

## RFLP를 이용한 *Gyrodactylus salaris*의 internal transcribed spacer(ITS) PCR 위양성 판별

김민성\* · 최희정\*\* · 정지민\*\* · 권문경\*\* · 황성돈\*†

\*국립한국해양대학교 해양과학융합학부

\*\*국립수산물품질관리원 수산방역과

### Determination of false positives in PCR diagnostics based on the internal transcribed spacer (ITS) of *Gyrodactylus salaris* using RFLP

Min Seong Kim\*, Hee Jung Choi\*\*, Ji-Min Jeong\*\*,  
Mun-Gyeong Kwon\*\* and Seong Don Hwang\*†

\*Division of Convergence on Marine Science, Korea Maritime and Ocean University,  
Busan 49112, Republic of Korea

\*\*Aquatic Disease Control Division, National Fishery Products Quality  
Management Service, Busan 49111, Republic of Korea

The World Organization for Animal Health (WOAH) recommends two protocols (ITS and COI) for conventional PCR of *G. salaris* diagnosis. However, ITS PCR protocol may yield false-positive results, leading to unnecessary countermeasures. It's difficult to distinguish between *G. salaris* and false-positive by similar amplicon size of PCR, since the amplicon size of ITS PCR in *G. salaris* and false-positive was 1,300 and 1,187 bp, respectively. The nucleotide sequences of ITS false-positive in rainbow trout is 99.7% identical to previously reported host genome sequences of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and 95.3 to 89.1% identical to those of other salmonid fish species. To reduce false-positive PCR band, PCR was performed by the different annealing temperature, but PCR bands were still detected. In RFLP analysis by *Hae*III, the PCR product of *G. salaris* was digested into four bands of 512, 399, 234 and 154 bp, while the false-positive was digested into seven bands of 297, 263, 242, 144, 93, 80 and 68 bp. In the RFLP patterns digested by *Hind*III, *G. salaris* showed two bands of 659 and 640 bp, while false-positive had one fragment of 1,187 bp without any digestion. Therefore, the RFLP method of ITS PCR with *Hae*III and *Hind*III can be used for differentiation between *G. salaris* and false-positive. These results might provide important information on the improvement of PCR diagnostic method of *G. salaris*.

**Key words:** *Gyrodactylus salaris*, Diagnosis, False-positive, RFLP

---

†Corresponding author:  
Tel: +82- 51-410-4321, Fax: +82-51-404-4750  
E-mail: sdhwang@kmou.ac.kr

외부기생충인 *Gyrodactylus*는 전세계 400종 이상이 보고되어 단생흡충류에서 가장 많은 종을 가지고 있는 속(*genera*) 중 하나이다(Harris et al., 2004). 그 중 연어과 어류에 심각한 피해를 유발하는 *Gyrodactylus salaris*에 의하여 발생하는 질병은 세계동물보건기구(World Organisation for Animal Health, WOA) 질병으로 지정되어 있으며, 국내에서는 수산생물질병관리법에 따라 수산생물전염병으로 지정되어 관리하고 있다. 감수성 숙주로는 대서양연어(*Salmo salar*), 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*), 브라운송어(*S. trutta*), Arctic char (*Salvelinus alpinus*), North American brook trout (*S. fontinalis*), Grayling (*Thymallus thymallus*)가 있다. *G. salaris*는 체표, 지느러미, 아가미에 부착하여 주변의 세포와 점액을 먹이로 하고 갈고리 활동으로 어류의 체표에 자극을 유발하여 점액 분비를 증가시키고 국소 또는 심각한 상피 손상으로 감염된 어류는 수조 벽, 바닥 등 기질에 체표를 긁는다(Chong, 2022). 체표 상처에서 곰팡이(*Saprolegnia* spp.)로 인한 2차 감염이 발생하고(Olstad et al., 2006) *G. salaris*의 먹이 활동으로 인한 피부 침투로 삼투압 불균형을 초래하여 폐사가 발생하는 것으로 추정된다(Pettersen et al., 2013). *G. salaris*의 주요 부착 부위는 체표, 지느러미, 아가미이지만, 품종 및 크기에 따라 부착 부위가 다양하고 일부 어류는 구강 및 비공에서도 관찰된다. 대서양연어 전기 스폴트 단계에서는 등, 가슴, 뒷 지느러미에 주로 부착하지만, 감염 강도에 따라 기생 부위는 다양화되어 다른 지느러미에도 부착하고(Jensen and Johnsen, 1992) 체표 및 머리 부분보다 감염 비율은 낮지만 아가미에서도 관찰된다(Appleby and Mo, 1997). Arctic char에서는 주로 꼬리 지느러미, 등지느러미에 주로 분포하고(Mo et al., 2023), 무지개송어에서는 최대 90일 이상 감염이 지속될 수 있으며, 감염 강도가 낮거나 임상증상이 없는 경우도 있다(Bakke et al., 1991; Peeler and Oidtmann, 2008; Peeler and Thrush, 2004).

