참붕어, *Pseudorasbora parva*의 인두흡충, *Clinostomum complanatum* 피낭유충 감염증

정은빈 · 김동완* · 김진도** · 박성우†

군산대학교 수산생명의학과, *동경미생물, **국립수산물연구원 병리과

Infection of *Clinostomum complanatum* (Trematoda: Digenea) metacercaria in cultured southern top mouthed minnow *Pseudorasbora parva*

Eun-Bin Jung, Dong-Wan Kim*, Jin-Do Kim**, and Sung-Woo Park†

Department of Aquatic life Medicine, Kunsan National University, Kunsan 573-701, Korea

*Dongkyung Microbial Technology, Iksan 570-912, Korea

**Pathology Division, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea

Many metacercariae in the musculature of southern top mouthed minnow (*Pseudorasbora parva*) cultured at a farm in Chonbuk Province. The excysted metacercariae looked yellowish white and were 4.02 ± 1.80 mm (1.66-5.81) in length and 1.27 ± 0.27 mm (1.01-1.64) in width for acetocarmin-stained specimens. The oral sucker measuring 0.18 ± 0.05 mm (0.11-0.24) in length and 0.23 ± 0.07 mm (0.15-0.33) in width, was located at the anterior end of the body. The ventral sucker situated at the fourth third of the body were measured 0.47 ± 0.08 mm (0.35-0.53) in length and 0.55 ± 0.09 mm (0.43-0.63) in width. The tongue-shaped metacercariae were identified as *Clinostomum complanatum* on the basis of morphological characteristics. The metacercaria was also confirmed to be *C. complanatum* using PCR reaction with *C. complanatum*-specific primer sets, Trem 18S F and Ccom670 R. No histopathological changes in the infected fish were observed except necrosis and exfoliation of epidermis in the skin and atrophy of muscle fibers.

Key words : Southern top mouthed minnow, *Clinostomum complanatum*, Histopathology

인두흡충, *Clinostomum complanatum*은 담수어류를 먹이로 섭취하는 왜가리, *Ardea cinerea*를 비롯한 어식성 조류의 구강이나 인두에 감염되어 성충으로 되며(Lo *et al.*, 1981; Kagei *et al.*, 1988; Aohagi *et al.* 1992), 물달팽이, *Radix auricularia coreana* 등을 제 1중간숙주(Lo *et al.*, 1981; Chung *et al.*, 1998), 담수

어류를 제 2중간숙주로 하고 있다. 제 2중간숙주인 담수어의 근육에서 발견되는 metacercaria는 북미에서는 “yellow grubs”라 부르고 있으며, 중숙주의 변형으로서 담수어류를 생식할 경우 사람에도 감염되어 *Clinostomum*성 인후염(pharyngitis)을 유발하기도 한다(Chung *et al.*, 1995A; Park *et al.*, 2009).

Chung *et al.* (1995B)은 우리나라산 야생 담수어류 12종인 칼납자루, *Acheilognathus koreensis*, 납지리, *Acheilognathus rhombeus*, 줄납자루, *Acheilognathus*

†Corresponding author: Sung-Woo Park
Tel: +82-63-469-1884
E-mail: psw@kunsan.ac.kr

yamatsutase, 금붕어, *Carassius auratus*, 기름종개, *Cobitis sinensis*, 돌마자, *Microphysogobio yaluensis*, 참붕어, *Pseudorasbora parva*, 돌고기, *Pungtungia herzi*, 각시붕어, *Rhodeus uyekii*, 참몰개, *Squalidus chankaensis tsuchigae*, 긴몰개, *Squalidus gracilis majimae*, 갈겨니, *Zacco temminckii*에 감염된 *C. complanatum*의 피낭유충을 발견하였다. 그 후 천연기념물인 어름치, *Hemibarbus mylodon* (김 등, 2008)과 몰개, *Squalidus japonicus coreanus* (Sohn, 2009)에 감염되는 것으로 보고하여, 현재 14종의 야생 담수어에 감염되는 것으로 알려져 있다. 한편 양식 어류에서의 감염 예는 우리나라에서는 금붕어(Kim and Nagasawa, 1996)에서만 발견되었을 뿐이며, 일본에서는 양식 미꾸라지(Kagei *et al.*, 1984) 및 대만의 양식 은어(Lo *et al.*, 1981)에 감염되는 것으로 보고되었다.

