한국어병학회지 제 16 권 제 2 호 (2003)
J. Fish Pathol., 16(2) : 81 ~ 90 (2003)

무지개송어 성어에 대량 폐사를 유발하는 IHNV의 분리와 특성

김기홍 · 김영진 · 정성주 · 정태성* · 오명주†
여수대학교 수산생명의학과, *경상대학교 수의학과

Isolation and Characterization of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Causing High Mortality in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*

Ki-Hong Kim, Young-Jin Kim, Sung-Ju Jung, Tae-Sung Jung* and Myung-Joo Oh†
Department of Aqualife Medicine, Yosu National University, Yeosu 550-749, Korea
**Lab of Fish & Shellfish Diseases, KyungSang National University, Chinju 660-701, Korea*

High mortality with signs similar to viral haemorrhagic septicemia (VHS) such as severe haemorrhages in the skin, muscle and air bladder occurred in the farmed adult rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in Ku-mi and Je-chun area in Korea. The isolates were neutralized by an antiserum against IHNV but not by antisera against VHSV. Electron micrograph of an ultrathin section showed large numbers of bullet-shaped virus particles. The newly isolated rhabdovirus was composed of five structural proteins. In the western blot analysis the anti-IHNV serum strongly reacted with G, N and M1 protein. The cumulative mortalities of RTK infected rainbow trout (10-12cm, 9-12g) with $10^{3.5}$ and $10^{1.5}TCID_{50}/m\ell$ were 80% and 30%, respectively. RTJ infected fish showed 50% mortality by infection with $10^{3.5}TCID_{50}/m\ell$. Control group and IHNV-ChAb exhibited no mortality. From these results, the viruses were identified IHNV although diseased fish showed similar signs with VHS and caused high mortality in large-sized fish.

Key words: Rhabdovirus, IHNV, Rainbow trout

서 론

무지개송어 (*Oncorhynchus mykiss*)의 랍도바이러스성 질병에는 바이러스성 출혈성 패혈증 (viral haemorrhagic septicemia, VHS)와 전염성 조혈기 괴사증 (infectious hematopoietic necrosis, IHN)이 널리 알려져 있으며, 이들 질병은 실제로 유럽과 북미 등의 어류 양식장에서 빈번하게 발생되어 왔다. (Bullock, 1976 ; Hedrick *et al.*, 1978; McAlliste, 1988; de Kinkelin *et al.*, 1991).

이들 바이러스성 질병은 주로 감염된 알과 보균된 친어의 유입을 통해 전파되어지는 것으로 알려져 있으며 (Ortega *et al.*, 1993), 국내의 경우 무지개송어의 양식이 시작되었던 1970년대부터 지금에 이르기까지 일본, 미국 및 유럽 등 다양한 지역에서 생산된 발안란의 무분별한 도입이 이루어지고 있는 이유로 최근에 이르기까지도 다양한 감염성 질병이 발생되고 있다.

IHN의 원인체인 IHNV (infectious hematopoietic necrosis virus) 및 VHS의 원인체인 VHSV (viral haemorrhagic septicemia virus)는 같은 핵산형을 가지는 공통점과 함께 구조단백질 역시 동일한 L, G, N, M1, M2로 구성되어 있어 유사하나 혈청학적으로는 전혀 다르다. 또한 이들 감염증은 감염된 어류에 나타나는 증상에 있어

†Corresponding Author : Myung-Joo Oh, Tel : 061-659-3173, Fax : 061-659-3173, E-mail : ohmj@yosu.ac.kr

서 서로간에 약간의 차이점를 나타내는 것으로 알려져 있다. 즉, VHS 병어는 근육과 부레를 포함한 내부장기의 심한 출혈을 나타내는 반면, IHN 병어의 증상은 표피의 출혈을 수반하기도 하지만 급성형의 경우는 외부 증상 없이 대량폐사 하는 특성이 있다 (Wolf, 1988).

IHN 감염증은 1969년에 연어과 어류로부터 처음으로 보고되어진 (Wingfield *et al*., 1969; Amend *et al*., 1969) 이래로, 1973년 이전까지는 북미에서 주로 발생하였으나 지금은 전세계로 확산되어 많은 피해를 초래하고 있다. 특히 우리나라에서도 대량 폐사된 무지개송어 치어에서 IHNV가 분리됨으로써 IHNV가 우리나라에서 매년 발생하는 무지개송어 대량 폐사의 원인임이 확인된 바 있다 (Park *et al*., 1993). 하지만 1970년대 이후 지금까지 약 25년간에 걸쳐 국내에서 사육되어진 무지개송어에서부터 VHS의 발생보고 예는 없었다.

본 연구에서는 2000년 12월 충북 제천과 2001년 3월 경북 구미에 소재한 양식장에서 사육중이던 무지개송어 성어가 표피출혈과 함께 부레와 근육층의 심한 출혈증상을 수반하며 폐사되었으며, 이와같은 폐사의 형태는 일찍이 국내에서 보고된 예가 없는 VHSV의 감염증과 매우 유사하여 그 폐사의 원인 및 본 질병의 특성을 파악하고자 행하여졌다.

