

양식 잉어류의 신종 바이러스성 질병에 대한  
신속진단 및 방제기술 개발

Development of Diagnosis and Preventive Methods  
for a New Viral Disease of Carp, *Cyprinus carpio*

2002. 12

여 수 대 학 교

해 양 수 산 부

## 제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “양식 잉어류의 신종 바이러스성 질병에 대한 신속진단 및 방제기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2002년 12월 20일

주관연구기관명 : 여 수 대 학 교

총괄연구책임자 : 오 명 주

연 구 원 : 정 성 주, 김 은 희  
최 태 진, 김 영 진  
박 명 애, 김 형 락  
김 위 식, 김 기 홍  
박 경 희, 김 춘 섭  
김 진 숙, 김 애 향  
김 종 오, 박 상 천

# 요 약 문

## I. 제 목

양식 잉어류의 신종 바이러스성 질병에 대한 신속진단 및 방제 기술개발

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

1998년 5월 하순부터 여름철에 이르기까지 약 2-3개월의 기간동안 소양호를 시작으로 춘천호, 화천호, 청평호, 충주호, 장성호, 안동호의 가두리 양식장에서 사육중이던 잉어류 (이스라엘 잉어, 잉어, 비단잉어)의 연쇄 대량폐사가 발생하였다. 이들 어종의 폐사는 댐 및 호소에 한정되지 않고 전국적인 단위로 일반 지수식 노지양식장 및 육상시설 양식장에서도 발생되었다. 이와 같은 피해는 1999년 5월 초반부터 장성댐, 청평댐 및 남부지방의 노지 및 시설양어장의 사육 잉어류에서 다시 발생하였으나, 그 원인체를 알 수 없는 상황에서 대책 수립이 시급한 실정에 이르렀다.

전국적인 규모로 연쇄적이며 대량으로 발생되고 있는 양식 잉어과 어류의 대량폐사 원인 연구를 통하여 확인되어지는 바이러스를 대상으로 그 발병기구 및 원인바이러스의 특성을 구명하고, 진단법을 개발하며, 질병발생 조건을 구명하여 현장에서의 방제대책을 강구할 목적으로 본 연구를 수행하였다. 이러한 전체적인 연구를 통하여 새롭게 발생되어 양식현장에서 심각한 피해를 주고 있는 "잉어과 어류 신종 바이러스성 질병"에 대한 대책을 마련하고자 한다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

잉어과 어류의 신종 바이러스성 질병에 대한 대책을 마련하기 위한 목적으로 3개의 세부과제 (1, 바이러스의 특성 및 발병기구에 관한 연구, 2, 바이러스성 질병 신속진단법에 관한 연구, 3, 바이러스성 질병 방제기술에 관한 연구)를 구성하고 3년간에 걸쳐 유기적인 연구를 행하였으며, 그 각각의 목표 및 연구의 내용은 다음과 같다.

바이러스의 특성 및 발병기구에 관한 연구에서는 바이러스의 분리, 바이러스의 배양특성, 바이러스의 세포선택성, 바이러스의 일반적 성장조사, 바이러스의 어종 및 조건에 따른 병원성, 바이러스의 어체내 감염경로, 감염 어류의 병리조직학적 검사 및 특성, 바이러스의 감염 경로 차단을 위한 방법의 제안, 바이러스 특성 및 발병기구의 검토에 따른 감염어 관리 기술 제안의 내용으로 연구를 행하였다.

바이러스성 질병 신속진단법에 관한 연구에서는 바이러스 감염어의 진단방법을 검토하기 위하여 육안적 진단, 해부학적 진단, 병리조직학적 진단, 면역학적 진단, 분자생물학적 진단의 내용으로 각각의 방법에 따른 원인바이러스의 감염에 따른 질병 진단법을 검토하였으며, 이들 진단법을 적용하여 무감염 친어를 확보하고, 확보된 무감염 친어를 이용한 건강종묘생산을 할 수 있는 기술을 검토하는 연구를 행하였다.

