

수온에 따른 참돔이리도바이러스(RSIV)의 감수성 품종에 대한 병원성 분석

정지민* · 권문경** · 김보성†

*국립수산물품질관리원(연구사) · **국립수산물품질관리원(연구관) · †군산대학교(교수)

Effect of Water Temperature on the Pathogenicity of Red seabream iridovirus in Susceptible Host Species

Ji Min JEONG* · Mun-Gyeong KWON** · Bo Seong KIM†

National Fishery Products Quality Management Service(*researcher, **senior researcher) ·

†Kunsan National University(professor)

Abstract

Red sea bream iridovirus (RSIV) causes serious economic losses in Korea by causing mass mortality in rock bream fish during the season of high water temperatures (25~30°C). More than 30 additional species of cultured marine fish are listed as susceptible. Among them are major aquaculture species, including rock bream, red sea bream, black porgy, rockfish, and olive flounder. In this study, the effect of water temperature on the pathogenicity of RSIV in these fish species was investigated. RSIV was found to be pathogenic to rock bream at high temperatures (28°C) but not at low temperatures (18°C). In the histopathological investigation of the RSIV-infected rock bream at 18°C, only lymphocyte infiltration was seen, however after 14 days of infection at 28°C, development of inclusion body-bearing cells was observed. However, neither low nor high water temperatures showed RSIV genome copies, high cumulative mortality, or inclusion body-bearing cells in RSIV-infected black porgy, rockfish, or olive flounder. These results may contribute to selective quarantine measures based on pathogenicity and water temperature distinctions.

Key words : RSIV, Pathogenicity, Water temperature, qPCR, Rock bream

I. 서론

참돔이리도바이러스(red sea bream iridovirus, RSIV)는 이리도바이러스과(Iridoviridae)의 정20면체의 double-stranded DNA 바이러스로 알려져 있다(Kurita and Nakajima, 2012; Chinchar et al., 2017). 일본 참돔양식장에서 처음 발견되어 명명되었고(Inouye et al., 1992), 30종이상의 농어목과

가자미목 해산어류에서 감염이 보고되었다(Matsuoka et al., 1996; Kawakami and Nakajima, 2002). 우리나라에서는 1998년 남해안에서 고수온기 양식 돌돔에 발생하였고, 이후 여름철 고수온기에 지속적으로 발생하여 경제적 손실을 일으키고 있다(Oh and Jueng, 1999; Sohn et al., 2000; Kim et al., 2002). 참돔이리도바이러스에 감염된 어류는 비장 비대, 아가미 점상 출혈, 신장 팽창

† Corresponding author : 063-469-1884 fishpath@kunsan.ac.kr

※ 본 연구는 국립수산물품질관리원 (해양수산부 NFQS2023002)의 지원에 의해 수행되었습니다.

및 빈혈 등의 증상이 보고되었다(Yanong and Waltzek, 2010; Kurita and Nakajima, 2012; WOA, 2022).

병리조직학적 특징으로 Giemsa solution에 의해 진하게 염색된 비정상적으로 이형비대세포 (Abnormally enlarged cells; inclusion body-bearing cells)를 감염된 어류의 비장, 심장, 신장, 장 및 아가미에서 관찰할 수 있으며(Inouye et al., 1992), 전자현미경으로 비대세포에서 직경 200~240 nm의 비리온(virion)을 관찰할 수 있다(Kurita and Nakajima, 2012).

현재까지 RSIV에 감염된 어류에 대한 효과적인 치료제가 없으며, 정확한 진단과 적절한 방역 조치만이 이 질병에 의한 피해와 확산 방지를 위해 가장 중요하다 할 수 있다. 현재 WOA(2022) RSIV의 감수성 품종은 30종 이상이 기재되어있으며 그중 돌돔, 감성돔, 조피볼락 및 넙치는 우리나라 주요양식 품종으로 알려져있다.

본 연구에서는 우리나라 주요 양식품종에서 수온에 따른 참돔이리도바이러스의 병원성 활성 분석을 수행하였고, 이러한 결과는 수온 및 품종별 병원성 차이에 따른 선택적 방역조치를 위한 기초자료로 유용하게 이용될 것으로 예상된다.

