

Iridovirus의 해산 양식어류에 대한 병원성과 사육수에서의 검출

정준범 · 정현도*
부경대학교 수산생명의학과

Pathogenicity of Iridovirus against Marine Fish and Its Detection in Culturing Seawater

Joon Bum JEONG and Hyun Do JEONG*
Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University,
Busan 608-737, Korea

The susceptibility of five different marine fish to iridovirus IVS-1 infection was analyzed and found a higher the cumulative mortality in the order of rock bream (*Oplegnathus fasciatus*), red sea bream (*Pagrus major*), sea perch (*Lateolabrax* sp.), rockfish (*Sebastes schlegeli*) and black porgy (*Acanthopagrus schlegeli*). However, the concentrations of virus in the infected spleens of these species did not differ significantly. To determine the release of iridovirus from infected fish into culturing seawater, rock bream were challenged with iridovirus IVS-1 and the concentration of virus in the water was analyzed using PCR. Over the 10 days of the analysis, the linear relationship between the number of dead fish and viral DNA concentration found in culturing seawater should be considered direct evidence of horizontal iridovirus transmission.

Key words: Iridovirus, Horizontal transmission, Culturing seawater

서 론

Iridovirus는 우리나라의 주요 양식 해산어종인 돌돔과 참돔 등에 감염되어 매년 큰 경제적 손실을 야기하고 있다. 감염된 어류는 행동이 둔해지고, 체색흑화, 빈혈, 아가미 점상출혈 등의 감염 증상을 보이며, 해부시 비장과 신장의 종대를 관찰할 수 있다. 또한 비장, 신장 등의 조직에서 Giemsa staining을 통해 이형 비대 세포를 확인할 수 있다(Oshima et al., 1996).

Iridoviridae family는 형태적, 유전적 특성에 따라 *Iridovirus*, *Chloriridovirus*, *Ranavirus*, *Lymphocystivirus*, 그리고 *Megalocytivirus* 등 다섯 genera로 분류되며 (Chinchar et al., 2005), 다양한 척추동물 (*Ranavirus*, *Lymphocystivirus*, *Megalocytivirus*)과 무척추동물 (*Iridovirus*, *Chloriridovirus*)에 감염성을 나타내어 무증상부터 치사에 이르는 질병을 유도한다. 척추동물에 감염되는 iridoviruses는 파충류·양서류·어류로부터 분리되었고, 이들 대부분은 양식 산업에서 systemic diseases를 야기하는 병원체로 알려져 있다 (Tsai et al., 2005).

*Megalocytivirus*에 감염된 어류의 여러 장기에서는 hyperthrophied cells가 나타나며, 다양한 어류에 심각한 폐사를 유발시킨다 (Gibson-Kueh et al., 2003; Sudthongkong et al., 2002). Genus *Megalocytivirus*는 rock bream iridovirus (RBIV) (Do et al., 2004), red sea bream iridovirus (RSIV) (Nakajima and Sorimachi, 1994), infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) (He et al., 2000), orange-spotted grouper iridovirus

(OSGIV) (Lu et al., 2005) 그리고 우리 나라에서 분리된 IVS-1 (Jeong et al., 2003) 등을 포함한다.

Iridoviral disease를 진단하기 위한 방법으로 monoclonal antibody를 이용한 immunofluorescence (IF) test (Nakajima et al., 1995)와 같은 면역학적 기법과 분자생물학적 진단법 특히, 초기에 viruses를 검출할 수 있는 polymerase chain reaction (PCR) 기법이 보편화되어 사용되고 있다 (Tamai et al., 1997; Rodger et al., 1997; Jeong et al., 2003). 최근 iridovirus의 유전 정보에 대한 연구는 매우 활발하게 진행되어 lymphocystis disease virus-1 (LCDV-1: Tidona and Darai, 1997: accession no. L63545)을 비롯하여, ISKNV (He et al., 2001: accession no. AF371960), tiger frog iridovirus (TFV: He et al., 2002: accession no. AF389451), RBIV (Do et al., 2004: accession no. AY532606), Singapore grouper iridovirus (SGIV: Song et al., 2004: accession no. NC006549), grouper iridovirus (GIV: Tsai et al., 2005: accession no. AY666015), OSGIV (Lu et al., 2005: accession no. AY894343) 등에 대해서는 약 110-200 kb에 이르는 전체 유전자 염기 서열이 이미 밝혀져 있다.

