

## 國內 무지개 松魚에서의 IPN 바이러스의分離

柳瑩銖 · 張正瑚 · 陳永華 · 李鐘五 · 李在鎮

家畜衛生研究所 農振廳

(1990. 9. 1 접수)

### Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from rainbow trout in Korea

Young-soo Lyoo, Chung-ho Chang, Young-hwa Jean, Jong-oh Lee, Je-chin Rhee

Veterinary Research Institute, RDA, Korea

(Received Sept 1, 1990)

**Abstract:** Infectious pancreatic necrosis(IPN) virus was known as a causative agent of newly recognized viral disease of young rainbow trout characterized by highly contagious, high mortality and necrosis of pancreas.

Several strains of IPN viruses were recovered from young rainbow trout that have been shown a typical clinical sign of infectious pancreatic necrosis disease. The field isolate produced cytopathic effect, and multiplied up to  $10^{6.0}$  to  $10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub>/0.1ml in BT cell culture.

In the indirect immunofluorescent assay with trout anti-IPN virus IgG and goat anti-trout IgG FITC conjugate, these isolates were proved to be a IPN virus that were closely related with VR277 strain of IPN virus antigenically.

**Key words:** infectious pancreatic necrosis virus, rainbow trout.

### 緒 論

Infectious pancreatic necrosis(IPN)病은 IPN 바이러스가 연어, 松魚類의 成魚로부터 稚魚에 垂直 感染이 되어 突發的으로 病이 發生한다. 이 病은 높은 傳染性과 斃死率을 나타내는 바이러스性 疾病으로 成魚에서는 臨床症狀를 나타내지 않으나 2~3cm程度 크기의 稚魚에서 眼球突出, 腹部膨大, 脊椎彎曲 등과 腹部, 비늘, 基底部的 出血 등의 症狀를 보이며 回轉運動을 하다가 바닥에 沈底 2~3時間後 斃死하게 된다. 이때 病理의 所見을 보면 脾臟의 壞死, catarrhal性 腸炎, 橫紋筋의 硝子變性 등이 特徵적으로 나타난다.<sup>1,2</sup>

IPN病은 1955年 Wood et al<sup>3</sup>에 의해 發生이 確因된 이래 1960年 Wolf et al<sup>4</sup>에 의해 IPN 바이러스가 分離되었고 現在 美洲, 유럽, 대만, 日本 등의 野生 연어類와 養殖 松魚類에서 가장 問題가 되고 있는 바이러스 疾病이다.<sup>5-10</sup>

IPN 바이러스는 Reovirus群에 속하는 바이러스로

55~70nm 程度의 크기를 가지며 2개의 genomic segments를 가진 double stranded RNA 바이러스로 알려져 있다.<sup>11,12</sup> IPN 바이러스는 CHSE-214(Chinook salmon), STE-137(Steel head trout) 등의 embryonic 由來細胞와 RTG-2(Rainbow trout gonad), BF-2(Blue-gill fry, caudal trunk) 細胞들에서 cytopathic effect(CPE)를 일으킨다.<sup>11,13,14</sup>

本 研究은 1989年 1月 江原道 鄭善郡 南面地域의 稚魚 15~40萬마리 程度를 飼育하는 두 養魚場에서 飼育中인 무지개 松魚의 稚魚들이 眼球突出, 腹部膨大, 脊椎彎曲 등의 症狀를 보이며 각각스럽게 全體의 60%~70% 以上이 斃死하므로 臨床症狀를 보이는 稚魚들로부터 바이러스 分離를 試圖하였다.

### 材料 및 方法

**바이러스 分離:** 무지개 松魚 稚魚가 大量 斃死한 두 곳의 養魚場으로 부터 臨床症狀를 보이는 稚魚들을 採取하여 바이러스 分離 材料로 使用하였다.

養魚場 1에서 採取한 稚魚들은 臨床症狀에 따라 腹部膨大, 脊椎彎曲, 柔弱魚 等 3群으로 分類하였고, 養魚場 2에서 採取한 稚魚들은 脊椎彎曲, 柔弱魚의 2群으로 分類하였다.

