

이리도 바이러스 감염에 의한 양식 돌돔, *Oplegnathus fasciatus*의 대량폐사

손상규[†] · 최동림* · 도정완* · 황지연* · 박정우**

국립수산진흥원 진해내수면연구소, *국립수산진흥원 병리과, **울산대학교

1998년 8~10월에 남해안 일원 해상 가두리 양식장에서 사육중인 돌돔, *Oplegnathus fasciatus*이 60%이상 폐사하였다. 병어의 체색은 검어지거나 퇴색되며 아가미는 빈혈증상이 심하고 비장은 특이적으로 비대되어 있었고, 비장, 심장, 심장 및 간장 조직에서 플겐양성과 호염기성의 비대세포가 관찰되었다. 병어의 비장조직 마쇄액을 GF세포에 접종배양한 결과, 세포가 구형화 되면서 커지는 세포변성효과가 나타나 감염된 GF 세포로부터 바이러스가 분리되었다. 분리된 바이러스 배양액(10^4 TCID₅₀/0.1 ml)을 건강한 돌돔 치어에 복강주사 하면 자연감염어와 유사한 증상을 나타내면서 폐사가 일어났고, 또한 병어의 비장조직을 전자현미경으로 관찰한 결과, 조직내 비대세포의 세포질에서 직경이 120~130 nm이며 외막이 있는 정 20면체의 바이러스 입자가 관찰되었다. 그리고 genebank로부터 얻은 참돔 이리도바이러스(RSIV)의 ATPase gene의 DNA염기서열을 주형으로 제작된 primer를 사용하여 PCR을 수행한 결과, 500 bp의 PCR 생성물이 병어나 인위감염된 GF세포에서 얻어졌는데, 이들 PCR 생성물은 RSIV의 ATPase cDNA gene과 95%의 상동성을 나타내었다. 따라서 양식돌돔에 대량 폐사를 일으킨 원인 바이러스는 참돔 이리도바이러스(RSIV)와 유사한 이리도바이러스로 밝혀졌다.

Key words : Striped beakperch, Iridovirus, RSIV

참돔 이리도바이러스 질병(red seabream iridovirus disease; RSIVD)은 1990년 일본 시코쿠 지역의 참돔 양식장에서 처음 발병된 후, 매년 발병지역이 확산되고 발병 어종이 다양해져 현재 붉돔(*Evynis japonica*), 감성돔(*Acanthopagrus schlegeli*), 농어(*Lateolabrax sp.*), 방어(*Seriola quinqueradiata*), 갯방어(*Seriola dumerili*), 흑점줄전갱이(*Pseudocaranx dentex*), 전갱이(*Trachurus japonicus*), snubnose dart(*Trachinotus blochii*), 참다랑어(*Thunnus thynnus*), 돌돔(*Oplegnathus fasciatus*), spotted parrot fish(*Oplegnathus punctatus*), 붉바리(*Epinephelus akaara*), 능성어(*Epinephelus septemfasciatus*), 도도바리(*Epinephelus awoara*), 벤자리(*Parapristipoma trilineatum*), 벵에돔(*Girella punctata*) 등 농어목 17종, 넙치(*Paralichthys olivaceus*)인 가자미목 1종 및 자주복(*Takifugu rubripes*)인 복어목 1종에서 참돔 이리도바이러스 질병이 발생하는 것으로 보고되었다(Matsuoka et al., 1996). 참돔에서 분리

