



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

넙치(*Paralichthys olivaceus*)에서
*Edwardsiella piscicida*의 자연감염과
인위감염 특성에 관한 연구



2023년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수산생명의학과

노을빛

이 학 석 사 학 위 논 문

넙치(*Paralichthys olivaceus*)에서
*Edwardsiella piscicida*의 자연감염과
인위감염 특성에 관한 연구

지도교수 허 민 도

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.

2023년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수산생명의학과

노 을 빛

노을 빛의 이학석사 학위논문을
인준함

2023년 2월 17일



위원장 약학박사 정 준 기 (인)

위원 이학박사 김 광 일 (인)

위원 농학박사 허 민 도 (인)

목차

목차	i
Abstract	ii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	5
1. 현장 샘플링	5
2. 인위감염 실험	6
2.1. Experimental trial 1	6
2.2. Experimental trial 2	7
2.3. Experimental trial 3	7
3. 혈액생화학적 분석	8
4. 조직병리학적 분석	8
5. PCR 분석	10
6. 조직 내 생균수 분석	12
7. 통계분석	12
III. 결과	13
1. 생체량 측정 결과	13
2. 병원성	15
2.1. 유병률	15
2.2. 폐사율	17
3. 임상증상	18
4. 조직병리학적 분석	23
5. K-means 군집분석	29
6. 혈액생화학적 분석	32
IV. 고찰	37
V. 요약	41
VI. 감사의 글	43
VII. 참고문헌	45

Characteristics of *Edwardsiella piscicida* from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) by natural and artificial infection

Eul-bit Noh

Department of Aquatic Life Medicine, The Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

The purpose of this study is to find out the difference in the characteristics of natural and artificial infections of *Edwardsiella piscicida* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Natural infected group were collected from olive flounder aquaculture farm, and artificial infected group were tested for 14 days after Intraperitoneal (IP) injection to histopathological and blood chemical analysis. As a result, symptoms of exophthalmos in the natural infection group and peritonitis and intestinal congestion in the artificial infection group were specifically observed. Especially, histopathological results showed that hepatic abscesses were frequently generated from the inside of hepatocytes in the natural infection group, while peritonitis was preceded in the artificial infection group, necrosis of hepatocytes was lesser than in the natural infection group. These results are due to the outflow of blood components from peritoneal or barrier blood vessels to prevent sepsis in which bacteria

that penetrated into the abdominal cavity spread throughout the body during abdominal vaccination, resulting in an immune response. Blood chemical results show that AST, ALT, and BUN values increased with the degree of infection, and that the BUN levels representing kidney function increased with the degree of infection, which is considered to have worsened kidney function due to damage to real tissue in the kidney. Therefore, it was confirmed that IP injection of *E. piscicida* against olive flounder showed a insignificant effect of sepsis compared to natural infection, showing lesser pathogenicity in artificial infected fish.



I. 서론

국내 어류 천해 양식업은 매년 성장 중이며 대표 양식 어종인 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)는 1980년대 종묘생산 기술이 도입된 이후로 생산량이 꾸준히 증가하여(Kim *et al.*, 2020) 2020년 기준 생산량은 43,813 M/T로 전체 어류 양식 생산량의 약 50%를 차지한다(MOF, 2020). 또한 넙치는 제주도를 중심으로 대규모 기업형 양식시설의 도입과 함께 육종 및 양성 기술의 발달이 이루어져 수출산업으로서의 가치가 높은 국내 최대 양식 품종 중 하나로 자리 잡고 있다(Shim *et al.*, 2019). 이러한 넙치의 대량 생산을 위해 국내 넙치 양식장의 개소수가 증가하고 있으나 고밀도 사육과 사료의 과다급여, 무분별한 약제 남용, 선별 및 이동 등으로 인한 물리적 스트레스가 질병의 발생, 증체율 저하 등의 문제를 야기하고 있으며(Heo, 1996), 사육 관리의 악조건들은 어체를 외부자극에 취약한 상태로 만들어 병원체 감수성을 증가시킬 수 있다(Caraceni *et al.*, 1999).

양식어류에 질병을 일으킬 수 있는 수생병원체로는 진균, 기생충, 세균, 바이러스 등이 있으며, 이 중 세균성 질병은 전체 병원성 질병의 발생 비율 중 54.9%를 차지하여 가장 많이 발병한다고 알려져 있다(Kibenge *et al.*, 2012). 국내 양식 넙치에서 연중 발생하는 세균성 질병 중 하나인 에드워드증은 단독 감염만으로도 심각한 경제적 손실을 초래할 뿐만 아니라 고수온기에는 *Sterptococcus* sp.와의 혼합 감염율이 높아 매년 피해가 더욱 더 가중되고 있다(Buján *et al.*, 2018; Jo *et al.*, 2007). 또한 에드워드증은 숙주범위가 넓어 양서류(Wyatt *et al.*, 1979), 파충류(Sakazaki, 1965), 조류(White *et al.*, 1973) 뿐만 아니라 인간을 포함한 포유류(Ewing *et al.*,

1965)에도 감염되기 때문에 인수공통감염성 세균으로서 공중보건 측면에서 중요한 병원체로 인식되고 있다(Leung *et al.*, 2012).

에드워드증의 원인균인 *Edwardsiella tarda*는 그람 음성 단간균으로 일본의 Hoshina (1962)에 의해 처음으로 분리되었으며 *Paracolobacterium anguilmortiferum*이라 명명되었지만, 이후 재검사를 통해 *E. tarda*로 구분되었다(Ewing *et al.*, 1965). *Edwardsiella* 속 세균은 1980년대까지 *E. tarda* 단일종으로 여겨졌으나 다양한 생물로부터 새로운 종인 *Edwardsiella hoshinae*, *Edwardsiella ictaluri*, *Edwardsiella piscicida*, *Edwardsiella anguillarum*이 보고되었다(Kim, 2021). 이후 *E. tarda* 라고 명명했던 상당수의 균들이 *E. piscicida*에 속하며 에드워드증을 유발한다고 밝혀졌다(Reichley *et al.*, 2017). *E. piscicida*는 해양과 내수면의 많은 어류에서 보고되었고(Griffin *et al.*, 2020), 남극대륙(Leotta *et al.*, 2009)에서도 발생할 만큼 넓은 지리적 분포를 갖는다. 국내에서는 터봇(*Scophthalmus maximus*), 뱀장어(*Anguilla japonica*), 참돔(*Pagrus major*), 망어(*Seriola quinqueradiata*) 등 경제적으로 중요한 주요 양식 어종에서 병원성이 보고된 바 있다(Castro *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2014; Matsuyama *et al.*, 2005, Yasunaga *et al.*, 1983).

한편 Park *et al.* (1983)은 445개의 *E. piscicida* 균주를 O-antigen을 사용해 A, B, C, D 총 4개의 serotype으로 구분하였으며, 이 중 serotype A는 뱀장어를 비롯한 어류 및 사람에게 가장 강한 병원성을 보였다. 이후 Rashid *et al.* (1997)의 연구에서 넙치에서 분리된 모든 균주가 serotype A로 확인되었다. *E. piscicida*의 독성 인자는 ECPs(Extracellular products), hemolysin, siderophore, cytotoxic effect 등이 보고되었으며(Park *et al.*,

2012), 넙치에 감염될 경우 안구돌출, 복부팽만, 피부 및 지느러미의 점상 출혈, 탈장 증상을 동반한 높은 폐사율이 발생한다(Egusa, 1976; Sahoo *et al.*, 1998; Miyazaki and Kaig, 1985). 특히 사육 수온이 25°C 이상으로 높아지는 고수온기에는 밀식 환경에서 가해지는 온도 스트레스로 인해 어체의 면역력이 저하되는데, 이때 *E. piscicida*의 높은 유병률로 대량 폐사에 의한 생산성 감소, 상품성 저하, 치료 약제 사용에 의한 생산 비용 증가가 양식 산업에 직접적인 경제적 피해로 이어질 수 있다(Kwon *et al.*, 2014).

이러한 피해를 줄이기 위해 넙치의 *E. piscicida*에 대한 항생제(Wang *et al.*, 2009), 백신(Sun *et al.*, 2010), 면역유도제(Kwon *et al.*, 2016) 등의 연구가 진행되고 있으나, 대부분의 연구 환경은 유수식이 아닌 순환여과식 환경이고, 공간적 제한으로 인해 작은 크기의 넙치를 실험어로 사용하며 수온, 밀도, 사료급여량 등의 사육 조건이나 핸들링 같은 스트레스 요소 등이 양식장 현장과 유사하게 설정되기 어렵다. 어류의 대사기능은 사육 환경에 영향을 받으므로 약물의 약동학적 변화가 크게 변동될 수 있어 실험실 환경에서는 유효했던 약물이 양식 현장에서는 혈중 유효농도 미달로 인한 치료 실패하거나 과다투여로 인한 부작용이 나타나는 등의 문제가 발생할 수 있다(Kim *et al.*, 1998). 이렇듯 연구 결과와 임상 적용 결과가 다르게 나타나는 한계점을 극복하기 위해 세계동물 보건기구(World Organisation for Animal Health, WOAH)에서는 질병 감수성 검사를 위한 실험에서 mimic natural pathway를 지향할 것을 권장하고 있다(WOAH, 2019). 이처럼 양식장 환경에 임상결과를 적용하는 과정에서 부작용과 실험적 오차를 줄이기 위해서는 자연 감염과 유사한 경로의 실험 설정이 필수적이다.

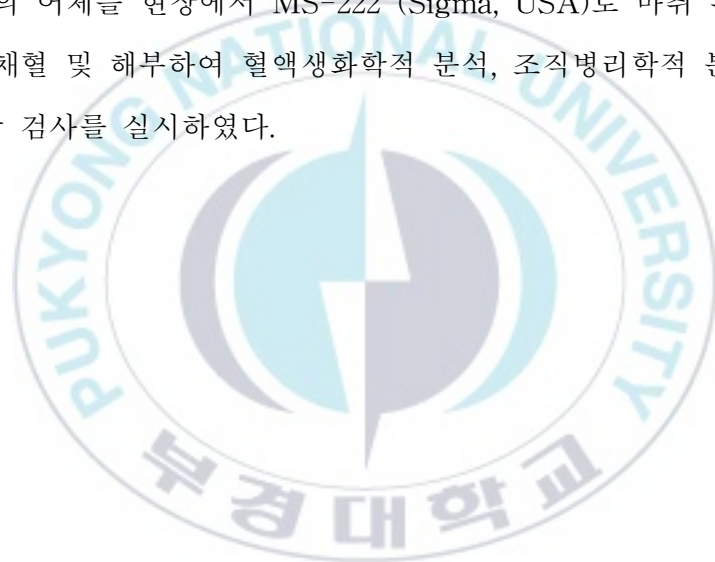
국내에서도 병원체의 자연 감염 특성에 대한 필요성이 대두되어 양식 넙치의 세균성 병원체에 대해서는 *Streptococcus* sp., *Vibrio* sp. 등을 대상으로 연구가 이루어지고 있다. Kim *et al.* (2020)의 연구에서 *Streptococcus parauberis*를 넙치에 복강, 근육, 정맥주사 3가지 방법으로 인위 감염하여 임상증상과 조직병리학적 증상을 비교 분석한 결과, 근육접종이 자연 감염 증상과 가장 유사하게 나타났으며 자연 감염 특성이 가장 잘 반영되어 복강접종보다 백신효능평가 및 병리학적 특성 연구에 효과적이라고 제안되었다. 또한 Kim *et al.* (2013)에서는 넙치 *Vibrio scophthalmi* 감염에 대해 자연 감염 특성과 관련된 자료의 부족으로 정확한 진단과 대책 수립에 혼선이 발생하여 자연 감염어와 인위 감염어의 병원성을 비교하는 연구가 진행되었다. 하지만 *E. piscicida*의 자연 감염 특성에 대한 연구는 극히 드물고(Kim *et al.*, 1992), 국내 어류 양식에서 중요한 어종인 넙치에 대해서는 *E. piscicida*가 주요 세균성 병원체임에도 불구하고 자연 감염어와 인위 감염어의 감염 특성에 관해 알려진 바 없다.

따라서 본 연구에서는 넙치 *E. piscicida*의 자연 감염과 인위 감염 특성 차이에 대한 고찰을 통해 넙치 에드워드증의 진단 및 예방에 대한 기초 자료를 모색하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 현장 샘플링

완도 지역에 위치한 육상수조식 넙치 양식장에서 2022년 4월부터 2022년 7월까지 총 4회 샘플링을 실시하였다. 매일 해당 어가에서 무작위로 채집한 12마리의 어체를 현장에서 MS-222 (Sigma, USA)로 마취 후 생체량을 측정하고 채혈 및 해부하여 혈액생화학적 분석, 조직병리학적 분석, 신장조직 내 세균 검사를 실시하였다.



