

친어용 넙치 성어에 있어 Marine Birnavirus (MABV) 감염에 관한 검색

오명주[†] · 정성주 · 김영진 · 김형탁* · 정태성** · 여인규***

여수대학교 어병학과, *부경대학교 식품생명과학전공,
경상대학교 의과대학 미생물학과, *제주대학교 해양생물공학과

우리나라 연안의 9곳의 지역에 위치한 넙치종묘생산장의 성숙 친어 및 친어용 자연채집어를 대상으로 각각의 생식소를 채집하여 체내 MABV 감염상황을 PCR법을 이용하여 검색한 결과 검사어의 34%가 MABV 감염 양성반응을 나타내었다. PCR 반응양성 어류의 샘플로부터 CHSE-214 세포주를 이용한 바이러스의 배양을 행한 결과, 친어 체내 생식소에 있어 바이러스 감염도가 $10^{2.30}$ 에서 $10^{4.30}$ TCID₅₀/g(ml)의 titer를 보여, 정상적인 친어로 보이는 개체내의 바이러스 잠복감염이 인정되었다. 각각의 다른 어체로부터 분리되어진 바이러스는 중화반응에 따른 검토결과 동일종의 MABV임을 확인할 수 있었다. 종묘생산용으로 관리중인 넙치 친어로부터 MABV의 잠복감염 확인으로 친어를 매개로한 감염의 가능성이 확인되어졌다.

Key words: Virus detection, Birnavirus, Marine birnavirus, Flounder, Brood stock

넙치 치어기 질병의 일종인 넙치 바이러스성 복수증(flounder viral ascites)은 남해안 양식산 넙치를 대상으로 행한 원인바이러스 검출 및 검출바이러스의 혈청학적 분석 연구를 통하여, 그 원인체가 일본에서 발생보고 되었던 방어나 넙치류의 복수증 원인 바이러스인 yellowtail ascite virus(YAV) 및 방어류의 바이러스성 변형증 원인체인 viral deformity virus(VDV)가 포함되어지는 marine birnavirus(MABV)에 포함되어지는 유사종으로 밝혀졌다(오 등, 1999b).

오 등 (1999a)은 현재 우리 나라에서 발생하는 marine birnavirus를 특이적으로 검출 가능한 PCR법을 제안하고, MABV의 감염이 전국의 연안 넙치 양식장 뿐만 아니라, 다른 양식어종인 조피볼락 및 농어류에서도 널리 검출되어짐으로 MABV 감염예방에 대한 필요성을 보고하였다.

Isshiki *et al.*(1989)은 방어 치어에 있어서의 MABV의 일종인 YAV 감염상황을 조사하여 천연 채포된 방어 치어에서 14.9%의 바이러스 감염을 확인하였으며, 또한 성숙 친어로부터 바이러스의 잠복감염이 이루어지고 있음을 확인하여(Isshiki *et al.*, 1993), 이러한 자연 감염된 친어가 치어의 바이러스

감염증의 전염원으로 작용함을 보고하고 있다.

본 연구는 우리나라 연안에 위치하는 몇 개 지역 넙치 종묘생산장의 체란·채정용 친어 및 친어용으로 자연 포획된 개체를 대상으로 생식소를 채취하여 PCR법 및 어류주화세포를 이용한 배양법에 따라 MABV의 검출 및 분리를 행하고 분리 바이러스의 혈청학적 특이성을 검토함으로써, 친어용으로 관리되어지고있는 넙치에 있어서의 MABV 바이러스 보유 및 종묘생산단계 치어에 대한 전염원으로서의 관련성을 검토하고자 행하였다.

