Check for updates

JFMSE, 36(1), pp. 68~80, 2024.
수산해양교육연구, 제36권 제1호, 통권127호, 2024.
www.ksfme.or.kr
https://doi.org/10.13000/JFMSE.2024.2.36.1.68

돌돔에서의 참돔이리도바이러스 동역학 및 비침습적인 방법을 이용한 예찰 방법 연구

지채영 · 강경식 · 우원식 · 김경호 · 손민영 · 손하정 · 권문경* · 박찬일†
경상국립대학교(연구원) · *국립수산물품질관리원(연구관) · †경상국립대학교(교수)

Study on the Dynamics of Red Sea Bream Iridovirus in Rock Bream (*Oplegnathus fasciatus*) and Surveillance Methods Utilizing Non-Invasive Methods

Chae-Yeong Ji · Gyoungsik Kang · Won-Sik Woo · Kyung-Ho Kim · Min-Young Sohn · Ha-Jeong Son · Mun-Gyeong KWON* · Chan-Il PARK†
Gyeongsang National University(Researcher) · *National Fishery Products Quality Management Service(senior researcher) · †Gyeongsang National University(professor)

Abstract

Red Sea Bream Iridoviral Disease (RSIVD) is a prevalent infectious disease in South Korea fish farms. Detecting the disease early and preventing its spread through continuous surveillance activities are crucial for disease prevention and management. To achieve this, we utilized a virus concentration method in seawater, providing a non-invasive means to indirectly monitor disease progression. We investigated the viral copy and viral shedding ratio in *Oplegnathus fasciatus*, known for their high susceptibility to red sea bream iridovirus (RSIV), under flow-through conditions. Horizontal transmission was confirmed in RSIV-infected *O. fasciatus* and uninfected *Lateolabrax japonicus* and *Acanthopagrus schlegelii*. In a flow-through conditions, the mortality rate of *O. fasciatus* increased with rising water temperature, and it was observed that the maximum viral copy was higher under high-density conditions compared to other density conditions. The study also confirmed horizontal transmission between RSIV-infected *O. fasciatus* and uninfected *L. japonicus* and *A. schlegelii*.

Key words : Non-invasive, Red sea bream iridovirus, Seawater, Surveillance, Rock bream

Ⅰ. 서 론

참돔이리도바이러스(red sea bream iridovirus, RSIV)는 Megalocytivirus에 속하는 바이러스로 1990년 일본 양식 참돔(*Pagrus major*)에서 최초로 보고된 후, 우리나라에서는 1998년 8월에 남해안 일대에 양식 돌돔(*Oplegnathus fasciatus*)에서 RSIV가 발생한 이후, 수온 20℃ 이상인 고수온기에 매년 발생하고 있다. 이러한 질병은 참돔이리도바이러스병(red sea bream iridoviral disease, RSIVD)로 명명되었으며, 고밀도 양식에 의한 폐사율은 100%에 달하는 경우도 보고된 바 있다

† Corresponding author : 055-772-9153, vinus96@hanmail.net
※ 이 연구는 해양수산부의 재원으로 국립수산물품질관리원의 지원을 받아 수행된 연구임(수산생물 검역 및 방역 관리 기술개발, NFQS2024001).

(Oh et al., 1999; Sohn et al., 2000; Kim et al., 2002; Kurita and Nakajima, 2012). 주로 동아시아와 아시아 국가에서 보고되었고, 그중 돌돔은 RSIV에 가장 감수성이 높은 어종으로 알려져 있으며, 우리나라에서는 2013년과 2015년 이후로 농어(*Lateolabrax japonicus*)와 감성돔(*Acanthopagrus schlegelii*)에서 RSIV가 검출된 바 있다(Miyata et al., 1997; He et al., 2000; Sudthongkong et al.., 2002; NFQS, 2023). 일반적으로 RSIVD에 감염된 어류의 외부 증상은 비정상적이고 무기력한 유영, 피부의 체색흑화 또는 체표출혈이 발생하고, 내부적으로는 심한 빈혈증상, 아가미 점상출혈, 비장비대가 나타나며, 조직병리학적으로는 비장 조직에 비대세포가 형성되는 것이 특징으로 알려져 있다(Wang et al., 2003; Inouye et al., 1992).

RSIV의 감염경로는 해수를 통해 수평적 전파로 질병이 확산된다고 보고된 바 있다(WOAH, 2022). RSIV의 감수성 수온 범위는 20─25℃인 것으로 알려져 있지만, 감수성이 낮은 15℃에서도 RSIV에 감염된 돌돔에서 바이러스가 방출하여 타 어종에 수평적 전파가 이루어진다고 보고된 바 있다(Kim et al., 2023a). 이는 RSIV에 감염된 돌돔에서 방출되는 바이러스가 매년 RSIVD 발생의 잠재적인 원인이 될 수 있음을 의미한다. 우리나라에서는 수산생물질병을 효과적으로 예방하고 관리하기 위해서 수산생물질병 관리법(2008년 시행)에 따라 전파속도가 빠르고 대량폐사를 유발하여 지속적인 감시와 관리가 필요한 질병을 법정전염병으로 지정하고 있다. RSIVD는 제3종 전염병으로 분류하여 관리하고 있으며, 지난 10년(2014─2023년)간 237건으로 가장 많이 발생한 수산생물질병으로 알려져 있다(NFQS, 2023). 이러한 질병을 예방하고자 돌돔에 대한 RSIV 포르말린 불활성화 백신이 상용화되었으나, 질병을 100% 예방할 수 없는 실정이다. 따라서, RSIV에 대한 질병을 효과적으로 예방하고 관리하기 위해서는 지속적인 예찰 활동을 통해 질병을 조기에 검출하고 확산을 방지하는 것이 중요하다.

최근, RSIV에 감염된 숙주에서 해수로 방출되는 바이러스를 철 응집 기반으로 농축하고 비침습적으로 검출할 수 있는 방법이 개발되었다(Kawato et al., 2016). 이 방법을 통해 정수식 실험 조건에서 RSIV에 감염된 돌돔의 체내 감염 역가와 해수로 방출되는 바이러스 양 사이에서 높은 상관관계가 있다고 보고된 바 있다(Kim et al., 2023a). 이는 해수에서의 비침습적인 방법을 이용하여 질병의 진행 상태를 간접적으로 이해할 수 있음을 의미한다. 그러나 돌돔은 가두리를 통해 양식되므로 지속적으로 해수가 환수되는 조건에서의 바이러스 방출능에 대한 연구가 필요한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 유수식 환경조건에서 사육되는 돌돔에 RSIV를 침지감염을 시킨 후 폐사율과 체내 감염 역가 및 바이러스 방출능을 확인하였다. 또한, 동거 감염 모델을 통해 RSIV에 감염된 돌돔에서 해수를 통해 종간 수평 전파가 발생하는지 확인하기 위해 RSIV 감염된 돌돔과 농어 및 감성돔 사이에서의 수평적 전파 성립 여부를 조사하였다.