재료 및 방법

바이러스의 분리

2000년 12월 충북 제천의 무지개 송어 양식장에서 채집된 병어와 2001년 3월 경북 구미 무지개송어 양식장에서 채집한 병어를 대상으로 바이러스의 분리를 행하였다. 병어의 크기는 체장이 약 30~40cm, 체중은 약 350~400g의 성어였으며, 사육수온은 약 9~11℃의 저 수온상태로 근육층의 심한 출혈을 동반하며 폐사하고있었다. 폐사 및 빈사상태인 어체의 신장과 비장조직을 9배 (4.5*ml*/0.5g)의 HBSS를 첨가하여 균질화한 다음, 원심 분리와 여과 (0.45㎛ filter)를 통하여 바이러스분리용 시험액을 제작하였고, 준비된 시험액은 -80℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

세균 및 기생충검사

세균 검사를 위하여 채집된 병어를 해부하여 간, 신장, 비장조직 그리고 체표 출혈부위를 무균적으로 채취하여 BHIA (Brain Heart Infusion Agar) 평판배지에 도말하고 15℃ 및 20℃ 에서 1주일간 배양하였다. 또한 병어의 기생충 감염여부를 확인하기 위하여 외부관찰 및 체표와 아가미 그리고 각각의 장기를 분리하였고, 분리된 조직은 PBS로 세척한 후 조직 표본을 제작하여 광학현미경하에서 관찰하였다.

주화 세포

무지개송어 시료로부터 바이러스 배양을 위하여 chinook salmon embryo cell line (CHSE-214: Lannan *et al*., 1984)을 상법에 따라 계대배양하여 준비하였고, 100 IU/*ml*의 penicillin, 100㎍/*ml*의 streptomycin, 10% FBS (Fetal bovine serum)를 첨가한 MEM (Eagle's minimum essential medium, Gibco)을 사용하여 배양하였다.

시험용 바이러스 및 바이러스 감염가

병어의 조직에 대한 배양실험을 통하여 얻어진 바이러스 분리주들 중에서 충북 제천의 무지개송어 양식장에서 채집한 병어에서 분리한 바이러스 분리주(RTJ)와 경북 구미의 무지개송어 양식장에서 채집한 병어에서 분리한 바이러스 분리주 (RTK)를 대표 분리주로하고 이들을 대상으로 특성비교 연구를 행하였다. 표준 IHNV 바이러스주로서는 일본 호카이도의 chum salmon (*Oncorhynchus keta*)에서 분리된 IHNV-ChAb 균주를 일본국 북해도 대학의 요시미즈 교수로부터 분양 받아 사용하였다. 바이러스 감

염가의 비교는 CHSE-214 세포를 이용한 TCID50법으로 행하였다.

바이러스의 정제

CHSE-214 세포를 75F flask에 단층 배양하여 바이러스 (IHNV-ChAb, RTK 그리고 RTJ)를 각각 15개의 플라스크에 접종하였다. 15℃에 배양하면서 세포가 완전히 lysis되는 것을 확인한 뒤 배양액을 모으고, 2,500rpm에서 20분, 4,000rpm에서 30분간 각각 2번씩 원심 분리하여 세포잔유물을 제거하였다. 여기서 얻어진 상층액을 28,000rpm에서 2시간 원심 분리하고 바이러스 펠렛을 TNE buffer에 부유시켰다. TNE buffer에 부유시킨 바이러스를 Sucrose discontinuous gradient 20% 와 50%의 농도 구배법으로써 초원심분리를 통해 바이러스를 획득하였다.

바이러스 항혈청 제작

정제된 각각의 바이러스 (IHNV-ChAb, RTK, RTJ) 500 $\mu\ell$와 Complete Ajuvant 500 $\mu\ell$를 유화하여, 토끼의 등에 1차 피하주사하고, 2주 뒤 정제된 바이러스 500 $\mu\ell$와 Incomplete Ajuvant 500 $\mu\ell$를 유화하여 토끼의 등에 2차 접종하였다. 2차 접종 2주 후에 정제된 바이러스 1 $m\ell$를 피하주사하고, 3일 후에 채혈하였다. 채혈된 혈액은 4℃에서 24시간 보관한 후에 혈청을 분리하여 56℃에서 1시간 불활화한 후, 사용시까지 -80℃에 보관하였다.