재료 및 방법

실험어 및 샘플채취

넙치 종묘 생산용 친어 체내 바이러스 보유 조사를 위해 1999년 9월부터 2000년 3월에 걸쳐 동해안 2개소, 남해안 4개소 및 서해안 1개소의 넙치 양식장 및 종묘 생산장에서 관리중이거나 동해안 및 남해안 각 한 개소에서 친어용으로 자연 채집되어진 성어를 시료어로 사용하였다. 샘플의 내력은 Table 1에 나타내었다. 동해안 연안의 샘플로서 E-1 양식장의 친어용 넙치 5미(♀: 3, ♂: 2), E-2 양식장 친어용 넙치 4미(♀: 2, ♂: 2), E-3 종묘배양장의 넙치 친어 2미(♀: 2)를 검사에 사용

[†]Corresponding author

Table 1. Summary of the experimental fish and materials employed for the detection of MABV

Fish Group	Sampled material*	Date of sampling	No. of fish	Sex	Mean weight(g)
E-1	Egg & ovarian fluid	Oct. 21. 1999	3	♀	2,600
	Seminal fluid	"	2	♂	"
2	Egg & ovarian fluid	Dec. 19. 1999	2	♀	2,300
	Seminal fluid	"	2	♂	"
3*	Egg & ovarian fluid	Jan. 10. 2000	2	♀	1,600
S-1	Egg & ovarian fluid	Oct. 12. 1999	3	♀	1,750
	Seminal fluid	"	1	♂	"
2	Egg & ovarian fluid	Oct. 23. 1999	3	♀	2,200
	Seminal fluid	"	1	♂	"
3*	Egg & ovarian fluid	Oct. 24. 1999	3	♀	1,600
	Seminal fluid	"	2	♂	"
4	Egg & ovarian fluid	Dec. 2. 1999	2	♀	2,100
5	Egg & ovarian fluid	Jan. 17. 2000	2	♀	1,800
	Seminal fluid	"	3	♂	"
W-1	Egg & ovarian fluid	Jan. 20. 2000	2	♀	1,400
	Seminal fluid	"	2	♂	"

*The two fish groups were natural sources, that treated any fertilizing methods.

하였고, 남해안의 경우, S-1 종묘배양장의 넙치 친어 4미(♀: 3, ♂: 1), S-2 양식장의 친어용 넙치 4미(♀: 3, ♂: 1), S-3 양식장의 친어용 넙치 5미(♀: 3, ♂: 2), S-4 종묘배양장의 친어용 넙치 2미(♀: 2), S-5 지역에서 채집된 자연산 넙치 성어 5미(♀: 2, ♂: 3)를 조사에 사용하였으며, 서해안의 1개소(W-1) 넙치양식장의 2년생 친어 4미(♀: 2, ♂: 2)를 사용하였다. 시험용 시료 채취는 자연산 채집어를 제외한 전체 조사구 어류의 경우, 인위적인 수온조절 및 광주기조절에 의한 관리가 진행되어진 후 산란을 예정하고 있는 2-3일전의 시기에 맞추어 현장에서 직접 행하였으며, 무작위로 선택된 각 개체의 난 및 난소액 또는 정액을 조사 재료로 채취하였다.

생식산물의 채취법은 Yoshimizu & Nomura (1989)의 방법에 준하여 행하였다. 즉, 채집된 어류의 체중을 측정한 후, 미리준비한 멸균된 5 ml 피펫의 선단부를 생식공에 삽입하여 피펫필러의 공기압으로 체내의 생식소를 1 ml 취한 후, 준비된 9 ml의 Anti-ink액(penicillin 1,600 IU/ml, streptomycin 1,600 µg/ml, Mycostatin 800 U/ml)에 혼합

한 것을 빙장상태를 유지하여 실험실로 이동하여 -80°C에서 보관하였다.