2. 인위 감염 실험

인위 감염 실험에 사용한 어류는 부산 남구 수산물 직판장에서 질병에 노출이 없는 넙치를 구입하여 부경대학교 수산질병관리원의 500L 수조에 1주일간 순치 후 실험에 사용하였다. 실험 균주는 국립수산과학원 균주은행에서 분양받은 *Edwardsiella piscicida* (FP5060)를 TSB (Difco, USA)에 28°C에서 24시간 배양 후 10% glycerol에 현탁하여 실험 전까지 -80°C에 보관하였다. 이후 실험을 위해 해동한 균주를 10 fold로 희석 후 각 trial 농도 조건에 따라 0.1ml 씩 복강접종하였으며, control군의 경우 동일 용량의 멸균 PBS를 복강접종하였다.

2.1 Experimental trial 1

Experimental trial 1(E1)은 넙치에 대한 *E. piscicida*의 농도별 병원성을 확인하기 위한 목적으로 사육 온도는 23°C를 유지하였으며, 외부여과기를 설치하여 순환여과식 환경(2,800L/h)에서 실험을 진행하였다. E1은 control 군과 10^3 , 10^4 , 10^5 CFU/fish 농도의 *E. piscicida* 접종군으로 나누었으며, 500L 수조에 각 그룹당 20마리를 입식하여 총 4개의 수조와 80마리의 넙치가 사용되었다. 이후 1, 7, 14 dpc에 4마리씩 임상증상이 나타난 개체를 위주로 샘플링하였고, 샘플링 날짜 이외에도 탈장 증상이 나타난 개체는 즉시 샘플링하였다. 추가적으로 각 그룹당 10마리를 입식한 수조를 두어 14일간 누적 폐사량을 측정하였다. 샘플링 개체는 MS-222 (Sigma, USA)로 마취 후 생체량을 측정하고 채혈 및 해부하여 혈액생화학적 분석, 조직병리학적 분석, 조직 내 생균수 측정, PCR 분석을 실시하였다.

2.2 Experimental trial 2

Experimental trial 2(E2)는 넙치에 *E. piscicida* 10^4 CFU/fish 농도를 접종하였을 때 누적 폐사율을 측정하기 위한 목적으로 사육 온도는 23°C를 유지하였으며, 유수식 환경(1.2T/day, 1.7 cycle)에서 실험을 진행하였다. E2는 control군과 10^4 CFU/fish 농도의 접종군으로 나누었으며, 1.5 Ton 수조에 각 그룹당 54마리를 입식하여 총 2개의 수조와 108마리의 넙치가 사용되었다. 14 dpc에 군별로 생존한 20마리를 샘플링하였다. 샘플링 개체는 MS-222 (Sigma, USA)로 마취 후 생체량을 측정하고 채혈 및 해부하여 혈액생화학적 분석, 조직병리학적 분석, 조직 내 생균수 측정, PCR 분석을 실시하였다.

2.3 Experimental trial 3

Experimental trial 3(E3)은 *E. piscicida* 감염 개체를 수집하기 위한 목적으로 사육 온도는 23°C를 유지하였으며, 유수식 환경(1.2T/day, 1.7 cycle)에서 실험을 진행하였다. E3은 control군과 10^4 CFU/fish 농도의 *E. piscicida* 접종군으로 나누었으며, 1.5 Ton 수조에 각 그룹당 50마리를 입식하여 총 2개의 수조와 100마리의 넙치가 사용되었다. 3, 7, 14 dpc에 6마리씩 임상증상이 나타난 개체를 위주로 샘플링하였고, 샘플링 날짜 이외에도 탈장증상이 나타난 개체는 바로 샘플링하였다. 샘플링 개체는 MS-222 (Sigma, USA)로 마취 후 생체량을 측정하고 채혈 및 해부하여 혈액생화학적 분석, 조직병리학적 분석, 조직 내 생균수 측정, PCR 분석을 실시하였다.

3. 혈액생화학적 분석

채혈한 혈액을 원심분리(6500rpm, 15분, 4°C)하여 혈청을 분리하고 실험 전까지 -80°C에 보관하였다. 이후 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), blood urea nitrogen (BUN), glucose (GLU)를 건식 생화학 분석장치(FUJI DRI-CHEM 3000, Fuji film Co., Japan)를 사용하여 측정하였다.

4. 조직병리학적 분석

아가미, 심장, 간, 췌장, 두신, 비장, 위, 장 조직을 해부하여 10% Neutral buffered formalin (BBC biochemical, USA)에 24시간 고정하였고, 고정이 완료된 샘플은 수세 후 ethyl alcohol에 순차적으로 탈수하고, xylene 투명화를 거쳐 paraffin을 침투시켰다. 이후 paraffin 포매하여 microtome (Reichert-Jung 820, Leica)으로 4 μ m두께의 절편을 박절하고, Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색한 조직 슬라이드를 광학현미경(Olympus DX50, Japan)으로 관찰하였다.

조직병리학적 평가는 Bernet *et al.* (1999)의 scoring system을 참고하여 병변의 중요도에 따라 importance factor를 1에서 3으로 부여하고, 병변의 변화에 따라 무변화 0, 경도 2, 중등도 4, 심도 6으로 구분하여 점수를 수치화하였다(Table. 1).

Table. 1. Histopathological lesions by important factor

	Importance factor = 1	Importance factor = 2	Importance factor = 3
Gill	Aneurysm		
	Oedema	Hyperplasia	Necrosis
	Lamellae fusion	Inflammation	
	Hypertrophy		
Body kidney	Dilation of bowman's capsule	Tubular atrophy	Tubular necrosis
	Hyaline droplet	Glomerulonephritis	
	Hydrophic degeneration	Abscess	
Head kidney		Nuclear alteration	Necrosis
		Increased MMC	
		Hematopoiesis	
		Activation of RES	
Liver		Abscess	Necrosis
	Congestion	Nuclear alteration	
	Hepatocyte atrophy/hypertrophy	Increased MMC	
	Fat/glycogen deposition	Inflammation	
	Hyaline droplet	Abscess	
Intestine		Pericholangitis	
Stomach		Inflammation	-
	Gastric atrophy		
	Vacuolation	Submucosal oedema	
Spleen		Increased MMC	Necrosis
		Activation of RES	
		Inflammation	
		Abscess	
Heart		Increased MMC	Necrosis
		Epicarditis	
		Myocarditis	
Mesentary			
		Peritonitis	-

5. PCR 분석

Culture swab으로 채신의 세균을 분리하여 BHIA (BD Difco, USA)에 도말하여 28°C에서 배양하였고, 24시간 후 yesGTM Cell Tissue mini kit (GenesGen, Korea, Busan)를 사용하여 DNA를 추출하였다. PCR에 사용된 primer와 조건은 Table. 2와 같다. 현장 샘플링의 경우 27F/1492R primer set를 사용하여 PCR 진행하였고, 증폭된 산물을 NCBI (National Center for Biotechnology Information)에서 제공하는 BLAST를 이용해 동정하였다. 인위감염 실험의 경우 BF1/BR1 primer set를 사용하여 PCR 진행하였고, 증폭된 산물은 blue mango (BioD, Korea)로 염색하여 0.5% agarose gel 상에서 전기영동 후 Davinch-K Gel Imaging System (YOUNG IN Labplus Co. Ltd, Korea)으로 band의 크기를 확인하여 *E. piscicida* 감염 여부를 판단하였다.

Table. 2. PCR primers and conditions used in this study

Gene	Primer	Sequence (5' to 3')	Size(bp)	PCR condition	Reference
16s rRNA	27F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	1500	95℃ 10 min-(95℃ 30 sec, 53℃ 30 sec, 72℃ 1 min)×30 cycles-72℃ 5 min	Weisburg <i>et al.</i> (1991)
	1492R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT TC			
<i>gyrB</i>	BF1	GCA TGG AGA CCT TCA GCA AT	415	95℃ 10 min-(94℃ 1 min, 52℃ 30 sec, 72℃ 30 sec)×30 cycles-72℃ 10 min	Lan <i>et al.</i> (2008)
	BR1	GCG GAG ATT TTG CTC TTC TT			

6. 조직 내 Colony-Forming units

체신 0.01g을 무균적으로 채취한 후 멸균 PBS 1ml를 첨가하여 마쇄한 다음 10^1 - 10^3 까지 단계 희석하였다. 희석된 마쇄액은 BHIA (BD Difco, USA)에 농도별로 3반복 도말하여 28°C에서 배양하였고, 24시간 후 평판도 말법으로 조직 내 생균수를 측정하였다.

7. 통계학적 분석

SPSS statistics (IBM)을 이용하여 개체 당 조직병리학적 분석 결과를 합산한 Total 값을 기준으로 K-means Clustering을 실시하였고, 이후 군집별 평균값을 95%의 유의수준에서 one-way ANOVA의 사후분석으로 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)을 실시하여 평균값을 비교하였다.

Ⅲ. 결과

1. 생체량 측정 결과

현장 샘플링 결과 샘플링 시기에 따라 현장 샘플링 개체의 체장 및 어체 중이 유의적으로 증가하였으며, 인위 감염 실험 결과 체장이 유의적으로 감소하는 경향이 나타났다(Table. 3).



Table. 3. Standard length, weight, liver weight, HSI and CF values for sampled fish

		Standard length (cm)	Weight (g)	Liver weight (g)	HSI ¹ (%)	CF ²	
Natural sampling	April	24.31 ± 1.02 ^a	232.54 ± 8.14 ^a	2.69 ± 0.73 ^a	1.14 ± 0.23 ^a	1.62 ± 0.12 ^a	
	May	23.88 ± 1.87 ^a	331.34 ± 87.25 ^b	5.39 ± 2.30 ^b	1.68 ± 0.73 ^b	2.40 ± 0.41 ^c	
	June	27.10 ± 2.27 ^b	386.87 ± 120.92 ^{bc}	5.55 ± 2.10 ^b	1.45 ± 0.38 ^{ab}	1.91 ± 0.39 ^b	
	July	28.02 ± 2.91 ^b	453.75 ± 138.09 ^c	6.32 ± 2.50 ^b	1.43 ± 0.55 ^{ab}	1.97 ± 0.24 ^b	
Experimental sampling	1 dpi	26.53 ± 1.45 ^b	420.26 ± 84.07	6.34 ± 2.64	1.48 ± 0.45	2.24 ± 0.30	
	Trial 1	7 dpi	25.91 ± 0.98 ^b	380.48 ± 41.39	6.43 ± 2.13	1.68 ± 0.46	2.19 ± 0.18
		14 dpi	24.27 ± 1.08 ^a	414.97 ± 52.37	7.76 ± 2.45	1.84 ± 0.47	2.90 ± 0.27
	Trial 2	14 dpi	22.24 ± 1.85	222.12 ± 47.45	2.83 ± 1.54	1.26 ± 0.54	2.04 ± 0.40
		3 dpi	24.22 ± 3.42 ^b	232.29 ± 44.32	2.53 ± 0.76	1.07 ± 0.18	1.72 ± 0.48
	Trial 3	7 dpi	21.65 ± 1.39 ^a	219.44 ± 52.78	2.31 ± 1.12	1.01 ± 0.28	2.02 ± 0.26
		14 dpi	21.58 ± 1.44 ^a	209.00 ± 51.90	1.95 ± 0.95	0.91 ± 0.34	2.05 ± 0.30

All data is presented as means ± SD

¹ HSI = {Liver weight (g) / Standard length (cm)} x 100

² CF = {Weight (g) / Standard length (cm)³} x 100

2. 병원성

2.1. 유병률

(1) 현장 샘플링

양식장 현장에서 샘플링한 넙치 24마리 중 19마리에서 *E. piscicida* 양성으로 나타났으며, 유병률은 4월에 최저(16.7%), 7월에 최고(75%)로 나타났다(Table. 4).

Table. 4. Prevalence of *E. piscicida* in natural sampling

Natural sampling	Month	Total (n)	Positive (n)	Detection rate (%)
	April	12	2	16.7
	May	12	5	41.7
	Jun	12	3	25
	July	12	9	75
Total		24	19	79.2

(2) 인위 감염 실험

세균에 노출되지 않은 control 군에서는 어떤 세균도 검출되지 않았으며, 복강접종한 인위 감염 실험군에서 99마리 중 84마리(84.8%)에서 *E. piscicida*가 검출되었다. Trial 1의 1dpi에 *E. piscicida*가 검출되지 않았으나 이후 샘플링한 모든 개체(100%)에서 검출되었고, trial 2 또한 샘플링한 모든 개체(100%)에서 검출되었으며, trial 3에서는 38마리 중 35마리(92.1%)에서 검출되었다(Table. 5).