본 연구에서는 비단잉어 양어지에 혼재되어 사육 중인 참붕어, *Pseudorasbora parva*에서 발견된 *C. complanatum*의 형태와 감염 조직에서의 병리학조직학적 변화를 조사하였고, 동일 양어지내의 비단잉어에 감염되지 않은 이유에 관하여 고찰하였다.

재료 및 방법

어류

2010년 3월에 김제 백산의 비단잉어 노지 양식장에서 비단잉어와 혼합양식 중 선별 과정에 이상이 발견된 참붕어, *Pseudorasbora parva* 10마리를 시료로 사용하였다. 참붕어의 평균 체장은 8.0 ± 1.8 cm (5.0-10.5), 평균 체중은 4.2 ± 2.1 g (1.2-7.3)였다.

Metacercaria

Cyst의 존재 부위를 절개하여 탈낭시킨 metacercaria는 AFA (alcohol-formalin-acetic acid: formalin 60

ml, 95% ethanol 500 ml, glacial acetic acid 40 ml, 증류수 400 ml)에 고정한 다음 acetocarmin 염색하였다. Acetocarmin 염색후의 탈색은 Semichon의 1% 염산알콜액 및 탈색과 충체의 팽화신장을 좋게 하는 45% 초산액의 2가지 방법으로 탈색하였다.

45% 초산액으로 탈색할 경우 충체를 슬라이드글라스에 올려 커버글라스를 덮고, 한쪽에서 70% 알콜을 주입하면서 반대쪽에서 여과지를 사용하여 초산액을 흡수하는 과정을 반복하여 재고정에 사용한 초산액을 완전히 세척한 다음에 탈수 과정으로 이행하였다. 탈수한 표본은 투명화과정을 거쳐 Canada balsam으로 봉입한 다음 충체의 크기와 흡반의 크기를 측정하였다.

PCR 반응

어류에서 탈낭시킨 추출한 유미유충은 Dzikowski *et al.* (2004)의 방법에 따라 생리식염수로 여러 번 세척한 다음 70% 알콜에 보존하였다. DNA 추출은 Levy *et al.* (2002)의 방법에 따라 충체를 10 mM Tris-EDTA에 옮겨 하루 밤 방치한 다음 Tris-EDTA를 교환하면서 1시간씩 2회 세척하였다. 세척한 충체는 시판의 DNA분리용 kit (AccuPrep® GenomicDNA extractionkit, Bioneer, Korea)를 사용하여 DNA를 추출하였다.

PCR에 사용한 primer는 Dzikowski *et al.* (2004)의 *C. complanatum* 특이 primer set인 Trem 18S F (5'-TCC TGC CAG TAG TCA TAT G-3')와 Ccom670 R (5'-AAT GAC CGA GTC TGA CAG-3')을 사용하여 94°C에 15분간 initial denaturation시킨 다음 35사이클(94°C, 1min; 60°C 45 sec; 72°C 1.5 min) 증폭시킨 다음 72°C 5분간 최종적으로 신장시켰다. PCR반응물은 1.5% agarose gel로 영동한 다음 특이 밴드(670 bp)의 존재를 확인하였다.

병리조직학적 변화

Cyst가 형성된 조직을 절취하여 Bouin액에 고정한 다음 상법에 따라 파라핀에 포매한 다음 5 μm 의 조직 절편을 만들어 Mayer's hematoxylin-eosin (HE)염색 및 Mallory's trichrome염색 후 광학현미경으로 검경하였다. 또 비단잉어와 참붕어의 피부를 상법에 따라 파라핀 표본에 대한 HE염색 표본에서 2어종의 피부의 차이점을 비교하였다.