PCR법에 의한 바이러스검출

냉동 보존중인 샘플로부터 바이러스 검출을 위한 핵산의 추출, cDNA의 제작 및 PCR은 Oh *et al.*(2000)의 방법과 동일하게 행하였다. 즉, 시료를 해동하여 마쇄한 후, 200 µl를 취하여 RNA Isolation Kit(Boehringer mannheim Co.)를 이용하여 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 100°C에서 10분간 변성시킨 후 즉시 얼음 위에서 냉각시키고, 여기에 Oligo(dT)15 primer와 RT mixture를 넣고 전체를 20 µl가 되게 농도를 맞추었다(50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTPs, 10 mM DTT, 10 units reverse transcriptase(GibcoBRL)). RT 반응은 42°C에서 50분간 실시하였고, 70°C에서 15분간 처리하여 잔존효소활성을 제거하여 cDNA를 얻어 PCR template로 사용하였다. PCR primer는 Suzuki *et al.*(1997)에 의해 디자인된 primer(P1/P2, P3/P4)를 사용하였다. PCR 반응은 100 pM의

Table 2. Detection of MABV with PCR in the egg & ovarian fluid and seminal fluid of flounder, *Paralichthys olivaceus* brood stocks

Fish Group	Samples	No. of Examined	samples	Detection	Detection rate (%)
E-1	Egg & ovarian fluid	3		0	0
	Seminal fluid	2		0	0
2	Egg & ovarian fluid	2		2	100
	Seminal fluid	2		1	50
3	Egg & ovarian fluid	2		0	0
S-1	Egg & ovarian fluid	3		0	0
	Seminal fluid	1		0	0
2	Egg & ovarian fluid	3		3	100
	Seminal fluid	1		1	100
3	Egg & ovarian fluid	3		1	33
	Seminal fluid	2		0	0
4	Egg & ovarian fluid	2		0	0
5	Egg & ovarian fluid	2		0	0
	Seminal fluid	3		0	0
W-1	Egg & ovarian fluid	2		2	100
	Seminal fluid	2		2	100

각 primer, 0.2 mM dNTPs, 1 U Taq DNA polymerase, 2.5 mM MgCl₂이 포함된 혼합물에 합성된 cDNA 1 μl를 첨가하여 실시하였다. 반응조건은 우선 95°C에서 5분간 pre-denature 시킨 후 95°C 1분간 denature, 48°C 1분간 annealing, 72°C 1분간 extension 반응을 30 cycles를 진행시키고, 72°C 5분간 postextension을 시킨 후 1 step product를 다시 1 μl를 취해 primer(P3/P4)를 사용하여 2 step PCR을 행하고, 여기서 얻은 product는 1.5% agarose gel을 이용하여 확인하였다.

주화세포 및 바이러스 배양

냉동 보존중의 샘플중에서 PCR 양성 및 음성의 결과가 판단된 샘플을 선택하여 해동한 후, 상법에 따라 바이러스 감염가 확인용 시료를 제작하였다. 바이러스 감염가 확인을 위한 배양용 주화세포로는 MABV에 감수성이 높은 chinook salmon embryo cell line(CHSE-214)을 사용하였고, 세포 배양액은 100 IU/ml의 penicillin, 100 μg/ml의

streptomycin, 10% FBS(Fetal bovine serum) 첨가 MEM(Eagle's minimum essential medium, Gibco)을 사용하였다. 생체 샘플내의 바이러스 감염가의 측정 96 well cell culture plate에 상기의 세포를 단층으로 배양한 후, 각 샘플을 적용하여 TCID₅₀법으로 행하였다.

바이러스 증화시험

조사용 친어로 부터 분리되어진 바이러스의 혈청학적 비교를 위하여 Oh 등(1999b)에 의하여 국내에서 새롭게 확인된 MABV를 이용하여 제작되어진 anti-MABV NC-1 rabbit serum(Jung *et al.*, 2000), anti-IPNV Ab rabbit serum 및 anti-MBV Y6 rabbit serum을 이용하여 상법에 따라 바이러스 증화시험을 행하였다. 즉, HBSS로 항체가 1:20이 되게 조정 한 항혈청용액에 100 TCID₅₀/ml로 조정 한 4 종류의 샘플유래 바이러스액, MABV NC-1, IPNV Ab를 각각 1 ml:1 ml 가되게 혼합하여 20°C에서 30분간 반응시킨 후,

96 well cell culture plate에 배양된 CHSE-214세포에 접종하여 바이러스 감염가의 변동을 관찰하였다.