된 RSIV는 icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus로서 크기가 200~240 nm이며 형태학적 특징에 의해 iridoviridae로 분류하고 있지만, 어류를 숙주로 하는 iridovirus과 중에서 lymphocystis virus屬인 flounder virus(LCDV-1) 및 lymphocystis disease virus(LCDV-2)와 goldfish virus 1-like virus屬인 goldfish virus 1(GFV-1) 및 goldfish virus 2(GFV-2)와는 전혀 다른 바이러스로 알려져 있다. 일반적으로 참돔 이리도바이러스 질병에 감염된 어류는 유영력을 상실하고 심한 빈혈증상과 아가미 점상출혈 및 비장 비대증상을 나타내며, 병리조직학적으로는 비장, 심장, 신장, 간 및 아가미 조직에 비대세포가 형성되는 것이 특징이며, 동 바이러스 질병에 의한 대량폐사는 참돔 및 방어치어 등에 일어나는 것으로 알려져 있다(Inouye et al., 1992). 지금까지 우리 나라에서는 iridovirus과에 속하는 lymphocystis virus가 양식 넙치에 감염되어 체표면에 종양을 형성하여 많은 피해를 주고 있었으나, RSIV의 감염례는 보고되지 않았다. 그런데, 1998년 8월경 남해안 일원의 통영, 거제, 삼천포, 여수 등의 해상가두리 양식장에서 사육중인

[†]Corresponding author

양식 돌돔이 폐사하기 시작하여 수온이 하강하는 10월말까지 사육량의 60%정도가 폐사하여, 기생충성 및 세균성 질병검사를 하였지만 병원성 기생충 및 세균은 검출되지 않았다. 따라서 정확한 폐사원인을 규명하기 위해 병어를 수집하여 병리학적 검사를 수행한 결과, RSIV의 감염증상과 유사한 비대세포가 비장조직 등에서 관찰됨으로 인해 양식 돌돔의 폐사가 이리도바이러스가 원인일 가능성이 매우 높아 양식 돌돔의 폐사원인 규명을 위해 본 연구를 수행하여 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시험어

1998년 8~10월 경남 통영군 및 거제군의 관내 해상 가두리 양식장에서 채색이 검어지거나 퇴색되며 힘없이 유평하는 빈사상태의 돌돔과 폐사된 돌돔(체장 15~26 cm)을 채집하여 시험에 사용하였다.

병리학적 검사

병어의 장기조직을 Davidson's sol.에 고정시킨 후 상법에 따라 파라핀 조직 절편(4 μ m)을 만들어 H-E 염색을 하거나 Feulgen 반응을 시켜 현미경으로 관찰하였으며, 또한 비장조직을 절개하여 슬라이드글라스에 도말한 후 Hemacolor 염색(Merck, Germany)을 하여 비대세포를 관찰하였다.

바이러스 분리

병어의 비장조직을 적출하여 저온상태에서 유리 호모게나이저로 마쇄한 후 10배량(w/v)의 EMEM (Eagle's essential medium, Gibco)을 첨가해서 4°C에서 10분간 5000 \times g로 원심분리하였다. 상층액을 수확하여 2분간 12,000 \times g로 원심분리하고 상층액을 수확하여 0.45 μ m syringe filter로 여과해서 10% fetal bovine serum(Gibco), penicillin (100 IU/ml) 및 streptomycin(100 μ g/ml)을 첨가한 EMEM으로 단층배양한 GF(grunt fin)주화세포에 접종하여 25°C에서 배양하면서 세포변성효과(CPE)를 관찰하였다.

전자현미경 관찰

병어의 비장조직을 잘게 세절하여 2.5% glutar-

aldehyde sol.로 4°C에서 4시간 고정하고, 1% osmium tetroxide로 실온에서 2시간 후고정한 다음, ethylalcohol계열로 탈수시켜 Epon mixture로 포매하고 60~90 nm박절해서 1% uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 투과전자현미경(Hitachi-7200)으로 바이러스 입자를 관찰하였다.

분리바이러스의 병원성시험

GF주화세포에 병어의 비장조직을 집중하여 분리 배양한 바이러스액 0.1 ml(10^4 TCID₅₀/0.1 ml)을 돌돔 30마리(체장 6.8~7.6 cm)에 복강주사하고, 대조구는 EMEM 0.1 ml씩 주사하여 200l 유수식 FRP수조에 각각 수용하여 수온 20~23°C에서 2주간 사육하면서 병원성을 관찰하였다.