결과 및 고찰

감염된 참붕어가 발견된 비단잉어 양식장은 지하수를 수원으로 한 노지 양식장으로 시료 채취시의

사육 수온은 20°C였으며, 먹이는 잉어용 배합사료를 투여하고 있었다. 병어는 미병부, 등지느러미 하부 체측근, 배지느러미의 앞쪽 복부, 아가미 뚜껑 내부에 1.6-2.8 mm인 황백색 타원형의 cyst를 육안으로 쉽게 발견할 수 있었다. 일부의 개체에서는 아래턱, 가슴지느러미의 기부 앞쪽에 출혈 환부가 형성되어 있었다(Fig. 1&2). 병어를 해부하였을 때 복강벽의 내면에 돌출된 cyst가 발견되는 개체도 있었다(Fig. 2). 병어는 Lo *et al.* (1981)과 Kim and Nagasawa (1996)의 경우처럼 cyst가 형성된 부위는 노란색으로 띄면서 용기되는 소위 “yellow grub”의 존재로 육안으로도 쉽게 식별할 수 있었다.

참붕어에 형성되는 cyst의 크기는 양식 금붕어,

Fig. 1. Many yellowish-white cysts of *Clinostomum complanatum* within the musculature of southern top mouthed minnow *Pseudorasbora parva*. A: Dorsal view. B: Ventral view.

Fig. 2. Juvenile southern top mouthed minnow *Pseudorasbora parva* infected with metacercariae of *Clinostomum complanatum*. Note yellowish white-oval cysts within the body musculature under the dorsal fin and caudal peduncle (A) and in the peritoneal wall (B). A and B are the same individual.

*Carassius auratus*에 형성된 크기와 유사한 0.4-0.8 mm 보다 대형의 cyst가 형성되었다(Kim and Nagasawa, 1996). Chung *et al.* (1985)은 야생 담수어류의 체측근, 아가미 주변 및 지느러미에서, 김 등(2008)은 어름치의 새장 주변과 측선 부근의 근육에서, Kim and Nagasawa (1996)는 양식 금붕어에서는 험부, 미병부 및 아가미 뚜껑 뒤쪽에서 가슴지느러미 부위의 체측근의 순으로 감염 빈도가 높았으며, 드물게는 눈 주변의 조직에서도 발견된다고 하였다. Malek and Mobedi (2001)은 *C. complanatum*의 cyst가 아가미 뚜껑 아래의 입 주변에서 많이 발견되는 이유는 충체의 체강내에 숙주의 혈액이 발견되는 것으로 보아 혈액을 먹이로 섭취하기 때문이라고 주장하였지만, 본 연구의 참붕어에서는 체측근 또는 복부의 근육, 미병부에도 다수 형성되기 때문에 적절한 원인이라고는 할 수 없을 것 같다. 또한 다른 담수어류의 경우와는 달리 참붕어의 복강 내부의 벽에 기생한 예는 본 연구가 최초이다.

Cyst는 피낭이 매우 얇기 때문에 쉽게 탈낭됨으로 metacercaria의 수집은 매우 용이하였다. 탈낭시킨 피낭유충을 AFA에 고정한 다음 acetocarmin 염색한 충체(n=12)는 햇바닥 모양으로, 길이는 4.02 ± 1.80 mm (1.66-5.81), 폭은 1.27 ± 0.27 mm (1.01-1.64)였다. 충체의 전단부에 위치한 구흡반(oral sucker)의 길이는 0.18 ± 0.05 mm (0.11-0.24), 폭은 0.23 ± 0.07 mm (0.15-0.33), 충체의 앞쪽 1/3의 부분에 위치한 복흡반(ventral sucker)의 길이는 0.47 ± 0.08 mm (0.35-0.53), 폭은 0.55 ± 0.09 mm (0.43-0.63)로 복흡반이 구흡반에 비해 훨씬 크고 명료하였다.

어류 조직에서 탈낭시킨 metacercaria의 크기는 Chung *et al.* (1998)은 $3.28-4.27 \times 0.94-1.46$ mm, Kim and Nagasawa (1996)는 $2.4-3.5 \times 0.7-1.37$ mm, Aogahi and Shibahara (1994)는 붕어에서 $3.58-6.99 \times 1.09-2.16$ mm,