바이러스 중화 시험

75 cm^2 플라스크에 충분히 배양된 CHSE-214 세포를 계대 배양하여 94 well plate에 1.0×10^6 cell/$m\ell$를 100$\mu\ell$씩 분주하여 15℃에서 24시간 배양하여 plate 바닥에 부착시켰다. 항원은 Control로서 IHNV-ChAb, 실험구로서 RTK와 RTJ를 사용하였다. 각각의 바이러스의 감염가를 100TCID50/$m\ell$ 로 조정하여 항원을 희석하였고, 일본국 북해도 대학의 요시미즈 교수로부터 분양 받은 Anti-VHSV serum과 본 연구를 통하여 제작되어진 Anti-IHNV-ChAb serum, Anti-RTK serum 그리고 Anti-RTJ serum을 50배로 희석한 다음 2^n으로 단계별 희석하여 준비하였다. 항원과 항체를 1:1로 반응시켜 실온에서 1시간 반응시킨 후 준비된 96 well plate에 100 $\mu\ell$씩 접종한 후, 15℃에 배양하면서 CPE를 관찰하였다 (Okamoto *et al.*, 1983).

전자현미경적 관찰

분리 바이러스의 형태적 관찰을 위하여 M.O.I가 0.1이 되게 CHSE-214 세포에 분리주를 감염시킨 후 15℃에서 24시간 배양하고, scraper로 감염된 세포를 수확하여 1000×g에서 15분간 원심 분리하였다. 원심분리를 통하여 얻어진 펠렛을 25 % 글루타르알데하이드에 2시간 고정시킨 후 세척용 buffer (0.1M phosphate buffer)로 3회 세척하고, OsO_4 고정과 에탄올 탈수를 거쳐, epoxy resin으로 포매 후 초박절편을 제작하였다. 초박절편은 5 % uranyl acetate 및 0.04 % lead citrate으로 이중염색하여 투과 전자현미경하에서 관찰하였다.

구조 단백질 분석

단백질 구조 분석은 정제된 바이러스 RTJ와 RTK를 10% polyacrylamide gel 상에서 전기영동한 후 CBR-250 염색액 (Coomassie Brilliant Blue 0.5g, Methanol 250 $m\ell$, Acetic acid 100 $m\ell$, DW2 650 $m\ell$)으로 염색하고, 탈수액 (Acetic acid 100 $m\ell$, Methanol 250 $m\ell$, Distilled water 650 $m\ell$)에 탈수 한 뒤에 건조하여 관찰하였다. 아울러 SDS PAGE에 나타난 단백질을 nitrocellulose 막에 Towbin *et al.*, (1979)의 방법으로 blotting하고, Anti-IHNV serum과 Anti-VHSV serum과 반응시켜 비교하였다.

감염 실험

감염실험은 본 연구에서 분리된 바이러스

(RTK, RTJ)와 기존에 보고된 IHNV와의 병원성의 차이를 알아보기 위하여 실시하였다. 실험어는 경북 안동의 무지개송어 양식장으로부터 당년생 무지개송어 치어 (전장 10cm)를 지원 받았으며, 실험 전 상법에 따라 바이러스와 세균검사를 각각 실시하였다. 감염실험은 10℃로 설정된 저온실에서 실시하였으며, 수조당 10마리의 어류를 사용하였다. 각각의 바이러스 감염가 (IHNV-ChAb, $TCID_{50}$ $10^{6.5}/m\ell$; RTK, $TCID_{50}$ $10^{5.5}/m\ell$; RTJ, $TCID_{50}$ $10^{6.75}/m\ell$)를 각각 $TCID_{50}$ $10^{3.5}/m\ell$와 $TCID_{50}$ $10^{1.5}/m\ell$의 감염가로 조정하여 1시간 침지법으로 감염시켰으며, 대조구에는 바이러스 배양액 대신 HBSS용액을 접종하였고, 실험 기간은 총 36일간 실시하였다. 실험 기간동안 폐사한 어체는 신장과 비장을 분리하여 바이러스 샘플 제작 후 RTG-2 세포에 접종하였으며, RT-PCR을 통해 IHNV의 감염 여부를 확인하였다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

바이러스에 감염된 세포 배양액 200㎕에서 추출된 RNA를 70℃에서 5분간 변성시킨 후 즉시 얼음위에서 냉각시키고, 여기에 Oligo $(dT)_{15}$ primer와 reverse transcription mixture를 넣어 전체 20㎕내의 조성을 50mM Tris-HCl, pH 8.3, 75mM KCl, 3mM $MgCl_2$, 0.5mM dNTPs, 10mM DTT, 10 units reverse transcriptase (GibcoBRL Co.)가 되게 하였다. 역전사 반응은 42℃에서 60분간 실시하였고 70℃에서 5분간 처리하여 잔존 효소활성을 제거하였으며, 이와 같은 처리로 얻어진 cDNA를 PCR의 주형으로 이용하였다. PCR primer는 IHNV G protein의 약 540bp를 target으로 하는 primer set을 사용 (Miller *et al.*, 1998)하여 PCR을 행하였다 (Fig. 1). PCR 반응은 100pM의 primer, 0.2mM dNTPs, 1U Taq DNA polymerase, 2.5mM $MgCl_2$이 포함된 혼합물에 합성된 cDNA 1㎕를 첨가하여 실시하였는데, 반응조건은 95℃ 45초간 denaturation, 50℃ 45초간 annealing, 72℃ 1분간 extension 반응을 30 cycle를 진행시키고, 72℃ 5분간, postextension을 반응시켜 1 step PCR을 행하였고, 2 step PCR도 같은 조건으로 반응시켰다. 증폭 후 PCR product는 1.5% agarose gel을 이용하여 확인하였다.