PCR반응(polymerase chain reaction)

돌돔에서 분리된 이리도바이러스와 일본에서 보고된 참돔에 치명적인 피해를 일으키는 RSIV(red sea bream iridovirus)의 연관성을 확인하기 위해, 폐사한 돌돔의 비장조직과 비장조직의 마쇄액을 집중시켜 배양한 GF세포로부터 high pure PCR template preparation kit(Boehringer Mannheim, USA)를 이용하여 template DNA를 각각 분리하고 PCR을 실시하였다. primer는 Kurita *et al.*(1998)이 보고한 RSIV ATPase gene을 이용해서 5'-GTACCA GGGCCATGTGAAGT-3'와 5'-GCAC AATGAGCTTCATTCCA-3'를 제작하여 사용하였으며, PCR증폭반응은 10 mM의 각각의 primer와 0.5 unit TaKaRa Ex TaqTM, 0.2 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 1 mM 2-mercaptoethanol이 포함된 혼합물에 10 ng의 template DNA를 각각 첨가한 후 Geneamp PCR system 2400(Perkin Elmer, USA)을 이용해 94°C 30초간 변성, 58°C에서 45초간 결합, 72°C에서 45초간 신장을 30회 반복 수행하였다. 증폭된 반응생성물(product)은 1.5% agarose gel에서 전기영동한 후 Ethidium bromide (Sigma, USA)로 염색해서 DNA 크기를 비교하였다.

염기서열분석(sequencing)

PCR로 증폭된 500 bp 크기의 생성물을 1.5% agarose gel에서 분리하여 pGEM-T easy vector (Promega, pGEM[®]-T Easy Vector System I,

USA)에 삽입시킨 plasmid DNA를 *E. coli* DH5 α 에 형질전환시켜 대량 배양한 후 DNA plasmid를 추출하여 Pharmacia Biotech automatic sequencer(Pharmacia Biotch, USA)을 이용해서 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열을 genbank 상에 존재하는 RSIV 유전자의 염기서열과 비교분석하였다.

결 과

병어의 내·외부 증상

병든 돌돔은 가두리 양식장의 수면에 빙빙 돌거나 복부를 위로 하여 힘없이 유영하다가 폐사하는데, 병어는 아가미의 빈혈과 채색이 검어지거나 퇴색되며 체표 및 지느러미에 출혈증상을 나타내거나 안구돌출증상을 나타내는 경우도 있었다. 그리고 병어를 해부해 보면 비장이 특이적으로 심하게 비대되어 있었다.

병리학적 관찰

병어의 장기조직에서는 광범위한 혈구의 침착과 국소적인 세포의 괴사가 공통적인 증상으로 관찰되었다. 특히 진한 호염기성의 비대세포가 비장과 간장조직에서 특이적으로 다수 관찰되었으며(Fig.

1), 이러한 비대세포는 Feulgen 양성반응을 나타내며 심장, 신장 및 아가미조직 등에서도 관찰되었다. 그리고 비장조직을 도말하여 hemacolor로 염색한 결과, 정상 적혈구보다 훨씬 큰 호염기성 비대세포가 관찰되었다(Fig. 2).

바이러스 분리

병어의 비장 마쇄여과액을 접종한 GF세포는 Fig. 3에서와 같이 접종 후 4일째부터 세포가 구형화되는 세포변성효과(CPE)가 나타내며 이러한 구형세포는 배양기간이 길어질수록 커지면서 점차 배양용기바닥에서 박리되었다.

바이러스 형태

병어의 비장조직을 전자현미경으로 관찰한 결과, Fig. 4에서와 같이 이형비대세포의 세포질내에서 크기가 120~130 nm이면서 외막이 있는 정 20면체 모양의 바이러스 입자가 무수히 관찰되었다.

바이러스의 병원성

병든 돌돔으로부터 분리된 바이러스를 돌돔에 인위감염시킨 결과 Fig. 5에서와 같이 돌돔은 감염시킨 후 7일째부터 폐사가 일어나기 시작하며, 14일째 전량 폐사되어 누적 폐사율이 100%였지만, 대조구로서 EMEM만을 주사한 돌돔은 시험기간동안

