

## 가물치, *Channa arga* 자어에서 분리한 Rhabdovirus 유사 병원체

김수미 · 홍미주\* · 박수일\*†

부경대학교 수산과학연구소, \*부경대학교 수산생명의학과

## Isolation of rhabdovirus-like from the fry of the snakehead fish, *Channa arga*

Su-Mi Kim, Mi-Ju Hong\* and Soo-Il Park\*\*†

Institute of Fisheries Science, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

\*Department of Aquatic Life Medicine, College of Fisheries Science, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Rhabdovirus-like virus were isolated from the fry (15~30 days post hatching, dph) and rearing water of the snakehead fish *Channa arga* exhibiting mass mortality in spring of 2003 and 2004 in Korea. The isolates were propagated in EPC and SSN-1 cells but not replicated in FHM cells. The bullet-shaped viral particles (45 × 100 nm) appeared to be compact and a similar morphology to those of the rhabdoviruses in the infected EPC cells. The optimum temperature for virus replication was 20 to 25°C but they could not replicate at 15°C. The isolates ShFRV-3 and ShFRV-5 from snakehead fish showed high pathogenicity against the fry (15 dph) and fingering (40 dph) of snakehead fish but did not in the larger size (90 dph).

*Key words* : Rhabdovirus, Snakehead fish, *Channa arga*, Snakehead Fry Rhabdovirus, ShFRV.

2003년 5월부터 6월 및 2004년 3월에, 부산 인근의 한 가물치, *Channa arga* 종묘 생산장에서 부화 후 15~30일령에 이른 자어가 대량 폐사하는 질병 사례가 2년에 걸쳐 발생하였다. 이러한 질병은 매우 급성적으로 진행되어 수 일 내에 95% 이상의 높은 누적 폐사율을 나타내었고 폐사 원인을 밝히는 과정에서 사육수의 수질이나 양식 환경과 관련하여 특이할 만한 사항은 없었다. 어체 및 사육수에서는 *Aeromonas* sp.가 다수 검출되었으나 이 분리 균주는 가물치 자어에 병원성이 없는 것으로 조사되었다. 그리고 진균이나 기생충 등의 어류 병원체는 검출되지 않았으나 병어를 미쇄하여 바이러스 조사 시험을 실시한 결과 세포 배양법과 전자현미경적 관찰을 통하여 rhabdovirus 형태의 바이러스를 분리할 수

있었다.

Family rhabdoviridae는 *Vesiculovirus*, *Lyssavirus*, *Ephemerovirus*, *Novirhabdovirus*, *Cytorhabdovirus*, *Nucleorhabdovirus*와 같은 6개의 Genus로 구분되어 있고, 외막이 있는 막대 혹은 탄환형의 바이러스이며, ssRNA genome을 가진 virus로서 5개의 구조 단백질 (polymerase, L; glycoprotein, G; nucleocapsid, N; phosphoprotein, P; and matrix, M)로 구성되어 있다 (Ahne *et al.*, 1989). Genus 중 어류를 숙주로 하는 것으로는 SVCV, PER, EVA, UDRV 등을 포함하는 Genus *Vesiculovirus*와 IHNV, VHSV, HIRRV, SHRV, Eel virus 등과 같은 Genus *Novirhabdovirus*가 있다 (van Regenmortel *et al.*, 2000). 이들 바이러스는 분리 어종에 따라 온수성 및 냉수성 어종에 감

†Corresponding Author : Soo-Il Park, Tel : 051-620-6141,  
Fax : 051-628-7430, E-mail : parksi@pknu.ac.kr

수성이 높은 종으로 구분할 수 있으며, *in vitro* 상에서 바이러스의 증식 적온이 온수성 어종 유래의 바이러스는 20°C 이상, 냉수성 어종 유래는 15°C 전후에서 잘 증식하는 것으로 보고되어 있지만 (Ahne *et al.*, 1989), 바이러스의 종에 관계 없이 각 감염 어종의 성장 적온보다 낮은 저수온기에 주로 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다 (Woo *et al.*, 1999).

온수성 어종인 가물치에서 분리 보고된 바이러스로는, 1980년대 이후 동남아시아 지역에서 주로 발생하는 Epizootic ulcerative syndrome (EUS)과 관련하여 체표 궤양 부위에서 분리된 Snakehead Rhabdovirus (SHRV, Frerichs *et al.*, 1986)와 Ulcerative disease rhabdovirus (UDRV, Wattanavijarn *et al.*, 1986a), birnavirus 및 reovirus (Roberts *et al.*, 1994) 등이 있으나, 이들 바이러스의 병원성에 대해서는 아직 불명확한 점이 많은 단계에 있다 (Lio-Po *et al.*, 2000).