김 등(2008)은 어름치에서는 $3.11-4.62 \times 0.90-1.43$ mm 라고 보고하여 감염되는 숙주별로 크기에 상당한 차이를 보이고 있다. 그러나 탈낭 또는 염색 표본의 크기를 직접 비교하는 것은 의미가 없을 것으로 생각된다. 왜냐하면 본 연구에서는 기생충의 염색에 널리 사용되고 있는 Semichon's acetocarmin 염색법과 같은 acetocarmin으로 염색하지만, 염색 후의 탈색에 45%초산을 사용해 본 결과 acetocarmin 염색 후의 탈색제의 종류에 따라 충체의 신장에는 상당한 차이가 있었다. 즉 Semichon의 1%염산알콜에 탈색한 충체(Fig. 3B)에 비해 45%초산액으로 탈색한 다음 탈색액을 70%에탄올로 치환한 충체(Fig. 3C)의 신장이 양호한 편이었다. 따라서 충체의 크기 비교에 있어 탈색제의 종류에 따라 충체의 크기는 상당한 차이가 있을 것으로 생각되었다. 또한 45%초산액을 사용하는 것이 충체의 내부 구조의 손상이 전통적인 acetocarmin 염색법보다는 양호한 것으로 생각되었다.

Fig. 3. Excysted metacercaria of *Clinostomum complanatum*. A: Wet preparation. B: Semichon's acetocarmin. C: Destained specimen in 45% acetic acid solution after staining with acetocarmin. Bars=1 mm.

어류에서 탈낭시켜 추출한 유미유충을 PCR 반응시킨 결과 Dzikowski *et al.* (2004)의 결과와 동일한 670 bp의 특이 밴드가 형성됨으로써 참봉어에서 발견된 metacercaria가 *C. complanatum*임을 확인되었다 (Fig. 4).

병리조직학적으로 외관상 황백색 타원형의 cyst가 발견되는 등지느러미 하부의 체측근, 아가미 뚜껑 및 미병부, 복강벽의 근육에는 숙주 유래의 피막에 둘러싸인 metacercaria의 cyst가 발견되었다 (Fig. 5). 또한 육안적으로 이상이 발견되지 않았던 두부의 근육에서도 cyst가 발견되었다. Cyst내에는 여러 발육 단계의 metacercaria가 존재하며, cyst내에는 1개 또는 많게는 3개이지만 대부분이 2개의 metacercaria가 발견되었다 (Fig. 5F). 또한 같은 cyst내에 들어 있는 metacercaria라 할지라도 발육 단계에는 차이를 보이고 있었다. Cyst에 대한 염증 반응은 거의 없었지만, cyst가 커짐에 따라 주변의 근육을 압박하게 되어

근 섬유의 위축을 나타내는 정도였다. 그러나 Cyst가 형성된 부위에 피부의 표층에 가까운 곳일 경우에는 피부를 외부로 압박하게 되어 상피세포가 붕괴되어 탈락하는 경우가 대부분이었다 (Fig. 5A, B & F).

Malek and Mobedi (2001)는 cyst가 형성된 근섬유에 약간의 출혈을 동반한 염증세포의 침윤과 초자변성이 생긴다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 이러한 숙주 반응은 관찰되지 않았다.

Trichrome염색한 cyst는 숙주 유래의 얇은 막으로 둘러싸여 있으며, 내부의 metacercaria가 소형이거나 1개체가 들어있을 때는 내막은 적색으로 염색되었다 (Fig. 6 B&C). 그러나 내부의 metacercaria가 대형으로 발육한 경우나 또는 여러 마리의 metacercaria가 들어 있는 경우에는 내막은 옅은 청색으로 염색되었다 (Fig. 6 A&D).

피낭 유충의 막은 어중에 따라 형성되지 않는 경우도 있으며, 막의 두께는 어체에서 형성되는 부위, 충체의 연령 및 어중에 따라서 차이가 나는 것으로 알려져 있으며, 동일 어체인 경우라도 어체의 외곽에 형성되는 경우가 어체의 심부에 비해서 막의 두께는 두터워진다고 알려져 있다. Kalantan *et al.* (1986)은 *C. complanatum* 피낭 유충의 cyst는 내막 및 외막의 2개로 구성되어 매우 얇은 막으로 피낭되어 있고, 내막은 교원섬유가 함유되어 있지만 외막은 염기성 단백질이 풍부하다고 보고하였다. Mallory's trichrome염색에 교원섬유는 aniline blue에 진한 청색 또는 옅은 청색, 탄성섬유는 옅은 핑크 또는 황색으로 염색됨으로 피낭 초기에는 탄성섬유에 의한 피포가 일어나지만, cyst의 크기가 커짐에 따라 내막은 옅어지는 대신에 외막의 교원섬유층이 두터워짐으로 aniline blue에 청색으로 염색되어 나타난 것으로 생각된다.