Table. 5. Prevalence of *E. piscicida* from artificial infected fish (number positive/number examined)

Experimental trials	Day post infection				
	1	3	7	8-13	14
1	0/12	-	12/12	9/9	8/8
2	-	-	-	-	20/20
3	-	5/6	5/6	6/6	19/20
Total	84/99 (84.8%)				

2.2. 폐사율

E. piscicida 10^4 CFU/fish 접종군의 폐사율은 E1에서 70%(Fig. 1), E2에서는 14dpi에 44.4%의 누적폐사율이 나타났으며(Fig. 2), E3에서는 실험기간 동안 샘플링 개체를 제외하고 폐사가 발생하지 않았다.

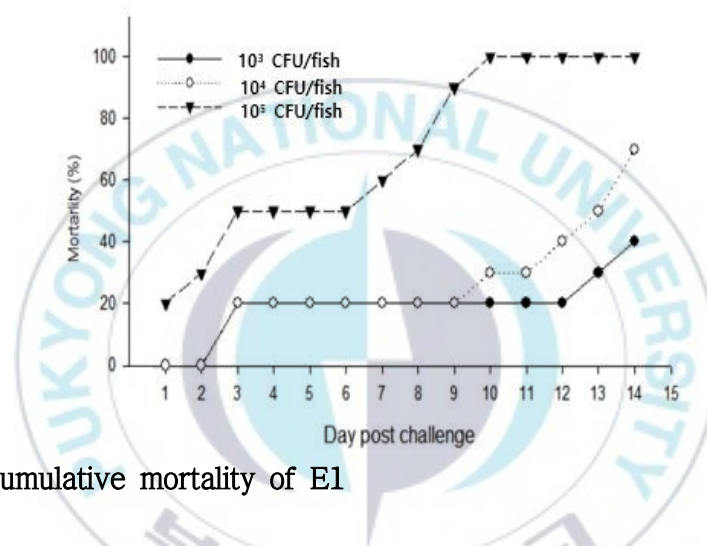


Fig. 1. Cumulative mortality of E1

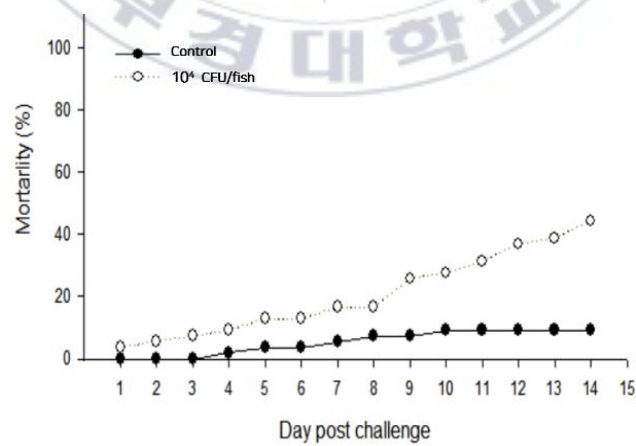


Fig. 2. Cumulative mortality of E2

3. 임상증상

(1) 현장 샘플링

E. piscicida 자연 감염 개체에서 비장 비대(Fig. 3-A), 신장 비대(Fig. 3-B), 복수(Fig. 3-C), 간 농양(Fig. 3-D), 탈장(Fig. 3-E), 안구돌출 및 안구출혈(Fig. 3-F)이 관찰되었다.

(2) 인위 감염 실험

인위 감염 실험 결과 세균에 노출되지 않은 control군은 임상증상이 나타나지 않았다. *E. piscicida* 감염 개체에서 7dpi부터 임상증상이 발생되었는데, 비장 비대(Fig. 4-A)와 연분홍빛 장액성 복수(Fig. 4-B)가 특징적으로 나타났다. 경우에 따라 복수가 있는 개체의 내부증상으로 비장의 캡슐을 둘러싼 장간막염(Fig. 4-C)과 간농양(Fig. 4-D)이 관찰되었다. 모든 trials에서 8dpi부터 탈장(Fig. 4-E) 개체가 출현했으며, 만성감염으로 접어들수록 복수에 악취가 나고, 위장관 muscularis의 충혈(Fig. 4-F)과 생식소에 점상출혈이 나타나기도 했다.

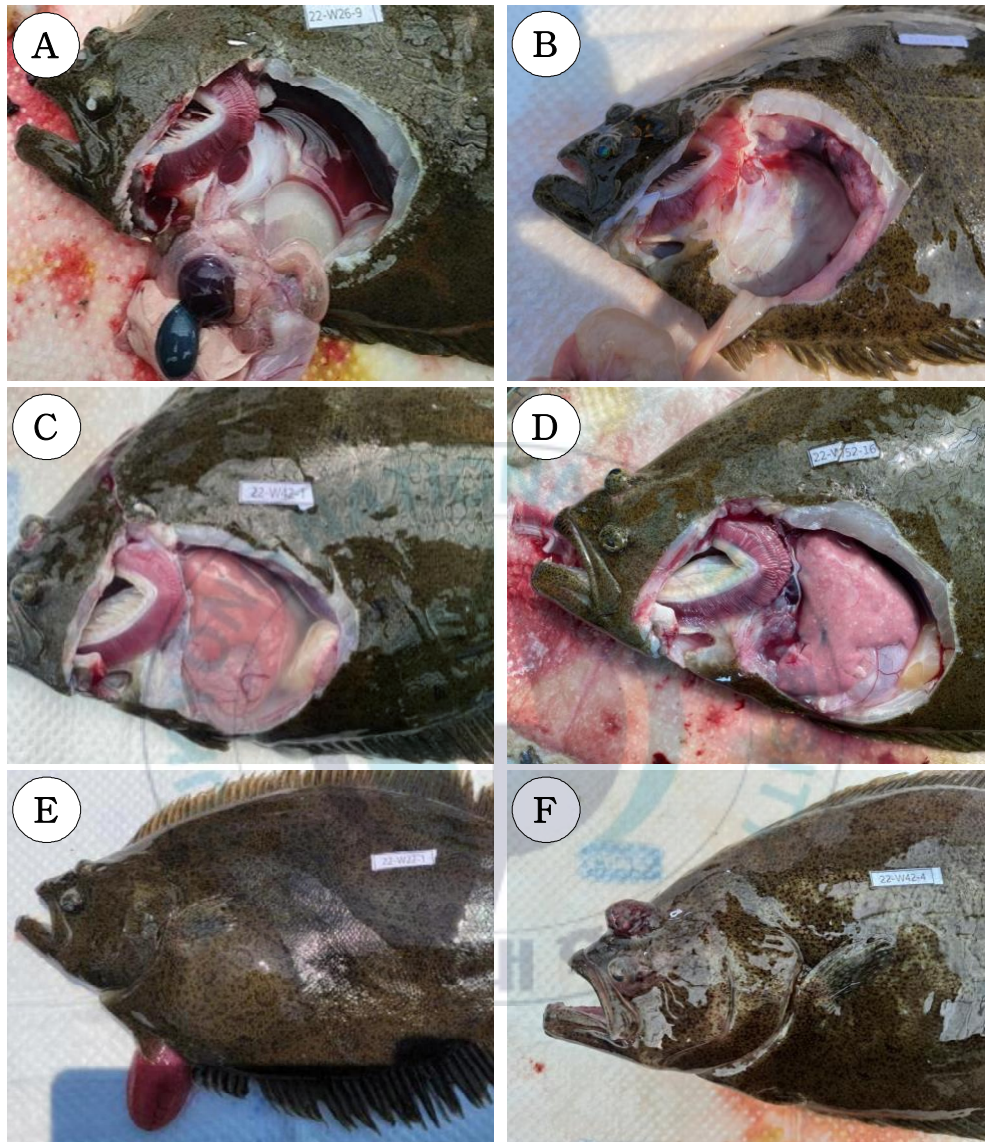


Fig. 3. Clinical signs from natural infected olive flounder. (A) Splenomegaly, (B) Nephromegaly, (C) Ascites, (D) Hepatic abscess, (E) Prolapsed rectum, (F) Exophthalmos and hemorrhage around eye

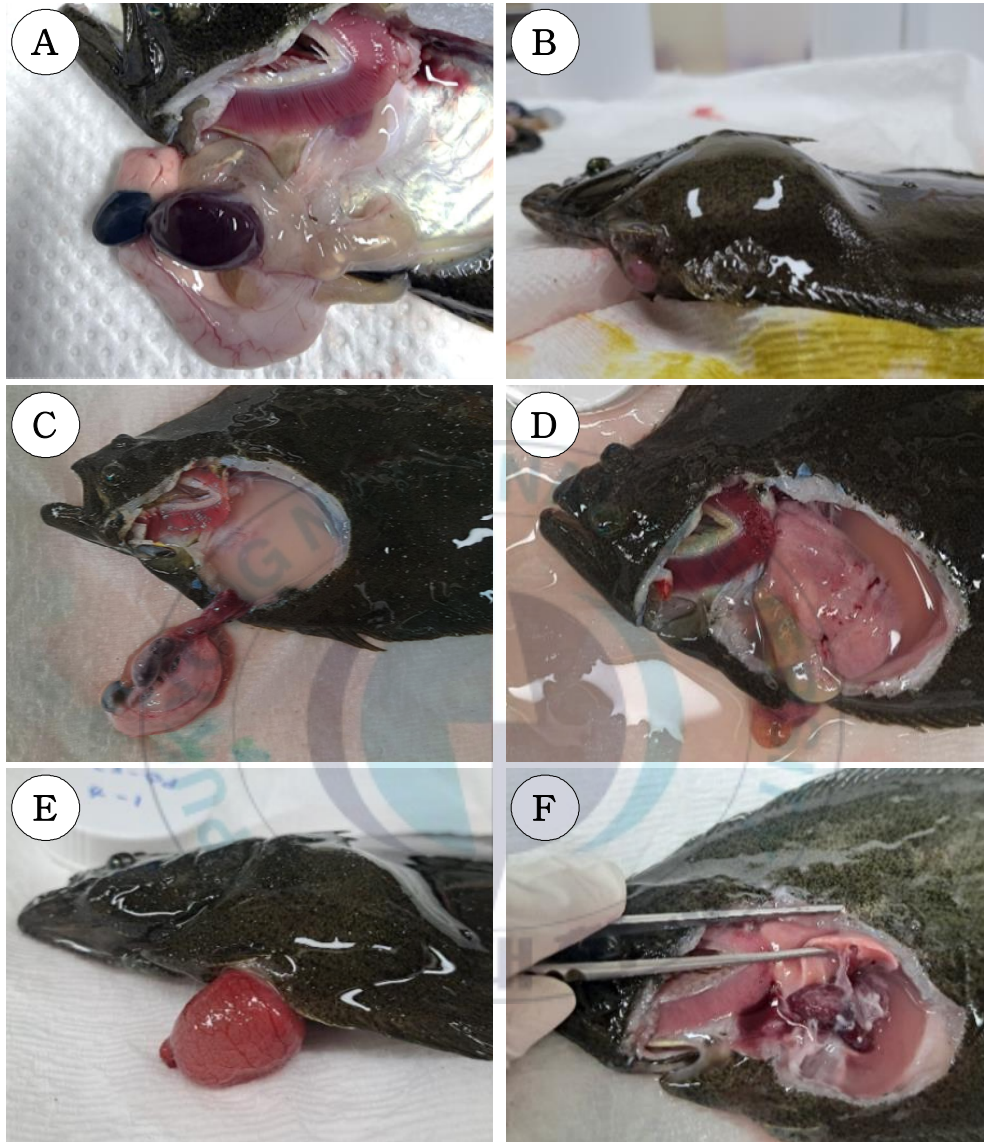


Fig. 4. Clinical signs from experimental infected olive flounder. (A) Spleenomegaly, (B) Ascites, (C) Peritonitis, (D) Hepatic abscess, (E) Prolapsed rectum, (F) Intestinal congestion

(2) 감염 조건에 따른 임상증상 비교

양식 현장에서의 자연 감염 개체와 실험실 환경에서의 인위 감염 개체의 임상증상 차이는 Table. 6과 같다. 자연 감염 개체에서 장간막염과 위장관 및 생식소 충혈은 관찰되지 않았고 간농양 57.9%(11/19), 안구돌출 52.6%(10/19), 비장비대 47.4%(9/19), 복수 42.1%(8/19), 신장비대 36.8%(7/19), 탈장 5.3%(1/19) 순으로 빈도가 높게 나타났다.

인위 감염 개체에서 안구돌출은 관찰되지 않았고 복수 48.8%(41/84), 장간막염 27.4%(23/84), 비장비대 26.2%(22/84), 탈장 15.5%(13/84), 간농양 13.1%(11/84), 신장비대 11.9%(10/84), 위장관 충혈 10.7%(9/84) 순으로 빈도가 높게 나타났다.