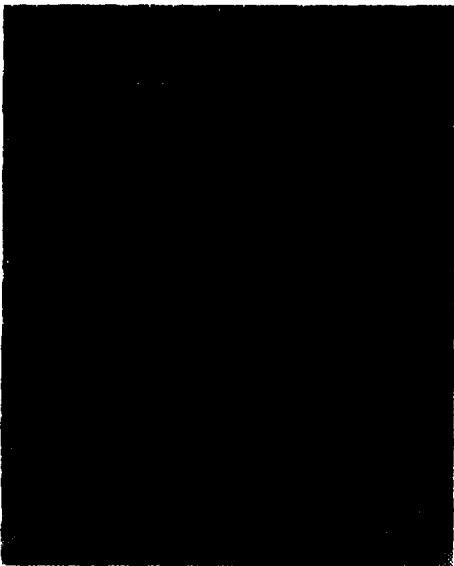


Fig. 1. Enlarged basophilic cells and infiltration of inflammatory cells in the spleen of diseased fish. H-E stain. Bar = 50 μ m

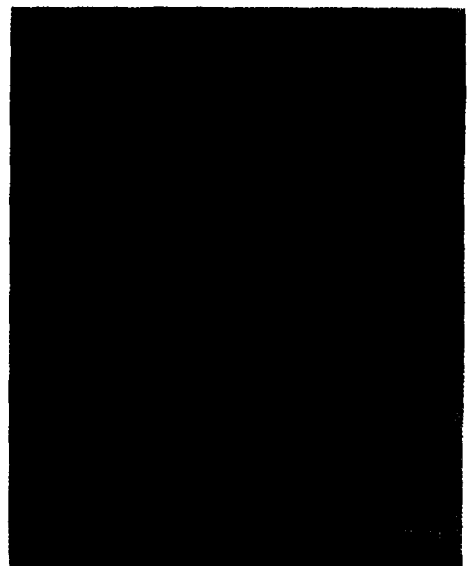


Fig. 2. Enlarged basophilic cells (arrow) in the imprinted spleen of diseased fish. Hemacolor stain. Bar = 5 μ m

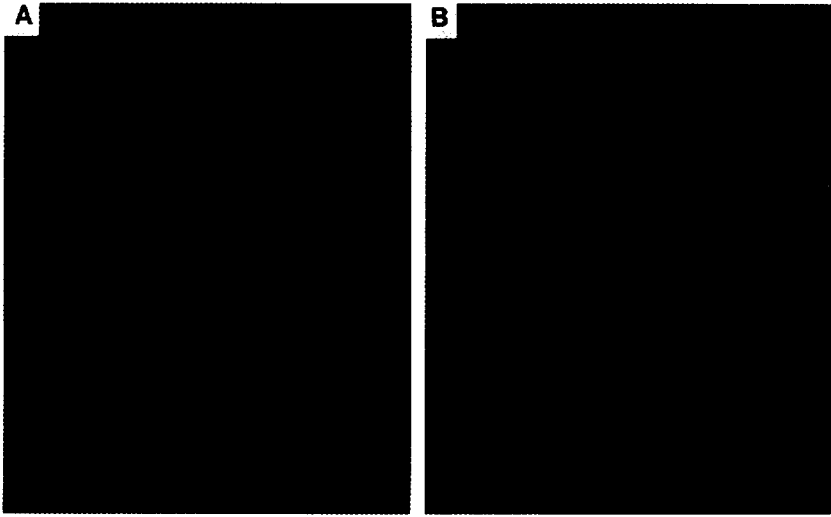


Fig. 3. Cytopathic effect showing enlarged and rounded GF cells infected with iridovirus. A, uninoculated cells; B, inoculated cells.