*G. salaris*는 스웨덴에서 1957년 최초 발생 이후 우크라이나, 노르웨이, 러시아, 조지아, 핀란드, 독일, 덴마크 등 주로 유럽의 부화장 및 양식장에 심각한 경제적 손실을 초래하고 자연수계 연어과 어

류에도 폐사를 유발하였다(Denholm et al., 2016; Paladini et al., 2021). 국내에서는 주요 연어과 어류인 무지개송어를 대상으로 2011년부터 10년 동안 예찰 등을 수행하여 국내에서 전염병이 발생하지 않았다는 과학적 결과를 바탕으로 2020년 WOA으로부터 청정국 지위를 획득하였다.

수산생물전염병 진단법의 국제 표준이 되는 WOA Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals (World Organisation for Animal Health, 2023)에서는 WOA 지정 질병에 대한 형태학적 특성, 병리조직학적 분석, 바이러스 배양, 항체 또는 항원 기반 검출법, *in situ* hybridization, 분자생물학적 방법(PCR) 등 다양한 진단 방법을 권장하고 있다. 다른 전염병과는 달리, *G. salaris*의 진단을 위하여 오직 형태학적 분석, 분자생물학적 방법(real-time PCR, conventional PCR, 염기서열 분석)을 권장하고 있다. 분자생물학적 방법 중 conventional PCR (PCR)은 총 2개의 프로토콜을 권장하고 있으며 각 프로토콜은 ribosomal RNA gene internal transcribed spacer (ITS, 18S rRNA subunit 3' 말단, ITS 1 및 2, 5.8S subunit, 2.8S subunit 5' 말단)과 mitochondrial cytochrome oxidase 1 (CO1) 유전자를 타겟하여 증폭한다. 하지만, 다양한 *Gyrodactylus*를 증폭할 수 있어, 추가적인 염기서열 분석을 통하여 최종 *G. salaris* 여부 확인이 필요하다. 또한 *G. salaris* ITS PCR 진단 시 양성 의심 밴드가 빈번하게 검출되어 염기서열 분석을 실시하지만, *G. salaris*가 아닌 위양성 시료로 판정되어 시간 및 인력 소모가 높다는 문제점이 있다. PCR 산물에 제한효소를 처리하여 얻은 단편 길이의 다형성을 분석하는 PCR Restriction fragment length polymorphism (RFLP)는 질병 원인체 및 유전형, 생물 동정 등 다양한 분야에 활용이 가능하다. 따라서, 본 연구에서는 *G. salaris* 위양성 시료를 PCR 기반 RFLP 기법으로 PCR 후 염기서열 분석 과정없이 PCR 산물에 제한효소를 처리한 후 단편 다형성을 확인하여 *G. salaris* 위양성 여부를 판별 할 수 있는 과학적 기초자료를 제공하고자 한다.

2022년 국립수산물품질관리원 연어과 어류 전염병 예찰을 위하여 채취한 경북 소재 양식장(5개소) 무지개송어의 체표, 지느러미, 아가미를 pool-

ing하여 균질화한 후, Patho Gene-spin™ DNA/RNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology, Korea)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 DNA를 추출하였다. AccuPower® PCR PreMix (BIONEER, Korea)를 이용하여 DNA template 2 µL, forward·reverse primers 각각 1 µL, DW 16 µL를 첨가하여 총량 20 µL이 되도록 혼합한 후, Clontech PCR Thermal Cycler GP (Takara, Japan)에서 PCR을 수행하였다. PCR primer와 조건은 WOAHA Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 및 수산생물 병성감정 지침서(국립수산물품질관리원, 2021)에 따라 실시하였으며 세부사항은 Table 1과 같다. 음성대조구는 DW를 첨가하고 양성대조구는 국립수산물품질관리원에서 제작한 양성표준물질(1,300 bp)을 사용하였다. PCR 산물은 1.5% 아가로즈겔에서 전기영동하여 *G. salaris*의 증폭여부를 확인하였다. PCR 수행결과 ITS를 타겟으로 한 PCR (ITS PCR)은 모든 시료에서 PCR 산물 예상 크기인 1,300 bp보다 낮은 사이즈에서 PCR 밴드가 확인되었고, COI를 타겟으로 한 PCR (COI PCR)에서는 모든 시료에서 밴드가 검출되지 않았다(Fig. 1). ITS PCR 밴드가 확인된 모든 시료에 대하여 유전자 염기서