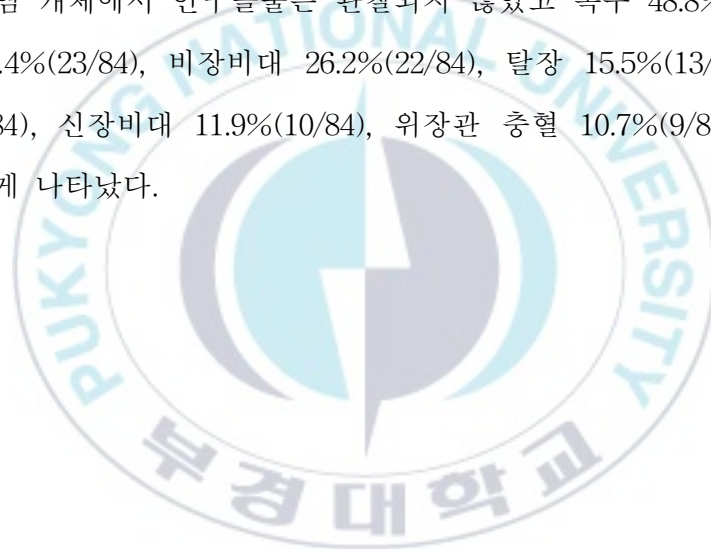


Table. 6. Clinical signs of olive flounder infected *E. piscicida*

	Splenomegaly	Nephromegaly	Ascites	Peritonitis	Exophthalmos	Hepatic abscess	Prolapsed rectum	Intestinal congestion
Natural infection (n=19)	9 (47.4%)	7 (36.8%)	8 (42.1%)	–	10 (52.6%)	11 (57.9%)	1 (5.3%)	–
Experimental infection (n=84)	22 (26.2%)	10 (11.9%)	41 (48.8%)	23 (27.4%)	–	11 (13.1%)	13 (15.5%)	9 (10.7%)

4. 조직병리학적 분석

(1) 현장 샘플링

현장 샘플링 결과 *E. piscicida* 감염 개체 대부분이 급성 면역반응으로 비장의 ellipsoid 비후 소견(Fig. 5-A)이 나타났고, 간혹 ellipsoid 주변으로 임파구와 MMC (Melanomacrophage center)가 침윤되었다(Fig. 5-B). 임상적으로 간 농양 소견을 보인 개체에서는 정상 간 조직(Fig. 5-C)에 비해 간장 내 실질조직인 간세포의 핵농축, 액화괴사로 인한 세포 파편이 관찰되었다(Fig. 5-D). 신장에서는 체신과 두신세포의 조혈조직에서 대식세포 활성화, 광범위한 농양이 관찰되었다(Fig. 5-E). 비염증성 병변으로는 위 점막하층의 부종 소견이 나타났다(Fig. 5-F).

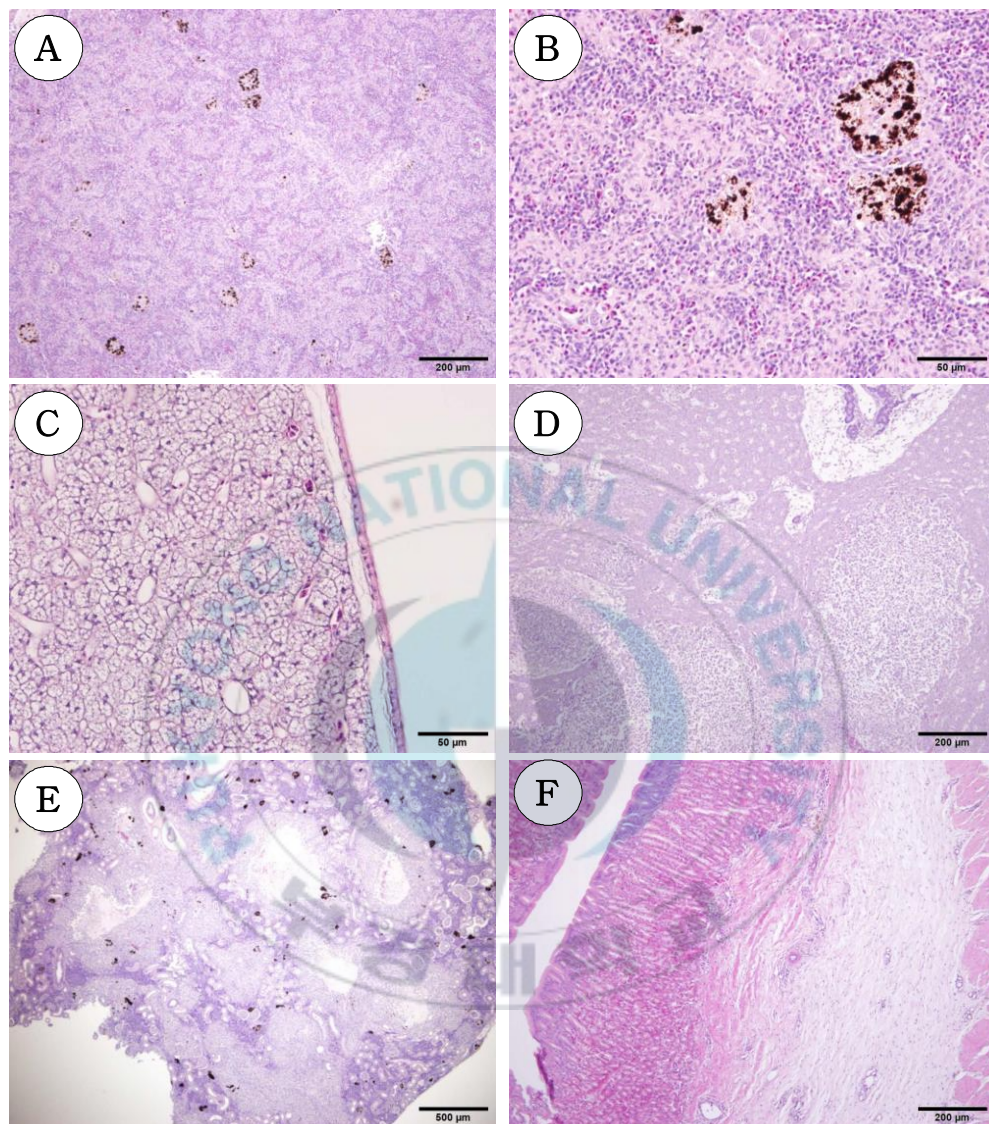
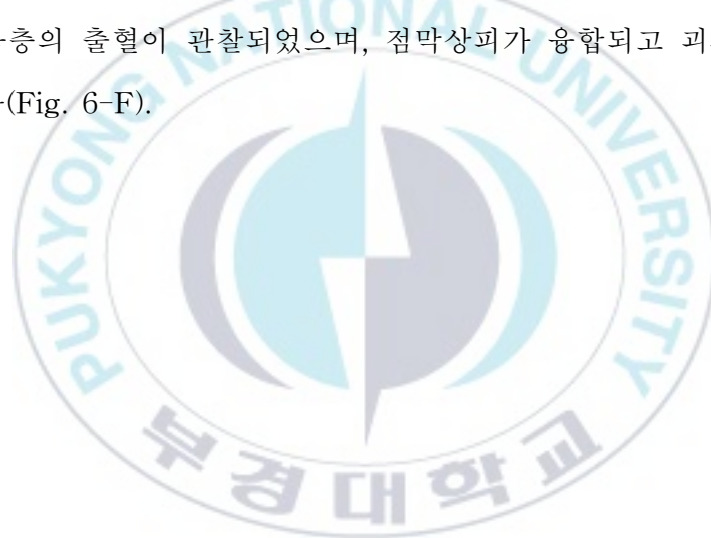


Fig. 5. Histopathological changes from natural infected olive flounder(*Paralichthys olivaceus*). (A) Ellipsoid activation, (B) Splenitis, (C) Normal liver, (D) Hepatic abscess, (E) Renal abscess, (F) Stomach submucosal oedema

(2) 인위 감염 실험

인위 감염 실험 결과 1dpi에는 병원체 감염으로 인한 조직병리학적 증상이 나타나지 않았다. 3dpi부터는 병원체 침투로 인한 급성 반응으로 대식세포 활성화로 인한 비장의 ellipsoid 비후 및 임파구 침윤 소견이 나타났다(Fig. 6-A). 7dpi 이후에는 임상증상으로 복수가 관찰된 일부 개체에서 장간막염(Fig. 6-B), 간막염(Fig. 6-C), 간농양(Fig. 6-D), 신장의 대식세포 활성화 및 농양(Fig. 6-E) 소견이 나타났다. 또한 탈장이 관찰된 개체에서는 장 근육층의 출혈이 관찰되었으며, 점막상피가 융합되고 괴사된 소견이 관찰되었다(Fig. 6-F).



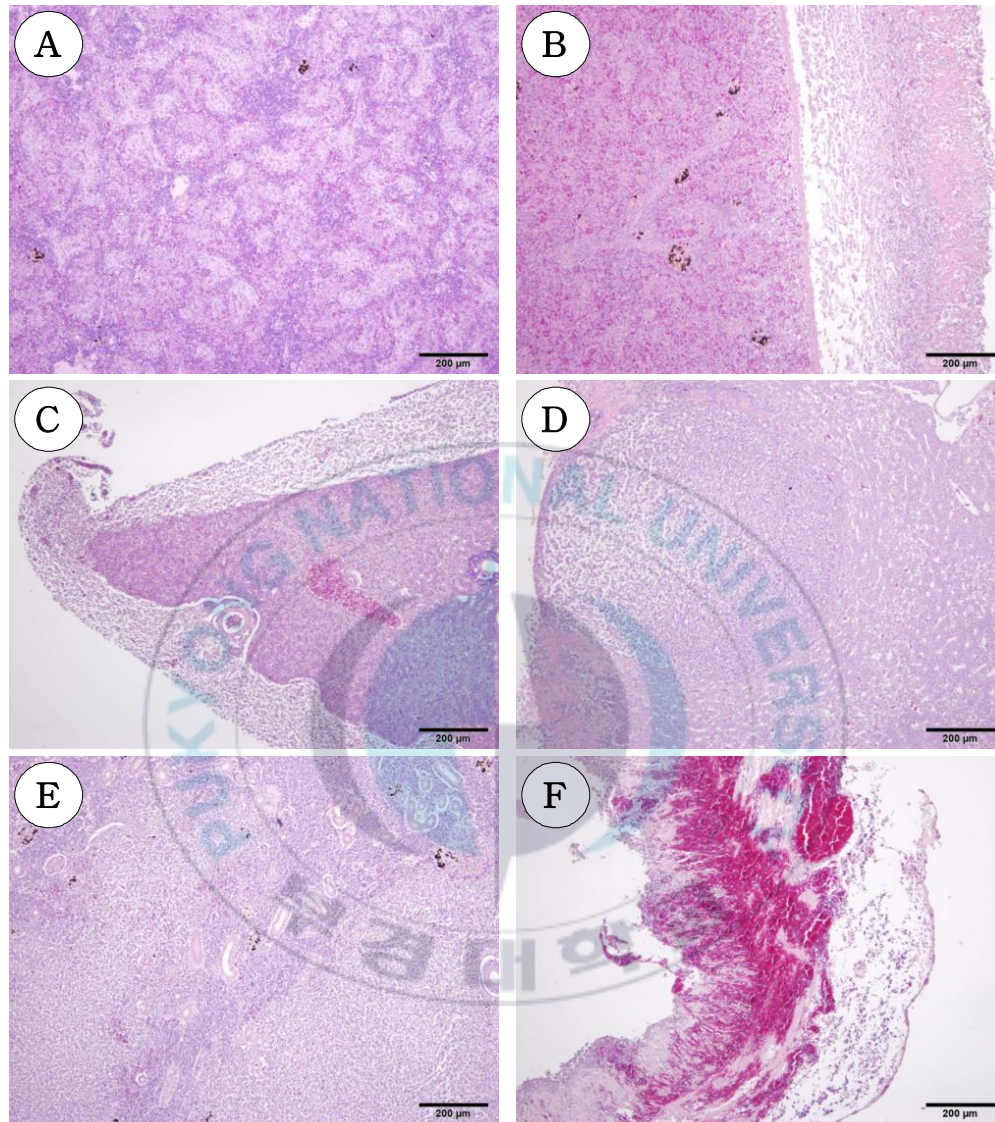


Fig. 6. Histopathological changes from experimental infected olive flounder(*Paralichthys olivaceus*). (A) Spleenitis, (B) Peritonitis at spleen, (C) Peritonitis at liver, (D) Hepatic abscess, (E) Renal abscess, (F) Intestinal hemorrhage and congestion

(2) 감염 조건에 따른 조직병리학적 비교

양식 현장에서의 자연 감염 개체와 실험실 환경에서의 인위 감염 개체의 조직병리학적 차이는 Table. 7과 같다. 자연 감염과 인위 감염에서 각각 간 농양 소견 31.6%(11/19), 34.7%(31/98), 비장의 엘립소이드 비후 소견 94.7%(18/19), 98.0%(96/98) 및 임파구 활성화 소견 68.4%(13/19), 73.5%(72/98)로 유사한 빈도가 나타났다. 하지만 신장 농양 소견은 57.9%(11/19) 31.6(31/98), 로 자연 감염에서 높은 빈도로 나타났으며, 위 submucosa 부종 소견은 인위 감염에서 더 높은 빈도로 나타났다. 또한 자연 감염에서는 나타나지 않은 장간막염 및 간막염 소견이 인위 감염에서 특징적으로 나타났는데 간막염 소견이 나타난 개체 중 93.2%(41/44)의 개체에서 위장관 및 비장으로 확산된 장간막염 소견이 나타났다.

