

무지개송어의 바이러스성 출혈성 패혈증에 관한 기초적 연구

이 근 광

군산대학교 해양산업대학 수족병리학과

무지개송어(*Salmo gairdneri*)의 바이러스성 출혈성 패혈증에 관하여 연구하였다. 병어의 hematocrit 값은 정상어보다 매우 낮게 나타났으며, GOT와 GPT값은 정상어보다 병어에서 약간 높게 나타났다. 병어의 혈청과 장기의 마쇄액을 CHSE-214세포에 감염시켜 세포변성 효과를 조사한 결과 감염 24시간 후에 세포변성이 나타났다.

Key Words : Rhabdoviridae, VHS, IHNV, IPNV, CHSE-214 cell line

무지개송어(*Salmo gairdneri*)의 바이러스성 출혈성 패혈증(viral haemorrhagic septicemia, VHS)을 일으키는 바이러스는 rhabdoviridae에 속하며, single strand RNA genome을 갖고, 분자량은 약 11~12Kb이다(Wolf, 1988). VHS virus와 IPNV는 infectious hematopoietic necrosis virus(IHNV)와 함께 virus성 질병을 일으키는 중요한 인자로 알려져 있으며(Pilcher and Fryer, 1980; Wolf, 1988). 실제 유럽과 미국의 어류 양식에서 이들 virus가 가장 많이 분리되었다(Bullock, 1976; Hedrick *et al.*, McAlliste, 1988; de Kinkelin, 1991). Nishizawa 등(1991)은 hirame rhabdovirus(HRV), IPNV, VHS virus의 genome 크기와 구조 단백질의 함성에 관하여 비교 연구하였으며, Ortega 등(1993)은 VHS virus가 수온 14~15C 이하에 많이 존재하며, 14~15C 이상의 수온에서는 virus가 복제되기 어렵고, 8~12C가 이 virus 복제의 최적 온도라고 보고하였다. 이러한 virus는 양식장에 보관된 알과 물고기를 도입함으로써 감염된다(Ortega *et al.*, 1993). 우리나라에서도 이들 중의 virus가 양식중인 송어에 발병하여 많은 피해를 주고 있는 실정므로 이에 대한 시급한 대책 수립이 요구되고 있으나, 이에 대한 보고는 없다. 따라서 본 연구에서는 VHS virus병에 대한 대책을 수립하기 위한 기초 조사 일환으로 우선 VHS virus에 감염된 병어와 정상어의 혈액을

비교 조사하였으며, 어류 세포에 감염시켜 그 증상을 조사하였다.

재료 및 방법

공시어

실험에 사용한 병어(평균 70~80g)는 1994년 1월 수온 4C 전후의 저수온에서 사육하고 있는 전북소재 송어 양식장에서 VHS 바이러스에 감염되어 폐사 직전에 있는 것을 사용하였다.

Hematocrit 조사

미부를 절단시켜 채혈하고 항응고제가 들어있는 tube에 조심스럽게 혈액을 받아 plain capillary tube에 2/3 가량 채운 다음 한쪽 끝을 불꽃으로 가열하여 봉입하고, microhematocrit용 원심분리기(Hanil Co.)에서 12,000 rpm으로 5분간 원심분리한 후 판독하였다.

GOT, GPT 측정

GOT, GPT 측정은 두개의 시험관에 각각 S(substrate)와 U(unknown)으로 표시한 후, S에는 AST substrate(alpha-ketoglutarate-aspartate) 1.5ml을, U에는 혈청 0.2ml을 넣고 37C에 5분 방치한 후 U시험관에 S시험관 액 1ml을 가하여 계속 1시간(GPT는 30분) 동안 incu-

bation했다. 다음 U시험관에 1mℓ 2,4-dinitrophenyl hydrazine을 넣고 혼합한 후, 실온에 20분간 방치하였다. 다음 0.4N NaOH 10mℓ을 넣어 혼합한 다음 5분후 파장 505nm에서 O.D를 관독하였으며, standard curve를 작성하여 unit를 계산하였다.

