

넙치(*Paralichthys olivaceus*) 근육 채취 방법에 따른 *Kudoa septempunctata* 진단 효율 비교

송준영 · 정승희¹ · 최혜승^{2*}

국립수산과학원 남동해수산연구소, ¹국립수산과학원 병리연구과, ²국립수산과학원 남해수산연구소

Evaluation of a Non-destructive Diagnostic Test for *Kudoa septempunctata* in Farmed Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*

Jun-Young Song, Sung Hee Jung¹ and Hye-Sung Choi^{2*}

Southest Sea Fisheries Research Institute, Tongyeong 53085, Korea

¹Pathology Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

²Aquaculture Industry Division, South Sea Fisheries Research Institute, Yeosu 59780, Korea

Kudoa septempunctata, a myxosporean parasite that infects olive flounder *Paralichthys olivaceus* is known to cause *Kudoa* food poisoning. Entire trunk muscle (ETM) is used for diagnosis of the parasite in fish and this method demands sacrifice of the host, causing a loss of commercial value. We developed a non-destructive method that uses a plastic syringe-style implanter to draw the sample, called the part-point muscle (PPM) sampling technique. We validated the PPM method in fish infected with *K. septempunctata* at the level detectable by the ETM method. We confirmed that the PPM method is equally sensitive in comparison to the ETM method for diagnosing *K. septempunctata* spores in olive flounder muscle. Our study also confirmed that the parasite is uniformly distributed in the dorsal muscle of infected fish. Over a period of 1 month, we observed no mortality of the host fish used for sampling by the PPM method. Thus, our studies demonstrate that the PPM sampling technique is an efficient, non-destructive method for diagnosing *K. septempunctata* in olive flounder.

Key words: *Kudoa septempunctata*, Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, Diagnostic test

서론

넙치의 근육에서 *Kudoa septempunctata*가 기생하는 것이 최초로 보고된 이후(Matsukane et al., 2010), 일본에서 *K. septempunctata*가 식중독의 원인이 되는 것으로 알려져(Harada et al., 2012a; Kawai et al., 2012), 우리나라에서는 넙치 양식장의 쿠도아 감염 현황 조사를 전국적으로 실시하여 감염 현황을 파악하였으며(Song et al., 2013; 2014), '쿠도아 자율관리지침'(MOF, 2015)을 마련하여 어업인·지자체·국가기관 차원에서 넙치의 위생 관리를 위해 노력하고 있다.

일반적으로 쿠도아충에 의한 감염은 숙주인 어류의 생리, 행동, 생존 등에 영향을 미치지 않지만(Moran et al., 1999), *Kudoa thyrsites*, *Kudoa musculoliquefaciens*, *Kudoa paniformis*, *Kudoa clupeiidae*, *Kudoa miniauriculata* 등은 근섬유에 기생하

면서 숙주가 죽은 후에 '젤리화'(기생충의 단백질 분해 효소에 의한 근육 용해)를 일으킴으로써 상품 가치를 떨어뜨려 경제적으로 피해를 일으키는 것으로 알려져 있다(Kudo et al., 1987, Moran et al., 1999, Yokoyama et al., 2004). 그러나, *K. septempunctata*는 감염 특성상 숙주의 염증 반응을 일으키거나 근육 내 시스트를 형성하지 않아 육안으로 감염이 확인되지 않으므로(Matsukane et al. 2010), 쿠도아 감염 여부 조사를 위해서는 반드시 넙치의 근육 세포를 채취하여 검사를 실시하여야 한다. *K. septempunctata*가 감염된 넙치가 식품으로 출하되는 것을 사전에 방지하기 위하여, 쿠도아 자율관리지침에 따라 넙치의 양성·출하 단계에서 기생충의 감염 모니터링 조사를 하도록 권고하고 있으며, 양성 단계의 넙치의 경우 사육 로트별 60마리 이상, 출하 단계의 경우 사육 로트별 30마리 이상 검사를 기본 원칙으로 한다. 본 연구팀의 선행 연구에서, 넙치 성어의 쿠도

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2018.0023>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Korean J Fish Aquat Sci 51(1) 23-30, February 2018

Received 23 October 2017; Revised 27 November 2017; Accepted 1 December 2017

*Corresponding author: Tel: +82. 61. 690. 8970 Fax: +82. 61. 685. 9073

E-mail address: choihs@korea.kr

아 감염 조사를 위해 넙치 등근육 전체를 절개하여 근육을 채취하는 방법이 사용되어 왔으나(Song et al., 2013; 2014), 출하 단계에서는 넙치 크기가 1 kg 전후로, 개체를 검사에 사용할 경우 실험어의 희생이 동반되어 상품 가치가 없어지므로 경제적으로 손실을 가져올 수 밖에 없다. 그러므로 본 연구에서는, 사육 단계에서 실험어를 죽이지 않고, 보다 간편하게 근육을 채취하여 쿠도아 검사에 사용할 수 있는 방법을 사용하여 근육 채취 방법에 따른 쿠도아 진단의 효율성을 검토하였다.