Table. 7. Histopathological changes of olive flounder(number positive) after infection with *E. piscicida*. Number of plus signs indicates severity of lesion: + = mild, ++ = moderate, +++ = severe.

	Peritonitis	Hepatic abscess	Renal abscess	Stomach submucosal oedema	Intestinal congestion	Ellipsoid activation	Splenitis
Natural infection (n=19)	-	+ 7 ++ 2 +++ 2	+ 1 ++ 2 +++ 3	+ 4 ++ 1	++ 2	+ 2 ++ 5 +++ 11	+ 5 ++ 8
Experimental infection (n=84)	+ 16 ++ 10 +++ 18	+ 14 ++ 7 +++ 10	+ 17 ++ 9 +++ 8	+ 23 ++ 25 +++ 3	++ 8 +++ 9	+ 22 ++ 31 +++ 28	+ 44 ++ 14

5. K-means 군집 분석

인위 감염 실험에서 조직병리학적 분석 결과의 Total 점수를 기준으로 37점까지 N (Normal), 59점까지 LI (Light infection), 117점까지 MI (Moderate infaction), 118점 이상 SI (Severe infection)의 네 군집으로 분류하였으며(Fig. 7), 감염 정도에 따른 군집의 조직 내 생균수가 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 8). *E. piscicida*가 검출된 98마리 중 N 군집 3마리, LI 군집 11마리, MI 군집 54마리, S 군집 16마리로 나타났다. 동일한 기준을 현장 샘플링에도 적용한 결과 *E. piscicida*가 검출된 19마리 중 N 군집에 속하는 개체는 없었으며, LI 군집 2마리, MI 군집 16마리, S 군집 1마리로 나타났다.

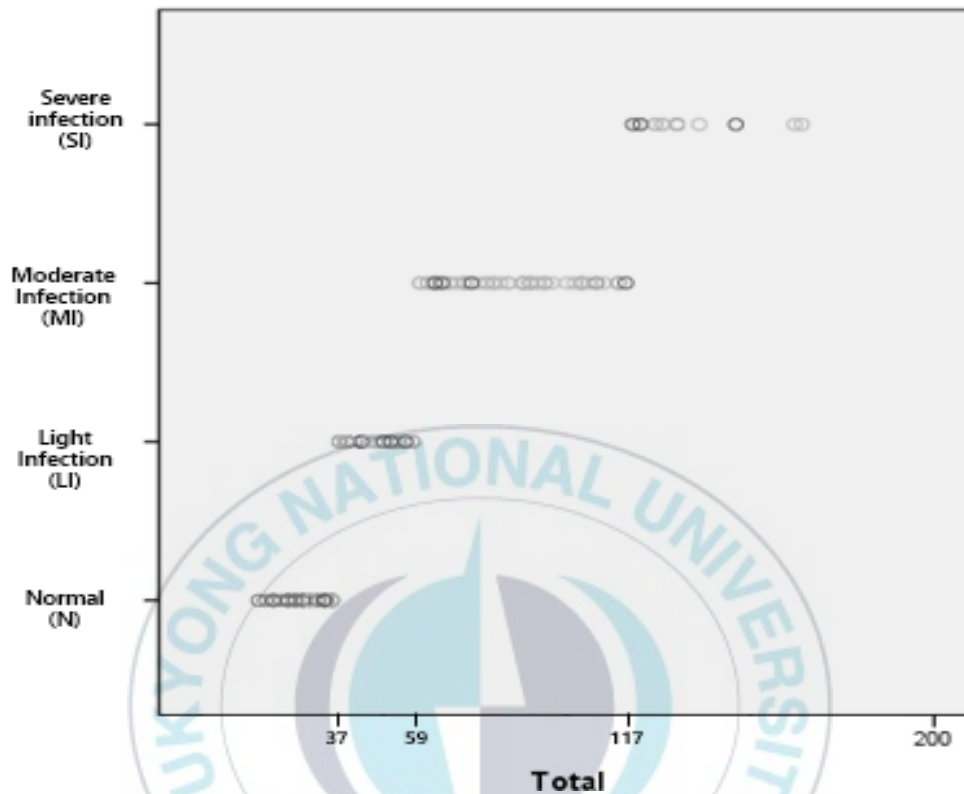


Fig. 7. Groups divided into histopathological total score by K-means clustering

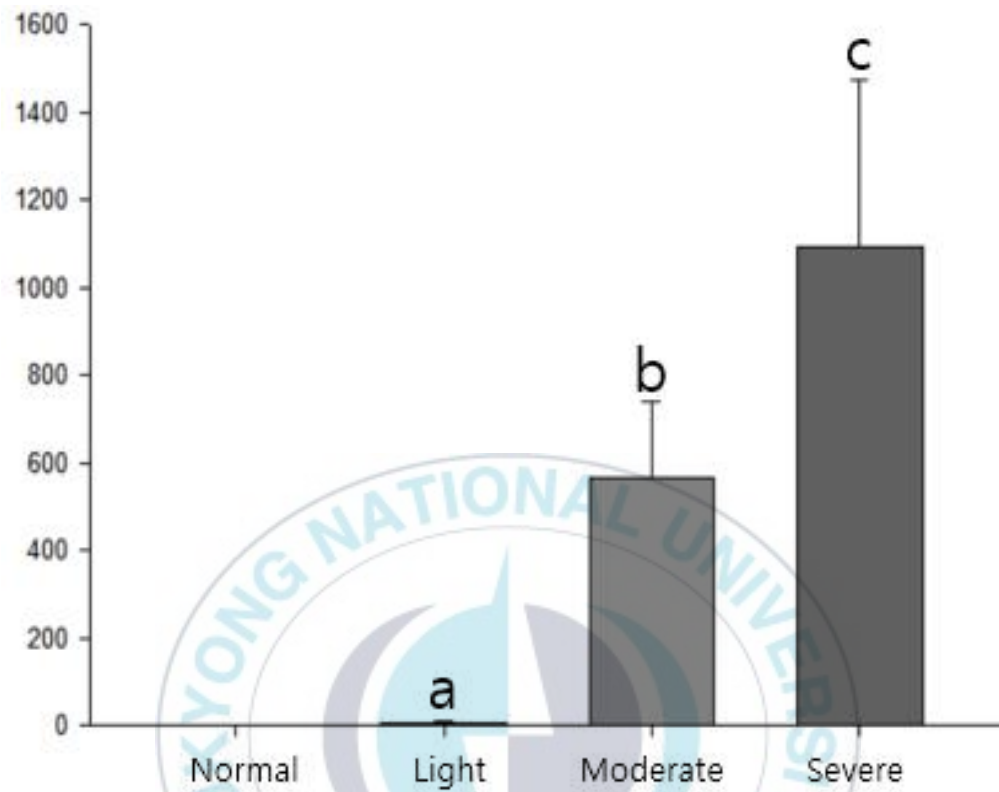


Fig. 8. Colony function units (CFU) in kidney of experiental infected olive flounder by infection level

6. 혈액생화학적 분석

GOT/AST 수치는 인위 감염에서 각 군집에 따라 24.02 ± 11.76 U/L, 27.75 ± 18.29 U/L, 58.31 ± 89.26 U/L, 89.94 ± 112.07 U/L로 감염 정도에 따라 유의적으로 증가하였고, 모든 구간에서 자연 감염보다 평균이 낮게 나타났다(Fig. 9).

GPT/ALT 수치는 인위 감염에서 각 군집에 따라 8.56 ± 2.7 U/L, 8.25 ± 3.15 U/L, 12.58 ± 21.16 U/L, 16.06 ± 19.31 U/L로 감염 정도에 따라 증가하는 경향이 나타났으나 Normal과 Mild infection 군집 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았으며, 모든 구간에서 자연 감염보다 평균이 높게 나타났다(Fig. 10)

BUN 수치는 인위감염에서 각 군집에 따라 3.44 ± 1.65 mg/dL, 3.8 ± 2.1 mg/dL, 4.79 ± 2.44 mg/dL, 5.93 ± 2 mg/dL로 감염 정도에 따라 유의적으로 증가하였고, 모든 구간에서 자연 감염보다 평균이 낮게 나타났다(Fig. 11).

GLU 수치는 각 군집에 따라 20.46 ± 8.3 mg/dL, 26.9 ± 14.65 mg/dL, 16.36 ± 11.62 mg/dL, 14.31 ± 13.09 mg/dL로 MI 이후에 유의적으로 감소하는 경향이 나타났으며, 자연 감염과 유의적인 상관관계는 나타나지 않았다(Fig. 12).

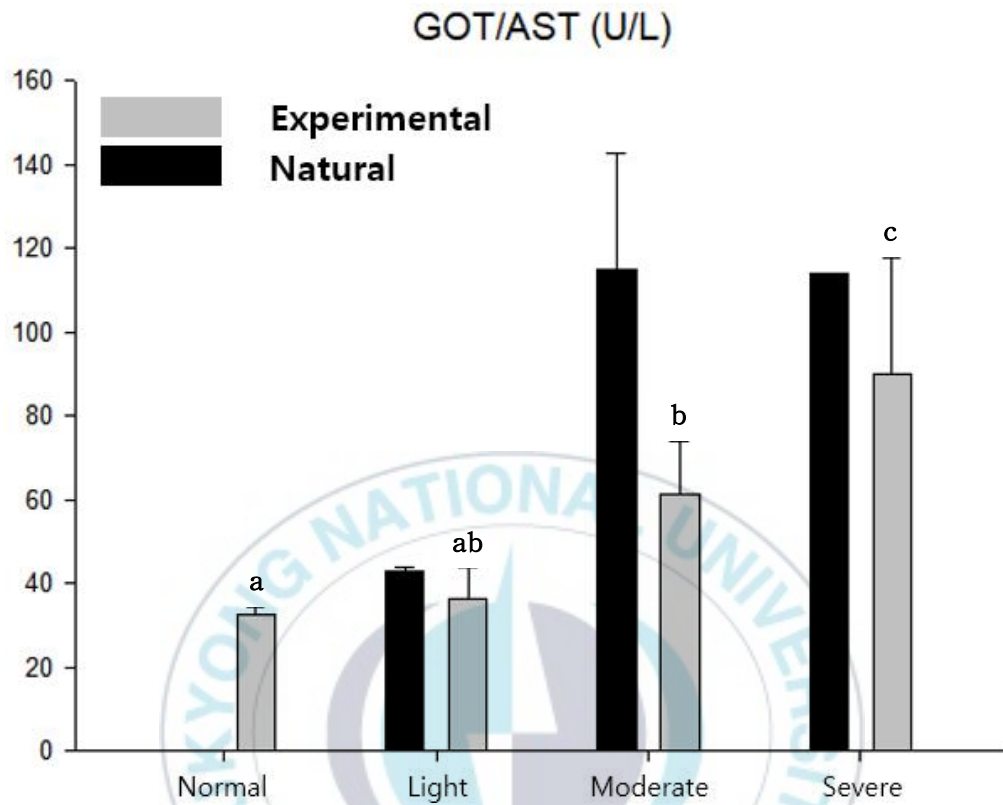


Fig. 9. Asparate aminotransferase (GOT/AST) values in experimental or natural infected olive flounder. Values are means $\pm$ SD ($P < .05$)