Ⅱ. 연구 방법

1. 실험 어류 및 바이러스

실험에 사용된 돌돔(7.8 ± 0.5 cm, 8.0 ± 0.7 g), 농어(8.8 ± 1.2 cm, 7.5 ± 0.8 g) 및 감성돔(5.8 ± 0.7 cm, 4.5 ± 1.6 g)은 경상남도 남해 및 거제에 위치한 종묘생산장에서 구입하였으며, 1,600 L의 유수식 원형 수조(16.9 ± 0.5℃)에 운반하여 2주간 순치하였다. 이후, RSIV 감염 여부를 확인하기 위해 각 어류를 무작위로 5마리씩 채집하여 세계동물보건기구(World Organization for Animal Health, WOAH)의 aquatic manual 및 qPCR (quantitative PCR)에 따라 RSIV에 감염되지 않음을 확인했다.

본 연구에서는 이전 연구에서 보고된 RSIV

(accession number: AY532608)가 사용되었다(Kim et al., 2022a). 바이러스는 이전 연구에서 보고된 바와 같이 10% fetal bovine serum (Gibco, USA)와 1% antibiotic-antimycotic (100 U/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin 및 25 μg/mL amphotericin B, Gibco)가 함유된 L-15 배지에서 배양된 *Pagrus major fin* (PMF) 세포주를 이용하여 복제되었다(Kwon et al., 2020). RSIV에 감염된 돌돔 비장 조직을 마쇄한 후 10,000 × g, 4℃에서 10분간 원심분리 하였다. 이후 상층액을 0.45 μm syringe filter에 여과하고 단층으로 배양된 PMF 세포주에 바이러스를 접종하였으며, 4시간 이후에 새로운 L-15 배지로 교체하였다. 세포변성효과는 7일 이후에 확인되었으며, 배지 상층액을 수거하여 0.45 μm syringe filter에 여과한 후 바이러스 접종액으로 사용하였다. RSIV copy number는 이전 연구에서 보고된 바와 같이 qPCR을 이용하여 분석하였다(Kim et al., 2022b).

모든 실험 방법은 경상대학교 동물실험윤리위원회 지침을 준수하였다(승인번호: GNU-230828-E0172).

2. 핵산 추출 및 qPCR 분석

Genomic DNA는 AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 제조사에서 권고한 방법을 통해 추출하였다. 바이러스 정량화를 위한 qPCR 분석은 이전 연구에서 보고된 바와 같이 동일하게 수행하였다(Kim et al., 2022b). 바이러스 체내 감염 역가는 각 적출한 비장의 무게(mg)을 측정한 후 mg 당 RSIV copy number를 환산하였다.

3. 해수 내 바이러스 농축

해수 내 존재하는 바이러스는 이전 연구와 동일하게 철 응집 방법을 통해 농축하였다(Kawato et al., 2016). 채집한 해수 500 mL을 1.6 μm pore size glass microfiber filter (GF/A; Whatman, UK)를 이용하여 부유 입자를 1차 제거하였다. 4.83 g의 iron (III) chloride hexahydrate ($FeCl_3$•$6H_2O$)를 100 mL의 증류수에 첨가하여 염화철 용액을 제작하였다. 이후, 염화철 용액 50 μL를 1차 여과된 해수 500 mL에 첨가하고 magnetic stirrer를 사용하여 20℃에서 1시간 동안 200 rpm으로 교반하였다. Fe-RSIV 응집체는 0.8 μm pore size polycarbonate filter (Whatman)를 이용하여 감압하에 여과되었다. 필터에 여과된 바이러스는 2 mL tube에 옮기고 gDNA를 추출한 후 qPCR을 통해 정량화하였다. RSIV에 감염된 어류의 바이러스 방출능(RSIV copies/L/g)을 결정하기 위해, 수조 내 생존한 어류의 총 평균 무게(g)와 RSIV copy number를 나누어서 분석하였으며, 모든 실험의 어류 내 바이러스 방출능은 폐사율 측정 수조 내에서 해수를 채집하여 분석하였다.

4. 돌돔 내 RSIV 침지감염

돌돔에 RSIV를 침지감염한 후 폐사율, 체내 감염 역가 및 바이러스 방출능을 확인하기 위해, 국내 돌돔 양식 매뉴얼의 사육밀도 기준에 따라 각각 3, 6, 9 kg/m^3 (각 그룹 당 50, 84, 120마리; 저밀도, 적정밀도, 고밀도 순)으로 150 L의 유수식 원형 수조(유수량 5.3회전/24시간)에 수용하였다(NIFS, 2020). 폐사율 측정 그룹에서의 RSIV 침지감염 최종 농도는 10^5, 10^3 RSIV copies/mL이었으며, 240분 동안 감염하였고 당시 수온은 16.9℃였다. 이후, 신선한 해수로 100% 전량 환수하였고, 대조군은 동일한 조건으로 수용한 후 아무런 처리를 하지 않았다. 각 그룹의 누적 폐사율은 90일간 관찰하였다.

RSIV에 침지감염된 돌돔에서의 체내 감염 역가를 확인하기 위해, 앞서 설명한 방식으로 동일하게 수조를 준비하고 감염을 수행하였으며, RSIV 감염 후 7, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 및 90일 차에 3마리의 돌돔을 채집하고 비장을 적출한 후 qPCR을 이용해 정량분석하였다. 해

수 내 바이러스 방출능 분석은 누적 폐사율 측정 수조에서 500 mL의 해수를 7, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 및 90일 차에 3회 채집하였으며, 철응집 기반 농축을 통해 바이러스를 농축하고 qPCR을 통해 정량화하였다. 유수식 환경에서의 수온은 매일 하루에 3회 측정하였으며 사용된 해수는 경상국립대학교 해양생물교육연구센터 인근 앞바다에서 펌프를 이용하여 해수를 공급하였고 모래여과를 거친 후 50 μm filter housing을 통과하여 자외선 처리(> 30 mW/cm2) 후에 사용하였다.

5. 공동 사육을 통한 RSIV 수평적 전파

RSIV에 감염된 돌돔의 수평적 전파 실험을 위해, 100 L의 수조를 25℃와 15℃로 설정한 후, 돌돔(donor)과 농어(recipient) 그리고 돌돔(donor)과 감성돔(recipient)을 각각 30마리씩 수조에 수용하였으며, 2주간 순치하였다. 각 그룹 내 돌돔(donor)에 RSIV (10^6 RSIV copies/fish) 100 μL를 복강주사하고 건강한 농어와 감성돔을 공동 사육하였다. 대조군은 돌돔 내 L-15 배지 100 μL를 복강주사 하였다. 각 그룹의 누적 폐사율은 40일간 관찰하였다.