各 群의 材料들은 滅菌한 sea sand를 利用하여 유제하고  $\alpha$ -MEM(5% FCS)을 添加한 後 2,000rpm에서 10分間 遠心分離를 하여 上層液을 0.45 $\mu$ m인 membrane filter에 濾過하였다. 濾過한 材料들을 單層 培養된 BF-2 細胞에 接種하여 22°C에서 90分間 感作시킨 後 接種液을 除去하고 5% FCS가 첨가된  $\alpha$ -MEM을 넣어 주고 22°C에서 培養하면서 cytopathic effect(CPE) 出現 有無를 觀察하였다.<sup>1-3</sup>

**螢光 抗體 試驗**: BF-2 細胞에 3代 繼代된 두株의 分離 野外 바이러스를 coverslip에 培養된 BF-2 細胞에 接種하여 CPE가 50~60% 程度 出現하였을때 cold acetone으로 10分 동안 固定하고 1次 抗體를 室溫에서 30分 동안 反應시켰다. 이때 使用한 1次 抗體는 ATCC 로 부터 購入한 IPN 바이러스 VR-299株를 adult rainbow trout의 筋肉內와 口腔內로 接種하고 4周後 採血하여 供試 하였다. 反應이 끝난 後 PBS로 3回 洗滌하고 2次 抗體인 goat anti-trout IgG FITC conjugated 를 反應시켰다. 室溫에서 30分 동안 反應시킨 後 다시 PBS로 洗滌하고 螢光顯微鏡으로 觀察하였다.

## 結 果

**바이러스의 分離**: 採取한 材料들을 臨床症狀別로 分類하여 BF-2 細胞에 接種하였을때 養魚場 2의 脊椎彎曲, 柔弱魚群과 養魚場 1의 腹部膨大群은 마로 CPE가 出現하였는데 그中 農場 1腹部膨大를 接種한 것이 가

장 강한 CPE를 일으켰다. 나머지 分離 材料들도 2代 繼代되던시 CPE를 일으켜 바이러스의 存在를 確證 하였고 3代 繼代된 分離 바이러스들은 BF-2 細胞에서 10<sup>6.0</sup>~10<sup>6.5</sup> TCID<sub>50</sub>/ml의 力價를 나타내었다(Table 1, Fig 1, 2, 3).

**螢光抗體 試驗**: BF-2 細胞에 3代 繼代한 分離 바이러스들을 trout anti-IPNV IgG와 goat anti-trout IgG FITC conjugate를 利用하여 間接 螢光抗體試驗을 實施하여 그림 4와 5에서와 같이 分離한 바이러스가 모두 間接 螢光抗體 試驗에 陽性 反應을 나타내었다.

## 考 察

IPN病은 연어나 松魚類의 稚魚에 주로 感染되어 높은 傳染성과 廢死率을 나타내는 바이러스性 疾病으로 成魚에서는 臨床症狀을 일으키지 않고 carrier 狀態로 存在하나<sup>8</sup> 感染된 成魚로부터 孵化된 稚魚는 臨床症狀을 나타낸 後 大量廢死를 일으켜 養魚場에 큰 被害를 주는 疾病이다. IPN病은 1955年 그 發生이 確證된 以後 美洲, 유럽, 대만, 日本 等의 淡水魚 大量 養殖 地域에서 問題가 되고<sup>1,4-7</sup> 國內에서도 最近 淡水魚 養殖場이 많이 생기면서 IPN病의 發生이 疑心되고 있다.

江原道 鄭善郡 두곳의 養魚場으로부터 脊椎彎曲, 腹部膨大 皮膚出血 等의 IPN病의 臨床症狀을 보이며 대량 廢死된 稚魚를 採取하여 바이러스 分離를 試圖하였다. 採取한 稚魚들을 症狀別로 分類하여 稚魚를 유제하여 BF-2 細胞에 接種한 全群에서 IPN 바이러스의 典型的인 CPE가 發生하였고 分離 바이러스는 BF-2 細胞에서 10<sup>6.0</sup>~10<sup>6.5</sup>TCID<sub>50</sub>/ml의 力價를 얻을 수 있었다.

BF-2 細胞는 稚魚에서 問題가 되는 魚類 疾病 바이러스들 中 IPN 바이러스만이 CPE를 일으키는 것으로 알려져 있다.

分離한 바이러스들을 trout anti-IPN virus IgG와 goat anti-trout IgG FITC conjugate를 利用하여 indirect immunofluorescent試驗을 實施한 結果 分離 바이러스들이 trout anti-IPN virus IgG와 特異的 結合을 하여 모두 螢光抗體 陽性反應을 나타내므로 分離 바이러스들이 IPN 바이러스임을 確證할 수 있었다.