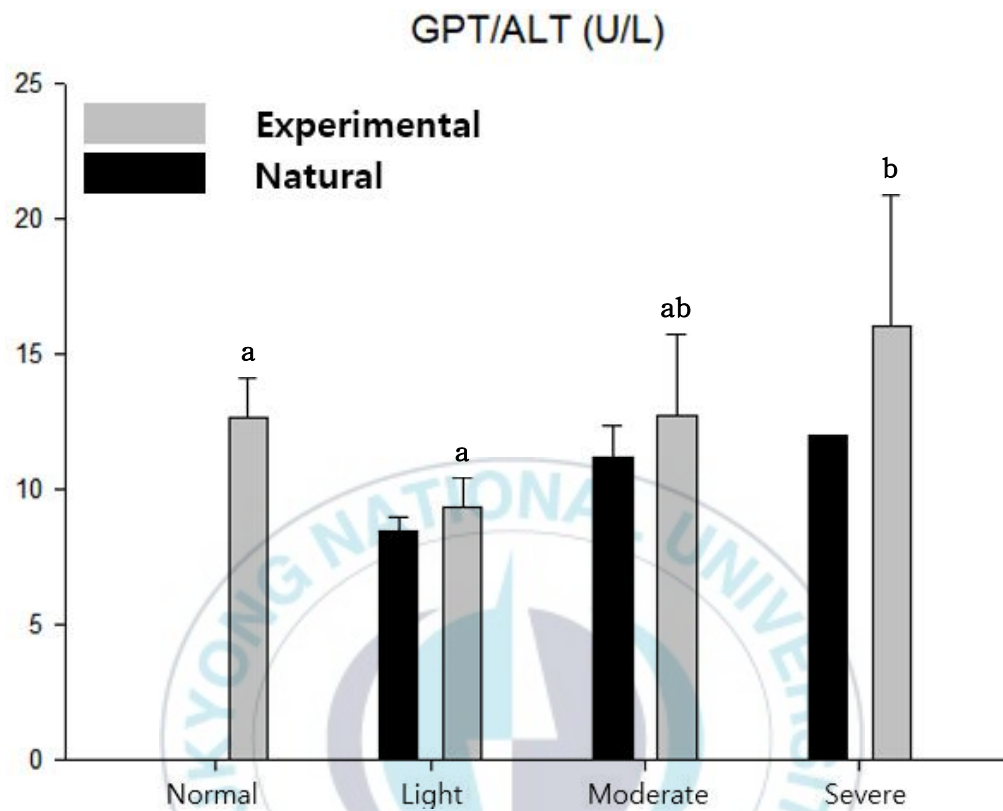


Fig. 10. Alanine aminotransferase (GPT/ALT) values in experimental or natural infected olive flounder. Values are means $\pm$ SD ($P < .05$)

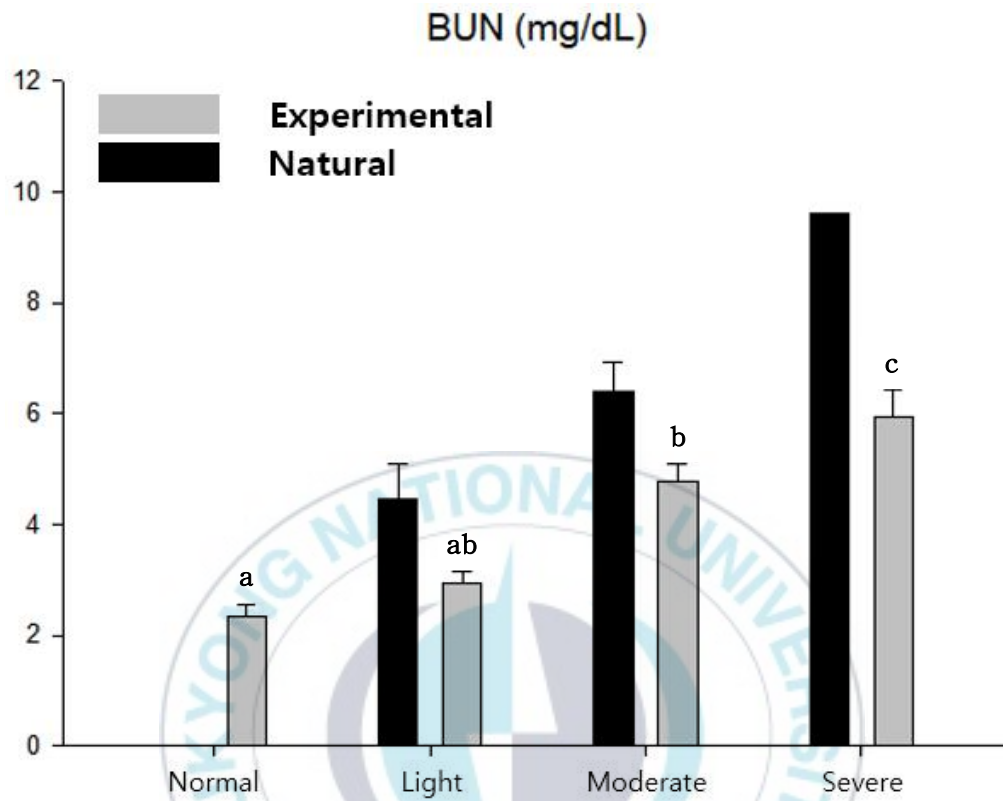


Fig. 11. Blood urea nitrogen (BUN) values in experimental or natural infected olive flounder. Values are means $\pm$ SD ($P < .05$)

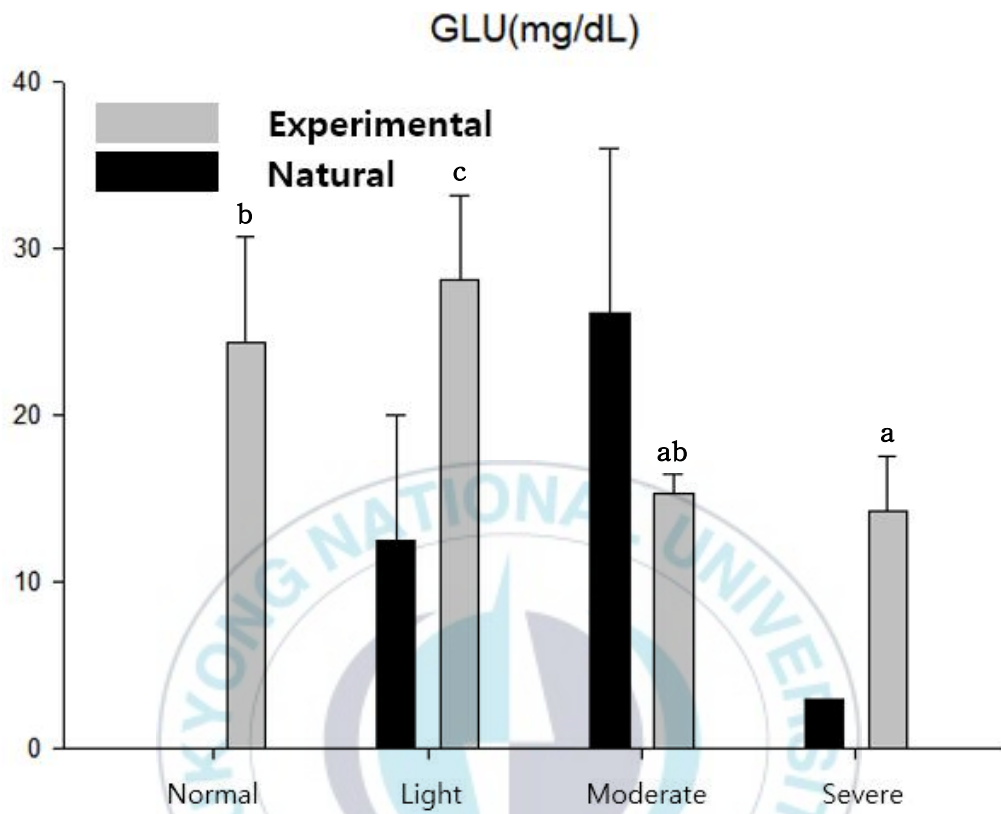


Fig. 12. Glucose (GLU) values in experimental or natural infected olive flounder. Values are means $\pm$ SD ($P < .05$)

IV. 고찰

본 연구는 넙치에 대해 *E. piscicida*의 자연 감염과 복강점종을 통한 인위 감염에서 나타나는 증상의 특성 차이에 관한 것으로, *E. piscicida*는 수중이나 장내에 상재하면서 체외 상처나 면역력 저하, 불균형한 환경조건(Woo *et al.*, 2011)과 같이 숙주가 민감한 상태에서 감염을 일으키는 기회성 병원체이며, 숙주 세포 내에서 증식하다가 숙주가 국소 감염을 방어할 수 없는 상태가 되면 혈액과 림프에 도달하여 전신으로 확산된다(Leung *et al.*, 2012). 본 연구의 감염 개체에서 나타난 복부팽만 및 복수, 탈장, 간농양, 비장비대, 신장비대를 포함한 임상증상들은 여러 연구에서 보고된 바와 일치한다(Miyazaki and Kaige, 1985; Park *et al.*, 2012; Kwon and Jung, 2012; Matsuyama *et al.*, 2005). 조직병리학적 변화로는 7 dpi 이후에 간과 신장의 농양 소견이 특징적으로 관찰되었으며, 이는 선행연구에서의 결과와 일치한다(Miyazaki and Kaige, 1985; Kusuda and Kawai, 1998).

어류에서 *E. piscicida* 감염으로 인한 염증은 화농성 염증과 macrophage를 동반한 육아종성 염증의 2가지 유형으로 구분되며, 넙치의 경우 간 실질조직과 신장의 조혈조직에 농양이 생기는 화농성 염증이 나타난다고 알려져 있다(Miyazaki & Kaige, 1985). 농양 병소의 호중구는 식세포 작용이 활발하여 포식된 세균이 관찰되기도 하는데 *E. piscicida*는 식세포 내에서 증식이 가능하며(Srinivasa, 2001), 이러한 농양의 생성은 광범위한 복막염으로의 확산을 저지하고 국소화하려는 방어기전의 결과물이다(Thomsen *et al.*, 2007; Rahimian *et al.*, 2004). Darwish *et al.* (2000)에서는 피부의 상

처를 통해 *E. piscicida*를 감염시킨 차넬메기에서 간 농양이 간 중심부에서 먼저 생성된 후 간막으로 확산된 결과가 보고되었다. 특히 간 조직은 전신과 문맥의 혈액순환을 받는다는 특성상 혈류로부터의 감염에 취약하기 때문에 패혈증으로 인해 농양병소가 형성된다(Hau *et al.*, 1984). *Edwardsiella* sp.로 인한 패혈증의 가장 큰 특징은 간, 신장 및 근육조직으로 빠르게 확장되는 섬유성 복막염이다(Miyazaki & Egusa, 1976). 본 연구에서 자연 감염어의 경우 장간막염이 발생하지 않고 간 실질세포 내부에서 다발성 농양이 형성된 반면, 인위 감염어의 경우 복수 혹은 복막염으로 인한 장간막염이 선행된 이후 간 실질세포로 농양이 확산되는 특징적인 차이가 발생했다. 복강접종을 통한 세균 감염의 특성상 혈액성 면역물질들이 복강으로 유출되어 장내 누출이 발생하게 되는데, 이때 간을 둘러싼 Kupfer cell은 실질 조직을 보호하기 때문에 감염에 의한 농양이 빠르게 일어나지 않을 수 있다(Akhondi and Sabih, 2019). 한편 인위에서 간 농양 발생 이후 패혈증이 발생하는 전이성 감염의 빈도는 8-10%로 알려져 있는데, 본 연구에서는 신장으로 농양이 확산된 빈도가 30% 이상으로 매우 높게 나타났으며 인위 감염어가 자연 감염어보다 드물게 관찰되었다. 이러한 결과로 *E. piscicida*가 자연 감염될 경우 복강접종을 통한 인위감염보다 패혈증으로 인해 간, 신장 등 내부조직의 실질 세포에 더 큰 손상을 유발한다는 것을 알 수 있다.

인간 및 가축과는 달리 변온동물인 어류에서는 혈액 성분의 정상 수치가 표준화되어 있지 않지만, 생리적 상태를 손쉽게 판단할 수 있기 때문에 어류의 병원체 감염, 독성물질 노출, 영양 불균형 등의 연구에서 생체지표로서 혈액생화학적 분석이 수행되고 있다(Jung *et al.*, 2006; Naveed Nabi *et al.*, 2022). AST와 ALT는 간 기능을 대표하는 혈장 전이효소로서 간 기능장애로 조직이 손상되었을 때 혈중으로 유출되며(Park and Oh, 2018),

AST는 간 외에도 심장, 근육 등의 조직손상으로 인한 스트레스 지표로 사용된다(Pan *et al.*, 2003). 어류의 간은 탄수화물, 단백질, 지방, 빌리루빈, 비타민 및 무기질 등 여러 물질의 대사기능을 수행하는 항상성 조절 기관으로(Kumar *et al.*, 2004; Sheth and Bankey, 2001), 간 세포가 구조적 손상을 받게 되면 대사물질 합성 및 운송기능이 저하되어 간 기능 장애가 발생할 수 있다(McCuskey *et al.*, 2004). 간 기능 장애로 인한 손상 시 AST보다 ALT의 변화율이 더 크게 나타나기 때문에 ALT:AST ratio가 통합적 손상 지표로 사용되는데(Qiao *et al.*, 2012) 본 연구에서 자연 감염이 인위 감염에 비해 AST 수치가 높고 ALT가 낮게 나타난 것은 더 큰 간 손상을 의미하며, 조직병리학적 결과에서 나타난 결과를 뒷받침할 수 있다.