1 step primer sets	
IG 1	
5′-ATG-ATC-ACC-AAC-TCC-GCT-CAT-T-3′	
ID 3	
5′-GAT-TGG-AGA-TTT-TAT-CAA-CA-3′	
2 step primer sets	
ID 4	
5′ -CTC-TGG-ACA-AGC-TCT-CCA-AGG-3′	
ID 3	
5′-GAT-TGG-AGA-TTT-TAT-CAA-CA-3′	

Fig. 1. Primer sequences used for RT-PCR amplification of IHNV genes on protein G junction region by designed Miller *et al.* (1998).

결 과

감염어 및 감염세포

2000년 12월과 2001년 3월 제천과 구미에 소재한 무지개송어 양식장에 폐사 및 빈사상태의 어체를 대상으로 해부학적 검사를 행한 결과 표피와 내부장기의 출혈과 함께 근육층의 심한 출혈 소견을 나타내었다 (Fig. 2). 세균분리 실험결과 병원세균은 분리되지 않았으며, 상법으로 준비한 바이러스 검사용 시료를 CHSE-214세포에 접종한 결과 세포의 구형화를 특징으로 하는 CPE가 관찰되었다 (Fig. 3). 감염어의 해부학적 및 세균학적 실험과 감염세포에서의 세포변성효과의 형태적 특징으로 보아 감염 원인체는 세균이나 기생충 이외의 여과성 병원체임을 생각할 수 있었다. 분리된 RTK와 RTJ는 배양 7일째에 CHSE-214 세포에서 각각 $10^{5.5}$ $TCID_{50}/m\ell$, $10^{6.75}$ $TCID_{50}/m\ell$의 바이러스 가염가로서 IHNV-ChAb의 감염가인 $10^{6.5}$ $TCID_{50}/m\ell$와 유사한 감염가를 나타내었다 (Table 1).

Fig. 2. Infected rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* showing severe haemorrhage in the lateral muscle. (A) Jecheon, (B) Kumi.

Fig. 3. Cytopathic effect (CPE) of CHSE-214 cells infected with the RTJ, RTK from rainbow trout showing diffuse retraction.

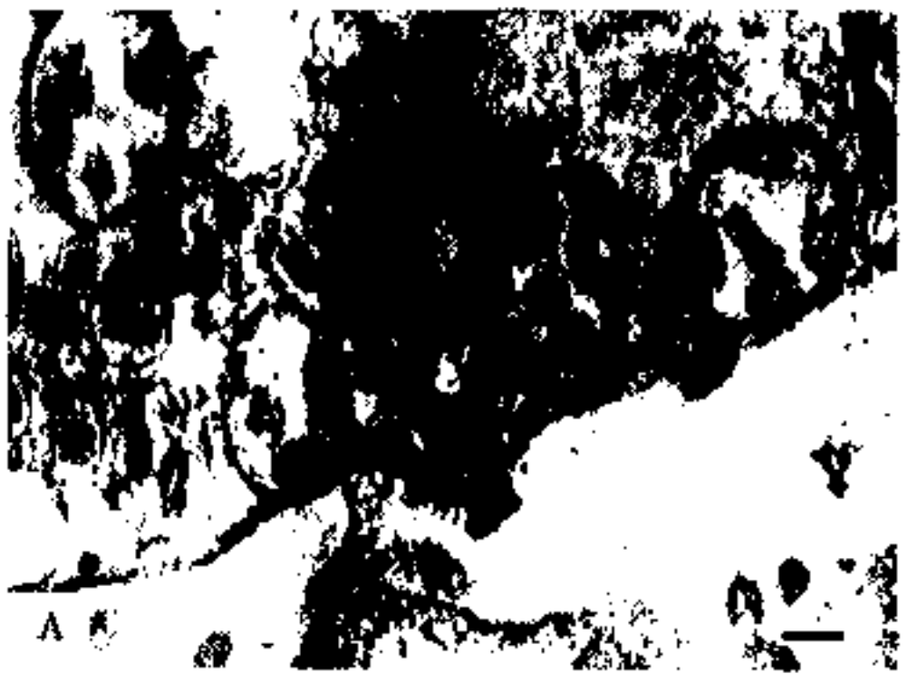

Fig. 4. Electron micrographs of an ultrathin section showing large number of bullet-shaped virus particles in CHSE-214 cells infected with the isolated virus. (A) RTJ, (B) RTK (Scale bar = 160nm).