각 그룹의 돌돔(donor)와 농어(recipient) 및 감성돔(recipient)의 체내 감염 역가를 확인하기 위해, 앞서 설명한 방식으로 동일하게 수조를 준비하고 감염을 수행하였으며, 공동 사육 후 1, 4, 7, 14, 21, 30, 및 40일 차에 donor와 recipient의 어류 3마리를 채집하고 비장을 적출한 후 qPCR을 이용해 정량분석하였다. 해수 내 바이러스 방출능 분석은 누적 폐사율 측정 수조에서 500 mL의 해수를 1, 4, 7, 14, 21, 30, 및 40일 차에 3회 채집하였으며, 철 응집 기반 농축을 통해 바이러스를 농축하고 qPCR을 통해 정량화하였다.

Ⅲ. 연구 결과

1. 돌돔 내 RSIV 침지감염 후 병원성 분석

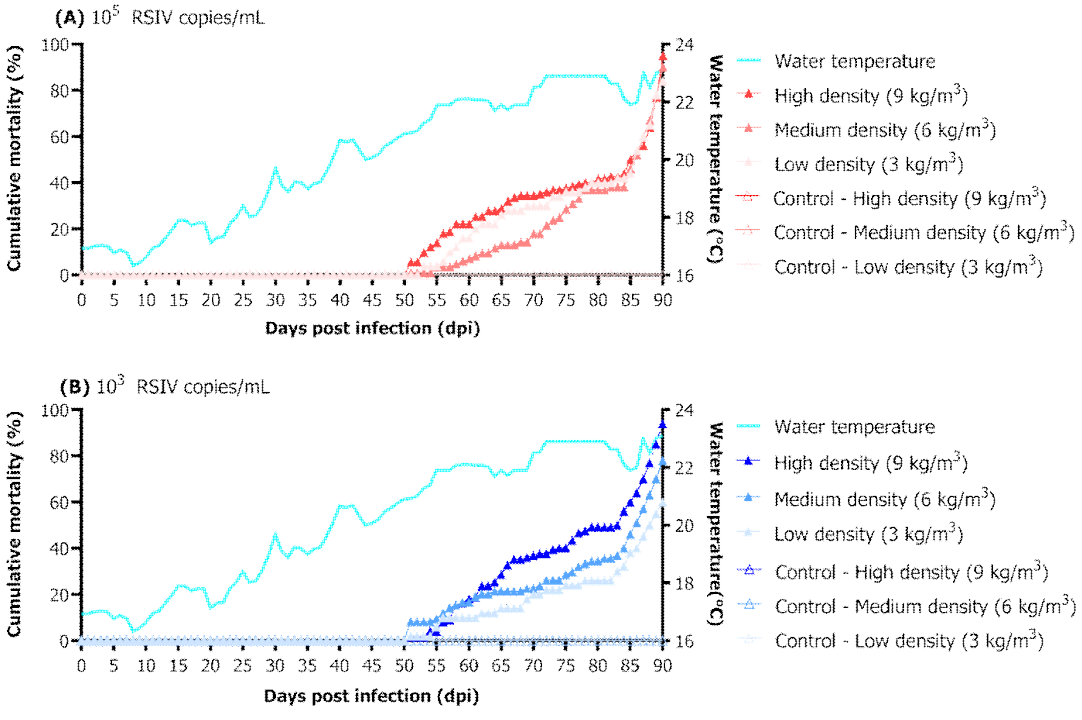
돌돔을 각각 3, 6, 9 kg/m^3 (각 그룹 당 50, 84, 120마리; 저밀도, 적정밀도, 고밀도 순)으로 150 L의 유수식 원형 수조(유수량 5.3회전/24시간)에 수용하여 RSIV 침지감염 최종 농도를 10^5, 10^3 RSIV copies/mL와 같이 되도록 한 후 240분 동안 감염하였고 당시 수온 16.9℃에서 시작하여 90일 동안 폐사율 관찰 그룹에서 폐사율을 관찰하였다.

RSIV에 노출된 돌돔은 대부분의 그룹에서 감염 후 51일 이후, 약 21℃에 도달하였을 때 폐사가 관찰되었으며, 수온이 증가함에 따라 지속적으로 폐사가 발생하였다. 10^5 RSIV copies/mL로 침지감염한 그룹에서 3, 6, 9 kg/m3 수조 내 돌돔의 누적 폐사율은 각각 84%, 90% 및 95%로 확인되었으며([Fig. 1A]), 10^3 RSIV copies/mL로 침지감염한 그룹에서는 낮은 밀도 순으로 60%, 78% 및 94%의 누적 폐사율이 확인되었고([Fig. 1B]), 대조군은 폐사가 관찰되지 않았다([Fig. 1A, B]). 실험구에서 폐사한 돌돔에서 RSIV를 측정한 결과, 약 10^7 RSIV copies/mg보다 높은 수준의 감염 역가를 나타냄을 확인하였다(not shown data).

2. 돌돔 내 RSIV 침지감염 후 감염 역가 및 해수 내 바이러스 방출능 분석

상기의 유수식 조건에서 7, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 및 90일 차에 각 그룹 당 3마리의 돌돔을 채집하여 비장을 적출 후 바이러스 정량분석을 수행하여 감염 역가를 확인하였으며 폐사율 측정 그룹에서 7, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 및 90일 차에 500 mL의 해수를 3회 채집하여 바이러스 농축 후 바이러스 정량분석을 수행하여 해수 내 바이러스 방출능을 확인하였다.