혈청 내 BUN은 신장 기능과 관련된 효소이며(Nelson *et al.*, 1999), 인의에서 신장기능장애는 세균으로 인한 합병증 환자의 사망을 예측하는 지표로 인식되고 있다(Navasa and Rodés, 2004). 세균 감염 시 사이토카인 등 염증물질의 방출로 혈관이 확장되고 신장 혈류가 감소하는데, 이러한 메커니즘이 신장기능장애를 초래할 수 있다(Kim *et al.*, 2009). 세균 감염 시 BUN 수치의 증가는 병원체가 혈류를 통해 신장으로 운반된 것을 의미하며(Saito and Hasegawa, 2003), 본 연구에서도 감염 정도에 따라 BUN 수치가 증가한 것은 혈액을 통해 세균이 이동한 패혈증의 결과로서 신장 내 실질조직이 손상되어 신장 기능이 악화되었다고 사료된다. AST와 마찬가지로 BUN 수치 또한 자연 감염이 인위 감염에 비해 높게 나타나 패혈증으로 인한 신장 손상이 더 크다는 것을 의미한다.

어류가 스트레스 자극을 받게 되면 1차적으로 cortisol의 분비가 일어나고 2차적으로 간에 저장된 glycogen의 에너지원 소모가 수반되는데, 이때 간에 저장된 glycogen이 glucose로 분해되어(glycogenolysis) 혈중 glucose 농도가 높아진다(Thomas and Robertson, 1991). 또한 세균 감염 시에는

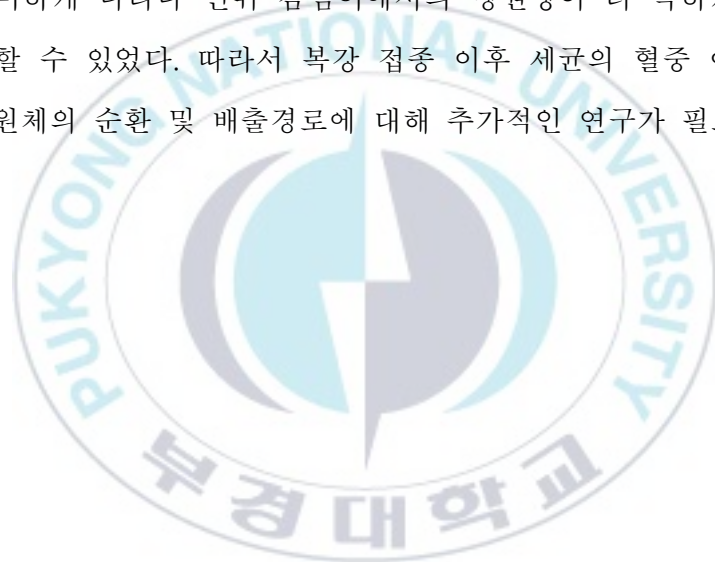
병원체의 성장과 증식을 위해 숙주 내에서 영양분을 섭취하기 때문에 숙주의 영양소 고갈은 세균이 숙주 안에 있다는 단서로 감지될 수 있다(Leung *et al.*, 2012; Harikrishnan *et al.*, 2003). 따라서 본 연구에서 감염 초기 glucose 수치 증가는 감염으로 인한 대체 에너지 소비로 보여지며, 이후 간 손상 혹은 스트레스로 인한 섭이 장애로 glucose 수치가 급격하게 감소하였다고 사료된다.

한편 *E. piscicida*의 감염경로를 규명하기 위해 틸라피아, 차넬메기, 뱀장어 등 담수어에 대해서는 다양한 연구가 진행 중이다. Kim *et al.* (1992)은 틸라피아의 장을 과산화수소로 자극시킨 후 경구감염 시킨 결과 패혈증으로 인한 전신감염이 발생하여 자연 감염어와 유사한 증상이 나타났으며, Wiedenmayer *et al.* (2006)은 *E. piscicida* 감염어 혹은 캐리어로부터 shedding된 세균에 감염되는 co-habitation이 자연 감염과 가장 유사한 경로를 따른다고 보고하였다. *E. piscicida*의 어체 내 침입은 피부, 아가미, 장관을 통해 이루어진다고 추정되지만(Ling *et al.*, 2001), 피부의 물리적 손상 여부가 침지감염에 미치는 영향은 크지 않았기 때문에 감염경로가 피부일 확률은 극히 낮으며, 경구감염은 장 점액의 면역 작용으로 병원체 침투가 제한되어 쉽게 발병하지 않아(Choi *et al.*, 2011) 병원성 재현실험에 있어서는 가장 일관된 결과를 제공하는 복강접종을 통한 감염이 이루어지고 있다(Reichley, 2017). 본 연구에서 넙치에 대한 *E. piscicida*의 복강접종은 비장 및 신장의 대식세포 활성화와 농양 소견이 자연 감염과 유사하지만 복막염 형성으로 인해 자연 감염에서 나타나는 패혈증의 영향이 미미한 것을 알 수 있었다. 다만 양식장에서 샘플링 한 자연감염어의 조직 내 생균수를 정량 비교하지 못한 한계점이 있으며, 차후 복강 접종 후 혈액 배양, 정맥 내 접종을 통해 세균의 혈중 이동을 확인하여 감염 후 병원체의 순환 및 배출경로에 대해 더 연구해 볼 필요가 있다고 생각된다.

V. 요약

국내 최대 양식 어종 중 하나인 넙치(*Paralichthys olivaceus*)에서 연중 발생하는 세균성 병원체 중 하나인 에드워드증은 *E. piscicida*에 의해 발병하며, 혼합 감염으로 인해 매년 피해가 가중되고 있다. 이러한 피해를 줄이기 위해 개발된 항생제, 백신, 면역유도제 등의 약물들이 개발되었지만, 양식장 현장에 임상 적용 시 실험적 오차가 발생하는 부작용 사례가 나타나고 있어 병원체의 자연 감염 특성에 대한 연구 필요성이 대두되고 있다. 따라서 본 연구에서는 넙치에 대한 *E. piscicida*의 자연 감염과 인위 감염의 특성 차이를 알아보려고 하였다. 자연 감염 개체는 완도 소재의 넙치 양식장에서 4개월간 샘플링을 통해 수집하였고, 인위 감염 개체는 복강 접종 후 14일간 실험을 수행하여 조직병리학적, 혈액생화학적 분석을 실시하였다. 그 결과 자연감염 개체에서는 인위감염 개체에서 나타나지 않았던 안구돌출 증상이 특이적으로 관찰된 반면, 인위감염 개체에서 나타났던 장간막염과 위장관 충혈 증상은 관찰되지 않았다. 특히 조직병리학적 결과 장간막염이 나타나지 않았던 자연감염 개체에서는 간 농양이 실질 세포 내부에서부터 다발적으로 생성된 반면, 인위감염 개체에서는 장간막염이 선행되어 간이나 비장의 실질 세포의 괴사는 거의 발생하지 않았다. 이러한 결과는 복강접종 시 복강 내 주입된 세균이 전신으로 확산되는 패혈증을 막기 위해 복막이나 장벽 혈관으로부터 혈액 성분이 유출되어 면역반응이 발생했기 때문이다. ALT:AST ratio 또한 자연 감염에서 더 높게 나타나 더 큰 간손상을 의미한다. 인위에서 간 농양 발생 이후 패혈증으로 인한 전이성 농양의 발생 빈도는 8-10%로 알려져 있는데, 본 연구에서는 간 농양이 신장에서도 확산되어 관찰된 빈도가 30% 이상으로 매우 높게 나타났으며 신

장기능을 대표하는 BUN 수치가 감염 정도에 따라 증가한 것은 혈액을 통해 세균이 이동한 패혈증의 결과로서 신장 내 실질 조직이 손상되어 신장 기능이 악화되었다고 사료된다. 한편 *E. piscicida*의 감염경로를 규명하기 위한 다양한 연구가 담수어에 대해서는 활발히 진행중이지만 넙치에 대해서는 연구가 미흡한 실정으로 병원성 재현 실험에 있어서는 가장 일관된 결과를 제공하는 복강 접종을 통한 감염이 이루어지고 있다. 하지만 본 연구에서 넙치에 대한 *E. piscicida* 복강접종은 자연 감염에 비해 패혈증의 영향이 미미하게 나타나 인위 감염어에서의 병원성이 더 약하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 복강 접종 이후 세균의 혈중 이동을 확인하거나 병원체의 순환 및 배출경로에 대해 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.



VI. 감사의 글

석사 학위 논문을 준비하면서 부족한 저를 이끌어주시고 도와주신 분들께 감사의 마음을 전합니다. 삶의 이치와 조직병리학이라는 학문에 대한 토론의 자세를 알려주신 허민도교수님, 학위 논문에 대한 정성 어린 격려를 해주신 정준기교수님, 바쁘신 와중에도 저의 논문에 구체적인 코멘트로 관심 가져주신 김광일 교수님, 수산생명의학에 대한 지식과 깊은 고찰을 통한 학자의 길을 알려주신 강주찬교수님, 김기홍교수님, 김도형교수님께 감사드립니다. 그리고 저의 롤모델이자 인생 첫 투고논문에 도움 주신 김보성 교수님께도 감사드리고 앞으로의 박사과정도 잘 부탁드립니다. 특히 학부 시절부터 값진 경험들을 선물해주신 심재동 회장님, 실험실 생활 4년간 다정한 선배로 학술적인 부분들을 챙겨주셨던 이무근 박사님께도 부족함이 많았을 저에게 관심과 가르침 주셔서 감사했다고 전하고 싶습니다.

사회초년생 병아리한테 보고서부터 현장경험까지 두루두루 알려준 종남선배, 이제는 말 없이도 손발이 맞는 세미 엄마 다혜언니, 내 일처럼 출장가서 같이 일해준 WHOA 번역기 상목선배랑 뜨거운 감자 수영선배, 또 다른 감자 지영이, 캡스톤이 끝나고도 힘이 되주었던 근심없는 심근이, 승준이, 보경이, 죽어있던 논문에 새 생명을 선물해 준 곰박사 준규선배, 지금은 학교를 떠났지만 철없던 22살에 물건 부셔도 많이 챙겨줬던 효은오빠, 예쁘고 소중한 병리방 간판 지원언니, 깨발랄한 승현언니, 천사 같은 준용오빠, 천사는 아니지만 졸업해서도 챙겨주는 승우오빠, 힐링 덩어리 백경 클래식 기타 동아리 부원들, 언제 만나든 술 없이도 즐거운 용디 친구들, 예쁘고 귀여운거 나랑 같이 해주는 카페 메이트 지민이, 노을빛 자존감 지킴이 충충 외에도 좋은 사람들을 많이 만난 덕분에 대학원 과정이 행복

했고 더 나은 사람으로 성장할 수 있었던 것 같습니다.

마지막으로 전과부터 대학원 진학까지 무한 신뢰로 선택을 응원해주었던
엄마 아빠, 눈에 넣어도 안 아플 예쁜 동생들, 손녀 사랑은 1등인 친할머니,
할아버지, 외할머니 감사하고 사랑해요.



VII. 참고문헌

- Akhondi, H., & Sabih, D. E. (2019). Liver abscess.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt Holm, P., & Wahli, T. (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of fish diseases*, 22(1), 25-34.
- Buján, N., Toranzo, A. E., & Magariños, B. (2018). *Edwardsiella piscicida*: a significant bacterial pathogen of cultured fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, 131(1), 59-71.
- Caraceni, P., Nardo, B., Domenicali, M., Turi, P., Vici, M., Simoncini, M., De Maria, N., Trevisani, F., Van Thiel, D. H., Derenzini, M., Cavallari, A., & Bernardi, M. (1999). Ischemia reperfusion injury in rat fatty liver: role of nutritional status. *Hepatology*, 29(4), 1139-1146.
- Castro, N., Toranzo, A. E., Barja, J. L., Nunez, S., & Magarinos, B. (2006). Characterization of *Edwardsiella tarda* strains isolated from turbot, *Psetta maxima* (L.). *Journal of fish diseases*, 29(9), 541-547.
- Choi, S. H., Kim, M. S., & Kim, K. H. (2011). Protection of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against *Edwardsiella tarda* infection by oral administration of auxotrophic mutant *E. tarda* ($\Delta alr \Delta asd$ *E. tarda*). *Aquaculture*, 317(1-4), 48-52.
- Darwish, A., Plumb, J. A., & Newton, J. C. (2000). Histopathology and pathogenesis of experimental infection with *Edwardsiella tarda* in channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 12(4), 255-266.
- EGUSA, S. (1976). Some bacterial diseases of freshwater fishes in Japan. *Fish Pathology*, 10(2), 103-114.
- Ewing, W. H., McWhorter, A. C., Escobar, M. R., & Lubin, A. H. (1965).