바이러스성 질병 방제기술에 관한 연구에서는 바이러스 감염에 의한 질병의 현장 발병 특성, 바이러스의 사육환경에서의 제어를 위하여 기초적으로 필요한 소독방법을 제시하기 위하여 소독제의 효과적인 사용법을 검토하였고, 실험적인 바이러스백신을 제작하고 그 처리효과 검토를 통하여 현장 방역 및 예방법으로서의 적용가능성을 검토하였다

#### IV. 연구개발결과

##### 1. 바이러스의 특성 및 발병기구에 관한 연구

- 가. 잉어과 어류의 대량 폐사 원인 병원체가 신종의 바이러스임을 확인하였다.
- 나. 원인 바이러스의 병원성을 확인하였다.
- 다. 원인 바이러스의 어체내 감염 특성을 파악하였다.
- 라. 분리 바이러스의 혈청학적 유사성 검토를 통하여 단일종류의 바이러스가 전국의 잉어 대량폐사에 관여되었음을 확인하였다.
- 마. 동일수계의 사육환경수를 통한 원인바이러스의 수평적인 전파가 확인되었다.
- 바. SVCV, GCRV, KHV 특이 검출용 PCR법을 이용한 연관성조사 결과 관련성이 없는 것으로 확인되었다.

##### 2. 바이러스성질병 신속진단법에 관한 연구

- 가. 감염 어체내 항원검출을 위하여 특이검출용 다클론 및 단클론 항체를 제작하였다.
- 나. 이들 항체를 이용하여 원인 바이러스 감염을 확인할 수 있는 형광항체법 및 ELISA법을 정립하였다.
- 다. 감염 어체내 혈중의 바이러스 대응 항체검출을 위한 ELISA법을 확립하였다.
- 라. 항체검출 및 항원검출법을 이용하여 미감염 친어의 확보를 위한 검출기술을 정립하였다.
- 마. 바이러스검출용 PCR법을 검토하였다.
- 바. 미감염어 검출 기술을 적용하여 건강종묘를 생산하는 기술을 확립하였다.

##### 3. 바이러스성질병 방제기술에 관한 연구

- 가. 원인 바이러스에 대한 효과적인 소독기준을 검토하였다.
- 나. 원인 바이러스의 대량 배양에 의한 바이러스의 수확 및 정제 방법을 확립하

여 백신으로 사용하고자하는 바이러스의 확보방법을 확립하였다.

다. 백신 제작방법에 따른 면역능의 비교를 통하여 효과적인 백신의 제작법 및 효과를 검토하였다.

## V. 연구개발결과의 활용

본 연구과정을 통하여 개발되어진 진단법을 양식 현장에서 신속히 활용할 수 있도록 진단 kit화하는 추가적인 연구를 통하여 특허취득 등을 검토할 수 있다.

또한, 현장에서 얻어진 질병 발생 특성 및 방제 연구 결과를 기반으로 감염을 미리 차단하는 예방 사육 manual을 제작하여 양식어민 교육용 홍보자료로 사용할 수 있을 것이다.

아울러 백신 개발을 위한 추가적인 연구를 통하여 현장성있는 백신을 개발 보급하는데 관심을 기울여야 할 것으로 생각된다.

# S U M M A R Y

## I . Title

**Development of diagnosis and preventive methods for a new viral disease of carp**

## II . Objectives and importance of the study

Mass mortalities have been occurred a variety of carps, such as Israel carp, common carp and Koi carp, and cage farms placing several locations, for example Soyang, Chunchun, Hwachon, Chungpyong, Choongju, Jangsung and Andong from middle of June to summer, 1998. The deaths were not only occurred carp culturing dam and lake but also farms constructed on land using either river or spring water. The losses were also occurred carp farms locating south area, for instance Jangsung, from the start of June, 1999. However, the causative agent was not explored but urgently needed to establish preventive method to reduce the losses.