상피세포에 존재하는 세포에는 비단잉어는 점액

Fig. 4. PCR analysis of *Clinostomum complanatum* from southern top mouthed minnow *Pseudorasbora parva*. PCR analysis was performed using the specific-primer sets Trem 18S F and Ccom670 Rs. Agarose gel electrophoresis analysis of PCR products of 670 base pairs were amplified. M= molecular marker. Lane 1=*C. complanatum*. Lane 2=muscle.

Fig. 5. Cysts of *Clinostomum complanatum* in the muscle of southern top mouthed minnow *Pseudorasbora parva*. A & B: Dorsal muscle. C: Head. D: Operculum. E: Caudal peduncle. F: Peritoneal wall. HE. Bars=200 μ m

Fig. 6. Cysts of *Clinostomum complanatum* in the muscle of southern top mouthed minnow *Pseudorasbora parva*. A: Dorsal muscle. B: Head. C: Caudal peduncle. D: Peritoneal wall. Mallory's trichrome. Bars=200 μ m.

Fig. 7. Light micrographs of the epidermis of colored carp (A) and southern top mouthed minnow (B). Note goblet cells are abundant in the skin of colored carp but not in the skin of southern top mouthed minnow. HE. Bar=20 μ m.

세포이외에 많은 호산성의 club cell이 존재하는 반면 참붕어의 상피세포에서는 점액세포는 존재하는 반면 club cell은 발견되지 않았다(Fig. 7). 본 연구에서 동일 양어지에 사육되고 있는 비단잉어에는 감염이 전혀 발견되지 않은 반면 참붕어에만 감염된 것은 cercaria의 침입에 대한 두 어종의 방어 능력에 차이가 있을 것으로 추정되며, 간흡충의 경우 처럼 cercaria에 대한 방어능력을 가진 club cell이 관여할 것으로 추정된다(전, 1964; 이, 1974).

*C. complanatum*이 양식 미꾸라지에 감염된 경우에는 먹이 섭취가 불량해지며 양어지의 표면에서 힘없이 헤엄치다가 폐사한다고 하였다(Kagei *et al.*, 1984; Kim and Nagasawa, 1996). 참붕어에 본 충의 감염에 의한 폐사유무는 확인할 수 없었지만, 심한 감염인 경우에는 Lo *et al.* (1981)의 보고처럼 이상 유영에 의한 먹이 섭취 불량으로 성장의 저하는 일어날 수 있을 것으로 추정할 수 있다.

**Clinostomum complanatum*의 우리말 명칭인 인두흡충은 대한기생충학회 용어위원회(1995)의 기생충학 학술용어(II)에 따라 표기.

**어류 학명은 김과 박(2002)의 원색도감, 한국의 물고기를 참고하였다.

요 약

노지 양식장에서 비단잉어와 함께 사육중인 참붕어의 미병부, 체측근, 복부 및 아가미 뚜껑 내부에 황백색의 cyst내의 metacercaria를 탈낭시켜 형태학적 및 분자생물학적으로 조사한 결과 *Clinostomum complanatum*으로 동정되었다.

병리조직학적으로는 상피세포의 박리와 괴사 및 cyst주변의 근섬유의 위축이외에 다른 조직의 변화는 발견되지 않았다.

감사의 글

본 연구는 군산대학교 수산과학연구소의 연구비 지원에 의한 대어민 질병 상담업무의 일환으로 수행되었습니다.