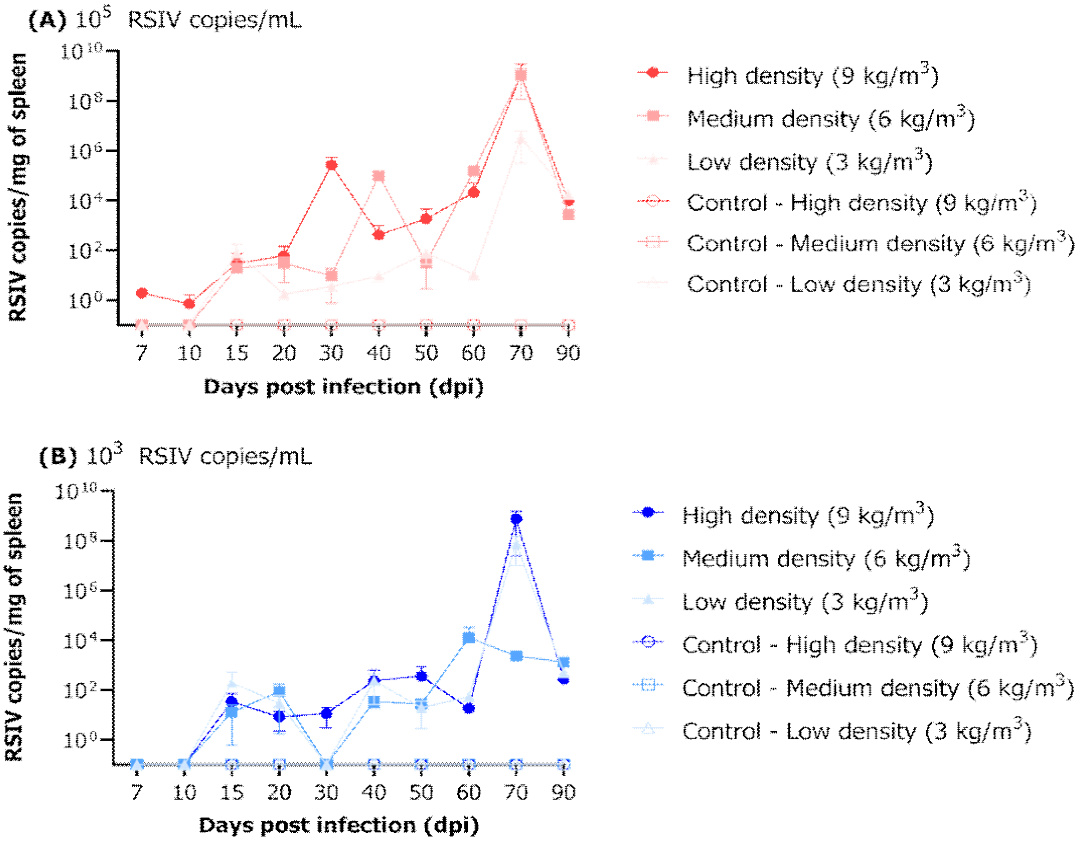
105 RSIV copies/mL로 침지감염한 그룹에서 7일 차에 고밀도 조건에서부터 감염 역가가 확인되었으며 수온이 17.9℃로 확인된 15일 차부터



[Fig. 1] (A) Cumulative mortality of rock bream (*Oplegnathus fascatus*) infection by immersion with red sea bream iridovirus (RSIV) at 10^5 RSIV copies/mL at natural water temperature in a flow-through conditions. (B) Cumulative mortality of rock bream (*Oplegnathus fascatus*) infection by immersion with red sea bream iridovirus (RSIV) at 10^3 RSIV copies/mL at natural water temperature in a flow-through conditions. The control group did not receive any treatment.

모든 밀도 조건에서 바이러스가 검출되었다. 수온이 상승함에 따라 돌돔의 체내 감염 역가도 증가하여 70일 차에 저밀도, 적정밀도 및 고밀도 조건에서 각각 3.22 × 10^6, 1.07 × 109, 1.10 × 10^9 copies/mg으로 가장 높은 감염 역가가 관찰된 것을 확인할 수 있었다([Fig. 2A]). 해수 내 바이러스 방출능은 45일 차 이후 수온 20℃를 초과할 때 수용 밀도에 관계없이 평균 약 102 copies/L/g으로 관찰되었다. 수온이 점차 증가함에 따라 모든 조건에서 해수로의 바이러스 방출이 증가했다. 고밀도 조건에서 가장 높은 바이러스 방출은 70일 차에 1.31 × 10^3 copies/L/g으로 관찰되었다. 저밀도 및 중간밀도 조건에서는 75일 차에 각각 2.76 × 10^5 및 1.39 × 10^4 copies/L/g으로 가장 높은 해수 내 바이러스 방출능이 관찰되었다([Fig. 3A]).

103 RSIV copies/mL로 침지감염한 그룹에서는 수온이 17.9℃로 확인된 감염 후 15일 차부터 모든 밀도 조건에서 바이러스가 검출되었다. 저밀도와 고밀도 조건의 경우, 감염 후 70일 차에 각각 7.49 × 10^8 및 7.69 × 10^7 copies/mg으로 가장 높은 체내 감염 역가가 확인되었다. 권장밀도의 경우, 감염 후 60일 차에 1.25 × 10^4 copies/mg으로 가장 높은 체내 감염 역가가 확인되었다([Fig. 2B]). 해수 내 바이러스 방출능은 수온이 상승함에 따라 증가하는 경향이 관찰되었다. 고밀도 및 권장밀도 조건에서는 감염 후 70일 차에 각각 2.57 × 10^4 및 1.68 × 10^3 copies/L/g으로 가장



[Fig. 2] Viral load in spleen after red sea bream iridovirus (RSIV) immersion infection in rock bream (*Oplegnathus fascatus*) at natural water temperature at (A) 10^5 and (B) 10^3 RSIV copies/mL. Copy numbers of RSIV were analyzed in three fish and seawater per sampling interval.

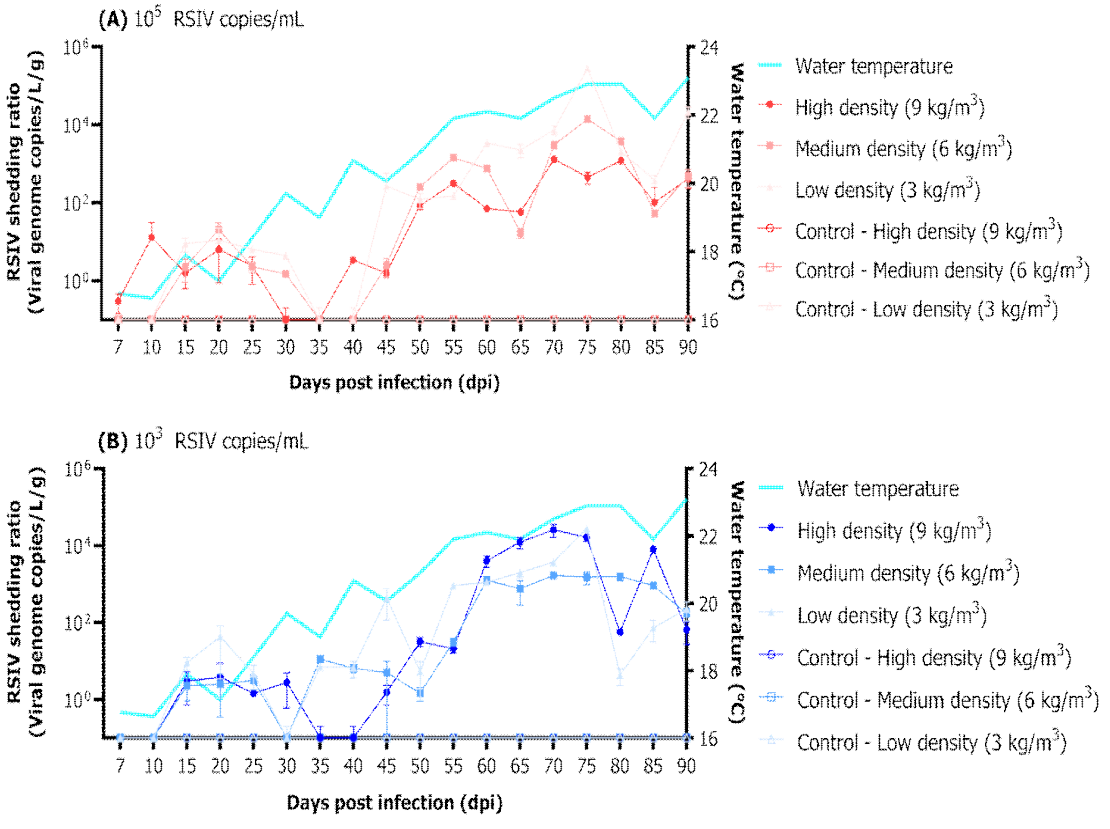
높은 해수 내 바이러스 방출능이 관찰되었다. 저밀도 조건의 경우, 감염 후 75일 차에 2.77×10^4 copies/L/g으로 가장 높은 해수 내 바이러스 방출능이 확인되었다([Fig. 3B]).

