, C.H., Han, M.C., Kim, J.W. and Jee, B.Y.: Prevalence of Anisakid larvae in chum salmon, *Oncorhynchus keta* in Korea. J. Fish Pathol., 23(1): 123-129, 2010 (In Korean with english summary)
- Suzuki, J., Murata, R., Miyake, H., Sawada, Y., Ohama, Y., Tsukuda, H., Maruyama, B., Morozumi, S. and Murata, I.: Detection rate on the larvae of *Anisakis simplex* from salmon (*Oncorhynchus* spp.) retailed in Tokyo during 1996~2001. Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H., 52: 26-30, 2001. (in Japanese)
- Suzuki, J., Murata, R., Hosaka, M. and Araki, J.: Risk factors for human *Anisakis* infection and association between the geographic origins of *Scomber japonicus* and anisakid nematodes. Int. J. Food. Microbiol., 137: 88-93, 2010.
- Umehara, A., Kawakami Y., Matsui, T., Araki, J. and Uchida, A.: Molecular identification of *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) from fish and cetacean in Japanese waters. Parasitol. Int., 55: 267-271, 2006.
- Umehara, A., Kawakami Y., Araki, J. and Uchida, A.: Multiplex PCR for identification of *Anisakis simplex* sensu stricto, *Anisakis pegreffii* and the other anisakid nematodes. Parasitol. Int., 57: 49-53, 2008.
- Wasko, A.P., Martins, C., Oliverira, C and Foresti, F.: Non-destructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales. Hereditas., 138: 161-165, 2003.
- Woo, H.C. and Kim, J.A.: The infection status and identification of Anisakid larvae in marine fish caught from the sea near Cheju island. Kor. J. Vet. Publ. Hlth., 24(4): 307-317, 2000. (In Korean with english summary)
- Zhu, X.Q., Podolska, M., Liu, J.S., Yu, H.Q., Chen, H.H., Lin, Z.X., Luo, C.B., Song, H.Q. and Lin, R. Q.: Identification of anisakid nematodes with zoonotic potential from Europe and China by single-strand conformation polymorphism analysis of nuclear ribosomal DNA. Parasitol. Res., 101: 1703-1707, 2007.

Manuscript Received : August 11, 2010

Revised : October 21, 2010

Accepted : October 28, 2010