열 및 NCBI blastN 분석 결과, 이전에 보고된 무지개송어 DNA (99.7%), 곱사연어(*Oncorhynchus gorbuscha*) ITS1, 5.8S rRNA (95.3%), 브라운송어 DNA (89.1%) 염기서열과 상동성이 매우 높았다.

ITS PCR 위양성 원인을 규명하기 위하여, 위양성 밴드와 상동성이 높은 무지개송어, 브라운송어의 숙주 유전자 염기서열 정보를 NCBI GenBank에서 확보하고 ClustalW를 이용하여 염기서열 alignment 실시하였다. *G. salaris* ITS PCR의 forward primer와 reverse primer는 무지개송어와 브라운송어의 숙주 유전자 염기서열과 100% 일치하였다(Fig. 2). 하지만, *G. salaris* ITS의 forward 및 reverse primer를 제외한 염기서열은 *G. salaris*와 관련이 없는 숙주 DNA 염기서열이었다. *G. salaris* ITS PCR 산물은 1,300 bp이고 ITS 위양성 PCR 산물은 1,187bp으로 PCR 증폭 산물 크기가 유사하여 아가로즈겔에서 *G. salaris*와 위양성 밴드 구분에 애로사항이 발생한다. 이러한 위양성 밴드 검출은 primer가 *G. salaris*에 결합하지 않고 조직에서 분리한 DNA 염기서열에 결합하여 검출되는 것으로 사료된다.

PCR annealing 온도(WOAH 권장 온도 50°C) 변화에 따른 위양성 밴드 검출 유무를 확인하기 위하

Table 1. PCR primers used in this study

Target	Primer	Sequence (5'-3')	Condition	Amplicon size (bp)	Reference
ITS	F	TTTCCGTAGGTGAACCT	95°C 5min (94°C 60s, 50°C 60s, 72°C 120s)×30 72°C 7 min	1,300	Cunningham (1997)
	R	TCCTCCGCTTAGTGATA			
COI	F	TAATCGGCGGGTTCGGTAA	95°C 5min (95°C 60s, 50°C 60s, 72°C 120s)×30 72°C 7 min	800	Meinilä et al. (2002)
	R	GAACCATGTATCGTGTAGCA			

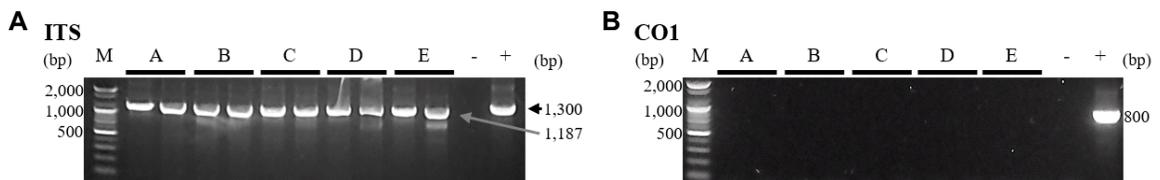


Fig. 1. Detection of *G. salaris* by ITS (A) and COI (B) protocol. PCR was performed in duplicated for each sample. M, 100 bp ladder; A to E, rainbow trout collected from different farm; -, negative control; +, positive control.