재료 및 방법

근육 채취 방법에 따른 *K. seoptempunctata*의 검출 효능 비교

실험어

2013년도 우리 연구팀에서 수행한 쿠도아 감염 모니터링 조사를 위한 PCR 검사법에서 쿠도아 감염 양성으로 검출된 넙치 성어 5마리(Table 1)를 획득하여 근육 채취 방법에 따른 *K. seoptempunctata* 검출 효과 비교 실험에 사용하였다.

부분 근육 (Part-point muscle; PPM) 채취 방법 (PPM 방법)

넙치 성어로부터 PPM을 채취하기 위하여 바닥에 폴리스티렌 보드를 깔고 그 위에 넙치를 올려놓은 후 plastic syringe-style MK7 implanter (Biomark, USA)를 사용하여 등근육을 수직으로 관통시켜 needle내부에 근육을 채취하였다(Fig. 1). 한 번의 샘플 채취 시 20-25 mg의 근육이 채취되므로 2회 반복 채취하여 약 50 mg의 근육을 분석에 사용하였다. 채취된 근육을 멸균된 2 mL tube containing 2 mm zirconia and 5 mm stainless beads (WATSON)에 넣고, 1X TE buffer (Promega)를 사용하여 5배 희석한 후, FastPrep®-24 (MP, USA)를 이용하여 20초간 분쇄하여 완전히 균질화하였다. 균질화 된 용액 100 µL (근육 20 mg에 해당)를 quantitative polymerase chain reaction (qPCR)와 conventional polymerase chain reaction (PCR) 분석

을 위한 DNA 분리에 사용하였고, 10 µL를 현미경 관찰에 의한 기생충의 포자를 확인하는 데 사용하였다.

전체 근육 (Entire trunk muscle; ETM) 채취 방법 (ETM 방법)

ETM 샘플의 채취는 선행 연구(Song et al., 2013)에 의한 방법에 따라 넙치 등근육 전체 부위를 해부용 칼로 끊어 근육 샘플 (1-5 g)을 채취하여 폴리스티렌 지퍼백에 넣어 골고루 마쇄하였다. 마쇄한 근육 200 mg를 멸균된 2mL tube containing 2 mm zirconia and 5 mm stainless beads (WATSON)에 넣고, 1X TE buffer (Promega, USA)를 사용하여 5배 희석한 후, FastPrep®-24 (MP, USA)를 이용하여 20초간 분쇄하여 완전히 균질화하였다. 균질화 된 용액 100 µL (근육 20 mg에 해당)를 qPCR와 PCR 분석을 위한 DNA 분리에 사용하였고, 10 µL를 현미경 관찰에 의한 기생충의 포자를 확인하는 데 사용하였다.

넙치 등근육에서의 쿠도아 분포 조사

PPM 방법에 의한 효과적인 근육 채취 부위를 결정하기 위하여, *K. seoptempunctata*에 감염된 넙치 2마리의 등근육에서의 부위별 쿠도아 감염 분포를 조사하였다. 넙치 등근육을 6개 point로 나누어 각 point마다 PPM 방법으로 근육을 6회 채취하였다(Fig. 2). 각 point당 3회 채취한 근육은 유전자 분석(qPCR, conventional PCR)에 triplicate로 사용하였으며, 나머지 3회 채취한 근육은 현미경 관찰에 의한 포자 계수에 각각 사용하였다.

사육 넙치에 대한 PPM 방법의 적용

PPM 방법의 현장 적용 가능성을 실험하기 위하여, 넙치 양식장에 사육중인 넙치 100마리(평균 500 g)를 실험에 적용하였다. PPM 방법에 의한 근육 채취를 위해 사육중인 넙치에 스트레스를 가하지 않도록 부드럽게 채포한 후 즉시 MS-222 (Sigma, Germany)를 사용하여 마취하였다. 마취한 어류는 폴리스티렌 보드 위에서 plastic syringe-style MK7 implanter (Biomark, USA)를 사용하여 꼬리 부위 근육을 수직으로 관통시켜 근육을 채취한 후, 다시 사육수조에 넣어 사육하면서 한달