Iridovirus는 현재까지 약 30종 이상의 해산어류에서 감염성을 보인다는 보고는 있으나 (Matsuoka et al., 1996; Kawakami and Nakajima, 2002), 각각의 어류에 대한 구체적인 폐사율에 관한 결과는 명확하게 구명되어 있지 않다. 다만 일본에서 RSIV의 병원성을 농어 (*Epinephelus malabaricus*), 갈돔 (*Lethrinus nebulosus*), 날쌔기 (*Rachycentron canadum*) 그리고 참돔 (*Pagrus major*) 등 4어종에 대하여 분석한 결과, 갈돔과

*Corresponding author: jeonghd@pknu.ac.kr

날새기에 대해 거의 병원성을 나타내지 않은 반면 농어와 참돔에 대해서는 높은 폐사율을 보이는 것으로 보고하였고 (Sano et al., 2001), 참돔과 방어 (*Seriola quinqueradiata*)에 대한 공격 실험에서는 각각 80%와 60%의 누적 폐사율 정도가 보고되어져 있다 (Inouye et al., 1992). 현재 국내에서 발견되고 있는 iridovirus는 RSIV와 genomic DNA 염기서열 차이를 나타내고 있으나 다양한 국내의 주요 양식어종에 대한 구체적인 병원성 분석이 충분히 이루어져 있지 않다. 본 연구에서는 iridovirus를 다양한 양식 해산어종에 인위 감염시켜 병원성 및 감염 조직 내의 virus 농도를 어종 간에 비교하였으며, 인위 감염시킨 어류로부터 사육수 중으로 유출되는 virus를 PCR로서 검출하여 그 수평감염에 대한 구체적인 증거를 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

바이러스

2000년 9월에 국내 남해안의 양식장에서 iridovirus 감염 증상을 나타내는 돌돔 (*Oplegnathus fasciatus*)의 비장으로부터 분리한 iridovirus IVS-1 strain을 사용하였다 (Jeong et al., 2006). IVS-1에 의해 감염된 돌돔의 비장은 사용전까지 -80°C에서 보관하였다.

실험어

돌돔 (*Oplegnathus fasciatus*) (6-8 g), 참돔 (*Pagrus major*) (6-8 g), 점농어 (*Lateolabrax sp.*) (8-10 g), 조피볼락 (*Sebastes marmoratus*) (5-7 g) 그리고 감성돔 (*Acanthopagrus schlegeli*) (8-10 g) 등 5종의 해산어를 남해안의 양식장에서 구입하여 virus의 병원성 실험에 사용하였다. 각 어종은 실험하기 전, 적어도 5마리씩 sampling하여 iridovirus 감염 유무를 PCR로서 확인하였으며, 모두 PCR 음성 반응을 나타내었다. 모든 어류는 매일 사료를 먹이고, 사육수를 환수시켰으며, 사육 수온은 25°C를 유지하였다.

바이러스의 핵산 분리

감염어의 비장 1 mg을 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA) 350 µL에 넣어서 Pellet pestle® motor (Sigma-Aldrich)를 이용하여 분쇄시킨 후, 8,000×g, 10분간 원심분리하였다. Heating 법에서는 상등액을 100°C에서 10분간 열처리한 후 10,000×g, 10분간 원심분리하여 그 상등액을 취하였다. Kit 법은 AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (K-3032, Bioneer)를 사용하여 제조사의 추천 방법에 따라 DNA를 분리하였다. 그리고 phenol-chloroform 방법에서는 상등액에 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) 40 µL와 10 mg/mL proteinase

K (Roche, Mannheim, Germany) 10 µL를 첨가하여 37°C, 1시간 동안 반응시키고, 동량의 phenol-chloroform을 사용하여 2번 추출 후, 3 M sodium acetate와 2배 volume의 ethanol을 사용하여 침전시켰다. 4°C, 12,000×g, 10분간 원심분리 후, pellet에 TE buffer 50 µL를 첨가하여 현탁시켰다. 3가지 방법으로 추출된 각각의 DNA는 사용전까지 -80°C에서 보관하였다.