*truttae*)의 RFLP 개발(Cunningham, 1997)에 사용된 *G. salaris*의 NCBI Genbank Accession No. Z72477 염기서열을 합성하고 pBHA vector에 클로닝된 플라즈미드를(Bioneer, Korea) 주형으로 PCR하였다 (Table 1). *G. salaris* ITS PCR 산물 및 위양성 시료에 대한 제한효소 처리 조성 및 반응은 제조사의 프로토콜(Enzyomic, Korea)에 따라 PCR 산물 1 µg, 10X Ez buffer 5µL, 제한효소 10 unit 1 µL를 혼합하여 총 50 µL를 37°C에서 1시간 반응 후 불활화하고 QIAxcel Advanced system (QIAGEN, Germany) 또는 3% 아가로즈겔에서 전기영동하여 제한효소 처리에 따른 PCR 단편 다형성을 확인하였다. *G. salaris* 표준시료 및 위양성 PCR 산물 염기서열의 제한효소 처리 후 단편의 수와 길이는 Table 2에 나타내었다. *G. salaris* 표준 시료 PCR 산물에 제한효소 *HaeIII*를 처리 시, 1,300 bp의 band가 4개의 단편 (512, 399, 234, 154 bp)이, *HindIII* 제한효소는 2개의 단편(659, 640 bp)이 QIAxcel advanced system에서 확인되었다(Fig. 4). *AlwI*를 처리하면 32, 678 bp에서 절단되어 3개로 단편화되지만(646, 621, 32 bp), 32 bp에서는 단편 크기가 작아 확인이 어려웠다. QIAxcel Advanced system에서 *AlwI*는 단편 크기가 유사한 646, 621 bp가 구분 가능하였지만, 아가로즈 겔에서는 두 단편이 유사한 단편크기(25 bp 차이)로 *HindIII*와 동일하게 하나의 단편처럼 확인되었다. 제한효소 *EcoRI*, *XbaI*, *XhoI*에 반응하지 않아 PCR 밴드와 동일한 크기에서 1개의 밴드가 나타났다.

위양성 PCR 산물을 정제한 후 제한효소 *HaeIII*를 처리하여 QIAxcel Advanced system에서 전기영동 시, 1,187 bp의 band가 7개 단편(297, 263, 242,

144, 93, 80, 68 bp)이 확인되었고 297, 263, 242 bp의 3개 단편은 144, 93, 80, 68 bp의 단편보다 밴드 강도가 상대적으로 강하였다. 하지만, 3% 아가로즈겔에서는 약 150 bp이하의 단편이 smear하게 확인되어 명확한 단편은 아가로즈겔 전기영동 특성상 확인이 어려웠다. *AlwI*는 32, 624 bp를 인식하여 3개의 밴드가(592, 563, 32 bp) 나타나야 하지만 아가로즈겔에서는 592, 563 bp의 크기가 유사하여 2개의 단편이 중복되어 1개의 진한 단편으로 확인되었고 단편 크기가 작은 32 bp는 확인이 불가능하였다. 제한효소 *HindIII*, *EcoRI*, *XbaI*, *XhoI*는 위양성 시료의 염기서열 인식 부위가 없어 1개의 단편이 나타났다. 따라서, *HaeIII*는 *G. salaris*를 총 4개의 단편을 만들지만 512, 399 bp에서 2개의 강한 메인 단편을 나타내었고, 위양성 시료는 총 7개의 단편 중 200 ~ 300bp에서 3개의 강한 메인 밴드가 QIAxcel Advanced system에서 확인됨에 따라, 전기영동 장비에 의한 차이는 있지만 *G. salaris* ~ 500 bp와 위양성 시료~300 bp의 메인 단편 유무로 위양성 여부를 판단할 수 있다. *HindIII*는 *G. salaris*가 659, 640 bp에서 단편이 확인되고, 위양성 시료는 단편화되지 않은 약 1,187 bp에서 밴드가 확인되므로 *G. salaris*와 위양성 시료의 구별이 가능하였다.

분자생물학의 발전으로 질병 원인체 검출 및 진단을 위하여 주로 PCR을 사용하여 있지만, 기생충은 너무 작아 실험 과정에서 숙주 DNA 오염 가능성이 상대적으로 높은 단점이 있다. 본 연구에서는 무지개송어를 포함한 연어과 어류에 심각한 피해를 유발하는 *G. salaris*를 WOH ITS PCR 방법으로 진단 시 위양성이 검출됨에 따라, PCR 산물에 *HaeIII*, *HindIII*를 처리하여 *G. salaris*와 위양성 시

Table 2. Prediction of fragment number and length for *G. salaris* (A) and false-positive sample (B) of ITS PCR by restriction enzyme

Restriction enzyme	<i>G. salaris</i>		False-positive	
	Number of fragments	Size of fragment (bp)	Number of fragments	Size of fragment (bp)
<i>HaeIII</i>	4	512, 399, 234, 154	7	297, 263, 242 144, 93, 80, 68
<i>HindIII</i>	2	659, 640	1	1187
<i>AlwI</i>	3	646, 621, 32	3	592, 563, 32
<i>EcoRI</i> , <i>XbaI</i> , <i>XhoI</i>	1	1299	1	1187