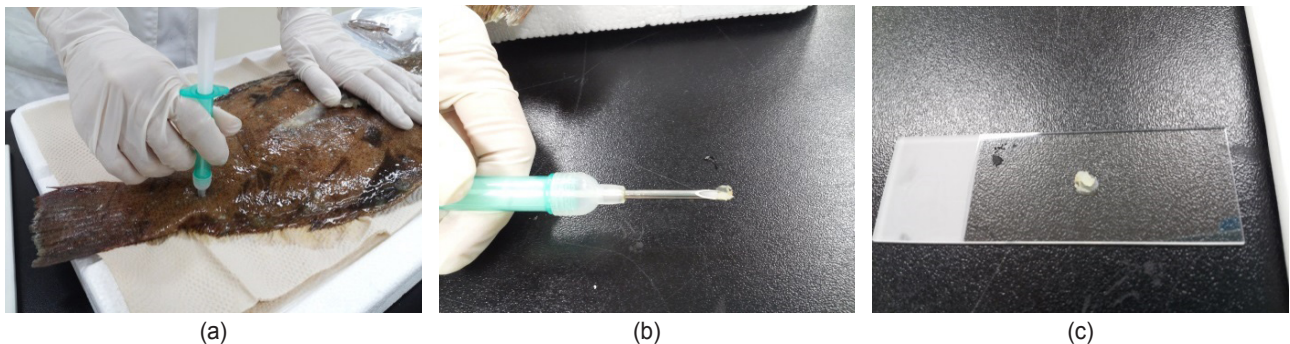


Fig. 1. Taking of the samples by part-point muscle (PPM) method in the fish *Paralichthys olivaceus* using a plastic syringe-style implanter on a polystyrene board (a). 20 to 25 mg of muscle is taken by the PPM method (b, c).

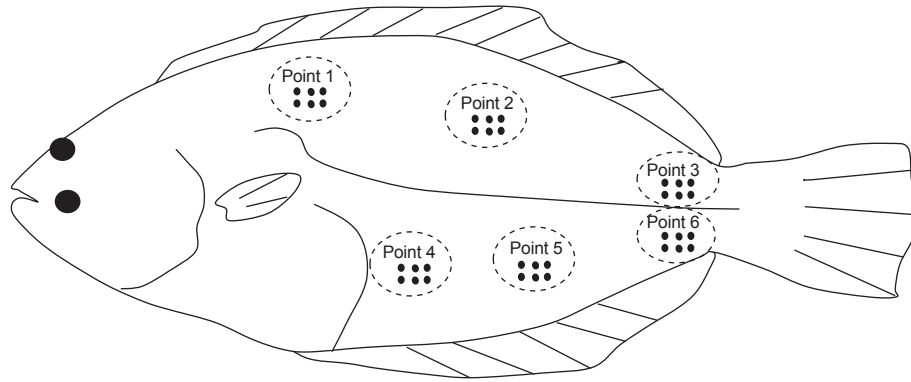


Fig. 2. Sampling points for testing *Kudoa septempunctata* distribution in the dorsal muscle of fish *Paralichthys olivaceus*. From each point, part-point muscle (PPM) was obtained six times for qPCR, PCR and microscopy.

간 생존 여부를 관찰하였다. 채취한 근육은 냉장 상태로 실험실로 운반한 후, 쿠도아 감염 여부 진단(qPCR, PCR과 현미경 확인)에 사용하였다.

시료 분석

DNA 추출

각 실험 항목으로부터 마쇄하여 준비한 근육 시료 100 μL (근육 20mg에 해당)로부터 DNA를 추출하여 쿠도아의 유전자 분석(qPCR, PCR)에 사용하였다. DNA 추출 방법은 선행 연구인 Song et al. (2014)에 의한 방법에 따라 시판되는 QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Japan)를 사용하여 매뉴얼에 따라 추출하였으며, 최종적으로 200 μL 의 volume으로 elusion하였다. 추출한 DNA는 사용할 때까지 -20°C 에 보존하였다.

qPCR

각 실험 항목으로부터 준비한 근육 시료로부터 추출한 DNA를 사용하여 *K. septempunctata*의 18S rDNA (AB553293)를 검출하는 real-time PCR을 수행하였다. Primers와 probe는 일본 후생노동성(MHLW, 2011) 방법에 따라 Kudoa-F (5'-CATGGGATTAGCCCGGTTTA-3'), Kudoa-R (5'-ACTCTCCCCAAAGCCGAAA-3'), Kudoa-P (5'-FAM-TC-CAGGTTGGGCCCTCAGTGAAAA-TAMRA-3')를 사용하였다. PCR 반응액 제조는 넵치 근육 샘플로부터 채취한 DNA 4 μL 또는 plasmid positive control 4 μL , Taqman 2X Universal master mix II (AB, USA) 10 μL , forward와 reverse primer 각 0.4 μM , probe 0.25 M을 넣어 최종 20 μL 의 volume이 되도록 제조하였다. PCR 반응은 95°C 10분 1 cycle, 95°C 15초와 60°C 60초에서 45 cycles 반응하였으며 모든 샘플은 duplicate로 반응을 수행하였다. Plasmid positive control은 Song et al.(2014)에서 제작한 것을 사용하여 Nanodrop ND-1000 spectrophotometer에서 DNA를 정량하고 plasmid copy수를 계산하였다. 2.5×10^7 (최종 10^8 농도), 2.5×10^5 (최종 10^6 농도), 2.5×10^3