The purpose of this project was firstly to identify the causative agent, especially virus, of continuous mass mortality between carps, and based on the identification of the agent to explore the characterization of the virus, rapid diagnosis method, pathogenesis, and environmental influences, and then establish preventive methods in the field for new viral diseases of carp.

### **III. Contents and scopes of the study**

In order to develop a preventive method, this project was performed to explore; isolation of virus, characterisation of viral culture, selection of proper cell lines, examination of general character, pathogenicity of virus relied on fish species and environmental conditions, route of infection to body, examination by histopathology, suggestion of blocking viral infection to body, control of infected fish based on viral character.

A number of diagnosis methods were employed and tried, such as gross external observation, dissection and anatomical observation, histopathological examination, immunological examination and molecular biological examination. Using these methods, non-infected brood fish was collected and tried to produce healthy larvae with the brood fish.

A variety of preventive methods were tried, firstly to find proper disinfectants in the field to inactivate the virus distributing in culturing water, secondly to develop a viral vaccine to know the vaccine effects whether or not it is able to prevent the viral infection.

### **IV. Results of the study**

1. Study of viral characterisation and pathogenesis
  - a. Identification of the causative agent as new virus of the mass



- mortality between carp
- b. Verification of pathogenicity
  - c. Characterisation of the infectivity to body
  - d. Serological identification as single viral strain involved in mass mortality in Korea
  - e. Verification of horizontal transmission between fish
  - f. No relation between SVCV, GCRV and KHV based on PCR method
2. Study of rapid diagnosis for the viral disease
- a. Production of polyclonal and monoclonal antibody to detect antigens in affected fish
  - b. Establishment of IFA and ELISA to explore viral infection with polyclonal and monoclonal antibody
  - c. Establishment of ELISA to explore viral infection with fish antibody
  - d. Selection of non-infected brood fish using both antigen and antibody techniques
  - e. Development of PCR method to detect virus
  - f. Production of larvae using non-infected brood
3. Study of preventive method for viral infection
- a. Examination of effective disinfective level for the causative virus
  - b. Trial of vaccine production by developing collection, purification and mass production of virus
  - c. Comparison of immune response for vaccines developed by producing different methods

## **V. Employment of present study**

At present study, the diagnosis method developed might be used in the field to know the virus infection by developing a kit in near future and may be necessary to obtain patent for the kit. A manual contained preventive method might be useful to educate fish farmers to prevent the disease before infection. In addition, vaccine development by performing additional study might be necessary to apply in the field situation.

# CONTENTS

Chapter 1 Introduction .....	16
Chapter 2 Study of viral characterization and pathogenesis .....	19
Section 1. Preface .....	19
Section 2. Isolation of the causative agent .....	21
1. Disease occurrence and field study .....	21
2. Biochemical and biophysical characterization .....	31
3. Serological identification .....	36
4. Selection of fish cell lines for virus cultures .....	38
5. Virus culture and purification .....	40
6. Electron microscopic study .....	42
7. Study of virus protein and nucleic acid .....	45
Section 3. Histopathology and Pathogenesis .....	46
1. Histopathological observation .....	46
2. Verification of pathogenicity .....	54
a. Pathogenicity to Carp .....	54
b. Pathogenicity to other fishes .....	55
Section 4. Comparison with pathogenic virus for carp .....	59
1. Comparison with PCR products .....	59
2. Comparison with serological types .....	64
Section 5. Results .....	65