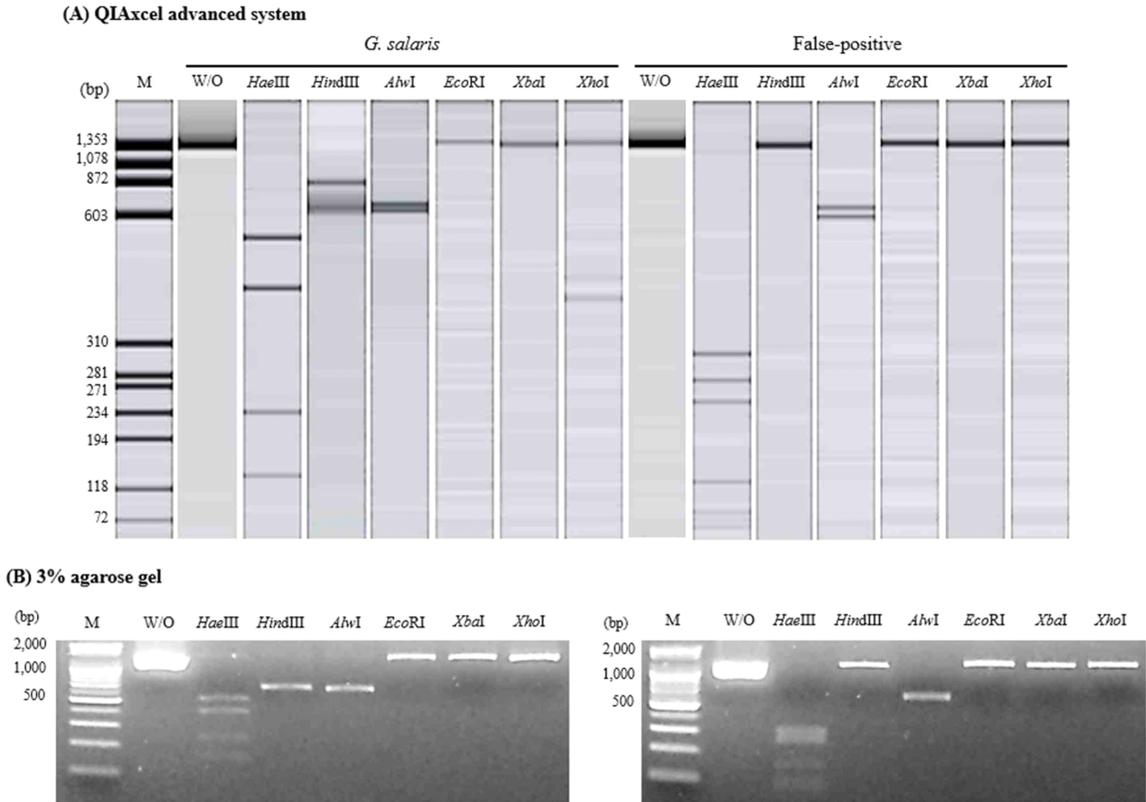


Fig. 4. PCR-RFLP analysis for *G. salaris* and false-positive sample of ITS PCR by QIAxcel advanced system (A) and 3% agarose gel (B). M, 100 bp ladder; W/O, PCR product without treatment of restriction enzyme.

료를 구별할 수 있는 PCR-RFLP기법을 개발하였다. *G. salaris*는 수산생물질병관리법에 따른 수산생물전염병으로 병성감정실시기관에서 병성감정 등 1차 수산생물 전염병 PCR 검사 시, 위양성을 포함한 *G. salaris* PCR 양성 의심 밴드가 검출되면 국가수산생물방역기관인 국립수산물품질관리원에 확정진단을 요청하고 지자체에서 초동 방역조치 등을 수행한다. 병성감정실시기관 등 *G. salaris* 1차 검사 진단 시 PCR 후 제한효소 처리는 신속히 위양성 유무를 확인하여 불필요한 행정절차를 줄이고 방역관리의 효율성을 제고할 수 있는 진단법 개선에 기초 자료를 제공한다.

### Acknowledgment

이 논문은 국립수산물품질관리원(수산생물 질병 방역 관리 기술개발(NFQS2024001)의 지원에 의해

수행되었습니다.