전자현미경적 성상

감염세포를 TEM으로 관찰한 결과 탄환형 바이러스입자를 확인할 수 있었다 (Fig. 4). 바이러스 입자의 크기는 직경이 약 78nm이었고 길이는 약 180~190nm이었으며, 바이러스 입자는 envelope이 있는 것으로 관찰되어졌다. 본 연구에서 분리한 RTJ와 RTK는 전체적인 형태적 특징으로 보아 랍도바이러스의 일종임을 확인

Table 1. CHSE-214 cell line susceptibility of the isolated virus

Cell line	Titer (Log $TCID_{50}/m\ell$)		
	RTK	RTJ	IHNV-ChAb
CHSE-214	5.50	6.75	6.50

할 수 있었다.

혈청학적 성상

분리 바이러스주 RTK와 RTJ를 1:50으로 조정한 Anti-IHNV-ChAb serum, Anti-RTK serum, Anti-RTJ serum 그리고 Anti-VHSV rabbit serum과 교차중화반응의 결과 분리 바이러스주 RTK와 RTJ는 Anti-IHNV-ChAb, RTK 그리고 RTJ rabbit serum에 높은 중화 항체가를 나타내었다 (Table 2). 반면, Anti-VHSV rabbit serum에는 전혀 중화가 되지 않아 혈청학적으로 IHNV와 유사성을 갖는 것으로 판정되었다 (Table 2).

바이러스 구성 단백질

분리 바이러스 RTJ와 RTK의 구성 단백질을 SDS-PAGE로 분석한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 분리 바이러스는 4개의 구성단백질인 L,G, N, M1이 관찰되었으며, 이는 대조구인 IHNV-ChAb와 유사한 것으로 관찰되었다. Anti-IHNV-ChAb serum과 Anti-VHSV serum을 사용한 교차반응에서 IHNV-ChAb와 RTJ, RTK는 Anti-VHSV serum에서 교차반응이 나타나지 않았지만, Anti-IHNV-ChAb serum에서는 IHNV-ChAb는 G, N 단백질에서 밴드가 나타났고, RTJ는 N과 M1, RTK는 G,N,M1에서 밴드를 확인할 수 있었다.

감염 실험

본 연구에서 분리된 바이러스 (RTK, RTJ)와 기존에 보고된 IHNV와의 병원성의 차이를 알아보기 위하여 감염실험을 실시하였다. 감염실험에 사용한 실험어로부터 사전 세균과 바이러스 검사를 행한 결과 병원체는 분리되지 않았다. 감염 실험 36일 동안 대조구 (비 감염구)와 IHNV-ChAb 감염구에서는 한 마리도 폐사되지 않았으나, IHNV-RTK와 IHNV-RTJ 감염구에서는 각각 80%와 50%가 폐사되었다 (Table 3). 인위 감염어의 주요 증상으로 안구 돌출과 출혈, 장출혈과 근육층의 점상출혈이 공통적으로 관찰되었는데, 이러한 증상은 자연 발생된 성어에서 것과 유사하였다 (Fig. 6). 이 때 인위감염 폐사어를 대상으로 세균배양과 바이러스 검사를 실시한 결과 세균은 분리되지 않았으나, 바이러스는 모두 분리되었고, RT-PCR을 통하여 IHNV임을 확인할 수 있었다 (Fig. 7). 실험 종료 후 생존한 무지개송어를 대상으로 바이러스 검사를 실시한 결과 바이러스는 분리되지 않았다.

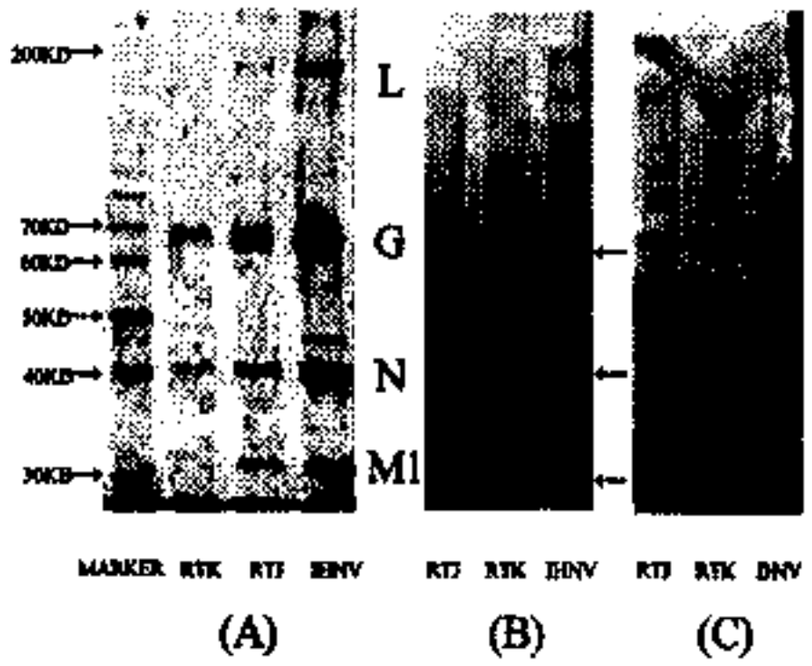

Fig. 5. SDS-PAGE and western blot analyses of structural proteins of IHNV-ChAb and RTJ, RTK. (A) SDS-PAGE, (B) Western blotting with antiserum against IHNV-ChAb, (C) with anti-VHSV serum.