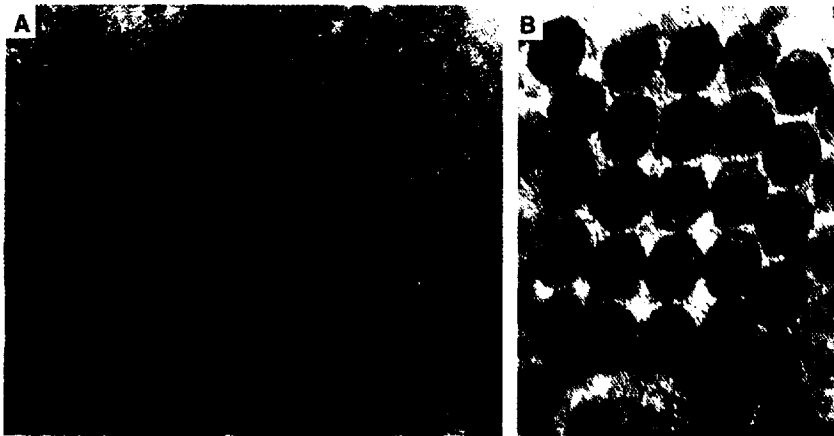


Fig. 4. Electron micrograph showing virions(120~130 nm in diameter) in the cytoplasm of infected cells from the spleen of diseased fish. Bar = 200 nm(A), 100 nm(B).

전혀 폐사가 일어나지 않았다.

PCR 반응

돌돔 병어의 비장조직과 비장조직의 마쇄여과액을 접종한 GF세포를 대상으로 RSIV ATPase gene을 이용하여 제작한 primer를 이용하여 PCR을 실시한 결과, Fig. 6에서와 같이 돌돔병어의 비장조직과 비장조직 마쇄액을 접종하여 배양한 GF세포에서는 크기가 500 bp인 반응생성물(product)이 증폭되었지만 바이러스를 접종하지 않은 GF세포에서는 반응생성물이 증폭되지 않았다.

염기서열분석(sequencing)

병든 돌돔의 비장조직으로부터 PCR에 의해 증폭된 500 bp의 반응 생성물(Fig. 6)을 sequencing하여 genebank에서 RSIV와 homology를 비교한 결과, 돌돔 병어에서 얻어진 PCR생성물은 RSIV의 ATPase cDNA gene과 95% 상동성을 보였다(Fig. 7).

고 찰

병든 돌돔은 외부형태학적으로는 체색이 흑화되거나 퇴색되었으며, 아가미는 심한 빈혈 증상을 나

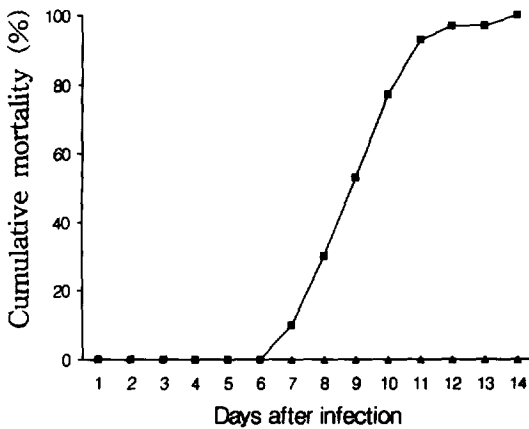


Fig. 5. Mortality of striped beakperch by intraperitoneal injection of the virus isolated from diseased fish. ■, inoculated with virus(10^4 TCID₅₀/0.1 ml); ▲, inoculated with EMEM(0.1 ml).

타내었다. 병리조직학적 소견은 비장 조직이 비대 되어 있었고, 비장, 신장, 간장, 심장 및 아가미 조직에서 Feulgen 양성반응의 호염기성 비대세포가 관찰되었는데, 이와 같은 증상은 참돔 이리도바이러스(RSIV)에 감염된 참돔의 증상과 매우 유사하였고(Nakajima and Sorimachi, 1994), 또한 돌돔 비장조직 마쇄여과액을 GF세포에 접종하여 배양한

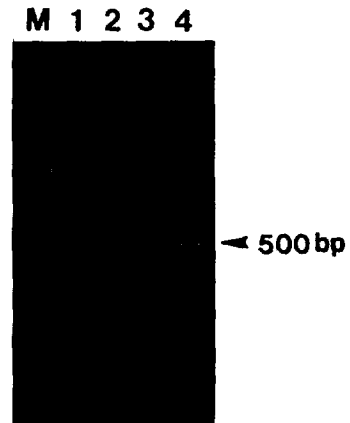


Fig. 6. Agarose gel electrophoresis of amplification products from the spleen of diseased fish and GF cell infected with the causative virus using primer based on ATPase gene of RSIV. Lane M, 100 bp DNA size marker; Lane 1, positive control; Lane 2, normal GF cells; Lane 3, spleen of diseased fish; Lane 4, GF cells infected with the causative virus.