PCR

Iridovirus를 검출하기 위해 이전에 사용되었던 K1 region의 ORF-2 부위로부터 primer set를 제작하였다 (Table 1) (Jeong et al., 2006; GenBank accession no. AY628698). PCR amplification은 Perkin-Elmer 2400 thermal cycler (Perkin-Elmer)를 사용하였다. Microtube에 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% (w/v) gelatin, 0.5% Tween-20, 200 µM의 각 dNTP, 1 µM의 각 primer, 1.25 U AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) 및 template DNA로서 추출된 viral nucleic acids를 첨가한 후, distilled water를 가하여 PCR 혼합물의 최종 volume이 50 µL가 되게 하였다. PCR amplification 조건은 다음과 같다. 94°C에서 3분간 pre-denaturation 시킨 후, 94°C에서 30초 denaturation, 55°C에서 30초 annealing, 72°C에서 30초 extension의 반응을 1 cycle로 하여, 30 cycles를 반응시켰다. 그 후, 72°C에서 7분간 extension 시켰다.

PCR 후 증폭된 산물은 0.5 µg/mL ethidium bromide가 첨가된 1% agarose gel을 이용하고, 0.5×TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)를 완충액으로 하여 전기영동을 실시하였다. UV 검출기에서 나타나는 band를 관찰하여 그 증폭 여부와 검출 한계를 확인하였다.

공격 실험

Iridovirus IVS-1에 감염된 돌돔의 비장 조직을 분쇄하여 그 조직 분쇄물을 점중액으로 사용하였다. 평균 체중 8 g의 해산어 (돌돔, 참돔, 점농어, 조피볼락 그리고 감성돔) 치어에 iridovirus 감염조직 1 µg/fish 농도가 되도록 감염조직 분쇄물 0.1 mL를 각 어종별 10마리씩을 대상으로 근육 주사하였다. 대조구로서 PBS buffer 0.1 mL를 각 어종에 대해 동일한 방법으로 근육 주사하였다. 공격 실험 후 25일간 폐사를 관찰하였고, 25°C의 수온을 유지하였다. 환수 2시간 전 사료를 투여하였고, 1일 1회 사육수를 환수시켰다. 매일 폐사 정도를 확인하고, 폐사어의 비장으로부터 total nucleic acids를 분리하여 PCR로서 iridovirus 감염 여부를 확인하였다.

감염 조직 내 virus 농도

폐사율과 감염 조직 내의 virus 농도와의 연관성을 알아보기

Table 1. Oligonucleotides primers used in this study

Target	Primer	Oligonucleotide sequences	Expected size	Accession No.	Reference
ORF-2	KE1F KE1R	5'-AAATGGCTCTTTGGAGTGTC-3' 5'-AATCCATCGGTATTATG-3'	939 bp	AY628698	Jeong et al. (2006)

위해, 각 어종별로 폐사어 5마리씩의 비장 조직을 동일한 양으로 취합하여 이것으로부터 viral nucleic acids를 분리하였다. 분리된 nucleic acids는 분광 광도계 (BioPhotometer, Eppendorf)를 사용하여 흡광도 측정으로 A260/280 nm값을 구하여 double-stranded DNA량을 측정하였다. 감염 조직 내의 virus 농도를 비교하기 위해, total DNA 1ng을 distilled water로 10배씩 단계 희석한 후, 이것을 template DNA로 하여 PCR amplification을 실시하였고, 그 검출 한계를 비교하였다.

사육수에서의 virus 분리

어류 사육 탱크 (40 L)에 돌돔 10마리 (평균 체중 7 g)를 감염조직 분쇄물 (1 µg/fish)을 근육 주사하여 감염시켰다. 매일 동일한 시각에 100 µL의 사육수를 취하여 AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (K-3032, Bioneer)를 사용하여 DNA를 분리한 후 KE1F/KE1R primer set를 사용한 PCR로 사육수 중의 바이러스를 검출하였다.