3. 공동 사육을 통한 RSIV 수평적 전파

가. 공동 사육 후 감염어(donor)와 비감염어(recipient)의 병원성 분석

RSIV에 감염된 돌돔의 수평적 전파 실험을 위해, 100 L의 수조를 25℃와 15℃로 설정한 후, 돌돔(donor)과 농어(recipient) 그리고 돌돔(donor)과 감성돔(recipient)을 각각 30마리씩 수조에 수용한 후 각 그룹의 돌돔(donor)에 RSIV (106 RSIV copies/fish) 100 μL를 복강주사하고 건강한 농어와 감성돔을 공동 사육을 수행한 후 RSIV 감염 돌돔(donor)과 함께 수용한 어류(recipient)의 누적 폐사율을 40일 동안 관찰하였다.

25℃에서 RSIV에 감염된 돌돔(donor)은 농어(recipient)와 감성돔(recipient)과 함께 사육한 그룹별로 각각 17일과 14일에 100% 누적 폐사율이 관찰되었으며, 농어(recipient)는 25일에 전량 폐사하였으며([Fig. 4A]), 감성돔은 실험 종료일인 40일까지 23%의 누적 폐사율이 관찰되었다([Fig. 4B]).



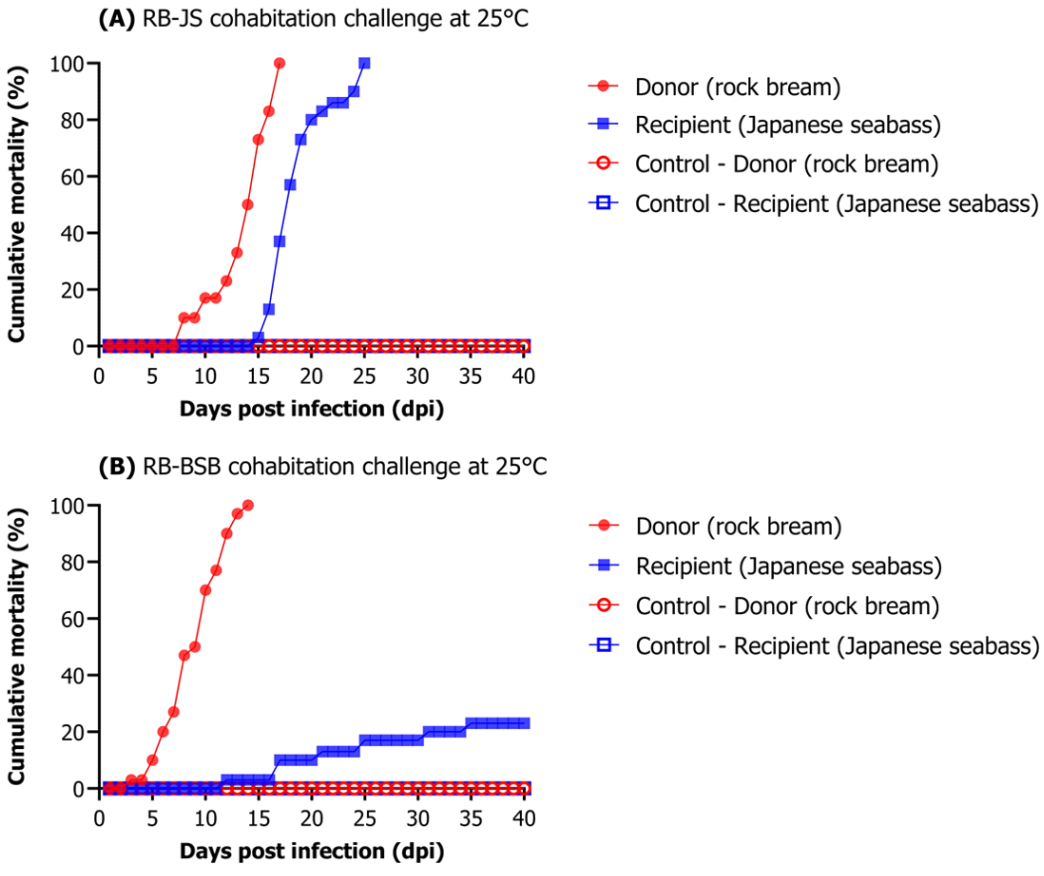
[Fig. 3] RSIV shedding ratio in seawater after red sea bream iridovirus (RSIV) immersion infection in rock bream (*Oplegnathus fascatus*) at natural water temperature at (A) 10^5 and (B) 10^3 RSIV copies/mL. The RSIV shedding ratio (viral genome copies L/g) was determined based on the total weight (g) of the fish remaining in the tank and the number of viral copies detected in the rearing seawater. Copy numbers of RSIV were analyzed in three fish and seawater per sampling interval.

15℃ 그룹에서는 donor와 recipient에서 폐사가 관찰되지 않았다.

나. 공동 사육 후 감염어(donor)와 비감염어(recipient)의 감염 역가 및 해수 내 방출능 분석

상기와 같은 정수식 조건에서 공동 사육 후 1, 4, 7, 14, 21, 30, 및 40일 차에 donor와 recipient의 어류 3마리를 채집하고 비장을 적출한 후 바이러스를 정량화하여 체내 감염 역가를 분석하였으며 폐사율 관찰 그룹에서 어류를 채집한 날짜와 동일한 날짜에 해수 500 mL를 채수하여 바이러스를 농축하여 바이러스 정량화 후 해수 내 바이러스 방출능을 확인하였다.