현재까지 우리 나라에서 분리 보고된 rhabdovirus는 연어과 어류의 Infection Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV, Park *et al.*, 1993), 넙치의 Hiram rhabdovirus (HIRRV, Oh and Choi, 1998) 및 넙치의 Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV, Kim *et al.*, 2003) 정도에 불과하지만, 그 밖의 바이러스에 대한 조사 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 가물치 자어에서 분리한 rhabdovirus의 바이러스학적 특성을 밝혀 기 보고된 어류 rhabdovirus와 비교하고, 병원성 시험을 통하여 분리 바이러스와 본 질병 사례와의 상관관계를 검토해보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시료 처리 및 바이러스 분리

2003년 5월부터 6월과 2004년 3월에 부산시 강서구 일대의 가물치 양식장에서 특징적인 증상을 보이며 대량 폐사하는 부화 후 15~30일령의 가물치 자어를 채집하여 실험에 사용하였다

(Table 1). 종묘 생산은 비닐하우스 내에서 이루어졌으며 이때 수온은 25~28°C이었고, 가온 성숙시킨 양식산 가물치의 수정란 및 호소에서 채집한 자연산 가물치의 수정란을 종묘 생산에 사용하고 있었다. 조사 대상 병어는 아카미 부위 발적, 가슴지느러미의 경미한 백탁 등의 증상을 나타내는 빈사어 및 폐사어였다.

세균 검사를 위하여 병어를 0.1% benzalkonium chloride saline solution으로 소독하고 멸균 생리 식염수 (0.85% NaCl, w/v)에 세척한 다음, 마쇄하여 Tryptic Soy Agar (TSA)에서 세균 배양을 시도하였고, 곰팡이 및 기생충 감염을 확인하기 위하여 현적 표본을 제작한 후 입체 현미경 및 광학 현미경으로 검경하였다.

바이러스 배양을 위하여 시험어를 0.1% benzalkonium chloride saline solution으로 소독한 후 정량하여 멸균한 유발에 넣고 마쇄한 다음 Minimum Essential Medium (MEM, Sigma)을 1:10의 비율로 넣어 희석한 후 4°C에서 10,000 × g, 10분간 원심 분리하고 그 상청액을 취하여 0.45 μm membrane filter로 여과한 것을 바이러스 접종 원액으로 사용하였다. 사육수는 0.22 μm membrane filter를 이용해 1/500배로 농축하고 0.45 μm membrane filter로 여과하여 접종 원액으로 사용하였다 (Table 1, ShFRV-4).

분리 바이러스 이외에도 Rhabdoviridae 중 Genus Vesiculovirus의 대표 종로서 Spring Viraemia of Carp Virus (SVCV)와 Novirhabdovirus의 대표 종인 VHSV를 참조 바이러스로 사용하였고, 일부 바이러스 성장 비교를 위해 본 연구실에서 IPNV를 함께 사용하였다 (Table 1).

바이러스의 세포 감수성 시험을 위해 사용한 어류 주화세포는 Chinook salmon embryo cells (CHSE-214, Fryer *et al.*, 1965), Epithelioma papulosum cyprini cells (EPC, Fijan *et al.*, 1983), Fathead minnow cells (FHM, Gravell and Malsberger, 1965), Striped snakehead cells (SSN-1, Frerichs *et al.*, 1991)이었으며, 배양액으로는 MEM (Sigma)에 10% FBS (Hyclone)와 1% antibiotic-antimy-

**Table 1.** Isolated viruses and tested reference viruses

|                              | Virus strain  | Origin of virus             |             |
|------------------------------|---|-----------------------------|-------------|
| Isolates<br>in this<br>study | ShFRV-1   | Snakehead fish fry (15 dph) | 2003, May   |
|                              | ShFRV-2   | Snakehead fish fry (15 dph) | 2003, June  |
|                              | ShFRV-3   | Snakehead fish fry (30 dph) | 2003, June  |
|                              | ShFRV-4   | Rearing water               | 2003, June  |
|                              | ShFRV-5   | Snakehead fish fry (20 dph) | 2004, March |
| Reference<br>virus           | Spring vireamia of carp<br>virus (SVC)                | Jo, 2005                    |             |
|                              | Viral hemorrhagic septicemia<br>virus (VHSV), KR01'-1 | Kim <i>et al.</i> , 2003    |             |
|                              | Infectious pancreatic necrosis<br>virus (IPNV)        | Rainbow trout, 2003. June   |             |

dph, days post hatching.

cotic (Gibco BRL)을 첨가하여 배양하였다 세포 감수성 시험은 모두 25°C에서 7일간 배양하면서 CPE를 관찰하였고 바이러스 감염가는 TCID<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup>으로 나타내었다 그리고 바이러스의 주화세포 감수성 시험결과, 높은 감수성을 나타낸 EPC cells을 이후의 다양한 시험에 사용하였다

#### 전자현미경적 관찰

감염된 EPC cells를 2.5% glutaraldehyde (pH 7.2, 4°C) 용액에 4시간 전고정하고 1% osmium tetroxide (pH 7.2, 4°C)에서 2시간 동안 후고정한 후 일련의 전자 현미경 시료 처리를 거친 다음 투과형 전자현미경 (JEM 1200- II, JEOL, Japan)으로 관찰하였다.