세포배양

CHSE-214 계대세포 배양은 Eagle's MEM 기본배지 (Flow Lab)에 10% fetal bovine serum(Flow Lab), 2 mM-glutamin과 penicillin streptomycin(100 I.U. 100μg/ml)을 첨가하여 사용하였으며, 매 4일마다 계대배양하였다.

바이러스 감염증상 관찰

세포배양용 flask에 세포가 약 70% 정도 단층 배양되었을 때 배양액은 버리고 병어에서 채혈한 혈청과 간장, 신장의 조직 마쇄액을 0.45μm 여과지로 여과하여 여과액 0.1mℓ을 세포에 접종한 후, 세포변성효과를 도립 현미경 (Olympus, Co.)하에서 관찰하였다(Hill, 1976).

결과 및 고찰

병어의 임상증상

병어의 외부 증상으로는 체색이 검게 변하였고, 아가미는 퇴색되어 심한 빈혈증을 나타냄과 함께 안구가 돌출되었는데, 돌출된 안구내와 안구 주변이 출혈되었고, 체표는 많은 점액이 분비되었다. 이와 같은 증상은 본 병의 전형적인 만성형 증상의 특징과 일치되었다. 육안적인 부검 소견으로는 간장이 회백색으로 변하였으며, 신장은 종대되어 정상어와 쉽게 구별할 수 있었으나, 다른 부위는 정상어에 비하여 특이한 병변은 볼 수 없었다.

Hematocrit 조사

정상어와 병어의 혈액을 취하여 hematocrit를 조사한 결과는 Table 1과 같다. 정상어의 hematocrit값은 평균 38%인 반면 병어는 평균 4.4%로 정상어의 hematocrit값보다 약 9배가 낮은 것으로 나타났다. 이는 본 병에 감염되면 심한 빈혈증을 일으킨다는 사실과 일치된 결

과로서 VHS virus에 감염된 병어의 hematocrit값은 정상어보다 1/3~1/4 정도 낮게 나타났다는 Egusa(1983)의 보고와 약간의 차이가 있는 것으로 나타났다.

Table 1. The hematocrit values normal and diseased fish, *S. gairdneri*

	Percent(%)	
	Normal	Diseased
	33	3.1
	28	7.5
	35	4.5
	45	3.9
	49	3.0
Mean	38	4.4

GOT, GPT 조사

정상어와 병어의 혈액 중 GOT, GPT값을 측정된 결과는 Table 2와 같다. 정상어의 평균 GOT값은 84.60, 평균 GPT값은 57.58 I.U인 반면, 병어의 평균 GOT값은 89.28, 평균 GPT값은 66.84 I.U로 병어의 GOT값은 정상어보다 평균 약 4.68 I.U, GPT는 평균 약 9.26 I.U 정도 높게 나타났다. 이러한 결과는 육안적인 부검 소견 시에 병어의 간장에 약간의 이상이 생긴 결과와 일치된 결과였다.

Table 2. The GOT and GPT values of normal and diseased fish, *S. gairdneri*

	GOT		GPT	
	Normal	Diseased	Normal	Diseased
	83.2	86.1	57.2	67.3
	87.3	99.2	57.1	67.3
	85.2	87.5	58.3	66.2
	83.1	85.3	56.1	68.1
	84.2	88.3	59.2	65.3
Mean	84.6	89.3	57.6	66.8

Unit : I.U

바이러스의 감염증상

병어에서 채혈한 혈청과 간장, 신장의 조직을 마쇄하여 마쇄액을 CHSE-214세포에 접종한 후 세포변성효과를 관찰한 결과, 감염 12시간 후부터 약간의 세포변성효과를 보이다가 감염 24시간 후에는 많은 세포가 세포변성을 나타내어(Fig. 1. A, B) virus에 감염되었음이 확인되었다. 이러한 결과는 Schlotfeldet 등(1991)이 감염 72시간 후에 CHSE 세포에 감염된 VHS virus 입자를 전자현미경으로 관찰한 결과와 Hedrick 등(1978), Malsberger와 Cerini(1963)이 IPN virus를 CHSE-214 세포주와 STE-137세포주에 감염시킨 결과와 매우 유사하였다. VHS virus는 Ortega 등(1993)이 보고한 것처럼 수온에 민감하기 때문에 먼저 이 바이러스에 노출되지 않도록 주의를 해야 되겠지만 양식장에 수온을 조절할