(최종 10^4 농도), 2.5×10^1 (최종 10^2 농도) copies/ μL 의 농도로 plasmid를 단계 희석한 후 검량선을 작성하였으며, 모든 real-time PCR 반응에 plasmid positive control를 함께 반응하였다.

PCR

PCR에 사용한 primer는 *K. septempunctata*의 28S rDNA를 검출하는 primer set (forward, 5'-gtgtgtgatcagacttgatgatg-3', reverse, 5'-aagccaaaactgctggccattt-3')를 사용하였다(MAFF, 2012). 추출한 4 μL template와 위의 primer를 AccuPower® PCR premix (Bioneer, Korea)와 혼합하여 20 μL 의 반응액에서 PCR을 수행하였다. PCR 산물은 ethidium bromide가 첨가된 1.5% agarose gel에 전기영동 한 후 MultiImage®II (Alphainnotech, USA)로 PCR 산물의 증폭(target size 356 bp)을 확인하였다.

현미경 검사

각 실험 항목으로부터 채취한 근육 샘플을 TE buffer (Promega, USA)에 5배 희석 후 완전히 마쇄하여 Loffler's methylene blue solution과 1:1로 혼합하여 cell-counting chamber에서 포자를 계수하여 근육 1 g당 포자수로 환산하였다. 사육 넵치에 대한 PPM 방법의 적용(재료 및 방법 3)을 위한 실험을 위해, PPM에 의해 채취한 근육을 slide glass 두 장 사이에 끼워 압착하여 근육을 얇게 편 후, Loffler's methylene blue solution을 떨어뜨리고 1분 후 현미경으로 관찰하여 포자의 검출 유무를 확인하였다.

결 과

근육 채취 방법에 따른 *Kudoa septempunctata*의 검출 효능 비교

쿠도아 감염 양성으로 판정된 5마리의 넵치를 사용하여 PPM과 ETM 방법에 의해 채취한 근육에서의 쿠도아 검출 효능을

Table 1. Comparison of PPM and ETM methods for detecting *Kudoa septempunctata* in the fish *Paralichthys olivaceus* infected with the parasite, by qPCR, PCR and microscopy

Fish no.	Fish size (cm)	PCR		qPCR (log rDNA copy no./g)		Microscopy (log spore no./g)	
		PPM ¹	ETM ²	PPM	ETM	PPM	ETM
1	43	P	P	9.72	9.56	5.57	6.48
2	35	P	P	9.20	9.31	5.27	4.98
3	38	P	P	8.20	7.89	5.91	6.02
4	42	N	P	5.75	6.28	nd	nd
5	33	P	P	7.32	7.77	5.24	5.10

¹PPM, part-point muscle. ²ETM, entire trunk muscle. P, positive (≥ 7.0 log rDNA copy); N, negative (< 7.0 log rDNA copy); nd, not detected.

비교하였다(Table 1). qPCR 결과, 5마리의 넙치 중 4마리(넙치 1, 2, 3, 5번)에서 PPM과 ETM 샘플 모두 쿠도아 감염 양성 기준치(7.00 log rDNA copy no./g) 이상으로 검출되었다(PPM 샘플은 7.32-9.72 log rDNA copy no./g 검출, ETM 샘플은 7.77-9.56 log rDNA copy no./g 검출). 반면, 4번 넙치는 PPM과 ETM 모두 기준치 이하로 검출되어 두 실험의 결과가 일치하였다. PCR 결과, qPCR에서 감염 양성 기준치 이상으로 검출된 4마리(넙치 1, 2, 3, 5번)에서는 PPM과 ETM 샘플 모두 쿠도아 양성으로 검출되었으나, 4번 넙치는 PPM 샘플의 경우 음성, ETM 샘플의 경우 양성으로 검출되어 두 실험 결과가 불일치하였다. 현미경에 의한 쿠도아 포자 확인 결과, qPCR과 PCR 실험에서 양성으로 검출된 4마리 넙치에서는 PPM과 ETM 샘플 모두 쿠도아 포자가 검출되었으나(4.98-6.48 log spore no./g), 4번 넙치의 경우 두 방법에 의한 샘플 모두 현미경으로 포자가 검출되지 않았다. 이상의 결과로부터, 유전자 검사의 결과 양성이며, 현미경으로 포자가 검출되는 수준으로 감염된 넙치에서는, 쿠도아 검출을 위한 PPM과 ETM 두 실험 방법의 결과가 일치함을 확인하였다.