결과, 마쇄여과액 접종후 4-5일제부터 GF세포가 구형화되고 세포가 거대해지는 세포변성효과는 RSIV를 접종하여 나타나는 세포변성효과와 유사하였다(Hannele et al., 1998). 그리고 병든 돌돔으로부터 분리된 바이러스를 인위감염법으로 건강한 돌

```

goacaatgagcttoaattoaacccattttogtogtcooggtttosacaggoogocagctcoogtoa 60 ←RSIV
|||||
goacaatgagcttoaattoaacccattttogtogtcooggtttosacaggoogocagctcoogtoa 471←isolate

gggacaactotgtgatttcoatttttgaatatgtcagactaogtoaggoggoataaac 120
|||||
gggacaactotgtgatttcoatttttgaatatgtcagactaogtoaggoggoataaac 411

caaaataatgatgocagcttgatgcaactaogctytagootatgtgatgtgtatatacattgg 180
|||||
caaaatgatgatgocagcttgatgcaactaogctytagootatgtgatgtgtatatacattgg 351

cagtaagggggcaaacatgctgogacaototgaagggooctgcaacaatgacgaataocacag 240
|||||
cagtaagggggcaaacatgctgogacaototgaagggooctgcaacaatgacgaataocacag 291

ggtggctogggooaggggggtgatgagacacttattatgaacacatgacaagctgtoa 300
|||||
ggtggctogggooaggggggtgatgagacacttattatgaacacatgacaagctgtoy 231

tgtoattgtgtocaaacagcacoagatgcaatatatgtgatattgtgtgocacagocaaatg 360
|||||
ogtoattgtgtocaaacagcacoagatgcaatatatgtgatattgtgtgocacagocaaatg 171

tgtgagcaaatotocogacacoocttogcatocaaacacooctgagacatgtgacooctgogtg 420
|||||
tgtgagcaaacotocogacacoocttogcatocaaacacooctgagacatgogacooctgogtg 111

gatgcootocaaacacooctgtgocaaagtotgocaaacacagagtgtoacaggogttocogggaa 480
|||||
gatgcootocaaacacooctgtgocaaagtotgocaaacacagagtgtoacaggogtt-cogggaa 52

gacttcacatgggocctggta 501
|||||
aacttcacat-gggocctggta 32
    
```

Fig. 7. Comparison of the DNA sequence of ATPase gene of the causative virus(isolate) and RSIV.

돔에 감염시킨 결과 자연감염어와 유사한 증상을 나타내면서 폐사함으로 인해 돌돔 폐사원인이 바이러스 감염에 의한 것임을 알 수 있다. 돌돔의 비장조직에서 관찰된 바이러스 입자들의 크기는 참돔이리도바이러스(직경, 120-240 nm; Inouye *et al.*, 1992)나 능성어이리도바이러스(직경, 150-196 nm; Jung *et al.*, 1997)보다 크기가 작지만, Inouye *et al.*(1992)와 Danayadol *et al.*(1996)은 이리도바이러스의 입자크기는 감염어종에 따라 많은 차이(직경, 120-240 nm)가 있다고 보고하고 있음을 감안하면 돌돔에서 분리된 바이러스를 이리도바이러스로 분류해도 문제가 되지 않을 것으로 생각된다.

그리고 돌돔에서 분리된 이리도바이러스가 일본의 참돔에서 분리된 이리도바이러스인 RSIV와의 유전학적인 연관성을 확인하기 위해 RSIV ATPase cDNA의 염기서열을 이용하여 제작한 primer를 사용한 PCR결과, 이리도바이러스에 감염된 돌돔 비장조직과 돌돔비장 마쇄액을 접종한 GF세포에서 500 bp의 PCR산물을 얻어 sequencing하여 genebank상에 등록되어 있는 염기서열과 상동성을 검색한 결과, RSIV ATPase cDNA gene과 95%의 상동성을 나타내어 돌돔의 폐사 원인바이러스는 일본의 참돔 이리도바이러스와 유사한 것으로 추정되지만, 돌돔이리도바이러스는 현재까지 보고된 RSIV나 GSIV와 같은 이리도바이러스와의 상관관계가 밝혀지지 않았으므로 향후 이들 바이러스 DNA 염기서열의 비교연구가 필요한 것으로 생각된다.