#### 분리 바이러스의 물리화학적 성상

##### ① 바이러스의 핵산 결정 시험

바이러스의 핵산 종류를 확인하기 위하여 Rovozzo and Burke (1973)의 방법에 따라 DNA 합성 저해제인 5'-iodo-2'-deoxyuridine (Sigma, IUdR)에 대한 감수성 시험을 실시하였다. 96

well plate에 단층 배양된 EPC cells에 10<sup>-4</sup> M IUdR 용액을 100 µl씩 분주한 다음, 바이러스액을 단계 희석하여 100 µl씩 5개의 well에 접종하고 25°C에서 7일간 배양하면서 CPE 형성 유무를 관찰한 후 감염가를 측정하였다.

##### ② Lipid 용제 감수성 시험

분리한 바이러스가 외막을 지녔는지의 유무를 알기 위하여 Feldman and Wang (1961)의 방법에 준하여 chloroform으로 감수성 시험을 실시하였다. 바이러스 접종 원액 1 ml과 chloroform 0.5 ml을 혼합하여 실온에서 10분 동안 진탕시킨 후, 4°C에서 1,500 × g, 10분간 원심 분리하여 그 상정액을 단계 희석하여 100 µl씩 5개의 well에 접종하고 바이러스 감염가를 측정하였다.

##### ③ 온도 안정성 시험

Rovozzo and Burke (1973)의 방법에 준하여 바이러스 접종원액을 56°C에서 30분 동안 증탕 가온한 후, EPC cells에 접종하고 25°C에서 7일간 배양하면서 바이러스 감염가를 측정하였다.

##### ④ pH 감수성 시험

Rovozzo and Burke (1973)의 방법에 따라 pH

3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 7.2, 7.6, 8.0, 9.0 및 10으로 조정된 MEM 여과액과 바이러스 액을 3시간 동안 반응시킨 후, EPC cells에 접종하여 25°C에서 7일간 배양하면서 감염가를 측정하였다.

#### ⑤ 온도에 따른 바이러스 증식능 시험

실험 24시간 전에 25 cm<sup>2</sup> tissue culture (T/C) flask에 단층 배양된 EPC cells을 준비하고 바이러스를 MOI = 0.01이 되게 접종한 후 15, 20, 25, 30, 32°C에서 배양하면서, 접종 후 10일간 매일 배양 상정액을 무균적으로 덜어내어 바이러스 감염가를 측정하였다.

#### 병원성 시험

병원성 시험에 사용한 어류는 전장 1 cm 내외의 부화 후 15일령 자어, 전장 4 cm 전후의 부화 후 약 40일령 자어 및 전장 22 ± 3 cm되는 부화 후 90~120일령의 가물치를 분양 받아 실험 전에 세포 배양법을 통해 바이러스가 검출되지 않는 어류를 병원성 시험에 사용하였다. 가물치에 대한 어체 크기별 병원성 시험은 사육수에 바이러스를 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup>의 농도가 되게 현탁하고 여기에 15, 30 일령과 90일령의 가물치 각 10마리씩을 3시간 동안 침지한 다음 새로운 사

육수로 환수하여 7일간의 누적 폐사율을 조사하였다. 추가로 90 일령의 중형어의 경우 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup>의 바이러스 배양액을 0.1 ml 씩 복강 주사하고 14일간 누적 폐사율을 조사하였다. 모든 공격 시험의 온도는 28 ± 1°C에서 실시하였으며, 모든 시험은 2회 반복 실험하였고 그 평균값으로 나타내었다. 폐사한 어류 및 살아남은 어체의 전체 혹은 내부 장기를 마쇄하여 EPC cells에 접종하고 CPE를 확인하였다.

## 결 과

#### 바이러스의 세포 감수성

가물치 자어에서 분리한 rhabdovirus isolates의 각종 어류 주화 세포에 대한 감수성 시험 결과는 Table 2와 같다. SSN-1 및 EPC와 CHSE-214 cells에 대해 높은 감수성이 있는 것으로 나타난 반면 CHSE-214 cell은 비교적 낮은 감수성을 보였으며 FHM cells에서는 증식하지 않는 것으로 나타났다.

#### 바이러스 입자의 관찰

병어의 조직 마쇄여과액을 접종한 EPC cells을 전자현미경으로 관찰한 결과 rhabdovirus의

**Table 2.** Susceptibility of the fish cell lines to isolated virus

| Virus strain    | Mean virus titer (Log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> ml <sup>-1</sup> ) on cell lines |          |       |       |
|-----------------|---|----------|-------|-------|
|                 | EPC   | CHSE-214 | FHM   | SSN-1 |
| SKR-1           | 5.50  | 2.25     | <1.00 | -     |
| SKR-2           | 5.75  | 4.50     | <1.00 | -     |
| Isolates SKR-3  | 6.50  | 2.25     | <1.00 | 7.50  |
| SKR-4           | 5.50  | 2.25     | <1.00 | 6.75  |
| SKR-5           | 5.75  | 2.00     | <1.00 | -     |
| SVC             | 6.50  | -        | 6.50  | -     |
| Reference VHSV* | 8.25  | 4.50     | 6.50  | -     |
| IPNV*           | 2.50  | 8.75     | -     | -     |

Incubation for 7 days at 25°C; \*, Incubation for 7 days at 18°C.