II. 재료 및 방법

1. 표준 RSIV strain

본 연구에서는 2015년 경남 남해군 양식 돌돔에서 분리된 RSIV strain(ADC-RSIV2015-021)을 실험에 이용하였다. 돌돔의 비장조직을 마쇄하여 L-15(SIGMA)에 현탁하고, 13,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 이를 PMF cell(L-15 with 1% penicillin/streptomycin and 5% FBS)에 100 μ l 접종하고, 25 $^{\circ}$ C에서 7일 후 Cytopathic effects(CPE)를 확인하고, 10일째 상층액을 회수하여 1 ml씩 -80 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

2. RSIV 정량 분석을 위한 검량곡선

RSIV의 정량 분석은 Caipang et al.(2003)의 SYBR Green method에 따라 분석 하였다. 정량분석을 위해 RSIV 배양 상층액 300 μ l에서 High pure PCR template Preparation kit(Roche, Swiss)를 이용하여 genomic DNA를 추출하고, MCPL primer set <Table 1>을 이용하여 증폭하였다. 429 bp의 PCR 산물은 pGEM T-easy Vector System I (Promega, USA)와 Escherichia coli JM109를 이용하여 클로닝 하였다. Hybrid-Q Plasmid Rapidprep kit를 이용하여 plasmid를 추출 하였으며, 추출된 plasmid는 NanoVue (GE Healthcare, USA)를 이용하여 농도를 측정 한 뒤 아래의 식을 이용해 표준 시료의 copy No.를 산출하였다.

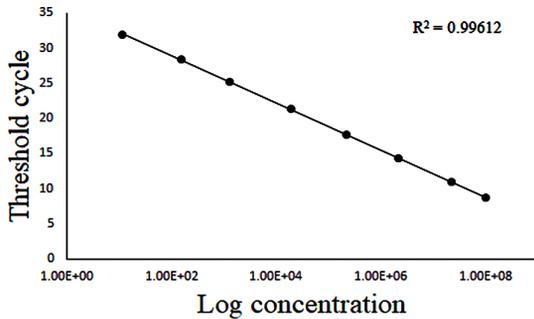
$$\text{Number of copies} = (\text{amount of ssRNA in nanograms} \times 6.022 \times 10^{23}) / (\text{length of ssRNA in basepairs} \times 1 \times 10^9 \times 330)$$

<Table 1> primer and probe used in this study

	Sequence	Size
MCPL sense	5'-CCTATCAAAACAGACTGGC-3'	429 bp
MCPL anti-sense	5'-TCATTGTACGGCAGAGACA-C-3'	
MCPS sense	5'-CTGCGTGTTAAGATCCCCTC-CA-3'	100 bp
MCPS anti-sense	5'-GACACCGACACCTCCTCAA-CTA-3'	

표준 시료의 검량곡선을 산출하기 위하여 10⁻⁷ 배까지 단계희석 한 plasmid DNA를 qPCR분석을 이용하여 Ct값을 측정 하였다. qPCR은 QIAgen QuantiTect SYBR green PCR kit(Germany)와 희석된 plasmid, primer를 첨가한 후, PCR반응 조건은 50 $^{\circ}$ C에서 2분, 95 $^{\circ}$ C에서 15분 initial denaturation 후, 95 $^{\circ}$ C에서 15초 denaturation, 55 $^{\circ}$ C에서 30초 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 30초간 extension의 반응을 40

cycles로 수행하였다. 최종적으로 측정된 Ct값으로 표준 검량곡선을 산출 하였다.



[Fig 1] Analysis of a qPCR assay performed in triplicate on aliquots of plasmid DNA containing the Megalocytivirusmajor capsid protein gene (MCP), serially diluted 10-fold. (a) Amplification plot of the real-time PCR assay. (b) The standard curve was obtained by regression analysis of cycle threshold values versus initial plasmid copy numbers.

3. 수온에 따른 RSIV 인위감염 후 감수성 품종에 대한 병원성 분석

가. 인위감염 농도 결정 시험

인위감염 실험을 위해 수량 250 L의 원형수조 (직경 80 cm × 높이 72 cm)를 환수량 1일 약 30 회전, 수온은 28±0.5℃로 유지하였다. 돌돔은 실험에 이용하기 전까지 2주간 순치하였으며, 순치 기간 중 질병 발생이나 폐사한 개체는 없었다.