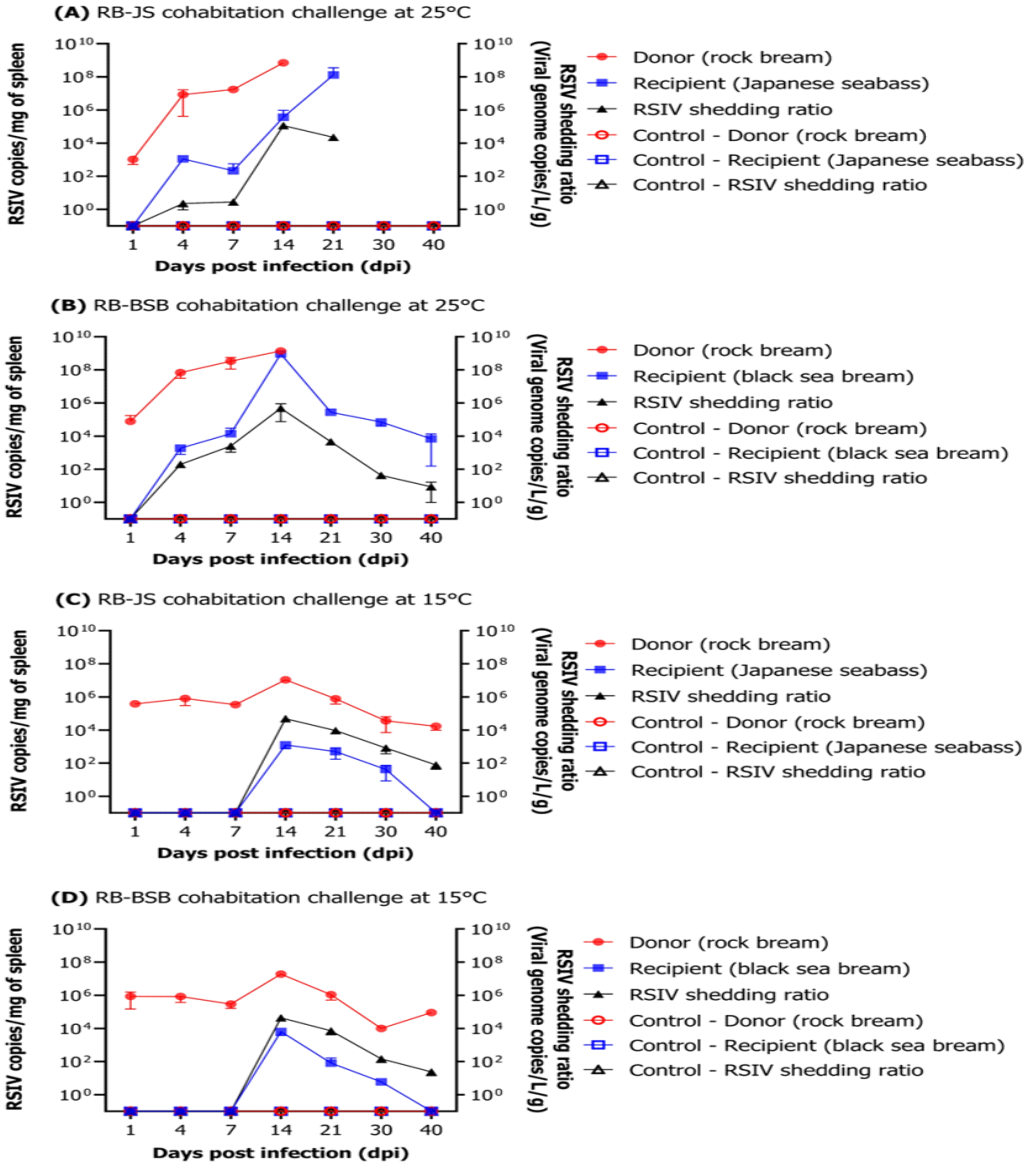
25℃ 조건에서 RSIV 체내 감염 역가의 경우 돌돔(donor)은 두 그룹에서 감염 이후 지속적으로 증가하는 경향이 보였으며, 14일 차에는 10^8 RSIV copies/mg으로 매우 높은 수준을 나타내었다. 농어(recipient) 경우 공동 사육 후 돌돔으로부터 방출된 RSIV로 인해 4일 차부터 체내 RSIV가 검출되었고, 21일 차에는 약 10^8 RSIV copies/mg으로 높은 감염 역가가 관찰되었다([Fig. 5A]).



[Fig. 4] (A–B) Cumulative mortality after cohabitation challenges was evaluated in naïve Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*) and black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) recipients with donors of rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) that were intraperitoneally (IP) injected with red sea bream iridovirus (10^6 RSIV copies/fish) at 25°C. The control group of donors was IP injected with 100 µL of L-15 medium (virus-free), and the recipients were not treated in any way. No mortality was observed at the control group and 15°C.

반면에, 감성돔(recipient)은 4일 차부터 RSIV가 검출된 후 14일 차에는 9.17 × 10^8 copies/mg으로 높은 감염 역가가 관찰되고 이후로 104 copies/mg 수준으로 감소하였다([Fig. 5B]). 해수 방출능은 두 그룹 모두 4일 차 이후로 해수 내 RSIV가 검출되었으며, 14일 차에 104 RSIV copies/L/g보다 높은 수준으로 관찰되었으며, 이후 감소하는 경향이 보였다([Fig. 5B]).

15℃ 조건에서 RSIV 체내 감염 역가의 경우 돌돔(donor)은 두 그룹 내 14일 차까지 증가한 이후 지속적으로 감소하는 경향이 보였고, 농어(recipient)와 감성돔(recipient)에서는 14일 차에 RSIV가 검출된 이후 지속적으로 체내 감염 역가가 감소하여 40일 차에는 검출되지 않았다. 해수 방출능은 두 그룹 모두 14일 차 이후로 해수 내 RSIV가 검출되었으며, 이후 점차 감소하는 경향이 보였다([Fig. 5C, D]).



[Fig. 5] (A-D) The viral kinetics were evaluated after cohabitation challenges involving naïve Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*) and black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) (recipient) post red sea bream iridovirus (RSIV) intraperitoneal injection (10^6 RSIV copies/fish) in rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) (donor) at 25°C and 15°C. The viral copy in fish was measured in the spleen, and the virus shed from the fish into the rearing seawater was expressed as RSIV shedding ratio. The RSIV shedding ratio (viral genome copies L/g) was determined based on the total weight (g) of the fish remaining in the tank and the number of viral copies detected in the rearing seawater. Copy number determination of RSIV was analyzed in three fish and seawater per sampling interval.

Ⅳ. 결 론

이번 연구에서는 양식장에서 자연적으로 발생하는 RSIV 감염 기작과 유사한 침지감염을 통해 돌돔 내 병원성을 확인하였으며, 양식장 내에서 해수를 통한 비침습적 방법으로 RSIV 검출 가능성을 확인하기 위해, 유수식 조건 내 돌돔 입식 수온인 16.9℃에서 RSIV 노출 후 바이러스 방출능을 조사하였다. 또한, RSIV의 수평적 전파 위험을 확인하기 위해 동거 감염 모델을 수행하였다.