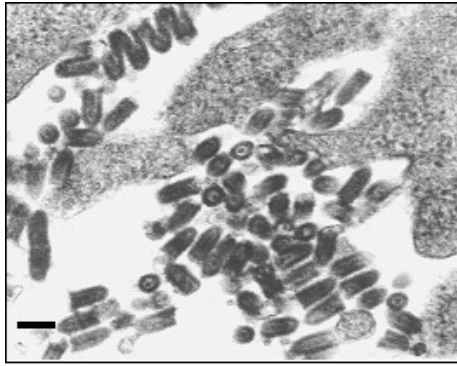


Fig. 1. Electron micrograph of the isolate, ShFRV-3 infected EPC cells, after three days culturing at 25 °C. ( $\times 50000$ . Bar = 100 nm).

전형적인 형태인 한쪽 끝이 둥글고 한쪽은 평평한 모양의 탄환형의 바이러스 입자가 다수 관찰되었다 (Fig. 1). 이들 바이러스 입자의 크기는 직경  $45 \pm 5$  nm, 길이  $100 \pm 5$  nm이었다.

#### 물리 화학적 성상

가물치 자어로부터 분리된 rhabdovirus isolates의 물리 화학적 성상을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 본 분리 바이러스와 DNA 합성 저해제인

IUdR 처리 후에도 감염가에 영향을 미치지 않는 것으로 조사되어 RNA virus일 것으로 추정하였다.

본 분리 바이러스의 외막 존재 여부를 조사하기 위한 chloroform 감수성 시험에서는 외막이 없는 virus인 IPNV는 chloroform 처리에 영향을 받지 않는데 반하여, 외막을 가지는 SVC, VHSV 및 본 분리 바이러스들은 모두 chloroform 처리에 의하여 완전히 불활화 되는 것으로 나타났다.

열에 대한 안정성 시험 결과에서 SVC와 분리 바이러스들은 열에 불안정하여 56°C에서 바이러스가 완전히 감염력을 상실하였으나, VHSV는 약한 감염력이 확인되었다.

pH에 대한 안정성 시험에서 바이러스를 pH 3과 pH 10에서 1시간 반응했을 때, VHSV를 제외한 SVC 및 가물치 분리주는 모두 감염력이 검출 한계 이하로 나타났고 (Table 3), pH 3~pH 10까지 각각의 배지에서 3시간 동안 반응시킨 결과, 본 분리 바이러스는 pH 7.2 전후가 최적 안정 조건인 반면, pH 7.6에서는 바이러스 감염가가 급격히 감소하여 pH 8 이상의 알칼리 조건에서는 검출 한도 이하로 감염가가 떨어졌다. 이에

Table 3. Biochemical and biophysical characteristics of the isolated virus

| Virus strain | Virus titer ( $\text{Log}_{10} \text{TCID}_{50} \text{ml}^{-1}$ ) |                     |                |             |        |       |       |
|--------------|---|---------------------|----------------|-------------|--------|-------|-------|
|              | IUdR<br>( $10^{-4}$ M)  | Chloroform<br>(50%) | Heat<br>(56°C) | pH (60 min) |        |       |       |
|              |   |                     |                | pH 3        | pH 7.2 | pH 10 |       |
| Isolates     | SKR-1*  | 5.50                | <1.50          | <1.50       | <1.25  | 5.50  | <1.25 |
|              | SKR-2*  | 5.75                | <1.50          | <1.50       | <1.25  | 5.75  | <1.25 |
|              | SKR-3*  | 6.50                | <1.50          | <1.50       | <1.25  | 6.50  | <1.25 |
|              | SKR-4*  | 5.50                | <1.50          | <1.50       | <1.25  | 5.50  | <1.25 |
|              | SKR-5*  | 5.75                | <1.50          | <1.50       | <1.25  | 5.75  | <1.25 |
| Reference    | SVC*  | 6.50                | <1.50          | <1.50       | <1.25  | 6.50  | <1.25 |
|              | VHSV <sup>a</sup>   | 8.25                | <1.50          | 2.05        | <1.25  | 8.25  | <1.25 |
|              | IPNV <sup>b</sup>   | ND                  | 8.75           | ND          | ND     | 8.75  | ND    |

\*, Incubation for 7 days at 25°C on EPC cells; <sup>a</sup>, tested at 18°C; <sup>b</sup>, tested at 18°C on CHSE-214; ND, not done.