참고문헌

- Aohagi, Y. and Shibahara, T.: *Clinostomum complanatum* infection in *Crassius* spp. collected from some ponds and rivers in Tottori and Shimane prefectures, Japan. *Jpn. J. Parasitol.*, 43: 129-135, 1994.
- Aohagi, Y., Shibahara, T., Machida, N., Yamaga, Y., Kagota, K., and Hayashi, T.: Natural infections of *Clinostomum complanatum* (Trematoda: Clinostomatidae) in wild herons and egrets, Tottori Prefecture, Japan. *J. Wildlife. Dis.*, 28: 470-471, 1992.
- Chung, D.-I., Kong, H.-E., and Joo, C.-Y.: *Radix auricularia coreana*: natural snail host of *Clinostomum complanatum* in Korea. *Kor. J. Parasitol.*, 36: 1-6, 1998.
- Chung, D. I., Kong, H. H., and Moon, C. H.: Demonstration of the second intermediate hosts of *Clinostomum complanatum* in Korea. *Kor. J. Parasitol.*, 33: 305-312, 1995B.
- Chung, D. I., Moon, C.-H., Kong, H.-H., Choi, D.-W., and Lim, D.-K.: The first human case of *Clinostomum complanatum* (Trematoda: Clinostomidae) infection in Korea. *Kor. J. Parasitol.*, 33: 219-223, 1995A.
- Dzikowski, R., Levy, M., Poore, M. F., Flower, J. R., and Paperna, I.: *Clinostomum complanatum* and *Clinostomum marginatum* (Rudolphi, 1819) (Digenea: Clinostomidae) are separated species based on differences in ribosomal DNA. *J. Parasitol.*, 90: 413-

- 414, 2004.
- Kagei, N., Yanohara, Y., Uchikawa, R., and Sato, S.: On the yellow grubs, metacercariae of *Clinostomum complanatum* (Rudolphi, 1814), found in the cultured loach. Jpn. J. Parasitol., 33: 59-62, 1984.
- Kakantan, A. M. N. and Arfin, M.: In vitro excystation of metacercariae of *Clinostomum complanatum* (Rudolphi, 1819) (Digenea: Clinostomatidae). Acta Zoologica, 69: 163-167, 1988.
- Kalantan, A. M. N., Arfin, M. and Nizami, W. A.: Histochemical nature and origin of the metacercarial cyst of *Clinostomum complanatum* (Trematoda: Digenea). Trans. Am. Microscop. Soc., 105: 290-295, 1986.
- Kim, Y.-G. and Nagasawa, K.: Infection of *Clinostomum complanatum* (Rudolphi, 1814) (Trematoda: Digenea) metacercaria in goldfish (*Crassius auratus*) cultured in Korea. J. Fish Pathol., 9: 1-9, 1996.
- Levy, M. G., Flowers, J. R., Poore, M. F., Khoo, L., Pote, L. M., Muller, J. R., Paperna, I., Dzikowski, R., and Litaker, R. W.: Morphologic, pathologic, and genetic investigation of *Bolbophorus* species affecting cultured channel catfish in the Mississippi Delta. J. Aquat. Anim. Health. 14: 235-246, 2002.
- Lo, C-F., Huber, F., Kou G-H., and Lo, C-J.: Studies of *Clinostomum complanatum* (RUD, 1819). Fish Pathol., 15: 219-227, 1981.
- Malek, M., and Mobedi, I.: Occurrence of *Clinostomum complanatum* (Rudolphi, 1819) (Digenea: Clinostomatidae) in *Capoeta capoeta gracilis* (Osteichthys: Cyprinidae) from Shiround River, Iran. Iranian J. Publ. Health, 30: 95-98, 2001.
- Park, C-W., Kim, J-S., Joo, H-S., and Kim, J.: A human case of *Clinostomum complanatum* infection in Korea. Kor. J. Parasitol., 47: 401-404, 2009.
- Sohn, W-M.: Fish-borne zoonotic trematode metacercariae in the Republic of Korea. Kor. J. Parasitol., 47, Supplement: S103-S113, 2009.
- 김익수, 박종영: 원색도감 · 한국의 자연시리즈 18. 한국의 민물고기. 교학사, 2002.
- 김지형, 김경연, 오태엽, 장환, 조성준, Gomez, D. K., Choresca, C. H., 박세창: 어름치(*Hemibarbus mylodon*)에서 *Clinostomum complanatum* 감염증. J. Vet. Clin., 25: 307-309, 2008.
- 이재규: 간흡충의 제2중간숙주에 관한 실험적 연구. III. 담수어류 표피의 곤봉상세포와 간흡충 피낭유충의 감염도에 관하여. 기생충학잡지, 12(2): 101-110, 1974.
- 전세규: 간흡충의 감염경로에 관한 실험적 연구. 제3편 각종 어류 체표면 점액물질의 간흡충에 대한 살충효과. 기생충학잡지, 2(3): 12-22, 1964.

Manuscript Received : December 22, 2011

Revised : July 11, 2012

Accepted : July 24, 2012