-80℃에 보관중인 상층액 샘플의 RSIV 정량분석을 위해 DNA를 추출하고, MCPS primer set <Table 1>과 QuantiTect SYBR Green PCR kit(QIAGEN, Germany)를 이용하여 quantitative real-time PCR을 수행한 결과 2.5 × 10⁸ copies/ml로 확인되었다. 이를 원액으로하여 10⁻⁵ 단계 희석 한 후 돌돔에 인위감염 하고, 21일간 폐사율을 확인 하였다. 폐사율 곡선이 비교적 완만하고, 인위감염 21일 전까지 전량폐사가 나타난 10⁵

copies/fish 농도를 감성돔, 넙치 및 조피볼락의 인위감염농도로 설정하였다([Fig. 2a]).

나. RSIV 인위감염에 따른 감수성품종의 병원성 분석

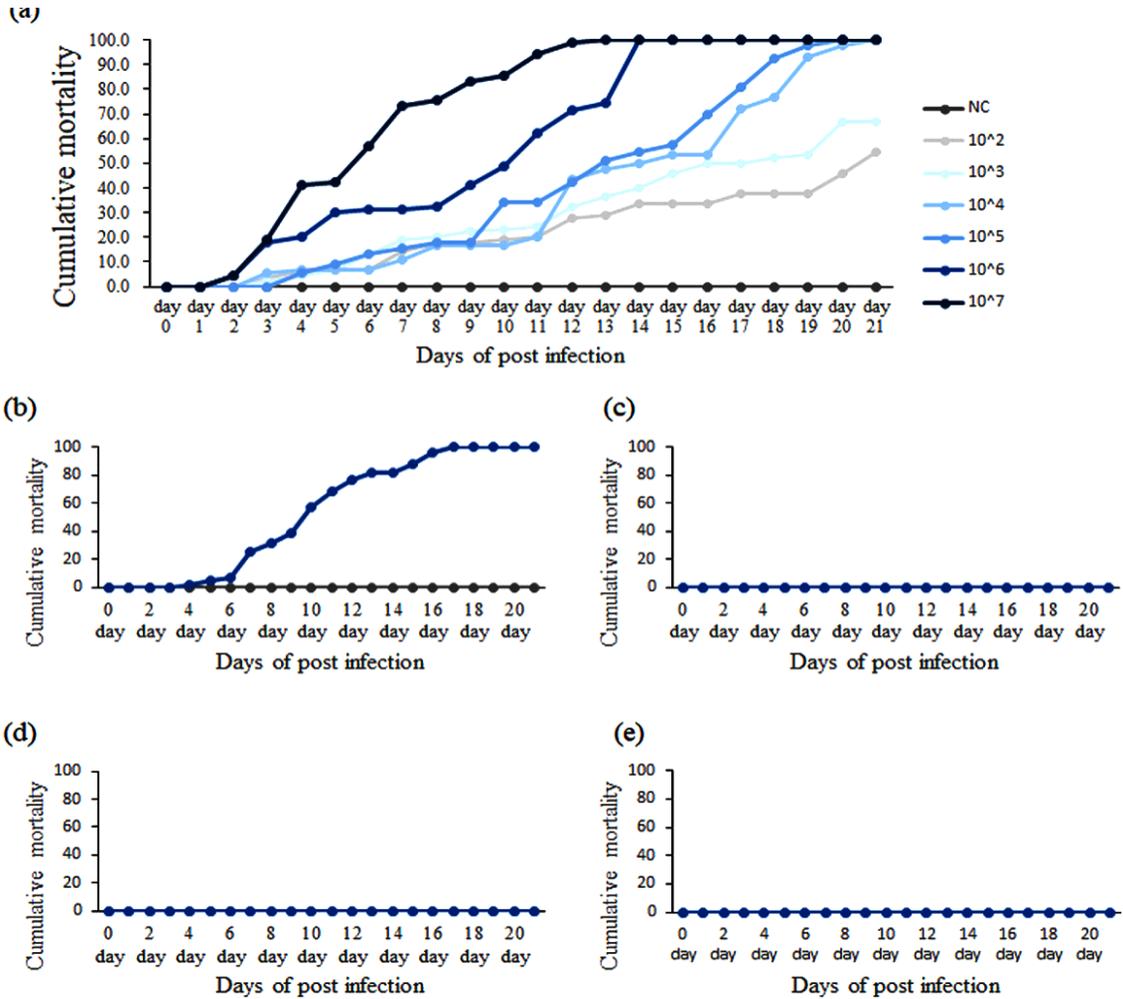
RSIV 인위감염 후 병원성 분석을 위해 감성돔, 넙치 및 조피볼락을 각각 저수온(18±0.5℃)과 고수온(28±0.5℃) 수조에서 인위감염 전까지 2주간 순치하였다. RSIV 인위감염 후 폐사율을 분석하기 위해 바이러스를 10⁵ copies/fish의 농도가 되도록 복강 내 주사하고, 21일까지 관찰하였다.