Table 2. Serological relationship of the rainbow isolates(RTK, RTJ) with the IHNV-ChAb

Virus strain \ Antisera	Anti-IHNV-ChAb	Anti-RTK	Anti-RTJ	Anti-VHSV
IHNV-ChAb	7101	4604	2074	<55
RTK	7879	2425	4150	<55
RTJ	8299	7101	7480	<55

Table 3. Mortality and virus infectivity in the rainbow trout artificially infected with virus strain IHNV-ChAb, IHNV-RTK and IHNV-RTJ

Virus strain	Body weight(g)	Infection: Immersion Dosc *1	No. of test fish	No. of dead fish: Day post infection 10	20	30	Virus infectivity *2: Dead	Surviving	Cumulative mortality (%)
IHNV ChAb	11	3.5	10	0	0	0	-*3	-	0
	11	1.5	10	0	0	0	-	-	0
IHNV RTK	11	3.5	10	0	5	3	4.75	-	80
	11	1.5	10	0	0	3	-	-	30
IHNV RTJ	11	3.75	10	2	3	0	5.25	-	50
	11	1.75	10	0	0	0	-	-	0
Control	11	HBss	10	0	0	0	-	-	0

*1 Log $TCID_{50}/m\ell$ of virus, *2 Log $TCID_{50}/m\ell$ of fish, *3 Not detected.

Fig. 6. Dead fish of experimental infection.

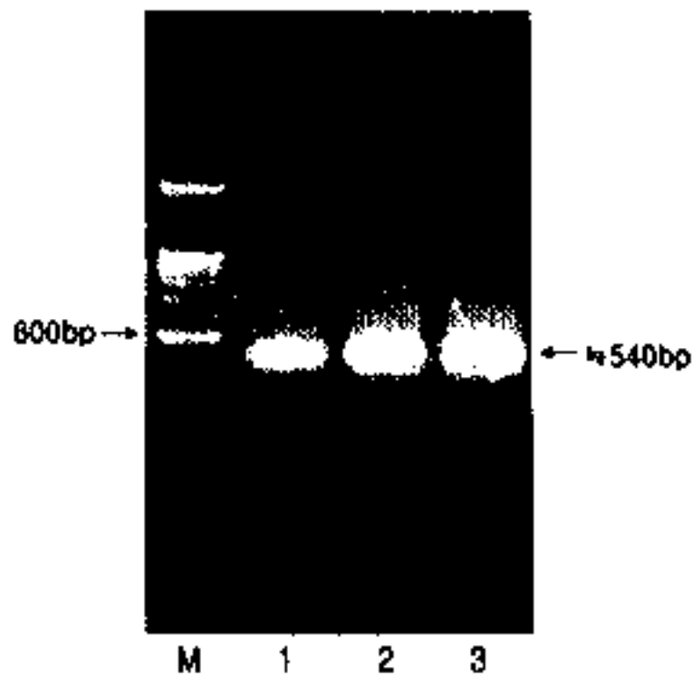

Fig. 7. Agarose gel electrophoresis of PCR products from genomes of RTK and RTJ from infected fish. M, Marker; line 1, IHNV-ChAb; line 2, RTK; line 3, RTJ.

고 찰

국내 무지개송어 (*Oncorhynchus mykiss*) 치어에서 IHNV가 분리됨으로써 IHNV가 우리 나라에서 무지개송어의 치어생산기에 폐사 원인체로 관여하고 있다는 것이 확인된 바 있다 (Park *et al.*, 1993). 2000년과 2001년 봄철에 충북 제천과 경북 구미의 송어 양식장에서 약 9~11℃의 저수온상태로 사육중이던 체장 약 30~40cm, 체중 약 350~400g의 성어에서 폐사가 연쇄적으로 발생하였다. 그 증상은 근육층의 심한 출혈을 동반하며 폐사하는 것으로 국내에 보고되지 않은 VHSV와 매우 유사 (Wolf, 1988)하다는 점에 근거하여 본 연구를 실시하였다. 세균과 기생충 검사 결과 어떤 병원체도 분리되지 않았으나 바이러스 검사를 위한 세포 배양법에서 세포의 구형화를 특징으로 하는 포도송이 모양의 CPE가 확인되어 랍도바이러스임을 의심하였고, 전자현미경적 성상에서 envelope을 가지는 탄환모양의 바이러스 입자의 관찰로 랍도바이러스의 일종