RSIV 병원성에 영향을 주는 주요 요인은 수온으로 알려져 있다(WOAH, 2022). 본 연구에는 유수식 조건 내 돌돔의 폐사가 발생하는 시기는 차이가 없었으나, 최종 누적 폐사율을 확인하였을 때, 더 많은 양의 바이러스에 노출된 그룹에서 상대적으로 높은 누적 폐사율이 관찰되었으며, 수온이 21℃ 이상부터 지속적인 폐사가 발생하였다. 이전 연구에서는 세포 내 실험 및 인위감염 실험에서 20─25℃ 범위의 조건일 때, RSIV의 병원성이 가장 높은 것으로 보고된 바 있다(Qin et al., 2023; Jung et al., 2015; Jun et al., 2009). 이러한 결과는 돌돔을 가두리에 주로 입식하는 수온 약 17℃에서 RSIV에 노출된다면 수온이 증가함에 따라 지속적으로 폐사를 유발할 수 있음을 나타낸다.

어류 사육밀도가 증가함에 따라 면역 관련 유전자의 발현 수준이 감소하고(Yarahmadi et al., 2016; Fazelan et al., 2020), 질병에 대한 감수성이 높아진다고 알려져 있다(Liu et al., 2017). 본 연구에서는 사육밀도에 따른 면역반응에 대한 분석은 수행하지 않았지만, 사육밀도가 상대적으로 높은 그룹에서 누적 폐사율이 높은 것을 확인하였다. 이전 연구에서 감염 어류의 점액에 바이러스가 존재하여 감염어 사이에서 직접적인 접촉에 따른 바이러스 전파를 촉진할 수 있다고 보고하였다(Grant et al., 2005). 본 연구에서 밀도에 따른 바이러스 방출능의 뚜렷한 차이는 확인되지 않았으나 사육밀도가 높은 그룹에서의 질병 피해를 저감시키기 위해서는 적정 사육밀도 조절을 통해 감염어 사이에서 직접적인 접촉을 줄여야 될 것으로 판단된다.

이전 연구에서 largemouth bass virus (LMBV) 감염 후 고밀도로 사육된 *Micropterus salmoides* (Largemouth bass)가 저밀도 조건에 비해 감염 역가가 더 높은 것으로 보고되었다(Inendino et al., 2005). 이번 연구에서 돌돔의 침지감염 시 두 가지 농도 그룹에서 고밀도 조건의 최대 감염 역가가 다른 밀도조건에 비해 높게 나타난 것으로 확인되었다. 어류의 고밀도 양식은 병원균의 확산이 촉진되고 성장이 감소하거나 면역반응이 억제될 수 있다고 보고되었으며(Iguchi et al., 2003; Salas-Leiton et al., 2010; Sánchez et al., 2010; Yarahmadi et al., 2016), 이러한 면역반응의 억제는 어류의 체내 바이러스 복제를 증가시켜 고밀도 조건에서 더 높은 감염 역가가 확인된 것을 뒷받침한다.

이전 연구에서는 정수식 조건 하에 체내 감염 역가와 바이러스 방출 양 사이에 상관관계가 있음을 보고하였지만(Kim et al., 2023a; Kim et al., 2023b), 이는 가두리 양식장의 환경과는 다른 조건으로 수행되었기에 실제 양식장에서의 비침습적인 방법에 대한 적용 가능성을 평가하기엔 부족하다. 본 연구에서는 유수식 환경 조건 하에 체내 RSIV 감염 역가가 증가함에 따라 돌돔에서 방출되는 바이러스 양이 증가함을 확인하였다. 그러나, RSIV에 노출된 후 40일까지 어류 내 감염 역가와 방출하는 바이러스 양에 대한 상관성은 낮았으며, 돌돔의 폐사가 관찰되고 체내 감염 역가가 급격하게 증가하는 50일 이후(21℃ 이상의 수온 범위)로 높은 상관성을 나타냈다. 이는 RSIV로 인한 폐사가 발생하는 시점에 바이러스 방출능이 증가한다는 이전 연구와 결과와 유사하였다(Kim et al., 2022a). 이러한 결과는 돌돔 양식장에서 수온이 상승하는 시기에 해수를 통한 비

침습적인 방법을 통해 질병의 진행 상태를 간접적으로 이해하는데 기초적인 자료를 제공하며, 추후 연구에서는 가두리 양식장 내 비침습적인 방법을 통해 예찰 활동이 가능한지 적용 가능성 여부를 조사해야 할 것이다.

이전 연구에서는 돌돔과 돌돔, 참돔, 숭어 간 RSIV 수평 전파에 대한 연구가 보고된 바 있다(Kim et al., 2023a; Kim et al., 2023b). 그러나 RSIV에 감염된 돌돔이 농어와 감성돔에 수평적 전파가 성립되는지 조사한 연구는 보고된 바 없다.

본 연구에서는 25℃ 조건에서 RSIV에 감염된 돌돔(donor)과 함께 공동 사육한 농어(recipient)와 감성돔(recipient)은 RSIV 감수성에 따라 누적 폐사율의 차이가 발생하였으며, 이러한 결과는 RSIV 감염된 돌돔과 함께 공동 사육된 참돔과 숭어의 이전 연구 결과와 유사하였다(Kim et al., 2023b). 본 연구에서는 농어와 감성돔 돌돔에서 방출하는 RSIV 최대 수치가 유사하였음에도 불구하고 농어는 수평 감염된 후 지속적으로 체내 감염 역가가 증가한 반면, 감성돔은 14일 차 이후로 체내 감염 역가가 감소하여 회복되는 경향이 관찰되었다. 이러한 결과는 농어가 RSIV에 대한 감수성이 상대적으로 높다는 것을 알 수 있으며, 감성돔은 이전 연구에서 보고된 바와 같이 RSIV에 대한 감수성이 낮다는 보고와 유사하였다(Jeong et al., 2023). 15℃ 조건에서는 모든 그룹에서 폐사가 발생하지 않았지만, 공동 사육된 어류(recipient)와 해수에서 RSIV가 검출됨을 확인하였다. 이는 낮은 수온에서도 RSIV에 감염된 돌돔에서 바이러스가 방출될 수 있음을 나타낸다.

본 연구에서는, RSIV에 감염된 돌돔에서 방출되는 바이러스는 비침습적인 방법을 통해 유수식 환경 조건에서 성공적으로 검출하였다. 또한, 수온이 증가함에 따라 바이러스가 지속적으로 방출될 수 있음을 확인하였으며, 방출되는 바이러스는 주변 어종에 수평적 전파를 일으킬 수 있음을 동거 감염 모델을 통해 확인하였다. 이러한 결과는 추후 양식 현장에서 감수성 종과 해수를 이용한 비침습적인 방법을 이용하여 질병을 예찰 할 수 있음을 나타내며, 나아가 해수를 이용한 RSIV 예찰 시스템을 도입한다면, 질병 발생 확산 모델링 분석에 도움이 될 것으로 사료된다.