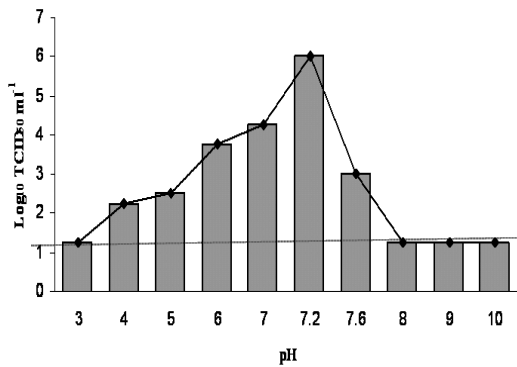


Fig. 2. Replication of isolate, ShFRV-3 in EPC cells incubated at different pH for 3 hours.

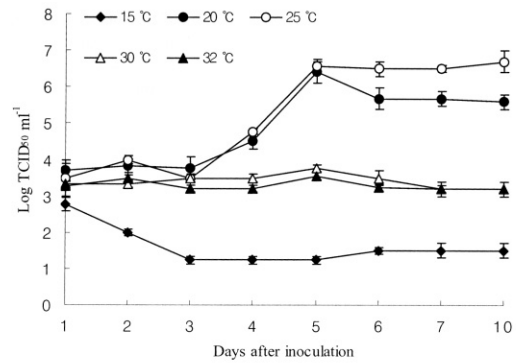


Fig. 3. Replication of isolate, ShFRV-3 in EPC cells incubated at five different temperatures.

비해 강산성 (pH 3)을 제외한 산성 (pH 4, 5, 6) 조건에서는 비교적 안정적이었다 (Fig. 2).

#### 바이러스의 온도에 따른 증식능

가물치 자어에서 분리한 rhabdovirus의 배양 온도에 따른 바이러스 증식 속도 및 감염역가를 비교한 결과는 Fig. 3과 같다. 20°C와 25°C에서는 빠르게 증식하여 25°C에서 최고 값 (10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup>)을 나타내었다. 반면, 30°C와 32°C에서는 배양 7일까지 초기 감염가가 유지될 뿐 더 이상의 증식은 확인되지 않았고, 15°C에서 배양하였을 때 검출 한계 이하로 나타났다.

#### 병원성 시험

가물치 자어 (15 dph), 치어 (40 dph) 및 중간육성어 (90 dph)에 대한 공격 시험의 결과는 Table 4에 나타내었다. 가물치 자어와 치어에 분리 바이러스 (ShFRV-3, ShFRV-5)를 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup>로 침지하였을 때 자어는 3일 이내에 100% 폐사하였고, 치어에서는 접종 후 7일 이내에 모두 폐사하였다. 이들 시험구에서 폐사한 어체를 EPC cells에 접종하였을 때 어체 g당 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub> 이상의 바이러스가 재분리되었다. 그러나 15일령의 가물치 자어는 7일간 사육하는 과정에서 대조구에서 30%, 참조 바이러스인 SVC 및

Table 4. Mortality (%) of snakehead fish, *Channa arga* by artificially infection with the isolated virus and reference virus

| Fish age (dph) | Total length (cm) | Challenge method            | Cumulative mortality* (%) |          |         |           |       |
|----------------|-------------------|-----------------------------|---------------------------|----------|---------|-----------|-------|
|                |                   |                             | Control <sup>a</sup>      | Isolates |         | Reference |       |
|                |                   |                             |                           | ShFRV-3  | ShFRV-5 | SVC       | VHSV  |
| 15 dph         | 1 ± 0.3           | immersion <sup>b</sup>      | 20/40                     | 100      | 100     | 30/50     | 30/30 |
| 40 dph         | 4 ± 1             | immersion <sup>b</sup>      | 0/10                      | 100      | ND      | 0         | 10/0  |
| 90 dph         | 22 ± 3            | immersion <sup>b</sup>      | 0                         | 0        | 0       | ND        | ND    |
|                |                   | i.p. injection <sup>c</sup> | 0                         | 0        | 0       | 0         | 0     |

dph, days post hatching; \*, at 28 ± 1°C for 7 days; <sup>a</sup>, challenged with only MEM; <sup>b</sup>, Immersion with 1 × 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup> virus in rearing water for 3 h; <sup>c</sup>, intraperitoneal injection with 1 × 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub> fish ml<sup>-1</sup> virus.

VHSV 감염구에서도 30~40% 폐사하였으나 이들 시험구의 폐사어 및 생존 개체에서는 바이러스가 배양되지 않았다.

이에 비하여 중간 육성어에서는 침지 및 복강 주사에서 폐사는 전혀 없었으나 시험 종료 후 7 일째 인위 감염구의 살아남은 어체에서는 바이러스가 배양되기도 하였다.

## 고 찰

본 연구에서는 가물치 자어에서 분리한 rhabdovirus의 여러 가지 바이러스학적 특성을 조사하고 분리 당시의 대량 폐사와 분리 바이러스와의 상관관계를 검토하고자 하였다.