결 과

MABV의 검출 상황

국내에서 종묘생산용으로 사용하고자 사육 중이던 넙치 친어 및 자연산 넙치 성어를 대상으로 채집되어진 생식소 유래 산물을 대상으로 PCR법을 이용하여 MABV 감염 상태를 조사한 결과를 Table 2에 나타내었다.

동해안 지역 3곳으로부터 채집한 계 11종의 샘플을 처리하여 목적으로 하는 MABV 바이러스 유전자를 검출해본 결과, 세 장소 중에서 한 장소(E-2)에서 채집한 샘플에서만 바이러스의 검출이 양성을 나타내어 그 감염율이 27%(3/11)이었다. 제주도 포함 남해안 5 지역에서 채집한 20개체의 생식소를 조사한 결과, 두 지역의 샘플에서 양성반응이 나타났다. 남해안 전체에서의 샘플량과 비교해 보았을 때, 바이러스 양성 어체의 검출율은 20%(4/20)를 나타내었다. 아울러 한 곳에 불과했으나 서해안 샘플의 경우 4마리 샘플에서 모두 MABV 양성 결과를 나타내었다. 이들을 종합하면, 전체 35개체의 넙치 친어 중에서 MABV에 감염되어진 개체는 12개체로 34%의 감염율을 보였다. 이들 샘플의 암수개체별 구분에 의한 바이러스 검출율을 비교하여 보면, 난 및 난소액이 채집되어진 암컷 22개체 중에 8개체에서 감염 양성어가 검출되어져, 그 감염율이 36%를 차지하였고, 숫컷개체의 경우 13개체 중에서 4개체가 감염되어짐이 확인되어져서 그 감염율은 31%로 나타나 양성간의 MABV 감염율의 차이는 나타나지 않았다.

MABV의 어체내 감염가

PCR을 이용하여 채집된 어체의 생식소 산물을 이용한 MABV 감염어의 검출 결과 양성으로 나타난 7개체의 냉동 샘플을 대상으로 생식소 산물내에 바이러스 감염가를 알아보기 위하여 생식소 산물의 마쇄 여과액을 CHSE-214세포에 감염시켜 1주일간 배양하여 그 발현된 CPE의 관찰 결과를 기초로 계산되어진 각각의 샘플어체에 있어서의 생식소내 바이러스 감염가를 Table 3에 나타내었다.

Table 3. The titer of MABV in the samples shown as viral positive reaction by PCR

Fish Group	Samples	Mean Virus titer (log TCID ₅₀ /g or ml)
E-2	Egg & ovarian fluid	4.30
	Seminal fluid	<1.80
S-2	Egg & ovarian fluid	<1.80
	Seminal fluid	2.30
S-3	Egg & ovarian fluid	3.80
W-1	Egg & ovarian fluid	2.55
	Seminal fluid	4.05

4개 지역의 7개체인 PCR 양성 개체 중에서 2개체의 샘플어로부터는 세포배양에 의한 바이러스의 검출이 불가능하였으며, 그외의 5개체로부터는 10^{2.30}에서 10^{4.30}TCID₅₀/g(ml)의 범위에서 바이러스 감염가가 확인되어졌다. 이를 암수로 구분하여 비교하여 보면, 난 및 난소액에서 10^{2.55}에서 10^{4.30}TCID₅₀/g의 바이러스감염가를 보였고, 정액을 조사한 어체의 경우 10^{2.30}에서 10^{4.05}TCID₅₀/ml로 나타나서 암·수간의 MABV 감염가의 크기는 차이를 보이지 않았다.

분리바이러스의 종화시험

동해안 E-2 지역에서 채집한 넙치의 생식소에서 분리되어진 바이러스 strain(E-2-E), 남해안 S-2 및 S-3 지역에서의 샘플로부터 분리되어진 바이러스 strain(S-2-S 및 S-3-E) 및 서해안(W-1)에서 채집한 어류의 정소유래인 W-1-S 바이러스 strain을 대상으로 1:20으로 조정된 항 MABV NC-1, 항 MBV Y-6 및 항 IPNV Ab를 반응시켜 바이러스 중화에 의한 감염가의 변동을 확인하여 본 결과, 본 연구를 통해 친어용 넙치 성어로부터 분리되어진 모든 바이러스 strain은 marine birnavirus로 보고되어진 MABV NC-1 및 MBV Y-6와 유사한 혈청학적 유사성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다(Table 4).