References

Fazelan Z, Vatnikov YA, Kulikov EV, Plushikov VG and Yousefi, M(2020). Effects of dietary ginger (*Zingiber officinale*) administration on growth performance and stress, immunological, and antioxidant responses of common carp (Cyprinus carpio) reared under high stocking density. Aquaculture, 518, 734833. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734833

Grant EC, Inendino KR, Love WJ, Philipp DP and Goldberg TL(2005). Effects of practices related to catch-and-release angling on mortality and viral transmission in juvenile largemouth bass infected with largemouth bass virus. Journal of Aquatic Animal Health, 17(4), 315~322. https://doi.org/10.1577/H04-044.1

He JG, Wang SP, Zeng K, Huang ZJ and Chan SM(2000). Systemic disease caused by an iridovirus like agent in cultured mandarinfish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky), in China. Journal of Fish Diseases, 23(3), 219~222. https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2000.00213.x

Inendino KR, Grant EC, Philipp DP and Goldberg TL(2005). Effects of factors related to water quality and population density on the sensitivity of juvenile largemouth bass to mortality induced by viral infection. J. Aquat. Anim. Health. 17, 304~314. https://doi.org/10.1577/H04-028.1.

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/jsfp.27.19

Iguchi K, Ogawa K, Nagae M, and Ito, F(2003). The influence of rearing density on stress response and disease susceptibility of ayu (*Plecoglossus altivelis*).

Aquaculture, 220(1–4), 515~523.
https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00626-9

Miyata M, Matsuno K, Jung SJ, Danayadol Y and Miyazaki T(1997). Genetic similarity of iridoviruses from Japan and Thailand. Journal of Fish Diseases, 20(2), 127~134.
https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1997.d01-115.x.

NFQS(2023). National Fishery Products Quality Management Service.
https://www.nfqs.go.kr/PreventionMgM/fishguard/fishguard01.jsp

NIFS(2020). National Institute of Fisheries Science.
https://www.nifs.go.kr/distantwater/skin/doc.html?fn=20220302103505900_0.pdf&rs=/distantwater/preview/Board0027/.

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

Jun LJ, Jeong JB, Kim JH, Nam JH, Shin KW, Kim JK, Kang JC and 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

Kim KH, Choi KM, Joo MS, Kang G, Woo WS, Sohn MY, Son HJ, Kwon MG, Kim JO, Kim DH and Park CI(2022, a). 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 KH, Choi KM, Kang G, Woo WS, Sohn MY, Son HJ, Yun D, Kim DH and Park CI(2022, b). Development and validation of a quantitative polymerase chain reaction assay for the detection of red sea bream iridovirus. Fishes, 7(5), 236.
https://doi.org/10.3390/fishes7050236

Kim KH, Kang G, Woo WS, Sohn MY, Son HJ, Kwon MG, Kim JO and Park CI(2023, a). Impact of Red Sea Bream Iridovirus Infection on Rock Bream (*Oplegnathus fasciatus*) and Other Fish Species: A Study of Horizontal Transmission. Animals, 13(7), 1210.
https://doi.org/10.3390/ani13071210

Kim KH, Kang G, Woo WS, Sohn MY, Son HJ, Kwon MG, Kim JO and Park CI(2023, b). Red Sea Bream Iridovirus Kinetics, Tissue Tropism, and Interspecies Horizontal Transmission in Flathead Grey Mullets (*Mugil cephalus*). Animals, 13(8), 1341.
https://doi.org/10.3390/ani13081341

Kim YJ, Jung SJ, Choi TJ, Kim HR, Rajendran KV and Oh MJ(2002). PCR amplification and sequence analysis of irido-like virus infecting fish in Korea. Journal of Fish Diseases, 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, Yoon MJ, Jin JW, Kim KI, Kim YC, Hong S, Jeong JB and Jeong HD(2020). Development and characterization of megalocytivirus persistently-infected cell cultures for high yield of virus. Tissue and Cell, 66, 101387.
https://doi.org/10.1016/j.tice.2020.101387

Liu G, Zhu S, Liu D, Guo X and Ye, Z(2017). Effects of stocking density of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) on immunities, antioxidant status, and resistance against Vibrio harveyi in a biofloc system. Fish & Shellfish Immunology, 67, 19~26.
https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.05.038

Oh MJ, Jung SJ and Kim YJ(1999). Detection of RSIV (red sea bream iridovirus) in the cultured marine fish by the polymerase chain reaction. Journal of fish pathology, 12(1), 66~69.

Qin P, Munang'andu HM, Xu C and Xie J(2023). Megalocytivirus and Other Members of the Family *Iridoviridae* in Finfish: A Review of the Etiology, Epidemiology, Diagnosis, Prevention and Control. Viruses, 15(6), 1359.
https://doi.org/10.3390/v15061359

Salas-Leiton E, Anguis V, Martín-Antonio B, Crespo D, Planas JV, Infante C, Cañavate JP and Manchado M(2010). Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Potential

effects on the immune response. Fish and Shellfish Immunology, 28(2), 296~302.
https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.11.006

Sánchez P, Ambrosio PP and Flos R(2010). Stocking density and sex influence individual growth of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). Aquaculture, 300(1–4), 93~101.
https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.12.013

Sudthongkong C, Miyata M and Miyazaki T(2002). Iridovirus disease in two ornamental tropical fresh-water fishes: African lampeye and dwarf gourami. Diseases of Aquatic Organisms, 48(3), 163~173.
https://doi.org/10.3354/dao048163

Sohn SG, Choi DL, Do JW, Hwang JY and Park JW(2000). Mass mortalities of cultured striped beakperch, *Oplegnathus fasciatus* by iridoviral infection. J. Fish Pathol. 2000, 13, 121~127.

Wang CS, Shih HH, Ku CC and Chen SN(2003). Studies on epizootic iridovirus infection among red sea bream, *Pagrus major* (Temminck & Schlegel), cultured in Taiwan. Journal of Fish Diseases, 26(3), 127~133.
https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00441.x

WOAH(2022). World Organization for Animal Health, https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/2.3.07_RSIVD.pdf

Yarahmadi P, Miandare HK, Fayaz S and Caipang CMA(2016). Increased stocking density causes changes in expression of selected stress-and immune-related genes, humoral innate immune parameters and stress responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish & shellfish immunology, 48, 43~53.
https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.11.007

• Received : 12 December, 2023
• Revised : 04 January, 2024
• Accepted : 10 January, 2024