결 과

Iridovirus의 어종에 따른 병원성

우리나라 주요 양식 해산어류인 돌돔, 참돔, 점농어, 조피볼락 그리고 감성돔 등 5어종을 대상으로 iridovirus IVS-1 strain을 사용한 challenge test를 실시하였다 (Fig. 1). 각 어종별 10마리를 대상으로 감염 돌돔으로부터 적절한 비장 조직을 분쇄하여 접종액으로 사용하였다. 돌돔은 감염 10일째 첫 폐사가 나타났으며, 14일째 100% 누적 폐사율을 나타내었다. 참돔은 감염 12일째부터 폐사가 나타나기 시작하여 19일째 60% 누적 폐사율을 나타내었다. 그리고 점농어와 조피볼락은 각각 50%, 40%의 누적 폐사율을 보였으나, 감성돔에서는 폐사어가 나타

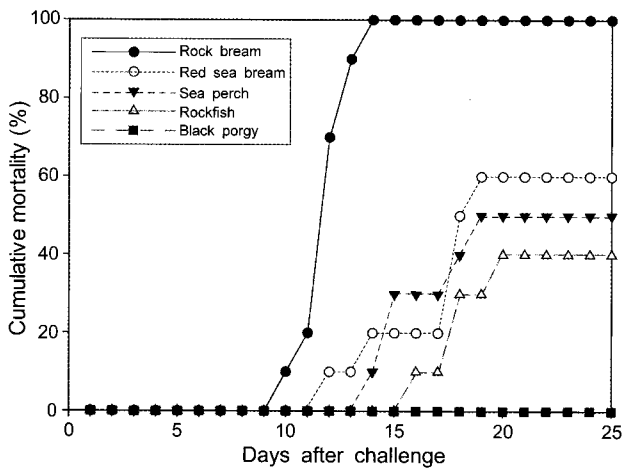


Fig. 1. Pathogenicity of the iridovirus IVS-1 against 5 different marine fishes. Cumulative mortalities of rock bream (*Oplegnathus fasciatus*), red sea bream (*Pagrus major*), sea perch (*Lateolabrax* sp.), rockfish (*Sebastes schlegeli*) and black porgy (*Acanthopagrus schlegeli*) were determined after challenge with 1 µg of tissue homogenate isolated from rock bream infected by IVS-1.

나지 않았다. PBS buffer를 접종한 모든 어종별 대조구에서는 폐사가 발생하지 않았다 (data not shown).

감염 어류와 감염 조직 내의 virus 농도

각 어종별로 폐사어 5마리의 비장 조직을 동일한 양으로 취합하여 viral nucleic acids를 분리하였고, 단계 희석시킨 후 PCR에 의한 검출 한계를 비교하였다 (Fig. 2, Table 2). 인위 감염에 의한 누적폐사율은 어종별로 차이를 보였지만 (Fig. 1), PCR에 의한 검출 한계 측정을 이용한 virus 농도 비교에서는 어종간 차이를 나타내지 않았다 (Fig. 2). 인위 감염시킨 감성돔의 경우, 실험기간 동안 폐사가 나타나지 않았으며 살아남은 어류에 대한 PCR 검사에서도 모두 음성 반응을 나타내었다. Iridovirus IVS-1을 인위 감염시킨 4어종 모두 1×10⁻⁵ 희석배수까지 PCR product가 검출되었으며 (Table 2), 희석 배수를 토대로 감염 조직 homogenate의 total DNA 양으로 환산하면 1×10⁰ 희석의 sample내에 있는 DNA가 1 ng total DNA/1 µL eluted sample이므로 PCR amplicon을 보이는 감염 조직의 최소 필요량은 DNA 10 fg (1 ng×10⁻⁵)이라고 할 수 있다. 즉 감염어의 tissue homogenate로부터 10 fg 이상의 DNA 양을 취하여 PCR을 실시했을 때 PCR positive 결과를 확인할 수 있다.