고 찰

우리나라의 전역에 널리 양식되고 있는 넙치의 버나바이러스 감염증이 끊이지 않고 계속되고 있

Table 4. Results of neutralization test for the samples isolated from flounder, *Paralichthys olivaceus* brood stocks

Anti-sera	Viruses*					
	NC-1	IPNVAb	E-2-E	S-2-S	S-3-E	W-1-S
MABV NC-1	+	-	+	+	+	+
MBV Y-6	+	-	+	+	+	+
IPNV Ab	-	+	-	-	-	-

*Virus: NF-4, marine birnavirus; Ab, infectious pancreatic necrosis virus; E-2-E and S-3-E, virus strain isolated from egg & ovarian fluid of E-2 and S-3 places; S-2-S and W-1-S, virus strain isolated from seminal fluid of S-2 and W-1 places.

는 점 및 그 주요 피해 대상 크기가 종묘생산단계의 자,치어 시기라는 점에서, 친어로 관리되어지고 있는 성어들의 MABV 바이러스 감염 상태를 파악해 봄으로서, 잠복감염 상태의 친어로 부터 종묘생산 과정 중의 수직적인 병원체 전파가 이루어 질 수 있는 기능에 대하여 살펴보고자 했다. 우리나라의 동, 서, 남해안에 위치한 수 곳의 종묘생산장 친어의 생식소를 대상으로 한 본 조사에서 약 30%의 MABV 감염이 PCR법에 의해 확인되었으며, 또한 그 바이러스 감염가에는 차이가 있었으나, PCR 양성인 개체들로부터 Oh *et al.*(1999b)에 의해 분리 보고되어진 MABV와 동일한 혈청학적 특성을 갖는 바이러스가 공통적으로 확인되어졌다. Marine birnavirus는 해양 유래 버나바이러스의 총칭으로 국내에서는 넙치의 자, 치어기에 이 바이러스에 의한 질병으로 심한 피해를 입히고 있다(Shon *et al.*, 1995; Oh *et al.*, 1999a; 1999b). 넙치 치어에 이 바이러스가 감염되었을 경우는 어류가 심각한 폐사를 일으키지만, 그 중 살아남은 개체는 외견상 건강해 보일지라도 병원바이러스를 몸에 지닌 상태에서 성장을 지속하게 된다. 친어에 잠복감염의 형태로 바이러스가 존재하면 그 병원체가 자손에 전이되어 면역체계가 제대로 발달하지 못한 상태의 치어에 심각한 감염증을 나타내게 된다(Ahne and Negele, 1985). 국내에서 분리되어진 MABV와 유사종으로 확인되어진 YAV의 친어에 대한 감염에 관한 연구에서 Isshiki *et al.*(1993)은 자연상태에서 채포 되어진 방어를 인위적으로 성성숙 호르몬을 처리하여 종묘 생산용으로 사용하는 친어의 경우 암컷에서 93% 수컷에서

20%의 바이러스 출현이 확인되어진 점 및 그러한 어류들의 혈청을 이용한 YAV와의 중화반응 실험에서 혈청내에 YAV 중화능을 갖는 항체의 보유 가능성을 확인한 점으로부터, YAV의 성숙어체내 잠복감염 및 수직감염의 가능성을 제시하고 있다. 본 연구의 경우, 광주기조절 및 수온조절을 통하여 조기 산란을 유도해 온 종묘 생산 현장의 성숙 개체를 대상으로 체내에 소수로 존재하는 바이러스 검출을 위해 개발되어진 PCR법을 이용하여 MABV의 검출을 행한 결과, 친어용으로 관리되어져온 개체들에서는 37%(11/30)의 감염율이 확인되어진 점에서, 넙치의 경우에 있어 MABV의 감염 원으로서 종묘 생산용 친어가 작용되어질 수 있는 가능성이 있음이 시사되어졌다.