RSIV 인위감염 후 비장내 바이러스 정량분석 및 병리조직학적 관찰을 위해 인위감염 1, 3, 5, 7, 14 및 21일 후 각각 어류 3마리의 비장을 샘플링하였다. 정량분석을 위해 전술한 방법대로 DNA를 추출하고, MCPS primer set <Table 1>과 함께 qPCR을 수행하였다. 비장의 병리조직학적 관찰을 위해 추출한 비장조직을 10% 중성포르말린(10% neutral buffered formalin)에 고정하였으며, 이후 전처리기계(Leica TP 1020, Germany)를 통한 파라핀 침투, 포매과정을 거쳐 rotary형 microtome (Leica RM2125 RTS, Germany)을 활용하여 4-5μm 두께의 박절편을 얻어 H&E염색을 실시하였다. 제작된 조직 slide는 MoticEasyScan One (Motic, China)으로 관찰하여 촬영되었다.

III. 결과 및 고찰

1. RSIV 정량 분석을 위한 검량곡선

Plasmid DNA copy 값(x)에 대한 Ct 값(y)의 표준 회귀식은 $y = -3.368 \times x + 35.778$ 를 이용하였다([Fig. 1]). Caiping et al.(2003)의 연구 결과에서 특이 primer를 이용하여 117.6 copies/5μl 범위 까지 검출되었다. 본 연구에서 Ct값 35에서 1.7 copies/rxn 까지 검출이 확인되었으며, 안정성과 신뢰성을 고려하여 Ct값 32 (1.6 × 10 copies/rxn)를 cut-off value로 설정하였다.