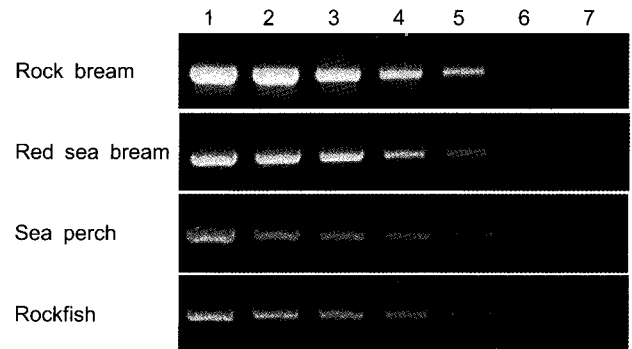


Fig. 2. Detection limit of the iridovirus DNA in the spleen homogenates of marine fishes infected by iridovirus in PCR analysis with the KE1F/KE1R primer set. Template DNA were prepared from the pool of three infected spleens after homogenation. Lane 1-7, prepared DNA samples were diluted from 100 (1 ng total DNA) to 10⁻⁶ (1 fg total DNA) fold serially. M, 100 bp DNA ladder.

Table 2. Minimum amount of infected tissue DNA for detection in PCR using the serially diluted tissue homogenate isolated from 4 different marine fishes in moribund stage after iridovirus IVS-1 infection

Fishes	Detection limit	
	Dilution rate	Amount of DNA
Rock bream (<i>Oplegnathus fasciatus</i>)	1×10 ⁻⁵	10 fg
Red sea bream (<i>Pagrus major</i>)	1×10 ⁻⁵	10 fg
Sea perch (<i>Lateolabrax</i> sp.)	1×10 ⁻⁵	10 fg
Rockfish (<i>Sebastes schlegeli</i>)	1×10 ⁻⁵	10 fg

감염어로부터 사육수로의 iridovirus 유출

사육수로부터 가장 효율적으로 virus를 검출할 수 있는 방법을 찾기 위해서, IVS-1에 감염된 돌돔의 비장 조직 100 µg에 해수 1 mL을 첨가하여 분쇄 후, heating 방법, phenol/chloroform 방법, genomic DNA extraction kit 방법 등 3가지 방법을 이용하여 viral nucleic acids를 분리하여 PCR을 실시하였다. 그 결과, 3가지 분리 방법 중 genomic DNA extraction kit를 사용한 실험구에서만 PCR positive 반응이 나타났으며 (Fig. 3), 이 방법을 사육수에서 virus를 검출하는데 사용하였다. 해산어 5종 중에서 가장 높은 폐사율을 나타내었던 돌돔을 iridovirus IVS-1으로 인위 감염시킨 후, 그 사육수를 매일 채취하여 감염어로부터 유출되는 virus를 PCR로서 분석하였다. 돌돔을 사용한 공격 실험에서 감염 후 7일째 첫 폐사어가 나타났고, 감염 후 10일째 10마리 모두 폐사하였다. 첫 폐사어가 나타나기 하루 전인 감염 후 6일째부터 사육수에서 PCR 양성 반응이 나타났으며, 10일째까지 계속적으로 PCR 양성 반응을 보였다

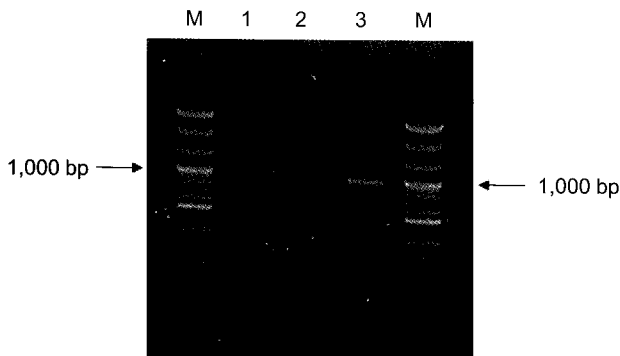


Fig. 3. Detection of iridoviral DNA in PCR with templates prepared three different methods from the spleen of infected rock bream. Lane 1, heating method; Lane 2, phenol/chloroform extraction method; Lane 3, commercial Genomic DNA Extraction Kit; M, 100 bp DNA ladder.