넙치 등근육에서 *Kudoa septempunctata*의 분포 조사

쿠도아 양성 넙치 2마리를 사용하여 등근육 부위별(Point 1-6) 쿠도아의 분포 조사를 위해 PPM방법으로 근육을 채취하여 분석한 결과, 1번 넙치에서는 6개 point의 샘플 모두에서 PCR 양성이었으며, qPCR 결과 모든 point에서(point 2의 1개 샘플 제외) 7.72-9.73 log rDNA copy no./g의 범위로 검출되어 쿠도아 유전자 검출 양성이었다. 또한, 현미경으로 포자 확인 결과 6개 point의 샘플 모두에서 쿠도아 포자가 5.06-6.59 log spores/g 범위로 검출되어 쿠도아가 등근육 전체에 고르게 분포함을 확인하였다. 반면, 2번 넙치의 경우 등근육 부위별 쿠도아 분포에 차이가 나타났는데, point 1에서는 3샘플(triplicates) 모두 PCR 음성이었으며, point 2에서는 3샘플 중 1개, point 2에서는 3샘플 중 2개에서 PCR 양성으로 검출되었으며, point 4-6에서는 모든 샘플에서 PCR 양성으로 검출되었다. qPCR 결과, point 1-3은 기준치 이하의 검출률(nd 또는 5.45-6.87 log rDNA copy no./g범위) 음성, point 4-6은 양성으로 검출되었다. 현미경 검

사 결과 모든 샘플에서 쿠도아가 검출되지 않았다(Table 2). 이상의 결과로부터, 쿠도아 포자가 검출되는 수준의 감염 단계에서는 근육의 6개 point에서 쿠도아가 동일한 수준으로 검출되는 것을 확인하였다.

사육 넙치에서의 쿠도아 검사를 위한 PPM 방법의 적용

양식장에 사육중인 넙치 100마리(평균 전중500g)에 대하여 꼬리 근육 부분에서 PPM 방법에 의한 근육 채취 후, 한달 간 사육한 결과 폐사가 발생하지 않아(data not shown) 넙치를 죽이지 않고 살아있는 상태에서 근육 채취 방법의 가능성을 입증하였다. 100마리 넙치에 대한 쿠도아 감염 조사 결과, 7마리의 넙치에서 모든 실험 방법(PCR, qPCR, 현미경 검사)에서 쿠도아 감염 양성으로 나타났으며, 4마리의 넙치에서 PCR과 qPCR에 의한 쿠도아 양성, 1마리의 넙치에서 PCR에 의한 쿠도아 양성 판정을 받았다(Table 3). 이러한 결과로부터, PPM 방법을 사용하여 넙치의 상품 가치를 훼손하지 않으면서 살아있는 넙치에서 효율적으로 쿠도아 감염 여부 확인이 가능함을 확인하였다.

고 찰

*Kudoa septempunctata*의 감염 특성상 넙치에 증상을 나타내지 않아 육안으로는 감염 여부를 판단할 수 없으므로, 진단을 위해서는 근육 속에 있는 *K. septempunctata*의 유전자를 확인하거나 현미경으로 포자를 확인하여 검출하는 방법이 사용되고 있다(MOF, 2015). 양식 넙치 성어에서 *K. septempunctata* 감염 모니터링을 위해, 선행연구에서는 넙치의 등근육 전체를 절개하여 근육을 채취하는 방법이 사용되어 왔으며(Song et al., 2013; 2014), 이를 위해서는 실험어의 희생이 동반되어 출하 크기의 넙치를 사용할 경우에는 검사어의 상품 가치 하락으로 인한 경제적인 손실을 초래할 수 밖에 없었다. 그러므로, 본 연구에서는 출하 크기의 양식 넙치에 대한 *K. septempunctata*의 감염 조사를 위해 넙치를 죽이지 않고 근육을 채취하여 검사하는 방법에 대한 실효성을 검토하였다.