Chapter 3 Study of rapid diagnosis for the viral disease .....	68
Section 1. Preface .....	68
Section 2. Study for immunological diagnostic method .....	69
1. Production of polyclonal antibody .....	69
a. Production of polyclonal antibody .....	69
b. Establishment of IFA .....	69
c. Establishment of ELISA .....	70
2. Production of monoclonal antibody .....	73
3. Establishment of rapid diagnosis methods with MAb .....	76
a. FAT method .....	76
b. ELISA method .....	76
4. Establishment of ELISA for antibody detection .....	82
a. Purification of carp IgM .....	82
b. Production of carp IgM monoclonal antibody .....	82
c. Selection of non-infected fish brood .....	86
Section 3. Development of PCR method to detect virus .....	92
Section 4. Results .....	104
 Chapter 4 Study of preventive method for viral infection .....	 106
Section 1. Preface .....	107
Section 2. Characterisation of the infection .....	107
1. Field study .....	107
2. Mechanisms of virus infection .....	109
3. Horizontal infection .....	111
4. Vertical infection .....	114

5. Co-infection and environmental facts .....	115
Section 3. Selection of effective virus prevention .....	121
1. Production of virus-free fish .....	121
2. Examination of effective disinfectant .....	124
Section 4. Trial of vaccine production .....	127
Section 5. Results .....	133
Chapter 5 Synopsis .....	137
Chapter 6 References .....	145

## 목 차

제 1 장 서론 .....	16
제 2 장 대량 폐사 원인 바이러스의 특성 및 발병기구에 관한 연구 .....	19
제1절 서론 .....	19
제2절 대량폐사 원인체의 분리 및 성상 .....	21
1. 발병 상황 및 원인체 조사 .....	21
2. 원인 바이러스의 생화학·물리학적 성상 .....	31
3. 원인 바이러스의 혈청학적 성상 .....	36
4. 원인 바이러스 배양용 세포의 선발 및 배양조건 .....	38
5. 원인 바이러스의 대량배양 및 정제 .....	40
6. 원인 바이러스의 전자현미경적 관찰 .....	42
7. 원인 바이러스의 단백질 및 핵산 구조 .....	45
제3절 감염어의 병리학적 특성 및 병원성 조사 .....	46
1. 자연 감염어 및 인위감염어의 병리학적 특성 .....	46
2. 병원성조사 .....	54
가. 잉어류에 대한 인위감염 실험 .....	54
나. 어종별 병원성조사 .....	55
제4절 외국의 주요 잉어류 병원 바이러스와의 비교 .....	59
1. 유전자 증폭(PCR)법에 의한 비교 .....	59
2. 분리바이러스주의 혈청학적 유사성 검토 .....	64
제5절 결과의 요약 .....	65

제 3 장	질병 신속진단 기술개발	68
제1절	서론	68
제2절	면역학적 신속진단법의 검토	69
1.	Polyclonal antibody의 제작 및 이를 이용한 진단법의 검토	69
가.	Polyclonal antibody의 제작	69
나.	효소 항체법 및 형광 항체법에 의한 바이러스 검출법의 확립	69
다.	ELISA법에 의한 검출법의 확립	70
2.	바이러스에 대한 monoclonal 항체의 제작	73
3.	Monoclonal 항체를 이용한 바이러스 특이 검출법의 확립	76
가.	형광항체법 (FAT)에 의한 신속진단법의 확립	76
나.	Monoclonal 항체를 이용한 ELISA에 의한 신속진단법의 확립	76
4.	혈중 바이러스항체 검출을 위한 ELISA법의 확립	82
가.	잉어의 IgM의 정제	82
나.	잉어의 IgM monoclonal 항체의 제작	82
다.	감염어 혈중 바이러스항체 검출을 위한 ELISA법	86
제3절	PCR을 이용한 진단법의 검토	92
제4절	결과의 요약	104
제 4 장	바이러스 방역대책 기술개발	106
제1절	서론	106
제2절	바이러스의 발병특성	107
1.	발병 현장조사	107
2.	바이러스 노출에 따른 어체 내 바이러스의 동태	109
3.	양식 사용수 중의 바이러스 검출 및 수평적인 바이러스 유입 검토	111
4.	바이러스 보유 친어를 통한 수직감염	114