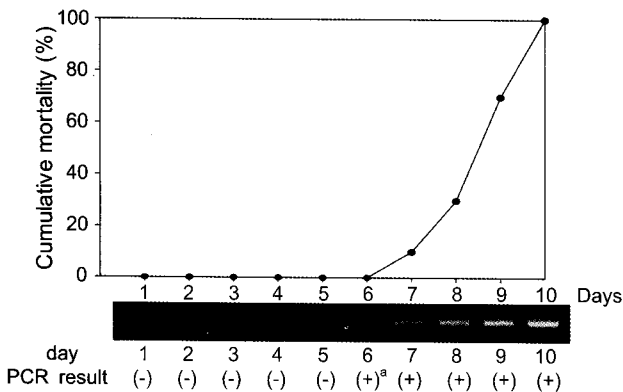


Fig. 4. Iridovirus released from the infected fish into culturing seawater. Rock bream were challenged with the infected tissue homogenate (1 µg/fish) by I.M. injection. Cumulative mortality and amounts of the virus released in culturing seawater were analyzed by PCR for 10 days (a: very weak positive result).

(Fig. 4).

고 찰

Mahardika et al. (2004)은 juvenile humpback grouper (*Cromileptes altivelis*)를 대상으로 orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)에서 감염이 확인된 grouper sleepy disease iridovirus (GSDIV)의 병원성 및 감염 전파 가능성을 확인하였다. 그리고 GSDIV에 의해 감염된 orange-spotted grouper에서 적출된 비장 조직을 이용하여 juvenile humpback grouper에 인위 감염시켰을 때, 30-100%의 누적 폐사율이 나타났다고 보고하였다. 본 연구에서는 우리나라 주요 양식 해산어종인 돌돔 (*Oplegnathus fasciatus*), 참돔 (*Pagrus major*), 점농어 (*Lateolabrax sp.*), 조피볼락 (*Sebastes schlegeli*) 그리고 감성돔 (*Acanthopagrus schlegeli*) 등의 순서로 iridovirus IVS-1에 의한 폐사율이 높게 나타나는 것을 확인하였고, 폐사어의 감염 비장 조직을 이용한 virus 농도 비교 실험에서는 어종간 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 2, Table 2). 이것은 비록 iridovirus에 의한 어종간 폐사율은 다를지라도 iridovirus에 의한 폐사가 발생했을 시에는 어체 내 virus의 양이 어종간에 유사하다는 것을 제시하고 있다. 그러나, 이것은 단지 한 번의 실험에서 얻어진 결과이며, 여러 번의 반복 실험과 다양한 batch의 어류를 사용한 실험을 통해 확립되어야 할 것이다.

He et al. (2002)은 Iridoviridae에 속하는 infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV)의 감염 경로 및 수평 감염 여부를 확인하고자 근육 주사·복강 주사·침치·경구 투여 등 다양한 방법을 사용하여 인위 감염 시키고, 그 폐사 정도를 확인하였다. 또한 ISKNV를 복강 주사하여 인위 감염시킨 group에 virus에 노출되지 않은 건강한 group을 cohobitation 시킴으로써 수평 감염 여부를 확인하였다. 그 결과 다양한 방법으로 인위 감염시킨 groups 모두 100% 폐사가 나타났으며, 병리조직학적으로 virus 감염에 의한 폐사였음을 확인하였다. 인위 감염시킨 group과 cohobitation시킨 group 역시 ISKNV에 의해 100% 폐사가 일어났으므로 감염된 개체로부터 유출된 virus가 건강한 다른 개체로 수평 감염을 일으키는 것이라고 밝히고 있다. 그러나 사육수로부터 iridovirus를 직접 검출하고 양적 변화를 분석한 연구는 아직 보고된 바 없으며, 사육수로부터 iridovirus를 검출한 본 연구 결과는 iridovirus에 의한 수평 감염의 직접적인 증거를 제시하고 있다.