임을 확인하였다. 이에 IHNV와 VHSV는 혈청학적 성상이 완전히 다름을 이용하여 중화시험과 ELISA실험을 행하였는데, 실험 결과, 바이러스주 RTK와 RTJ는 Anti-IHNV-ChAb, RTK 그리고 RTJ 토끼 혈청에 높은 중화 항체가를 나타내는 반면, Anti-VHSV 토끼 혈청에는 전혀 중화가 되지 않아 혈청학적으로 IHNV와 유사성을 갖는 것으로 판정되었다. 이상의 실험의 결과로 RTK와 RTJ는 IHNV일 가능성으로 높게 나타내었고, 확증을 위해 SDS-PAGE와 western blot를 행하였다. SDS-PAGE에 나타난 RTK와 RTJ의 구조 단백질은 대조구인 IHNV-ChAb와 매우 유사한 크기의 단백질로 관찰되었으며, 이를 western blot했을 때 Anti-VHSV 혈청에서는 특이 단백질에 대한 반응을 확인할 수 없었지만 Anti-IHNV-ChAb 혈청을 사용했을 때에는 G, N, M1에서 단백질 밴드를 확인할 수 있었다. 이상의 결과로 본 연구에서 무지개송어에 대량폐사는 IHNV에 의한 것임을 확인할 수 있었다.

본 연구의 분리주 (RTK, RTJ)와 기존에 보고된 IHNV와의 병원성 차이를 알아보기 위하여 안동의 무지개송어 양식장에서 지원받은 당년생 무지개송어 치어를 대상으로 36일 동안 감염실험을 실시한 결과, 비 감염구와 IHNV-ChAb 감염구에서는 폐사되지 않았으나, IHNV-RTK와 IHNV-RTJ 감염구에서는 각각 80%와 50%가 폐사되었다. Pilcher and Fryer (1980)는 여러 지역에서 분리된 IHNV의 병독성이 그 분리주에 따라 각각 다름을 발견하고 여러 종류의 IHNV가 있음을 시사하였으며, 서로 다른 IHNV의 분리주들이 보이는 항원성, 생화학적 특성 및 항원성 등이 모두 동일하지는 않음을 여러 연구자들이 보고하고 있다 (Winton *et al.*, 1988. LaPatra 1989. LaPatra *et al.*, 1990). LaPatra *et al* (1990)은 연어과 어류의 서로 다른 종에서 IHNV strain들이 나타내는 병원성의 차이를 보고하였는데, Type 2 strain (Idaho)은 무지개송어에서, Type 1 strain (Oregon)은 kokanee salmon에서, Type 3 strain (calfornia)는 chinook salmon에서 각각 심한 병원성을 나타내는 것으로 보고하였다. 본 연구의 결과에서 볼 때, 이번에 분리된 RTK와 RTJ 분리주는 IHNV type 중 type 2 strain과 유사함을 추정할 수 있고, 본 연구에 대조구로 사용된 IHNV-ChAb와는 다른 Type의 IHNV임을 의심할 수 있었다.

일반적으로 국내에서의 무지개송어 양식장에서 분리되어진 IHNV는 성어에게는 폐사를 일으키지 않으며, 치어에 한정되어 피해를 입히는 것으로 보고가 되어 왔으나 (Park *et al.*, 1993), 본 연구를 통하여 최근 들어 국내의 무지개송어 양식장 성어의 대량 폐사 원인체로서 또 다른 IHNV가 분리되어짐에 따라 앞으로 이들 바이러스 strain의 확보 및 사육단계별 어체 성장도에 따른 바이러스의 병원성 비교 연구를 통하여 IHNV 감염에 대한 방역의 재검토가 행해져야 할 것으로 생각되어진다.

요 약

2000년 12월 충북 제천과 2001년 3월 경북 구미에 소재한 무지개 송어 양식장에서 무지개 송어가 대량 폐사되어 병어를 검사한 결과, 외부증상은 지느러미의 출혈와 아가미 빈혈을 보였으며, 해부학적 검사를 행한 결과, 부레와 복강내 지방, 근육층의 출혈 등을 수반하였다. 바이러스 sample을 제작하여 세포에 접종한 결과 세포의 구형화를 특징으로 하는 CPE가 관찰되었다. 감염세포를 TEM으로 관찰한 결과 탄환형의 바이러스입자를 확인할 수 있었다. 바이러스 입자의 크기는 직경 80nm, 길이 170nm이었고, 입자의 표면은 envelope으로 둘러싸여 있는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 형태적 특징으로 볼 때 Rhabdovirus의 일종임을 확인할 수 있었다. 분리 바이러스주 RTK와 RTJ를 Anti-IHNV-ChAb serum, Anti-RTK serum, Anti-RTJ serum 그리고 Anti VHSV serum과 교차중화반응 시험한 결과 분리 바이러스주 RTK와 RTJ는 Anti-IHNV-ChAb serum, Anti-RTK serum 그리고