以上の 實驗의 結果 分離된 바이러스가 IPN 바이러스임을 確證할 수 있었고 이와 동시에 家畜衛生研究所의 病理科에서 同一 材料를 病理 組織學的인 檢査를 實施한 結果 IPN病의 銓衡的인 病理的 所見을 나타내어 依賴된 稚魚의 大量廢死 原因이 IPN病임을 確證할 수 있었다(data not shown).

現在 國內에서 內水面 養殖이 增加함에 따라 魚類의

**Table 1.** Cytopathic effect of field isolates to BF-2 cells

Sample Groups	No. of passage (level of CPE)			Titer of isolate
	1st	2nd	3rd	
Farm 1-AS*	##	##	##	6.5※
Farm 1-SC**	—	+	##	6.0
Farm 1-W***	—	+	##	6.0
Farm 2-SC	+	+	##	6.0
Farm 2-W	+	+	##	6.0

\* abdominal swelling

\*\* scoliosis

\*\*\* weakness.

+ weak, ## severe CPE

※ Log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub>/ml.

疾病發生이 問題化되고 있고 여러 疾病中에 바이러스性 疾病, 특히 IPN病처럼 成魚가 臨床症狀 없이 carrier의 役割을 하는 疾病은 成魚를 外國에서 輸入하거나 다른 養魚場에서 入殖할때 疾病을 傳播시킬 可能性이 많다. 따라서 IPN 바이러스를 血清學的으로 빠르게 診斷, 檢索할 수 있는 ELISA法 또는 coagglutination 方法<sup>15,16</sup>의 開發과 함께 豫防藥 開發을 위해 分雜바이러스의 遺傳子 分析 等を 통한 血清型 確認 等の 基礎 研究가 進行되어야 하겠다.

### 結 論

江原道 鄭善郡 南川 地域의 두곳의 養魚場에서 稚魚들이 眼球突出, 腹部膨大, 脊椎彎曲 等の 臨床症狀을 보이면서 大量斃死되어 두 地域에서 稚魚들을 採取하

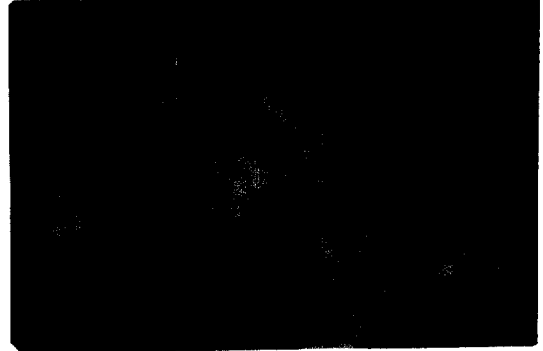
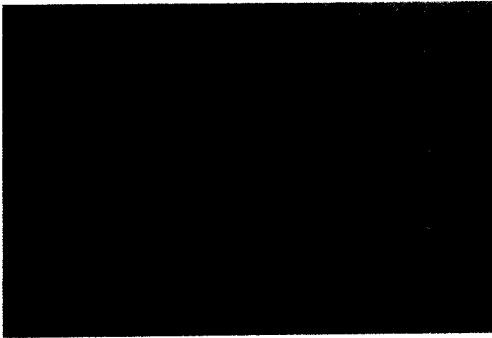
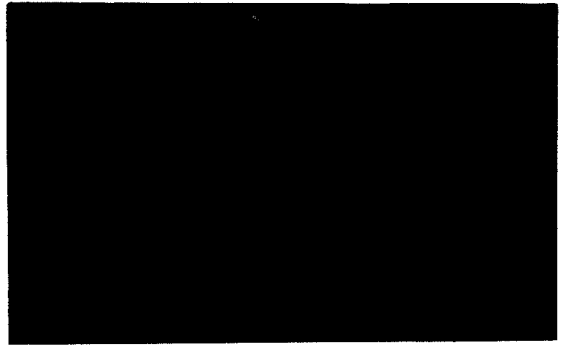
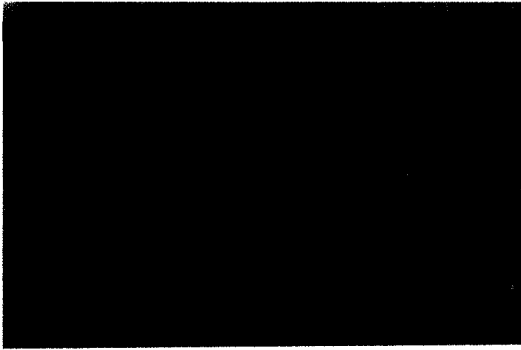
여 바이러스의 分雜를 試圖하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 稚魚들을 症狀別로 分類하여 BF-2 細胞에 接種, 繼代한 結果 農場 1과 農場 2의 接種 材料 모두가 BF-2 細胞에서 CPE가 出現하였고 그중 農場 1의 腹部膨大群이 가장 강한 CPE를 나타내었다.