일반적으로 가물치 종묘 생산은 자연산 가물치의 수정란을 수집하여 부화시키거나 인공적으로 산란을 촉진시키는 방법으로 이루어지고 있다. 자연 상태의 가물치 산란기는 보통 5월 하순부터 7월 말까지이며, 6월 중순에 가장 많이 산란하고 한 친어가 산란기 내에 여러 번 산란하는 습성이 있어 (김, 2000), 종묘장에서는 수차례 종묘 생산이 가능하다. 본 연구에서 조사한 양식장에서는 2003년과 2004년에 수차례 친어 유래가 다른 수정란을 부화시켜 종묘 생산을 시도하였으나 별다른 이상이 없던 종묘가 매년 15~30 일령 즈음에 이르면 일시에 대량 폐사하여 그 원인을 조사하게 되었다. 가물치는 부화 후 7~10일이면 복부의 난황을 다 흡수하고 먹이를 먹기 시작하는데 (김, 2000), 본 연구에서의 폐사 시기는 초기 먹이인 물벼룩이나 알테미아 (brine shrimp)를 투여하는 시기에 주로 발생하여 수일 내에 90% 이상 폐사하여 2년 연속 종묘 생산이 불가능한 경우이었다.

전 세계적으로 가물치에서 분리되는 rhabdovirus는 SHRV와 UDRV의 두 종류가 알려져 있고 주로 가물치 성어의 저수온기 체표 껍질과 관련하여 분리된다고 하였지만 (Frerichs *et al.*, 1986; Wattanavijarn *et al.*, 1986), 자치어기의 바이러스성 질병에 대해서는 보고된 예가 거의 없

다. 이들 두 바이러스는 형태 및 세포 감수성에서 현저한 차이를 나타내는데, SHRV의 경우 양 끝이 모두 둥근 형태인 bacilliform이며 (Lio-Po *et al.*, 2000), EPC와 BF-2 cell lines에 감수성을 나타내는 것으로 보고되었다 (Frerichs *et al.*, 1989). 이에 비해 UDRV의 경우 한쪽은 둥글고 밑바닥은 평평한 전형적인 탄환모양이며 (Lio-Po *et al.*, 2000), FHM에는 감수성이 있지만 CHSE-214와 EPC cells에서는 감수성이 없는 것으로 알려져 있다 (Lilley *et al.*, 1994). 본 연구에서 분리한 rhabdovirus는 SHRV와 UDRV의 특성을 복합적으로 나타내었다. 즉, 바이러스의 형태는 전형적인 탄환모양으로 UDRV와 유사한 반면, 세포 감수성은 EPC cells에서 가장 높았고 CHSE-214 cells에서 비교적 낮기는 하지만 감수성이 있었으며 FHM cells에서는 감수성이 없는 것으로 나타나 SHRV나 UDRV와는 형태 및 배양 특성 등이 일치하지 않았다.

어류의 Rhabdovirus를 검출하고 진단하기 위하여 다양한 방법이 이용되고 있는데 (OIE, 2001), 특히 중화항체를 이용한 면역학적 방법과 바이러스 유전자를 이용한 RT-PCR 방법이 신속 진단 및 바이러스 동정에 효과적인 방법으로 제시되고 있다. 먼저, 중화 항체를 이용한 방법은 본 연구실에 rhabdovirus에 대한 개별 항체를 보유하고 있지 않기 때문에 각각의 항체에 대한 중화 항체가 측정할 수 없었으나, 본 분리 바이러스에 대한 토끼 항체 (anti-ShFRV rabbit Ab)로 SVC, VHSV, HIRRV 및 IHNV 중화 항체 시험을 하였을 때, 면역학적으로 일치하는 바이러스가 없었다. 다음으로 RT-PCR을 이용한 바이러스의 검출 및 동정을 시도하였다. 본 연구에서는 SHRV (Johnson *et al.*, 1999)를 비롯한 기 보고된 다양한 어류 rhabdovirus (Miller *et al.*, 1998; Stone *et al.*, 2003)의 특이 primer를 이용하여 PCR을 시도해 보았으나 일치하는 바이러스를 찾을 수 없었다. 앞으로 본 분리 바이러스의 항원 특성 및 분자 생물학적 연구를 심도 깊게 할 필요성이 있겠지만, 현 시점에서는 본 분리 바이

러스는 SHRV 및 UDRV와는 다른 또 다른 가물치 rhabdovirus로 생각되며, 일단 가물치 자어 랩도바이러스 (Snakehead fry rhabdovirus, ShFRV)로 제안하고자 한다.

Kasornchandra *et al.* (1991)에 따르면 어류에서 분리되는 rhabdovirus는 일반적으로 지질 용매, 56°C 이상의 고온, 알칼리 조건 (2% NaOH)에서 쉽게 불활화되며, 산성 (pH 3)에서는 비교적 안정하다고 하였다. 본 연구에서 분리한 가물치 자어 rhabdovirus는 pH 4~pH 7.6까지는 비교적 안정한 반면 pH 3 과 pH 10에서는 활성이 전혀 없어 다른 rhabdovirus와 유사하거나 약간의 차이를 배양 특성을 보였으나, 특이할 만 한 것은 pH 8이상에서부터 급격히 불활성화되어 배양액의 적정 pH 영역이 매우 좁게 나타났다는 점이다. 이러한 특성은 이 바이러스 배양 조건 및 수증의 바이러스 제어 등에 대한 중요한 정보라고 여겨진다.