5. 어류병원세균의 혼합감염 및 영양·환경요인과 발병과의 연계성 .....	115
제3절 무감염 친어의 확보 및 효율적인 소독법을 이용한 건강종묘생산.....	121
1. 무감염어의 확보 .....	121
2. 효과적인 소독법의 검토 .....	124
제4절 바이러스 백신의 제작 및 처리 효과 .....	127
제5절 결과의 요약 .....	133
제 5 장 결 론 .....	137
제 6 장 참고문헌 .....	145



## 제 1 장 서 론

국내 잉어 양식은 1980년대에 댐호의 맑은 물을 이용한 가두리양식업의 활기에 힘입어 크게 번창하였으며, 이들 잉어 양식의 호황을 계기로 기타 어류의 중요생산기술 및 관리기술의 발전이 이루어졌고, 아울러 막대한 사육량을 기반으로 국내 양식 사료업 및 수산용 약품업의 성장의 계기가 마련되어졌다. 이렇듯 활발하던 잉어 양식은 댐호의 환경문제가 불거져 나오면서 그 생산기반이 서서히 무너지기 시작하였으나, 잉어 양식에서 얻어진 자금과 기술력은 기타 다른 어종의 양식발전으로 이어져 국내 수산 양식업의 모체로서 그 역할을 다하여 왔다. 이러한 측면에서 잉어 양식은 지금에 와서는 비록 그 중요성이 과거에 비하여 줄어든 것이 사실이지만 그 역사성과 사회성을 감안하여 볼 때, 양식 산업의 다른 주요 대상 어종과 마찬가지로 지속적으로 관심을 가지고 유지·발전시켜야 될 것으로 생각되어진다.

최근에 들어와 잉어, 이스라엘잉어(향어), 비단잉어 등과 같은 담수어 및 넙치, 조피볼락, 돌돔, 참돔, 농어와 같은 해산어에서 지금까지의 국내 양식 과정에서 출현되지 않았던 질병들이 이상적으로 발생되어 양식현장 및 업계의 근심이 되고 있다. 이러한 질병의 원인 조사는 국내의 다양한 어류질병 연구 집단에 의해 다양하게 연구되어지고 있으나, 그 중 일부는 원인의 해명 및 대책 수립에 이르지 못하고 있다.

1998년 5월 하순부터 여름철에 이르기까지 약 2~3개월의 기간동안 소양호를 시작으로 춘천호, 화천호, 청평호, 충주호, 장성호, 안동호의 가두리 양식장에서 사육 중이던 잉어류 (이스라엘잉어, 잉어, 비단잉어)의 연쇄 대량폐사가 발생하였다. 이들 어종의 폐사는 댐 및 호소에 한정되지 않고 전국적인 단위로 일반 지수

식 노지 양식장 및 육상시설 양식장에서도 발생되었다. 이와 같은 피해는 1999년 5월 초반부터 장성댐, 청평댐 및 남부지방의 노지 및 시설양어장의 사육 잉어류에서 다시 발생하였으나, 그 원인체를 알 수 없는 상황에서 대책 수립이 시급한 실정에 이르렀다.