먼저, *K. septempunctata* 감염 모니터링 선행 연구를 통해 얻은 감염 넙치 5마리를 사용하여 기존에 사용된 근육 채취 방법

Table 2. Distribution of *Kudoa septempunctata* from the 6 points of the dorsal muscle in the fish *Paralichthys olivaceus*

	Fish 1 (38 cm, 877 g)			Fish 2 (43 cm, 949 g)		
	PCR	qPCR ¹	Microscopy ²	PCR	qPCR ^a	Microscopy ^b
P1	P	P (9.19)	P (5.30)	nd	N (6.58)	nd
	P	P (8.89)	P (5.85)	nd	N (5.49)	nd
	P	P (7.72)	P (6.18)	nd	N (5.45)	nd
P2	P	N (6.51)	P (5.90)	nd	nd	nd
	P	P (9.03)	P (6.59)	P	N (6.87)	nd
	P	P (7.90)	P (5.63)	nd	N (5.65)	nd
P3	P	P (9.04)	P (6.29)	nd	N (6.57)	nd
	P	P (8.86)	P (6.00)	P	N (6.60)	nd
	P	P (9.15)	P (5.85)	P	N (6.77)	nd
P4	P	P (9.48)	P (6.36)	P	P (7.09)	nd
	P	P (9.15)	P (5.57)	P	N (6.84)	nd
	P	P (9.73)	P (5.74)	P	P (7.48)	nd
P5	P	P (9.09)	P (6.36)	P	P (7.42)	nd
	P	P (9.32)	P (6.23)	P	P (8.37)	nd
	P	P (9.20)	P (6.20)	P	P (7.42)	nd
P6	P	P (9.30)	P (6.37)	P	P (7.30)	nd
	P	P (9.36)	P (6.26)	P	P (7.59)	nd
	P	P (9.24)	P (5.06)	P	N (6.96)	nd

¹qPCR, The letter indicates log rDNA copy no./g of fish muscle. ²Microscopy, The letter indicates log spore no./g of fish muscle. P, positive (≥ 7.0 log rDNA copy); N, negative (< 7.0 log rDNA copy); nd, not detected.

인 등근육 전체로부터 근육을 채취하여 검사를 하는 ETM방법과, 넙치를 죽이지 않고도 가능한 부분적 근육채취 방법인 PPM 방법에 대하여 쿠도아 검출 효과를 비교하였다. 그 결과, 쿠도아 양성 기준치 이상(7 log rDNA copy/g 이상) 감염어의 경우 ETM과 PPM의 PCR 검출 결과는 모두 양성으로 동일하였고, 쿠도아 포자도 모두 검출되었다. 하지만, 유전자 농도가 기준치 이하이며 포자가 검출되지 않는 수준의 감염어의 경우, ETM 샘플은 PCR 양성이었으나, PPM의 경우 PCR 음성으로 나타나 두 방법의 결과가 일치하지 않았다. 본 결과로부터, 유전자 검출 결과 기준치 이상이 검출되고 포자가 검출되는 수준의 감염 단계에서는 PPM방법을 사용하여 국소적으로 근육 샘플을 채취하더라도 ETM 방법에 의한 결과와 일치하여 쿠도아 감염 진단에 충분히 실효적인 것으로 나타났다.

또한, PPM 방법에 의한 넙치 등근육 부위별 검출 효과를 비교하기 위해, 쿠도아 감염 넙치 2마리를 사용하여 등근육 6개 point에 따른 쿠도아 검출 효과를 비교한 결과, 포자가 검출되는 수준의 감염 단계에서는 모든 부위에서 쿠도아가 검출되었으나, 포자가 검출되지 않는 수준의 감염 단계에서는 부위별로 차이가 발생하였다. Iijima 등(2012)에 의한 보고에서 쿠도아 감염은 유안측/무안측의 몸 전체에 퍼지는 것을 제안하였으며, Harada 등(2012b)의 연구에서, 쿠도아 포자수가 1.1×10^6

spores/g 이상의 감염 수준에서는 등근육 전체에 rDNA copy수가 동일하게 분포하였으며, $5.6 \times 10^4 - 8.4 \times 10^5$ spores/g의 감염 수준에서는 rDNA copy수가 다양하게 나타남을 보고하였다. 이번 연구의 결과, 포자가 검출되는 수준의 감염 단계에서는 채취 부위에 관계없이 PPM 방법에 의해 쿠도아 진단을 할 수 있는 것이 확인되어, 근육층의 두께가 비교적 얇은 꼬리 부위를 이용하여 근육을 채취하는 것이 현장에서 간단하게 채취할 수 있는 방법임을 제안한다.

마지막으로, 본 연구에서는 양식장에서 사육중인 넙치를 대상으로 PPM법을 이용한 근육 채취 후 다시 사육하였을 경우의 생존율을 조사한 결과, 실험어 100마리 모두 한 달 동안 폐사가 발생하지 않았다. 또한, 100마리의 쿠도아 감염 여부 조사 결과, 포자가 검출되는 7마리의 감염어는 유전자 검사법(PCR, qPCR)에서도 모두 쿠도아 양성 반응을 나타내었고, 현미경으로 포자가 검출되지 않는 경우에도 5마리에서 유전자 검사법에 의해 쿠도아가 양성으로 검출되었다.