어류 rhabdovirus인 VHSV, IHNV 및 HRV 등은 대부분 냉수성 어류에서 분리되어 증식 적온이 20°C 이하인 것으로 알려져 있고, 그 외에 SVCV, PFRV, UDRV 및 SHRV와 같은 온수성 어류 유래 rhabdovirus는 20°C 이상에서 잘 증식한다고 알려져 있다 (Ahne *et al.*, 1989). 온수성 어종인 가물치에서 분리된 UDRV의 경우 SHS cell lines에서 증식 가능 온도 범위는 15°C~37°C (증식 적온 15°C~30°C)이며 최고 바이러스 감염가는  $10^7$  TCID<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup> 이었다 (Lio-Po *et al.*, 2000). 이와 유사하게 본 연구에서도 EPC cell lines에서 20°C~25°C에서 가장 잘 자랐고, 특히 25°C에서 잘 증식하여 최고 바이러스 감염가는 약  $10^7$  TCID<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup> 이었다. 그러나 30°C와 32°C에서는 바이러스 감염가가 유지되는 되지만 잘 증식하지 못하는 것으로 나타났으며 15°C에서는 검출 한계 이하로 나타나 증식 가능 온도 범위가 다른 온수성 rhabdovirus에 비해 협소함을 알 수 있었다.

VHSV, IHNV 및 SVCV와 같은 대부분의 어류 rhabdovirus가 치어기에 병원성이 높다고 보고

되어 있는 것 (Woo *et al.*, 1999)과 유사하게 본 연구에서도 28°C에서 15일령에서 40일령의 가물치 자어 및 치어에는 병원성이 높은 반면 중간 육성어에서는 병원성이 없는 것으로 나타나 age-dependent한 병원체로 판단되었다. 그러나, 중간 육성어에서 폐사체는 없었지만 실험 종료 후 14일째 까지 바이러스가 재분리되었다는 점을 미루어 보아 불현성 감염의 가능성이 있을 것으로 생각되며, 이후 가물치 성어에 대한 역학 조사가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서의 질병 사례는 2003년과 2004년에 걸쳐 반복적으로 발생하긴 하였지만, 2년 모두 같은 양식장에서 발생한 것이었기 때문에 전체 가물치 종묘 생산지에서 발생하는 질병인지의 여부는 알 수 없었다. 그러나 본 연구의 사전 조사에서 부화전의 난이나 물벼룩, 일테미아 등에서는 바이러스를 검출할 수 없었지만 종묘 생산지의 사육수에서 바이러스가 검출되었으므로 환경 조건과 어체의 상태에 따라 이 질병이 확산될 우려가 있을 것으로 판단되며 지속적인 조사 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 요 약

2003~2004년 봄, 대량 폐사한 가물치 자어 (부화 후 15~30일령)에서 랩도바이러스 유사 병원체를 분리하였다. 분리 바이러스주는 EPC cell과 SSN-1 cell에서 잘 증식하는 반면 FHM cell에는 감수성이 없었고 감염된 EPC cell에서 전형적인 랩도바이러스 모양의 탄환형 바이러스 입자 (45 × 100 nm)를 다수 관찰할 수 있었다. 분리 바이러스주의 증식 적온은 20~25°C이었고, 15°C이하에서는 증식할 수 없었으며, 30°C 이상에서는 증식하지는 않았으나 초기 감염가를 유지하였다. 분리 바이러스는 15일령 및 40일령의 가물치 자어에서는 침지 감염에서 병원성이 높은 반면, 90일령 이상의 중간 육성어에서는 폐사를 나타내지는 않았다.



## 감사의 글

본 연구 결과의 일부는 한국해양수산개발원의 수산특정 과제 (20010064) 의 연구비 지원에 의하여 수행되었음을 밝힙니다.