2. 分雜 바이러스들은 BF-2 細胞에서  $10^{6.0} \sim 10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml의 力價를 나타내었다.

3. 分雜한 바이러스들을 trout anti-IPN virus IgG 와 anti-trout goat IgG FITC conjugated를 利用 immunofluorescent 試驗을 實施한 結果 分雜바이러스들이 모두 螢光 抗體 陽性 反應을 나타내었다.

以上の 結果 大量 斃死한 稚魚로부터 分雜된 바이러스가 IPN 바이러스임을 確因할 수 있었다.



#### Legends for figures

- Fig 1.** Uninfected BF-2 cells (200×).
- Fig 2.** Cytophatic effect in BF-2 cells infected with field isolates, 24 hour after infection (200×).
- Fig 3.** Cytophatic effect in BF-2 cells infected with field isolates, 48 hour after infection (200×).
- Fig 4.** Immunofluorescent pattern of BF-2 cells infected with field isolates. The infected cells were reacted with anti-IPN virus antibody and goat anti-trout IgG FITC conjugate (200×).
- Fig 5.** Immunofluorescent pattern of BF-2 cells infected with field isolates. The infected cells were reacted with anti-IPN virus antibody and goat anti-trout IgG FITC conjugate (400×).

## 参 考 文 献

1. 江草周三. Infectious pancreatic necrosis. 魚の感染症 東京, 日本 2nd ed. 1984;42~63.
2. Snieszko SF, Wood EM, Yasutake WT. Infectious pancreatic necrosis in Trout. *A M A Archives Path* 1955;60:229~233.
3. Wood EM, Snieszko SF, Yasutake WT. Infectious pancreatic necrosis in Brook trout. *A M A Archives Path* 1955;60:26~28.
4. Wolf K, Snieszko SF, Dunbar CE, et al. Virus nature of infectious pancreatic necrosis in trout. *Proc Soc Exp Bio* 1960;104:105~108.
5. Ball HJ, Munro ALS, Ellis A, et al. Infectious pancreatic necrosis in Rainbow trout in Scotland. *Nature* 1971;23:417~418.
6. Yulin J, Zhebgqiu L. Isolation of IPN virus from imported rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in the P.R. China. *J Appl Ichthyol* 1987;3:191~192.
7. Bucke D, Finlay J, McGregor D, et al. Infectious pancreatic necrosis(IPN) virus: its occurrence in captive and wild fish in England and Wales. *J Fish Disease* 1979;2:549~553.
8. Mangunwiryo H, Agius C. Studies on the carrier state of infectious pancreatic necrosis virus infections in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J Fish Disease* 1988;11:125~132.
9. Dprson M. Infectious pancreatic necrosis of salmonidae-recent developments and future prospects. *Vet Sci Communication* 1977;1:201~212.
10. Sonstegard RA, McDermott LA. Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from White suckers (*Catostomus commersoni*). *Nature* 1972;239:174-175.
11. Hedrick RP, Fryer JL. Persistent infection of three salmonid cell lines with infectious pancreatic necrosis virus(IPNV). *Fish Pathol* 1981;15:163~172.
12. Hsu YL, Chen BR, Wu JL. Comparison of RNAs and polypeptides of infectious pancreatic necrosis virus isolates from eel and rainbow trout. *J gen Viro.* 1989;70:2233~2239.
13. Hedrick RP, Frter JL. Persistent infections of salmonid cell lines with infectious pancreatic necrosis virus(IPNV): A model for the carrier state in trout. *Fish Pathol* 1982;16:163~172.
14. Hedrick RP, Eaton WD, Fryer JL, et al. Biochemical and serological properties of Birnaviruses isolated from fish in Korea. *Fish Pathol* 1985;20:463~468.
15. Kimura T, Yoshimizu Y, Yasuda H. Rapid, simple serological diagnosis of infectious pancreatic necrosis by coagglutination test using antibody-sensitized Staphylococci. *Fish Pathol* 1984;19:25~33.
16. Rodak L, Pospisil Z, Tomanek J, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) detection of infectious pancreatic necrosis virus(IPNV) in culture fluids and tissue homogenates of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J Fish Disease* 1988;11:225~235.