대서양 연어의 *Kudoa thyrsites*의 감염 진단을 위해 연어의 필렛(Fillets)을 사용하지 않고 아가미 뚜껑 안쪽의 *hyohyoid ventralis* 근육을 잘라 검사를 하는 방법이 보고되었으며, 필렛을 사용한 진단법과 비교하여 79% (중감염의 경우 93%)의 검출 감도 효율성이 있는 것이 보고되었다(St-Hilaire et al., 1997). 본

Table 3. *Kodoa septempunctata* detection from the 100 fish *Paralichthys olivaceus* for non-destructive diagnostic test

Fish no.	PCR	qPCR ¹	Microscopy	Fish no.	PCR	qPCR ¹	Microscopy
1	N	nd	nd	51	N	nd	nd
2	N	nd	nd	52	N	N (4.87)	nd
3	N	nd	nd	53	N	nd	nd
4	N	nd	nd	54	N	nd	nd
5	N	nd	nd	55	N	nd	nd
6	N	nd	nd	56	N	nd	nd
7	N	nd	nd	57	N	nd	nd
8	N	nd	nd	58	N	nd	nd
9	N	nd	nd	59	N	nd	nd
10	N	nd	nd	60	N	nd	nd
11	P	P (7.06)	nd	61	N	nd	nd
12	N	nd	nd	62	N	nd	nd
13	P	P (7.24)	P	63	N	nd	nd
14	N	nd	nd	64	N	N (4.67)	nd
15	N	nd	nd	65	N	nd	nd
16	N	nd	nd	66	N	nd	nd
17	N	nd	nd	67	N	nd	nd
18	N	nd	nd	68	N	N (5.35)	nd
19	N	nd	nd	69	N	nd	nd
20	N	nd	nd	70	N	N (5.23)	nd
21	P	P (8.73)	P	71	P	N (6.53)	nd
22	P	P (7.29)	P	72	N	nd	nd
23	N	nd	nd	73	P	P (7.22)	P
24	N	nd	nd	74	N	nd	nd
25	N	N (5.05)	nd	75	N	nd	nd
26	N	nd	nd	76	N	nd	nd
27	P	P (7.96)	nd	77	N	nd	nd
28	N	N (5.02)	nd	78	N	nd	nd
29	P	P (8.15)	nd	79	N	nd	nd
30	N	nd	nd	80	N	nd	nd
31	N	nd	nd	81	N	nd	nd
32	P	P (8.24)	P	82	N	nd	nd
33	N	nd	nd	83	P	P (7.11)	nd
34	N	nd	nd	84	N	nd	nd
35	N	N (4.94)	nd	85	N	nd	nd
36	N	N (5.37)	nd	86	N	nd	nd
37	N	nd	nd	87	N	nd	nd
38	N	nd	nd	88	N	nd	nd
39	N	nd	nd	89	N	nd	nd
40	N	nd	nd	90	N	nd	nd
41	P	P (7.16)	P	91	N	nd	nd
42	N	N (5.00)	nd	92	N	nd	nd

Table 3. Continued

Fish no.	PCR	qPCR ¹	Microscopy	Fish no.	PCR	qPCR ¹	Microscopy
43	N	nd	nd	93	N	nd	nd
44	N	nd	nd	94	N	nd	nd
45	P	P (7.79)	P	95	N	N (4.79)	nd
46	N	nd	nd	96	N	nd	nd
47	N	nd	nd	97	N	nd	nd
48	N	nd	nd	98	N	nd	nd
49	N	N (4.27)	nd	99	N	nd	nd
50	N	nd	nd	100	N	nd	nd

¹qPCR, The letter indicates log rDNA copy no./g of fish muscle. P, positive (≥ 7.0 log rDNA copy); N, negative (< 7.0 log rDNA copy); nd, not detected.

연구에서의 PPM 방법을 사용한 쿠도아 검사법은 사육 과정 또는 출하 단계의 넙치를 죽이지 않고 넙치의 가식부위 근육을 사용하여 쿠도아 검사가 가능하므로 현장에서 매우 유용하게 사용될 수 있는 방법임을 제안한다. 이러한 결과로부터, PPM 방법을 사용하여 넙치를 죽이지 않고 상품 가치를 훼손하지 않으며 근육 샘플 채취가 가능하므로, 양식장에서 넙치를 사육하는 동안 지속적인 쿠도아의 감염 모니터링에 매우 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 특히, PPM 방법에 의해 근육을 부분채취하더라도 현미경 검사법으로 포자 검출이 가능하므로 고가의 장비를 사용하지 않고도 양식장 자체나 협회 등에서 자신의 사육생물을 모니터링 할 수 있는 효율적인 방법으로 사용될 수 있음을 제안한다.