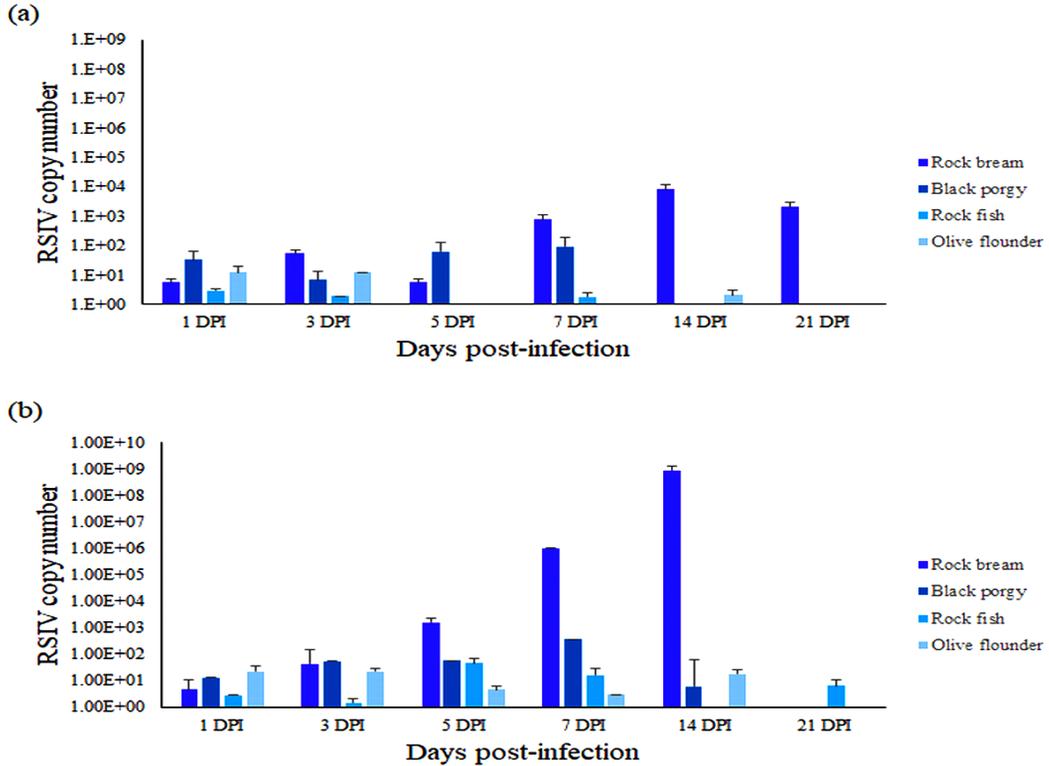


[Fig 2] (a) Cumulative mortality of rock bream injected intraperitoneally (IP) with serially diluted RSIV(10⁷ copies/fish ~ 10² copies/fish) at 28°C. Cumulative mortality of rock bream (b), black porgy (c), rockfish (d) and olive flounder (e) injected intraperitoneally (IP) with 10⁵ copies/fish of RSIV at difference water temperature 18°C and 28°C.

2. 주요 양식품종의 RSIV 인위감염 후 병원성 분석

돌돔, 감성돔, 조피볼락 및 넙치를 각각 18°C와 28°C 수조에 순차적으로 RSIV를 10⁵ copies/fish의 농도로 복강주사 1일, 3일, 5일, 1주, 2주 및 3주 후 비장을 적출하여 조직 내 바이러스 정량분석 및 병리조직학적 분석을 수행하였다. 28°C 돌돔

에서 감염 5일 후부터 비장 조직내 RSIV는 1 × 10³ copies/mg으로 검출되었고, 7일(9 × 10⁶ copies/mg) 후 급격하게 증가하여 접종 14일(9 × 10⁹ copies/mg) 후 가장 높게 나타났으며([Fig. 3b]) 이후 돌돔(28°C)은 전량 폐사 하였다([Fig 2b]). 18°C 돌돔에서는 접종 14일 후 8 × 10³ copies/mg 그리고 21일 후 2 × 10³ copies/mg 으로 나타났다 ([Fig. 2a]).



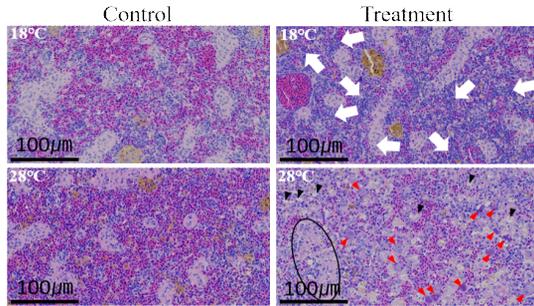
[Fig 3] Quantitative analysis of RSIV genome copies was performed in the spleen of rock bream, black porgy, rockfish and olive flounder after 1~21 dpi of challenge with RSIV(10^5 copies/fish) at difference water temperature (a) 18°C and (b) 28°C.

돌돔에서 RSIV 인위감염 후 폐사율을 분석한 결과 28°C 돌돔에서 인위감염 4일 후부터 폐사가 발생하기 시작하여 17일 후에 전량 폐사 하였으나, 18°C 수조에서는 폐사가 발생하지 않았다. 또한 18°C수조의 돌돔 비장에서 인위감염 14일 후 가장 높은 바이러스 copies(10^3 /mg)가 검출되었는데, 이러한 결과는 돌돔에서 RSIV는 저수온에서도 바이러스 복제(virus replication)가 일어난다는 것을 의미한다(Kim et al., 2022). 그러나 저수온(18°C)에서 돌돔의 폐사율 분석 결과로 미루어, 저수온 환경에서 RSIV는 돌돔에 폐사를 초래할 만큼의 충분히 복제하지 못한 것으로 예상된다. 병리조직학적 분석에서 돌돔은 18°C의 전구간에서 이형비대세포가 발생하지 않았으며, 림프구

침윤 소견이 우점적으로 나타났다([Fig. 4]). 28°C의 14일에서 이형비대세포의 출현이 관찰되었으며, 인근의 ellipsoid의 응고괴사, 대식세포의 포식 활성 증가에 따른 공포화 소견이 나타났다([Fig. 4]).