본 연구의 결과를 토대로 종묘생산 친어용 어체의 성성숙과 관련된 체내 잠복감염 MABV 바이러스의 증식 특성, MABV의 넙치 종묘에 있어서의 병원성 및 감염 친어로부터 생산된 자,치어의 발병 양상에 대한 연구가 필요하다.

사 사

이 논문은 1998년도 학술진흥재단의 신진교수연구비 (KRF-98-003-H00005) 지원에 의해 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Ahne, W., and Negele, R.D.: Studies on the transmission of infectious pancreatic necrosis virus via eyed eggs and sexual products of salmonid fish. In: Ellis, A.E. (ed) Fish and Shellfish Pathol., Academic Press, London, pp. 261-269, 1985.
- Isshiki, T., Kawai, K., and Kusuda, R.: Incidence of yellowtail ascites virus (YAV) in wild yellowtail fingerling. Nippon Suisan Gakkaishi, 55(4), 633-637, 1989.
- Isshiki, T., Kawai, K., and Kusuda, R.: Detection of yellowtail ascites virus and neutralizing antibody in brood stocks of yellowtail. Fish Pathol., 28(2): 65-69, 1993.
- Jung, S.J., Oh, M.J., Park, S.C. and Suzuki S.: Characterization of the birnavirus from cultured flounder fry in Korea which is closely related with marine birnavirus. Dis. Aquat. Org. (in press).
- Oh, M.J., Jung, S.J., and Kim, H.R.: Biological and serological characteristics of birnavirus isolated from cultured Japanese flounder in 1999. J. Fish Pathol.,

- 12(1), 56-62, 1999b.
- Oh, M.J., Jung, S.J., and Kim, Y.J.: Detection of birnavirus from marine cultured fish using polymerase chain reaction (PCR). *J. Fish Pathol.*, 12(1), 49-55, 1999a.
- Oh, M.J., Choi, W.C., Kim, H.R., Jung, S.J., and Kim, Y.J.: Relationship between viral propagation and apoptosis after marine birnavirus (MABV) infection. *J. Fish. Sci. & Tec.* (in press).
- Sohn, S., Park, M., Do, J., Choi, J., and Park, J.: Birnavirus isolated from cultured flounder in Korea. *Fish Pathol.*, 30: 279-280, 1995.
- Suzuki, S., Hosono, N., and Kusuda, R.: Detection of aquatic birnavirus gene from marine fish using a combination of reverse transcription and nested PCR. *J. Mar. Biotechnol.*, 5: 205-209, 1997.
- Yoshimizu, M., and Nomura, T.: An improved method for isolation of fish pathogenic bacteria and viruses from mature salmonid. *Fish and Eggs*, 158, 49-59, 1989.

The Screening of Marine Birnavirus (MABV) Infected in Brood Stocks of Flounder, *Paralichthys olivaceus*

**Myung-Joo Oh, Sung-Ju Jung, Young-Jin Kim,
Hyeong-Rak Kim*, Tae-Sung Jung** and In-Kyu Yeo*****

Department Fish Pathology, Yosu National University

**Department of Food Science and Biotechnology, Pukyung National University*

***Department of Microbiology, College of Medicine, Gyeongsang National University*

****Department of Marine Biotechnology, Cheju National University*

Presence of marine birnavirus (MABV) was examined against egg and ovarian fluid, and seminal fluid from the brood stocks of flounder, *Paralichthys olivaceus* collected from 9 different stations around Korean peninsula. The detection rate of MABV in brood stocks flounder was observed to 34% by PCR. The mean virus titer of the PCR positive fish was $10^{2.30}$ to $10^{4.30}$ TCID₅₀/g(ml). By a neutralization test, all of the isolated virus were ascertained to be closely related to marine birnavirus (MABV).

Key words : Virus detection, Birnavirus, Marine birnavirus, Flounder, Brood stock