사 사

이 연구는 국립수산과학원 시험연구사업(R2017064)의 지원에 의해 운영되었습니다. 또한, 넙치의 근육채취방법 연구에 도움을 주신 Yokoyama Hiroshi와 Shirakashi Sho 교수님께 감사드립니다.

References

Harada T, Kawai T, Jinnai M, Ohnishi T, Sugita-Konishi Y and Kumeda Y. 2012a. Detection of *Kudoa septempunctata* 18S ribosomal DNA in patient fecal samples from novel foodborne outbreaks caused by consumption of raw olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). J Clin Microbiol 50, 2964-2968. <https://doi.org/10.1128/jcm.01218-12>.

Harada T, Kawai T, Sato H, Yokoyama H and Kumeda Y. 2012b. Development of a quantitative polymerase chain reaction assay for detection of *Kudoa septempunctata* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Int J Food Microbiol 156, 161-167. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.018>.

Iijim Y, Nakanishi N, Furusawa H, Ohnishi T and Sugita-Konishi Y. 2012. Inter-laboratory validation and applications

of quantitative real-time PCR for the detection of *Kudoa septempunctata* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Jpn J Infect Dis 65, 436-438. <https://doi.org/10.7883/yo-ken.65.436>.

Kawai T, Sekizuka T, Yahata Y, Kuroda M, Kumeda Y, Iijima Y, Kamata Y, Sugita-Konishi Y and Ohnishi T. 2012. Identification of *Kudoa septempunctata* as the causative agent of novel food poisoning outbreaks in Japan by consumption of *Paralichthys olivaceus* in raw fish. Clin Infect Dis 54, 1046-1052. <https://doi.org/10.1093/cid/cir1040>.

Kudo G, Barnett H and Nelson R. 1987. Factors affecting cooked texture quality of Pacific whiting, *Merluccius productus*, filets with particular emphasis on the effects of infection by the myxosporeans *Kudoa paniformis* and *K. thyrstitis*. Fish Bull 85, 745-756. <https://spo.nmfs.noaa.gov/sites/default/files/pdf-content/1987/854/kudo.pdf>.

MAFF (Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries). 2012. Retrieved from http://www.jfa.maff.go.jp/test/saibai/pdf/kudoa_notice_03.pdf on Sep 17, 2017.

Matsukane Y, Sato H, Tanaka S, Kamata Y and Sugita-Konishi Y. 2010. *Kudoa septempunctata* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida) from an aquacultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) imported from Korea. Parasitol Res 107, 865-872. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1941-8>.

MHLW (Ministry of Health, Labour and Welfare). 2011. Retrieved from <http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzendu/0000124372.pdf> on Sep 17, 2017

MOF (Ministry of Oceans and Fisheries) 2015. Hygienic management guidelines for domestic flounder farm. MOF, Sejong, Korea.

Moran JDW, Whitaker DJ and Kent ML. 1999. A review of the myxosporean genus *Kudoa* Meglitsch, 1947, and its impact on the international aquaculture industry and commercial fisheries. Aquaculture 172, 163-196. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(98\)00437-2](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(98)00437-2).

Song JY, Choi JH, Choi HS, Jung SH and Park MA. 2013.

- Monitoring of *Kudoa septempunctata* in cultured olive flounder during 2012. J Fish Pathol 26, 129-137. <https://doi.org/10.7847/jfp.2013.26.3.129>.
- Song JY, Kim MJ, Choi HS and Jung SH. 2014. Monitoring *Kudoa septempunctata* in Cultured Olive Flounder *Paralichthys olivaceus* in Different Regions of Korea in 2013. Korean J Fish Aquat Sci 47, 611-621. <https://doi.org/10.5657/kfas.2014.0611>.
- St-Hilaire S, Ribble C, Whitaker DJ and Kent ML. 1997. Evaluation of a nondestructive diagnostic test for *Kudoa thyrssites* in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture 156, 139-144. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(97\)00081-1](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(97)00081-1).
- Yokoyama H, Whipps CM, Kent ML, Mizuno K and Kawakami H. 2004. *Kudoa thyrssites* from Japanese flounder and *Kudoa lateolabracis* n. sp. from Chinese sea bass: causative myxozoans of post-mortem myoliquefaction. Fish Pathol 39, 79-86. <https://doi.org/10.3147/jsfp.39.79>.