특히, 조직병리학적 소견에서 이형비대세포가 첫 번째로 출현하는 구간인 7일과 14일 사이 기간에 돌돔의 폐사량이 급증하는 것으로 RSIVD 증상의 발현과 폐사량이 연관이 깊은 것으로 나타난다. 돌돔은 17°C미만의 수온에서 RSIV에 대한 감수성이 현저히 낮으며(Jung et al., 2015), RSIV 복제를 위한 적절한 온도범위는 20~25°C로 보고되었다(Oh et al., 2016; Jung et al., 2017). 이러한 결과는 RSIV의 병원성이 수온에 의존적으

로 발현한다는 연구결과와 일치한다(Jun et al., 2009; Jung et al., 2015; Kim et al., 2022).

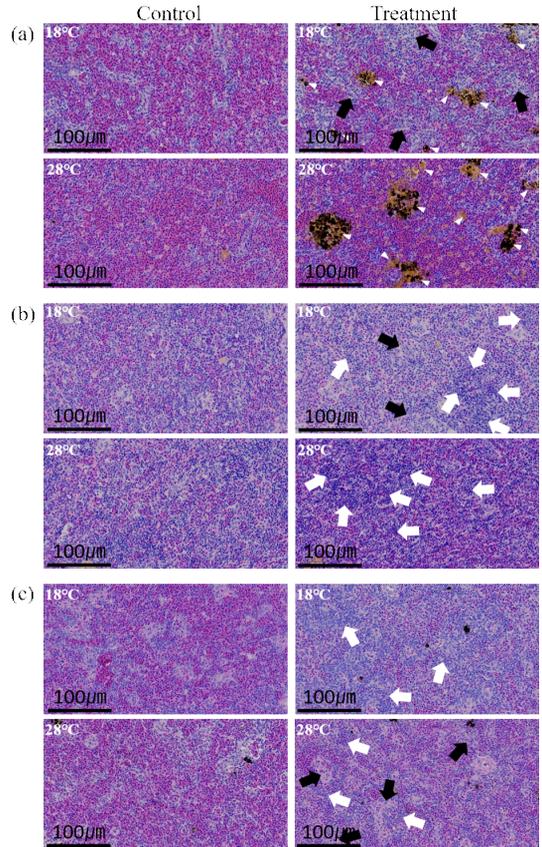


[Fig. 4] Histopathological observation of spleen in Rock bream after 14 day post-injection with 18°C and 28°C. lymphocytic infiltration (white arrows) in treatment groups compared with control groups at 18°C; coagulative necrosis of ellipsoid (black ellipse), vacuolation of macrophage associated with phagocytosis (black arrowheads) and megalocytic inclusion bodies (red arrowheads) in treatment groups at 28°C.

한편 돌돔 이외 감성돔, 조피볼락 및 넙치의 인위감염 후 폐사율분석 결과 모든 시험구(18°C, 28°C)에서 폐사가 나타나지 않았으며([Fig. 2c, d and e]), 비장 내 RSIV 정량분석 결과 모든 시험구에서 검출한계 미만으로 나타났다([Fig. 3]). 이전연구에서 이리도바이러스 인위감염 후 조피볼락(환수율: 50%/day) 및 넙치(환수율: 20%/day) 조직내 바이러스 검출이 보고되었다(Jung et al., 2016; Min et al., 2021). 이러한 결과로 미루어 수조 크기 및 환수율 등 조건에 따라 인위감염 후 조직 내 바이러스 보균량이 달라질 수 있을 것으로 예상된다.