## 참 고 문 헌

- Ahne, W. and Kurstak, E.: Viruses of Lower Vertebrates. Springer-Verlag., 317-332, 1989.
- Feldman, H. and Wang, S.: Sensitivity of various viruses to chloroform. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 106: 736-738, 1961.
- Fijan, N., Sulimanovic, D., Bearzotti, M., Muzinic, D., Zwillnberg, L. O., Chilmonczk, S., Vautherot, J. F. and de Kinkelin, P.: Some properties of the *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cell line from carp *Cyprinus carpio*. Ann. Virol., (Inst. Pasteur), 134: 207-220, 1983.
- Frerichs, G. N., Millar S. D. and Roberts R. J.: Ulcerative rhabdovirus in fish in South-East Asia. Nature, 17: 322, 1986.
- Frerichs, G. N., Hill, B. J. and Way, K.: Ulcerative disease rhabdovirus: cell-line susceptibility and serological comparison with other fish rhabdoviruses. J. Fish Dis., 12: 51-56, 1989.
- Frerichs, G. N., Morgan, D., Hart, D., Skerrow, C., Roberts, R. J. and Onions, D. E.: Spontaneously production C-type retrovirus infection of fish cell lines. J. Gen. Virol., 72: 2537-2539, 1991.
- Fryer, J. L., Yushua, A. and Pilcher, K. S.: The in vitro cultivation of tissue and cells of Pacific salmon and steelhead trout. Annuals of the New York Academy of Sciences, 126: 566-586, 1965.
- Gravell, M. and Malsberger, R. G.: A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Annuals of the New York Academy of Sciences, 126: 555-565, 1965.
- Johnson, M. C., Maxwell, J. M., Loh, P. C. and Leong, J. C.: Molecular characterization of the glycoproteins from two warm water rhabdoviruses : snakehead rhabdovirus (SHRV) and rhabdovirus of penaeid shrimp (RPS) / spring viraemia of carp virus (SVCV). Virus Research, 64: 95-106, 1999.
- Kasornchandra, J., Lannan, C. N., Rohovec, J. S. and Fryer, J. L.: Characterization of a rhabdovirus isolated from the snakehead fishes (*Ophicephalus striatus*). In: Fryer J. L. (ed) Proceedings from the Second International Symposium of Viruses of Lower Vertebrates. Oregon State University Press, Corvallis, Oregon, 175-182, 1991.
- Kim, S. M., Lee, J. I., Hong, M. J., Park, H. S. and Park, S. I.: Genetic relationship of the VHSV (Viral Hemorrhagic Septicemia Virus) isolated from cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea. J. Fish Pathol., 16: 1-12, 2003.
- Lilley, J. H. and Frerichs G. N.: Comparison of rhabdoviruses associated with epizootic ulcerative syndrome (EUS) with respect to their structural proteins, cytopathology and serology. J. Fish Dis., 17: 513-522, 1994.
- Lio-Po, G. D., Traxler, G. S., Albright, L. J. and Leano, E. M.: Characterization of a virus obtained from snakeheads *Ophicephalus striatus* with epizootic ulcerative syndrome (EUS) in the Philippines. Dis. Aqua. Org., 43: 191-198, 2000.
- Miller, T., Rapp, J., Wastlhuber, U., Hoffmann, R. W. and Enzmann, P. J.: Rapid and sensitive transcriptase polymerase chain reaction

- based detection and differential diagnosis of fish pathogenic rhabdoviruses in organ samples and cultured cells. *Dis. Aquatic. Org.*, 34: 13-20, 1998.
- Oh, M. J. and Choi, T. J.: A New Rhabdovirus (HRV-like) isolated in Korea from cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish Pathol.*, 11: 129-136, 1998.
- Office International des Epizooties. International aquatic animal health code and diagnostic manual for aquatic animal disease. OIE, Paris. 2001.
- Park, M. A., Sohn, S. G., Lee, S. D., Chun, S. K., Park, J. W., Fryer, J. L. and Hah, Y. C.: Infectious haematopoietic necrosis virus from salmonids cultured in Korea. *J. Fish Dis.*, 16 : 471-478, 1993.
- Roberts, R. J., Frerichs, G. N., Tonguthai, K. and Chinabut, S.: Epizootic ulcerative syndrome of farmed and wild fishes. In: Muir J. F., Roberts R. J. (eds). *Recent advances in aquaculture*, Vol 5. Blackwell Science, Oxford: 207-239, 1994.
- Stone, D. M., Ahne, W., Denham, K. L., Dixon, P. E., Liu, C. T., Sheppard, A. M., Taylor, G. R. and Way, K.: Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp virus and pike fry rhabdovirus isolates reveals four genogroups. *Dis. Aquat. Org.*, 53: 203-210, 2003.
- Rovozzo, G. C. and Burke, C. N.: *A manual of basic virological techniques*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 1973.
- van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R. and Wickner, R. B.: *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, New York, NY, 2000.
- Wattanavijarn, W., Tangtrongpiros, J. and Wattanadorn, K.: Viruses of ulcerative diseased fish in Thailand, Burma, and Laos. In: *First International Conference on the Impact of Viral Diseases on the Development of Asian Countries*. WHO: 121, 1986a.
- Wattanavijarn, W., Wattanadorn, S., Hunnak, P., Tangtrongpiros, J. and Rattanaphani, R.: Viruses of ulcerative diseased fish. *Electron Microscopy Society*, 3: 20-23, 1986b.
- Woo, P. T. K. and Bruno D. W.: *Fish disease and disorders*, Vol. 3, 1999.
- 김인배: *어류양식학*. 구덕인쇄사, 344-351, 2000.

---

Manuscript Received : June 30, 2005

Revision Accepted : December 31, 2005

Responsible Editorial Member : Sung-ju Jung  
(Yosu Univ.)