잉어의 바이러스 질병으로는 랍도바이러스에 속하는 SVCV (잉어의 봄 바이러스병) 와 SBIV (부레염)이 있으며, 헤르피스바이러스에 속하는 CHV (폭스병)와 KHV (koi herpesvirus)가 있다. 그 밖의 잉어 바이러스로는 레오바이러스인 GCRV (심각한 접촉 전염성의 출혈성 질병), 어종과 연령에 따른 독력실험에서 어류에 아무런 영향을 끼치지 못하는 이리도바이러스인 CCIV (Shchelkunov et al., 1990)등이 있다. 잉어의 봄 바이러스병은 유럽에서는 오래 전부터 전염성 복수병 (infectious dropsy of carp, IDC)이라는 이름으로 양식장 잉어 뿐 만 아니라 야생잉어, 붕어, 금붕어 등에 발병하며 병어는 체색이 검어지며 주수구에 모이는 경향으로 호흡이 완만하고 옆으로 드러눕게 된다. 병이 진행되면 복부의 팽창, 안구돌출, 항문의 종창과 발적, 빈혈 및 아가미의 점상출혈이 특징적으로 나타난다. 해부학적 특징은 복강에 장액성 또는 출혈을 동반한 복수가 고이며, 장은 심한 염증으로 확장되어지며 관공내에 박리된 점액상피, 붕괴물 및 농양과 같은 것들이 들어있다. 거의 모든 기관에 출혈이 생기지만 가장 심한 곳은 부레의 벽이다. 발생시기는 봄철에 수온이 7℃이상일 때부터 시작되어 13-20℃일 때 많이 발생하는데 수온 17℃부근이 가장 많이 발생하게 되며, 20℃을 넘게 되면 종식되는데 일단 발병하면 수온 상승과 더불어 급속히 진행되어 2-3주간에 80-90%가 사망한다. 잉어의 부레염은 거의 모든 성상이 봄 바이러스병과 동일하며, 혈청형도 같다고 하는데 부레염은 봄 바이러스병 보다 높은 온도에서 발병되기 쉬워 13℃에서는 그다지 발병하지 않지만 고수온기에서는 급성으로 진행된다. 급성형에서는 수온이 20℃부근일 때 감염 후 1달 후에 증상이 나타나지만 2-3개월 걸리는 경우도 있다. 급성형의 병어는 부레에 심한 염증이 일어나 있는 것이 특징이며, 때로는 부레벽 조직의 붕괴, 복막염이 생기고 이어서 신장을 비롯한 다른 장기에 병변

이 생겨 죽게 되는데 사망률은 거의 100%에 가깝다. 잉어의 폭스병은 잉어나 금붕어 등의 잉어과 어류의 구간근, 두부, 지느러미 등에 백색 또는 핑크색의 표재성의 유두종이 형성되며 크기는 1-수cm<sup>2</sup>이며, 높이는 대개 1-2mm정도이다. 종양의 유래는 상피세포로 상피세포의 이상증식이 일어나 종양에 영양을 공급하기 위하여 혈관이 함유된 결합조직이 형성되어 유두종으로 되는데 종양은 쉽게 박리되지 않기 때문에 무리하게 떼어내려고 하면 출혈이 생긴다. 종양이 자연 탈락한 경우에는 치유되는 것처럼 보이지만 재발되며, 이 병 자체로 사망하는 경우는 거의 없으며 종양이 광범위하게 형성되면 어류는 성장이 나빠지던가 쇠약해져 병원체에 의한 2차 감염으로 폐사된다 (박과 오, 2001). 최근 폭스병과 구분되는 KHV (koi herpesvirus)는 잉어의 치어와 성어를 대량폐사 시키고 있다. 병어의 외부증상으로 빈혈과 불규칙적인 아가미의 색깔이 관찰되며, 특징적인 현미경적 병변으로 아가미 상피의 증생과 괴사가 심하게 관찰되고 다른 병변으로 신장, 비장, 장에 염증을 수반하였다. 전형적인 헤르피스 바이러스 입자는 아가미 상피세포, 간세포, 순환 혈중의 백혈구세포에서 관찰되며 침지와 복강주사에 의한 감염 실험에서는 80~100%의 폐사를 보인다고 보고하였다 (Hedrick et al., 2000).

본 연구진들은 발병 현장 어류를 대상으로 다수의 배양세포를 이용한 바이러스의 분리를 행하여 일부의 세포주에 나타나는 배양 선택성, 세포변성효과(CPE) 확인, 병리조직학적 관찰을 통한 바이러스 특이적 병리소견, 전자현미경 관찰을 통한 바이러스 입자의 확인, 잉어류에 있어 인위적 감염에 따른 병원성의 확인 및 감염 병원체의 재 분리 등과 같은 기초 연구 결과를 근거로 이 질병이 잉어류에서 아직까지 세계적으로 발견 및 보고된 예가 없는 신종 바이러스 유사 병원체에 의한 감염성 질병일 가능성이 높은 것으로 판단하여 본 질병에 대한 어민들의 불안을 해소하고, 산업적으로 안정되고 경쟁력이 유지되어지는 담수어 양식 환경을 조성하기 위하여, 원인 바이러스를 대상으로 그 발병 기구 및 원인 바이러스의 특성을 구명하고, 진단법을 개발하며, 질병 발생조건을 구명하여 현장에서의 대비책을 강구할 목적으로 본 연구를 수행하였다.