병리조직학적 분석결과에서 18°C 및 28°C 전구간에서 샘플링한 감성돔, 조피볼락, 넙치 RSIV 접종 군들은 모두 이형비대세포가 확인되지 않았으나, Control 군과 대조하여 림프구의 침윤, ellipsoid 비후, MMC 생성증가 소견이 나타났다

([Fig. 5a, b and c]). 림프구의 침윤은 virus 침입에 대한 숙주 면역반응으로 초래된 것으로 보여지며(Ramos-Casals et al., 2001), 염증반응이 지속되며 ellipsoid 비후 및 MMC 형성이 나타난 것으로 예상된다(Agius and Roberts, 2003; Han et al.,



[Fig. 5] Histopathological observations of the spleen in black porgy (a), rockfish (b), olive flounder (c) after 14 days following infection at temperature of 18 °C and 28 °C. (a) increased Melano-macrophage center (white arrowheads) and ellipsoidal enlargement (black arrows) in RSIV-infected black porgy, (b) ellipsoidal enlargement (black arrows) and lymphocytic infiltration (white arrows) in RSIV-infected rockfish, (c) ellipsoidal enlargement (black arrows) and lymphocytic infiltration (white arrows) in RSIV-infected rockfish.

1995). 감성돔 및 조피볼락은 RSIV에 대한 병원성이 돌돔에 비하여 없거나 낮은 수준으로 보고되었으며(Jeong and Jeong, 2008; Choi et al., 2010; Kwon et al., 2015), 넙치(Do et al., 2005), 가자미 및 쥐치(Jo et al., 2009) 등 에서 RSIV의 검출이 보고되었으나, 병원성에 대한 연구는 여전히 부족한 실정이다.

본 연구에서 수온에 따른 주요 양식품종에 대한 RSIV의 병원성 분석을 수행하였다. 돌돔에서 RSIV는 고수온(28℃)에 의존적으로 병원성을 확인할 수 있었으나, 감성돔, 조피볼락 및 넙치는 고수온(28℃) 및 저수온(18℃)에서 RSIV 인위감염 및 병리조직학적 분석 결과 병원성을 확인할 수 없었다.

References

- Agius C and RJ Roberts(2003). Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *J Fish Dis.* 26(9), 499~509.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00485.x>
- Caipang CM, Hirono I and Aoki T(2003) Development of a Real-time PCR Assay for the Detection and Quantification of Red Seabream Iridovirus (RSIV). *Fish Pathol.* 38(1), 1~7.
<https://doi.org/10.3147/jfsfp.38.1>
- Chinchar VG, Hick P, Ince IA, Jancovich JK, Marschang R, Qin Q, Subramaniam K, Waltzek TB, Whittington R, Williams T and Zhang QY(2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Iridoviridae. *J Gen Virol.* 98(5), 890~891.
<https://doi.org/10.1099/jgv.0.000818>
- Choi HS, Jee BY, Cho MY and Park MA(2010). Monitoring of pathogens on the cultured Korean rockfish, *Sebastes schlegelii* in the marine cages farms of south sea area from 2006 to 2008. *J Fish Pathol.* 23(1), 27~35.
- Do JW, Cha SJ, Kim JS, An EJ, Lee NS, Choi JH, Lee CH, Park MS, Kim JW, Kim YC and Park JW(2005) Phylogenetic analysis of the major capsid protein gene of iridovirus isolates from cultured flounders *Paralichthys olivaceus* in Korea. *Dis Aquat Org* 64(3), 193~200.
<https://doi.org/10.3354/dao064193>
- Han KS, Kim JY, Jeong HD and Huh MD(1995). Pathological studies on the morphological and functional changes of lymphomyeloid tissues overpopulated with melano-macrophage centers in tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J Fish pathol.* 8(2), 119~134.
- Inouye K, Yamano K, Maeno Y, Nakajima K, Matsuoka M, Wada Y and Sorimachi M(1992) Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol.* 27(1), 19~27.
<https://doi.org/10.3147/jfsfp.27.19>
- Jeong JB and Jeong H.D(2008). Pathogenicity of iridovirus against marine fish and its detection in culturing seawater. *J Kor Fish Soc.* 41(1), 20~25.
<https://doi.org/10.5657/kfas.2008.41.1.020>
- Jun LJ, Jeong JB, Kim JH, Nam JH, Shin KW, Kim JK, Kang JC, Jeong HD(2009). Influence of temperature shifts on the onset and development of red sea bream iridoviral disease in rock bream *Oplegnathus fasciatus*. *Dis Aquat Org.* 84(3), 201~208.
<https://doi.org/10.3354/dao02041>
- Jung MH, Jung SJ, Vinay TN, Nikapitiya C, Kim JO, Lee JH, Lee J and Oh MJ(2015). Effects of water temperature on mortality in Megalocytivirus-infected rock bream *Oplegnathus fasciatus* (*Temmincket Schlegel*) and development of protective immunity. *J Fish Dis.* 38(8), 729~737.
<https://doi.org/10.1111/jfd.12286>
- Jung MH, Lee J and Jung SJ(2016). Low pathogenicity of flounder iridovirus (FLIV) and the absence of cross protection between FLIV and rock bream iridovirus. *J Fish Dis.* 39(11), 1325~1333.
<https://doi.org/10.1111/jfd.12459>
- Jung MH, Nikapitiya C, Vinay TN, Lee JH and Jung SJ(2017). Rock bream iridovirus (RBIV) replication in rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) exposed for different time periods to susceptible water temperatures. *Fish Shellfish Immunol.* 70, 731~735.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.09.038>
- Kawakami H and K Nakajima(2002) Cultured fish species affected by red sea bream iridoviral disease from 1996 to 2000. *Fish Pathol.* 37(1), 45~47.
<https://doi.org/10.3147/jfsfp.37.45>