참고문헌

- Danayadol, Y., Direkbusarakom, S., Boonyaratpalin, S., Miyazaki, T. and Miyata, M.: An outbreak of iridovirus-like infection in brown-spotted grouper(*Epinephelus malabaricus*) cultured in Thailand. The AAHRI(aquatic animal health research institute) News letter, 5, 6, 1996.
- Hannele, T., Niels-Jorsen, O., Jere, L., Eija, R. and Carl-Henrik, V. B.: Isolation of an iridovirus from pike-perch *Stizostedion lucioperca*. Dis. Aquat. Org., 32(1): 185-193, 1998.
- Inouye, K., Yamano, K., Maeno, Y., Nakajima, K., Matsuoka, M., Wada, Y. and Sorimachi, M.: Iridovirus infection of cultured red seabream, *Pagrus major*. Fish Pathol., 27: 19-27, 1992.
- Jung, S. J., Miyazaki, T., Miyata, M., Danayadol, Y. and Tanaka, S.: Pathogenicity of iridovirus from Japan and Thailand for the red sea bream *Pagrus major* in Japan, and histopathology of experimentally infected fish. Fisheries Sci., 63(5): 735-740, 1997.
- Kurita, J., Makajima, K., Hirono, I. and Aoki, T.: Polymerase chain reaction(PCR) amplification of DNA of red seabream Iridovirus(RSIV). Fish Pathol., 33(1): 17-23, 1998.
- Matsuoka, S., Inonye, K. and Nakjima, K.: Cultured fish species infected by red sea bream iridoviral disease from 1991 to 1995. Fish Pathol., 31(4): 233-234, 1996.
- Nakazima, K. and Sorimazi, M.: Biological and physico-chemical properties of the iridovirus isolated from cultured red sea bream, *Pagrus major*. Fish Pathol., 29(1): 29-33, 1994.

Mass Mortalities of Cultured Striped Beakperch, *Oplegnathus fasciatus* by Iridoviral Infection

Sang-Gyu Sohn, Dong-Lim Choi*, Jeung-Wan Do*,
Jee-Youn Hwang* and Jeong-Woo Park**

Jinhae Inland Fisheries Research Institute, NFRDI

**Pathology Division, NFRDI*

***College of Natural Sciences, University of Ulsan*

From August to October 1998, over 60% mortality of cultured striped beakperch *Oplegnathus fasciatus* was occurred in net cages along the southern coast of Korea. Moribund fish showed some clinical signs of lethargic behavior, dark coloration or decoloration, severe gill anemia and enlargement of spleen. Also enlarged basophilic cells showing Feulgen -positive reaction were observed in the tissue section of spleen, kidney, liver and heart of the diseased fish. GF cells inoculated with spleen homogenate of diseased fish produced cytopathic effect of enlarged and rounded cells, therefore the causative virus was isolated from diseased fish. Striped beakperch fingerlings intraperitoneally inoculated with the causative virus (10^4 TCID₅₀/0.1 ml) revealed symptoms similar to those of naturally infected fish and died from 7 to 14 days post injection. Transmission electron microscopy revealed that the causative virus was enveloped icosahedral particle with 120~130 nm in diameter. PCR products of the expected size (500 bp) were amplified with a primer set based on the ATPase gene of RSIV (red sea bream iridovirus) using template DNAs which were extracted from the spleen of diseased fish and GF cells inoculated with the causative virus. According to the analysis of nucleotide sequence of these PCR products, the sequence from ATPase cDNA gene of the causative virus showed 95% homology with that of RSIV. These results indicate that the mass mortality in the cultured striped beakperch was caused by the infection of iridovirus similar to RSIV.

Key words : Striped beakperch, Iridovirus, RSIV