Kitamura and Suzuki (2000)는 자연 해수에 함유되어 있는 unknown inhibitors가 nucleic acids extraction 과정과 PCR amplification에 작용할 수 있으므로, 해수 내에 존재하는 virus를 PCR로 검출하기 위해서는 viral nucleic acids extraction 과정 전에 투석과 같은 방법으로 해수 내의 많은 salts를 반드시 제거해야 한다고 하였다. 본 연구에서 해수 속의 virus를 검출할 수 있는 방법을 찾기 위해 3 가지 viral nucleic acids 분리 방법을 실시하여 비교한 결과, heating 방법 및 phenol/chloroform extraction 방법으로는 해수 중의 virus를 검출하기

에 적합하지 않다는 것을 밝혔다. Genomic DNA extraction kit를 사용했을 때 iridovirus가 PCR 분석에서 검출되는 것은 kit에 사용되는 column에 의해 해수 내의 inhibitor 성분이 제거 되기 때문인 것으로 추정되었고, 이러한 결과는 동일한 방법을 사용하는 다른 회사의 nucleic acid extraction kit 사용에서도 유사한 결과를 나타내어 본 실험결과와 같은 해수내 PCR inhibitor 제거 추정을 확인할 수 있게 하였다 (data not shown).

본 연구에서는 다양한 해산어종에 대한 iridovirus의 병원성을 확인하였고, 어종별로 감염 조직에 있는 virus의 양을 비교하였다. 또한 감염어로부터 사육수로 유출되는 iridovirus를 PCR 방법으로 처음 검출하였고, 공격실험 후 매일 사육수를 조사한 결과 감염어의 moribund stage에 특히 사육수 중으로 많은 양의 iridovirus가 유출된다는 것을 밝혔다. 이것은 수평 감염의 증거일 뿐 아니라, 어느 시기의 감염 stage에서 수평 감염이 이루어지는지도 나타내고 있다. 이러한 방법과 결과는 iridovirus의 진단과 감염 경로 연구에 또 다른 방향을 제시할 수 있을 것이다.