Anti-RTJ serum에 높은 중화 항체가를 나타낸 반면, Anti-VHSV serum에는 매우 낮은 항체가를 나타내었다. 단백질 구조 분석의 결과로 L, G, N, M1이 관찰되었으며, 이들의 분자량은 각각 180, 68, 41, 32kDa에 해당하였다. Anti-IHNV serum과 Ant-VHSV serum을 이용한 교차반응에서 Anti-IHNV serum에 대해서만 반응이 나타났다. 당년생 무지개 송어를 대상으로 병원성 실험을 한 결과, 실험 기간동안 Control 어류와 IHNV-ChAb에 감염된 어류는 폐사 예가 없었으나, IHNV-RTK와 IHNV-RTJ에 감염된 어류는 (자연 감염어와 유사한 증세를 보이며) 각각 80%와 50%가 폐사되었다.

참 고 문 헌

Amend, D.F., Yasutake, W.T. and Mead, R.W. : A hematopoietic virus disease of rainbow trout and sockeye salmon. Trans. Am. Fish Soc., 98 : 796~804, 1969.

Bullock, G.L., Rucker, R.P., Amend, D., Wolf, K. and Stuckey, H.M. : Infectious pancreatic necrosis : transmission with Iodine-treated and nontreated eggs of brook trout(Salvelinus fontinalis). J. Fish Res. Board. Can., 33 : 1197~1198. 1976.

De Kinkelin, P. Michel, C.H. and Ghittino, P. : Tratado de las enfermedades de los peces. Ed. : Acribia. Zaragoza., 1991.

Hedrick, R. P., Leong, J.C. and Fryer, J.L. : Persistent infection in salmonid cells with infectious pancreatic necrosis virus. J. Fish Pathol., 1 : 297~308. 1978.

Lannan, C. N., Winton, J. R. and Fryer, J. L. : Fish cell line: Establishment and characterization of nine cell line from salmons. In vitro, 20: 671-676, 1984.

LaPatra. S.E. : Strain differentiation and detection of infectious hematopoietic necrosis virus. Doctoral dissertation. Oregon State University, Corvallis, 1989.

LaPatra, S.E., Groberg, W.J., Rohovec, J.S. and Fryer, J.L., : Size and susceptibility of two salmonid species to two strains of infectious hematopoietic necrosis virus. Trans. Am. Fish Soc., 1990.

McAllister, P.E. : Infectious viricas de peces cultivados. Patologia en Acuicultura (C.A.I.C.Y.T.) Madrid. 1988.

Miller, T.A., Rapp, J., Wastlhuber, U., Hoffmann, R.W. and Enzmann, P.-J. : Rapid and sensitive reverse transcriptase polymerase chain reaction based detection and differential diagnosis of fish pathogenic rhabdoviruses in organ samples and cultured cells. Dis. Aquat. Org., 34: 13-20, 1988.

Okamoto, N., Sano, T, Hedrick, R.P. and Fryer, J.L. : Antigenic relationship of selected strains of infectious pancreatic necrosis virus and European eel virus. J. Fish Dis., 6 : 19-25. 1983.

Ortega, C., Planas, E., Docando, J., Muzaulz, J.L., Alonso, J.L. and Simon, M.C. : Epidermiological risk factors affecting the presentation of viral agents in freshwater aquaculture in north eastern Spain. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 13(1) : 154~157. 1993.

Pilcher, K.S. and Fryer, J.L. : The viral diseases of fish: a review through 1978. Part Ⅰ : Disease of proven viral etiology. CRC Crit Rev. Microbiol., 7 : 287~364. 1980.

Park, M.A., Shon, S.G., Lee, S.D., Chun, S.K. , Park, J.W., Fryer, J.L. and Hah, Y.C. : Infectious hematopoietic necrosis virus from salmonids cultured in Korea. J. Fish Dis., 16 : 471~478. 1993.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. : Electrophoretic transfer of proteins from poly-

acrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natio. Aca. Sci. USA, 76: 4350-4354, 1979.

Winton, J.R., Arakawa, C.K., Lannan, C.N. and Fryer, J.L. : Neutralizing monoclonal antibodies recognize antigenic variants among isolates of infectious hematopoietic necrosis virus. Dis. aquat. Org., 4: 199-204, 1988.

Wingfield, W.H., Fryer, J.L. and Pilcher, K.S. : Properties of the sockeye salmon virus(Oregon strain). Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 130, 1055-1059, 1969.

Wolf, K. : Fish viruses and fish viral diseases. p 83~109, 217~242. Cornell University Press. New York, 1988.

Manuscript Received : April 25, 2003
Revision Accepted : May 26, 2003
Responsible Editorial Member : Kwan-Ha Park
(Kunsan Univ.)