- Kim KH, Choi KM, Joo MS, Kang G, Woo WS, Sohn MY, Son HJ, Kwon MG, Kim JO, Kim DH, Park CI(2022) Red Sea Bream Iridovirus (RSIV) Kinetics in Rock Bream (*Oplegnathus fasciatus*) at Various Fish-Rearing Seawater Temperatures. *Animals*. 12(15), 1978.
<https://doi.org/10.3390/ani12151978>
- Kim YJ, Jung SJ, Choi TJ, Kim HR, Rajendran KV and Oh MJ(2002) PCR amplification and sequence analysis of irido-likevirus infecting in Korea. *J Fish Dis*. 25(2), 121~124.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2002.00345.x>
- Kurita J and Nakajima K(2012). *Megalocytiviruses*. *Viruses* 4(4), 521~538.
<https://doi.org/10.3390/v4040521>
- Kwon WJ, Kim YC, Yoon MJ and Jeong HD(2015) Characterization of asymptomatic Megalocytivirus infection in farmed rockfish (*Sebastes schlegelii*) in Korea. *J Fisheries Mar Sci Educ*, 27(4), 1184~1193.
<https://doi.org/10.13000/JFMSE.2015.27.4.1184>.
- Matsuoka S, Inouye K and Nakajima K(1996) Cultured fish species affected by red sea bream iridoviral disease from 1991 to 1995. *Fish Pathol*. 31(4), 233~234.
<https://doi.org/10.3147/jsfp.31.233>
- Min JG, Jeong YJ, Jeong MA, Kim JO, Hwang JY, Kwon MG and Kim KI(2021). Experimental transmission of red sea bream iridovirus (RSIV) between rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) and rockfish (*Sebastes schlegelii*). *J fish pathol*. 34(1), 1~7.
<https://doi.org/10.7847/jfp.2021.34.1.001>
- Oh SY and Nishizawa T(2016). Establishment of rock bream *Oplegnathus fasciatus* embryo RoBE-4) cells with cytolytic infection of red seabream iridovirus (RSIV). *J Virol Met*. 238, 1~5.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.09.017>
- Ramos-Casals M, Garcia-Carrasco M, Cervera R, Font J(2001). Is hepatitis C virus a sialotropic virus? *Am J Pathol*. 159(4), 1593.
[https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62543-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62543-6)
- Sohn SG, Choi DL, Do JW, Hwang GY and Park JW(2000) Mass mortalities of cultured striped beakperch, *Oplegnathus fasciatus* by iridoviral infection. *J Fish Path*. 13(2), 121~127.
- WOAH(2022). World Organization for Animal Health, https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tdr/s/aahm/current/2.3.07_RSIVD.pdf

-
- Received : 08 December, 2022
 - Revised : 03 March, 2023
 - Accepted : 09 March, 2023