사 사

본 연구 (M2007-07)는 해양수산부 Marine Bio 21 Center의 Marine Process Research Center로부터의 지원에 의하여 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- Chinchar, G., S. Essbauer, J.G. He, A. Hyatt and T. Miyazaki. 2005. Family iridoviridae. In: Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses. Fauquet, C.M., M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, L.A. Ball, eds. Academic Press, San Diego, 145-161.
- Do, J.W., C.H. Moon, H.J. Kim, M.S. Ko, S.B. Kim, J.H. Son, J.S. Kim, E.J. An, M.K. Kim, S.K. Lee, M.S. Han, S.J. Cha, M.S. Park, M.A. Park, Y.C. Kim, J.W. Kim and J.W. Park. 2004. Complete genomic DNA sequence of rock bream iridovirus. *Virology*, 325, 351-363.
- Gibson-Kueh, S., P. Netto, G.H. Ngoh-Lim, S.F. Chang and L.L. Ho. 2003. The pathology of systemic iridoviral disease in fish. *J. Comp. Pathol.*, 129, 111-119.
- He, J.G., S.P. Wang, K. Zeng, Z.J. Huang and S.M. Chan. 2000. Systemic disease caused by an iridovirus-like agent in cultured mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky), in China. *J. Fish Dis.*, 23, 219-222.
- He, J.G., M. Deng, S.P. Weng, Z. Li, S.Y. Zhou, Q.X. Long, X.Z. Wang and S.M. Chan. 2001. Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. *Virology*, 291, 126-139.
- He, J.G., K. Zeng, S.P. Weng and S.M. Chan. 2002. Experimental transmission, pathogenicity and physical-chemical properties of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV). *Aquaculture*, 204, 11-24.
- Inouye, K., K. Yamano, Y. Maeno, K. Nakajima, M. Matsuoka, Y. Wada and M. Sorimachi. 1992. Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol.*, 27, 19-27.
- Jeong, J.B., L.J. Jun, M.H. Yoo, M.S. Kim, J.L. Komisar and H.D. Jeong. 2003. Characterization of the DNA sequences in the genome of red sea bream iridoviruses isolated in Korea. *Aquaculture*, 220, 119-133.
- Jeong, J.B., L.J. Jun, K.Y. Park, K.H. Kim, J.K. Chung, J.L. Komisar and H.D. Jeong. 2006. Asymptomatic iridovirus infection in various marine fishes detected by a 2-step PCR method. *Aquaculture*, 255, 30-38.
- Kawakami, H. and K. Nakajima. 2002. Cultured fish species affected by red sea bream iridoviral disease from 1996 to 2000. *Fish Pathol.*, 37, 45-47.
- Kitamura, S.I. and S. Suzuki. 2000. Occurrence of marine birnavirus through the year in coastal seawater in the Uwa Sea. *Mar. Biotechnol.*, 2, 188-194.
- Lu, L., S.Y. Zhou, C. Chen, S.P. Weng, S.M. Chan and J.G. He. 2005. Complete genome sequence analysis of an iridovirus isolated from the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Virology*, 339, 81-100.
- Mahardika, K., Zafran, A. Yamamoto and T. Miyazaki. 2004. Susceptibility of juvenile humpback grouper, *Cromileptes altivelis*, to grouper sleepy disease iridovirus (GSDIV). *Dis. Aqua. Org.*, 59, 1-9.
- Matsuoka, S., K. Inouye and K. Nakajima. 1996. Cultured fish species affected by red sea bream iridoviral disease from 1991 to 1995. *Fish Pathol.*, 31, 233-234.
- Nakajima, K. and M. Sorimachi. 1994. Biological and physico-chemical properties of the iridovirus isolated from cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol.*, 29, 29-33.
- Nakajima, K., Y. Maeno, Y. Fukuda, S. Tanaka and S. Sorimachi. 1995. Immunofluorescence test for the rapid diagnosis of red sea bream iridovirus infection using monoclonal antibody. *Fish Pathol.*, 30, 115-119.
- Oshima, S., J. Hata, C. Segawa, N. Hirasawa and S. Yamashita. 1996. A method for direct DNA amplification of uncharacterized DNA viruses and for development of a viral polymerase chain reaction assay: application to the red sea bream iridovirus.

- Anal. Biochem., 242, 15-19.
- Rodger, H.D., M. Kobs, A. Macartney and G.N. Frerichs. 1997. Systemic iridovirus infection in freshwater angelfish, *Pterophyllum scalare* (Liechtenstein). J. Fish Dis., 20, 69-72.
- Sano, M., M. Minagwa, A. Sugiyama and K. Nakijima. 2001. Susceptibility of fish cultured in subtropical area of Japan to red sea bream iridovirus. Fish Pathol., 36, 38-39.
- Song, W.J., Q.W. Qin, J. Qiu, C.H. Huang, F. Wang and C.L. Hew. 2004. Functional genomics analysis of Singapore grouper iridovirus: complete sequence determination and proteomic analysis. J. Virol., 78, 12576-12590.
- Sudthongkong, C., M. Miyata and T. Miyazaki. 2002. Viral DNA sequences of genes encoding the ATPase and the major capsid protein of tropical iridovirus isolates which are pathogenic to fishes in Japan, South China Sea and Southeast Asian countries. Arch. Virol., 147, 2089-2109.
- Tamai, T., K. Tsujimura, S. Shiragata, H. Oda, T. Noguchi, R. Kusuda, N. Sato, S. Kimura, Y. Katakura and H. Murakami. 1997. Development of DNA diagnostic methods for the detection of new fish iridoviral disease. Cytotechnology, 23, 211-220.
- Tidona, C.A. and G. Darai. 1997. The complete DNA sequence of lymphocystic disease virus. Virology, 230, 207-216.
- Tsai, C.T., J.W. Ting, M.H. Wu, M.F. Wu, I.C. Guo and C.Y. Chang. 2005. Complete genome sequence of the grouper iridovirus and comparison of genomic organization with those of other iridoviruses. J. Virol., 79, 2010-2023.

2007년 10월 31일 접수
2008년 2월 4일 수리