수 있는 system을 갖추어 수온을 조절함으로써 피해를 최소화시켜야 될 것이다. 실제로 본 논문에서 실험결과는 기록하지 않았지만 VHS virus에 감염된 병어를 18~19°C에 사육했을 때 모두가 정상적인 생활을 하였다. 그러나 이 바이러스 병에 대한 연구는 미비하여 앞으로 전자현미경을 통한 virus의 복제 기작을 밝히고, 이에 대한 온도효과 실험 및 백신 개발등의 여러분야에서 더욱 연구해야 할 것으로 생각된다.

References

- Bullock, G. L., R. P. Rucker, D. Amend, K. Wolf, H. M. Stuckey : 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. Ghittino, P. Tratado de las enfermedades de los peces. Ed. : Ac-ribia. Zaragoza. 1991.
- Egusa : 魚病學. 新水産學全集. 1983.
- Hedrick, R. P., J. C. Leong and J. L. Fryer : Persistent infections in salmonid fish cells with infectious pancreatic necrosis virus. J. Fish Pathol. 1 : 297~308, 1978.
- Hill, B. J. : Procedures for the isolation and identification of IPN, VHS, IHN and SVC viruses from diseased fish. Fisheries Reserach Technical Report. 1~3, 1976.
- Malsberger, R. G. and Cerini, C. P. : Characteristics of infectious pancreatic necrosis virus. J. Bacteriol. 86 : 1283~1287, 1963.
- McAllister, P. E. : Infectious viricas de peces cultivados. Patologia en acuicultura(C. A. I. C. Y. T.) Madrid. 1988.
- Nishizawa, T., M. Yoshimizu, J. R. Winton, and T. Kimura : Comparison of genome size and syn-

Fig. 1. Phase contrast photomicrographs of normal CHSE-214 cells(A) and cytopathic effect of the cells infected with VHS virus agents(B. $\times 200$).

- thesis of structural proteins of hirame rhabdovirus, infectious hemorrhagic septicemia virus. *Jap. J. Fish. Pathol.* 26(2) : 77~81, 1991.
- Ortega, C., E. Planas, J. Docando, J. L. Muzaulz, J. L. Alonso, M. C. Simon** : Epidemiological 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 J. L. Fryer** : The viral disease of fish : A review through *Crit. Rev. Microbiol.* 7 : 287~364, 1980.
- Schlotfeldt, H. J., W. Ahne, P. E. Vesterard-Jorgensen and W. Glende** : Occurrence of viral haemorrhagic septicemia in turbot (*Scophthalmus maximus*) a natural outbreak. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 11(3) : 105~107, 1991.
- Wolf, K** : Fish viruses and fish viral diseases. Cornell University Press, Ithaca, New York, pp. 217~249, 1988.

**A Basical Study on Viral Haemorrhagic Septicemia of
Rainbow trout, *Salmo gairdneri***

Keun-Kwang Lee

Department of Fish Pathology, Kunsan National University, Kunsan 573-400, Korea

The viral hemorrhagic septicemia of rainbow trout, *Salmo gairdneri* was studied. The hematocrit values of diseased fish were very low than those of normal fish. And, the GOT and GPT values of serum of diseased fish were a little high than those of normal fish. Cytopathic effect of viral agents (serum and organs of diseased fish) was observed with inverted phase contrast microscopy. After 24hrs infection, the cells were showed the cytopathic effect.

Key Words : Rhabdoviridae, VHS, IHNV, IPNV, CHSE-214 cell line