### Reference

- Appleby, C. and Mo, T.A.: Population dynamics of *Gyrodactylus salaris* (Monogenea) infecting Atlantic salmon, *Salmo salar*, parr in the river Batnfjord-selva, Norway. *J. Parasitol.*, 83(1):23-30, 1997. <https://doi.org/10.2307/3284312>
- Bakke, T.A., Jansen, P.A. and Kennedy, C.R.: The host specificity of *Gyrodactylus salaris* Malmberg (Platyhelminthes, Monogenea): susceptibility of *Onco-rhynchus mykiss* (Walbaum) under experimental conditions. *J. Fish Biol.*, 39:45-57, 1991. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1991.tb04340.x>
- Chong R.S.M.: Chapter 42 - Infection with *Gyrodactylus salaris*. In: Kibenge FSB, Baldisserotto B and Chong RS-M (eds). *Aquaculture Pathophysiology*, Academic Press. pp. 513-515, 2022.

- Cunningham, C.O.: Species variation within the internal transcribed spacer (ITS) region of *Gyrodactylus* (Monogenea: Gyrodactylidae) ribosomal RNA genes. *J. Parasitol.*, 83: 215-219, 1997. <https://doi.org/10.2307/3284442>
- Denholm, S.J., Hoyle, A.S., Shinn, A.P., Paladini, G., Taylor, N.G. and Norman, R.A.: Predicting the potential for natural recovery of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) populations following the introduction of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea): *PLoS One*, 11(12): e0169168, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169168>
- Harris, P.D., Shinn, A.P., Cable, J. and Bakke, T.A.: Nominal species of the genus *Gyrodactylus* von Nordmann 1832 (Monogenea: Gyrodactylidae), with a list of principal host species. *Syst. Parasitol.* 59(1):1-27, 2004. <https://doi.org/10.1023/B:SYPA.0000038447.52015.e4>
- Jensen, A.J., and Johnsen, B.O.: Site specificity of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea) on Atlantic Salmon (*Salmo salar* L) in the river Lakselva, northern Norway. *Canadian Journal of Zoology*, 70:264-267, 1992. <https://doi.org/10.1139/z92-039>
- Meinilä, M., Kuusela J., Ziętara M. and Lumme J.: Primers for amplifying approximately 820 bp of highly polymorphic mitochondrial COI gene of *Gyrodactylus salaris*. *Hereditas*, 137:72-74, 2002. <https://doi.org/10.1034/j.1601-5223.2002.1370110.x>
- Mo, T.A., Hansen, H., and Hytterød, S.: Occurrence and seasonality of *Gyrodactylus salaris* and *G. salmonis* (Monogenea) on Arctic char (*Salvelinus alpinus* (L.)) in the Fustvatnet lake, Northern Norway. *J. Fish Dis.*, 46(4), 395-403, 2023. <https://doi.org/10.1111/jfd.13752>
- Olstad, K., Cable, J., Robertsen, G. and Bakke, T.A.: Unpredicted transmission strategy of *Gyrodactylus salaris* (Monogenea: Gyrodactylidae): survival and infectivity of parasites on dead hosts. *Parasitology*, 133:33-41, 2006. <https://doi.org/10.1017/S0031182006009966>
- Paladini, G., Shinn, A.P., Taylor, N.G.H., Bron, J.E. and Hansen, H.: Geographical distribution of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea, Gyrodactylidae). *Parasit. Vectors*, 14(1):34. 2021. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04504-5>
- Peeler, E.J. and Thrush, M.A.: Qualitative analysis of the risk of introducing *Gyrodactylus salaris* into the United Kingdom. *Dis. Aquat. Org.*, 62:103-113, 2004. <https://doi.org/10.3354/dao062103>
- Peeler, E.J. and Oidtmann B.C.: Demonstrating freedom from *Gyrodactylus salaris* (Monogenea: Gyrodactylidae) in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.*, 79:47-56, 2008. <https://doi.org/10.3354/dao01880>
- Pettersen, R.A., Hytterød, S., Vøllestad, L.A. and Mo, T.A.: Osmoregulatory disturbances in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., caused by the monogenean *Gyrodactylus salaris*. *J. Fish Dis.*, 36(1):67-70, 2013. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2012.01441.x>
- World Organisation for Animal Health: *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*, 2023.
- 국립수산물품질관리원: 수산생물병성감정지침서, 2021.

---

Manuscript Received: May 21, 2024

Revised: Jun 03, 2024

Accepted: Jun 04, 2024