- Edwardsiella*, a new genus of Enterobacteriaceae based on a new species, *E. tarda*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 15(1), 33-38.
- Griffin, M. J., Greenway, T. E., Byars, T. S., Ware, C., Aarattuthodiyil, S., Kumar, G., & Wise, D. J. (2020). Cross protective potential of a live attenuated *Edwardsiella ictaluri* vaccine against *Edwardsiella piscicida* in channel (Ictalurus punctatus) and channel× blue (Ictalurus furcatus) hybrid catfish. Journal of the World Aquaculture Society, 51(3), 740-749.
- Harikrishnan, R., M. Nisha Rani, and C. Balasundaram. 2003. Hematological and biochemical parameters in Common Carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. Aquaculture, 221, 41 - 50.
- Hau, T., Haaga, J. R., & Aeder, M. I. (1984). Pathophysiology, diagnosis, and treatment of abdominal abscesses. Current problems in surgery, 21(7), 8-82.
- Heo, G. J. (1996). A study on efficacy of the mixed digestive in cultured fish, *Cyprinus carpio* and *Oncorhynchus mykiss*. Laboratory Animal Research, 12(1), 31-36.
- Jo, M. Y., Kim, M. S., Kwon, M. K., Ji, B. Y., Choi, H. S., Choi, D. L., Park, K. H., Lee, C. H., Kim, J. D., Lee, J. S., Oh, Y. K., Lee, D. C., Park, S. H., & Park, M. A. (2007). Epidemiological study of bacterial diseases of cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* from 2005 to 2006 in Korea. Journal of fish pathology, 20(1), 61-70.
- Jung, S. H., Byun, S. G., Ji, B. Y., & Choi, H. S. (2006). Application of Veterinary Chemistry Analyzer used to Hematological Analysis of Marine fish Cultured in Floating Netcage. Journal of fish pathology, 19(3),

253-265.

- Kibenge, F. S., Godoy, M. G., Fast, M., Workenhe, S., & Kibenge, M. J. (2012). Countermeasures against viral diseases of farmed fish. *Antiviral research*, 95(3), 257-281.
- Kim, E. H. (2021). Characteristics Comparisons of *Edwardsiella tarda* Isolated from Cultured Olive Flounder and Eel. *Journal of fish pathology*, 34(1), 31-38.
- Kim, M. S., Park, S. W., Huh, M. D., & Jung, H. D. (1998). Effect of Temperature and Bacterial Infection on the Absorption and Elimination of Oxolinic Acid in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 31(5), 677-684.
- Kim, K. H., Choi, D. L., Chung, J. K., & Chun, S. K. (1992). Experimental infection of *Edwardsiella tarda* in the Tilapia. *Journal of fish pathology*, 5(2), 61-75.
- Kim, K. I., Kang, J. Y., Park, J. Y., Joh, S. J., Lee, H. S., & Kwon, Y. K. (2014). Phenotypic traits, virulence associated gene profile and genetic relatedness of *Edwardsiella tarda* isolates from Japanese eel *Anguilla japonica* in Korea. *Letters in applied microbiology*, 58(2), 168-176.
- Kim, M. S., Kim, K. D., Kim, K. W., Park, M. A., & Kim, J. W. (2009). The efficacy and influence on growth of olive flounder *Paralichthys olivaceus* vaccinated against *Edwardsiella tarda* and *Streptococcus iniae*. *Journal of fish pathology*, 22(3), 327-334.
- Kim, S. H., Woo, S. H., Lee, S. J., & Park, S. I. (2013). The Infection Characteristics of *Vibrio scophthalmi* Isolated from Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Journal of fish pathology*, 26(3), 207-217.
- Kim, T. H., Lee, L. S., Choi, H. S., Jung, S. H., & Han, H. J. (2020). An

- Experimental Study on Artificial Infection of Olive Flounder *Paralichthys olivaceus* by *Streptococcus parauberis* Using Different Injection Sites. Korean J Fish Qauat Sci, 53(4), 628-636.
- Kumar, V., Cotran, R. S., & Robbins, S. L. (1997). Basic pathology. Philadelphia, 12. 641-655.
- Kusuda, R., & Kawai, K. (1998). Bacterial diseases of cultured marine fish in Japan. Fish pathology, 33(4), 221-227.
- Kwon, M. G., Hwang, J. Y., & Jung, S. H. (2014). The Efficacy and Safety on Combination Vaccines : *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus iniae* and *S. parauberis*, in Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Journal of Fisheries and marine sciences education, 26(6). 1193-1200.
- Kwon, M. G., & Jung, S. H. (2012). Comparative study of pathogenicity following single or coinfection with *Edwardsiella tarda* and *Streptococcus iniae* in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Journal of Fisheries and Marine Sciences Education, 24(4), 591-601.
- Kwon, M. G., Seo, J. S., Hwang, J. Y., Park, C. I., Jeong, J. M., & Bae, J. S. (2016). Effect of the Polychaete Antimicrobial Peptide as feed Additives on Olive Flounder and Black Rockfish Immune Activity. Journal of fisheris and marine sciences education, 28(6), 1640-1650.
- Lan, J., Zhang, Z. H., Wang, Y., Chen, J., & Han, Y. (2008) Isolation of an unusual strain of *Edwardsiella tarda* from turbot and establish a PCR detection technique with the *gyrB* gene. J Appl Microbiol 105, 644 - 651
- Leotta, G. A., Piñeyro, P., Serena, S., & Vigo, G. B. (2009). Prevalence of *Edwardsiella tarda* in Antarctic wildlife. Polar Biology, 32(5), 809-812.
- Leung, K. Y., Siame, B. A., Tenkink, B. J., Noort, R. J., & Mok, Y. K. (2012). *Edwardsiella tarda* - virulence mechanisms of an emerging gastroenteritis

- pathogen. *Microbes and infection*, 14(1), 26–34.
- Ling, S. H., Wang, X. H., Lim, T. M., & Leung, K. Y. (2001). Green fluorescent protein-tagged *Edwardsiella tarda* reveals portal of entry in fish. *FEMS microbiology letters*, 194(2), 239–243.
- Matsuyama, T., Kamaishi, T., Ooseko, N., Kurohara, K., & Iida, T. (2005). Pathogenicity of motile and non-motile *Edwardsiella tarda* to some marine fish. *Fish Pathology*, 40(3), 133–135.
- McCuskey, R. S., Ito, Y., Robertson, G. R., McCuskey, M. K., Perry, M., & Farrell, G. C. (2004). Hepatic microvascular dysfunction during evolution of dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology*, 40(2), 386–393.
- Miyazaki, T., & Egusa, S. (1976). Histopathological Studies of Edwardsiellosis of the Japanese Eel (*Anguilla japonica*)—II Suppurative hepatitis form. *Fish Pathology*, 11(2), 67–75.
- Miyazaki, T., & Kaige, N. (1985). Comparative histopathology of edwardsiellosis in fishes. *Fish Pathology*, 20(2–3), 219–227.
- MOF (Ministry of Oceans and Fisheries). Statistics of production by major fish speies in aquaculture . 2020. Retrieved from <https://www.mof.go.kr/statPortal>
- Nabi, N., Ahmed, I., & Wani, G. B. (2022). Hematological and serum biochemical reference intervals of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* cultured in Himalayan aquaculture: Morphology, morphometrics and quantification of peripheral blood cells. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(4), 2942–2957.
- Navasa, M., & Rodés, J. (2004). Bacterial infections in cirrhosis. *Liver International*, 24(4), 277–280.
- Nelson, K., Jones, J., Jacobson, S., & Reimschuessel, R. (1999). Elevated blood

- urea nitrogen (BUN) levels in goldfish as an indicator of gill dysfunction. *Journal of Aquatic Animal Health*, 11(1), 52-60.
- Pan, C. H., Chien, Y. H., & Hunter, B. (2003). The resistance to ammonia stress of *Penaeus monodon* Fabricius juvenile fed diets supplemented with astaxanthin. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 297(1), 107-118.
- Park, S. B., Aoki, T., & Jung, T. S. (2012). Pathogenesis of and strategies for preventing *Edwardsiella tarda* infection in fish. *Veterinary research*, 43(1), 1-11.
- Park, S. I., Wakabashi, H., & Watanabe, Y. (1983). Serotype and virulence of *Edwardsiella tarda* isolated from eel and their environment. *Fish Pathology*, 18(2), 85-89.
- Park, J. W., & Oh, S. Y. (2018). Physiological Responses of Marine Fish to External Attachment of Pop-up Satellite Archival Tag (PSAT). *Ocean and Polar Research*, 40(3), 169-176.
- Qiao, G., Park, S. I., & Xu, D. H. (2012). Clinical, hematological, and biochemical alterations in olive flounder *Paralichthys olivaceus* following experimental infection by *Vibrio scopthalmi*. *Fisheries and aquatic sciences*, 15(3), 233-239.
- Rashid, M. M., Nakai, T., Muroga, K., & Miyazaki, T. (1997). Pathogenesis of experimental edwardsiellosis in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries science*, 63(3), 384-387.
- Reichley, S. R. (2017). Advancing our understanding of the *Edwardsiella*. Mississippi State University PhD dissertation.
- Reichley, S. R., Ware, C., Steadman, J., Gaunt, P. S., García, J. C., LaFrentz, B. R., ... & Griffin, M. J. (2017). Comparative phenotypic and genotypic

- analysis of *Edwardsiella* isolates from different hosts and geographic origins, with emphasis on isolates formerly classified as *E. tarda*, and evaluation of diagnostic methods. *Journal of clinical microbiology*, 55(12), 3466-3491.
- Rahimian, J., Wilson, T., Oram, V., & Holzman, R. S. (2004). Pyogenic liver abscess: recent trends in etiology and mortality. *Clinical infectious diseases*, 39(11), 1654-1659.
- Sahoo, P. K., Mukherjee, S. C., & Sahoo, S. K. (1998). *Aeromonas hydrophila* versus *Edwardsiella tarda*: a pathoanatomical study in *Clarias batrachus*. *Journal of Aquaculture*, 6, 57-66.
- Saito, K., & Hasegawa, A. (2003). Diseases and outcomes in rabbits with high BUN levels. *Journal of veterinary medical science*, 65(5), 625-628.
- Sakazaki, R. (1965). A proposed group of the family Enterobacteriaceae, the Asakusa group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 15(1), 45-47.
- Sheth, K., & Bankey, P. (2001). The liver as an immune organ. *Current opinion in critical care*, 7(2), 99-104.
- Shim, J. D., Hwang, S. D., Jang, S. Y., Kim, T. W., & Jeong, J. M. (2019). Monitoring of the mortalities in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) farms of Korea. *Journal of fish pathology*, 32(1), 29-35.
- Srinivasa Rao, P. S., Lim, T. M., & Leung, K. Y. (2001). Opsonized virulent *Edwardsiella tarda* strains are able to adhere to and survive and replicate within fish phagocytes but fail to stimulate reactive oxygen intermediates. *Infection and Immunity*, 69, 5689-5697.
- Sun, Y., Liu, C. S., & Sun, L. (2010). Identification of an *Edwardsiella tarda* surface antigen and analysis of its immunoprotective potential as a

- purified recombinant subunit vaccine and a surface-anchored subunit vaccine expressed by a fish commensal strain. *Vaccine*, 28(40), 6603–6608.
- Thomas, P., & Robertson, L. (1991). Plasma cortisol and glucose stress responses of red drum (*Sciaenops ocellatus*) to handling and shallow water stressors and anesthesia with MS-222, quinaldine sulfate and metomidate. *Aquaculture*, 96(1), 69–86.
- Thomsen, R. W., Jepsen, P., & Sørensen, H. T. (2007). Diabetes mellitus and pyogenic liver abscess: risk and prognosis. *Clinical infectious diseases*, 44(9), 1194–1201.
- Wang, Q., Yang, M., Xiao, J., Wu, H., Wang, X., Lv, Y., Xu, L., Zheng, H., Wang, S., Zao, G., Liu, Q., & Zhang, Y. (2009). Genome sequence of the versatile fish pathogen *Edwardsiella tarda* provides insights into its adaptation to broad host ranges and intracellular niches. *PloS one*, 4(10), e7646.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), 697–703.
- White, F. H., Simpson, C. F., & Williams Jr, L. E. (1973). Isolation of *Edwardsiella tarda* from aquatic animal species and surface waters in Florida. *Journal of Wildlife Diseases*, 9(3), 204–208.
- Wiedenmayer, A. A., Evans, J. J., & Klesius, P. H. (2006). Experimental *Edwardsiella tarda* infection in nonabraded channel catfish *Ictalurus punctatus* by immersion. *FISHERIES SCIENCE-TOKYO*-, 72(5), 1124.
- WOAH(World Organisation of Animal Health). (2019). Aquatic Animal Health Code, 30th Ed. OIE, Paris.
- Woo, P. T., Leatherland, J. F., & Bruno, D. W. (Eds.). (2011). Fish diseases

and disorders, CABI international, 3, 512-534.

Wyatt, L. E., Nickelson 2nd, R., & Vanderzant, C. A. R. L. (1979).
Edwardsiella tarda in freshwater catfish and their environment. Applied
and Environmental Microbiology, 38(4), 710-714.

YASUNAGA, N., HATAI, K., & TSUKAHARA, J. I. (1983). *Pasteurella*
piscicida from an epizootic of cultured red sea bream. Fish Pathology,
18(2), 107-110.