## 제 2 장 대량 폐사 원인 바이러스의 특성 및 발병 기구에 관한 연구

### 제1절 서론

본 연구에서는 첫 번째로, 잉어의 대량 폐사를 유발하는 원인체를 알아내는 조사를 통하여 원인 병원체로서 바이러스의 확인, 바이러스의 분리, 바이러스의 배양, 바이러스의 세포 선택성, 바이러스의 일반적 성상 조사의 내용으로 연구를 행하였다. 원인체로 분리된 바이러스가 지금까지 보고 예가 없었던 새로운 바이러스인 점에서 그 원인의 규명에 있어 가능한 최대한의 방법들 및 기존의 병원 바이러스와의 연계성에 대한 세밀한 조사를 행하고자 하였다. 또한, 분리된 바이러스가 기존에 발생 보고가 없는 신종인 점에서 바이러스의 배양법 및 바이러스의 성상조사에 있어 수회에 걸친 반복 실험을 통하여 객관적인 결과를 기반으로 그 특성을 확인하고자 했다.

두 번째로, 원인 바이러스의 병원성 및 병리학적 연구를 통하여 본 바이러스 성 감염증의 병리학적 성상을 비교·구명하고, 본 바이러스의 어체 내 침입 이후의 감염경로를 확인함으로써 질병감염에 대처할 수 있는 병원·생물학적 기초를 수립하기 위하여 잉어류 뿐만 아니라 기타 양식어종에 본 연구의 대상인 신종 바이러스가 감염되어지는가, 어떤 수온 조건에서 발병되어지기 쉬운가, 감염 이후 생잔어는 다시 재발되어지는가, 감염에 따라 어떠한 병리학적 특성을 보이는가, 수중에서 바이러스에 노출되어진 경우 어체에 바이러스는 어떤 경로를 통하여 감염되어지며, 그 진행의 빠르기는 어느 정도인가 하는 의문의 해답을 얻기 위하여

다양한 생체 실험 및 개발되어진 진단방법을 적용하는 실험을 통하여 감염 기구의 구명을 하고자 하였다.

아울러, 이 바이러스의 외국으로부터 유입되어질 수 있는 가능성에 대한 검증을 통하여 앞으로 유입되어질 수 있는 병원체의 관리기술에 대한 기초적인 검토를 행하였다.

## 제2절 대량폐사 원인체의 분리 및 성상

### 1. 발병 상황 및 원인체 조사

양식장 잉어류에서의 대량 폐사는 1998년부터 전국적으로 일시에 생기기 시작하여 그 이후 지속적으로 대량 폐사가 보고되어, 국내의 양식장의 감소 및 국산 잉어류 양식기피에 의하여 발생량 및 빈도는 줄어들었으나 본 연구 종료 시점인 2002년에 이르기까지 끊이지 않고 지속되어져 왔다 (그림 1, 2, 및 3).

감염어는 활력을 잃고 수면의 표층으로 올라와 물살에 밀려다니며, 수중 산소가 5ppm 이상으로 충분히 유지됨에도 불구하고 산소 부족에 의한 입울림과 같은 행동을 하였다. 감염어의 특이적 외부증상은 체표점액의 다량분비 및 체표면의 백탁증상이 대표적이며, 체색은 흑화하고, 경우에 따라서는 비늘이 탈락한 개체가 관찰되었다. 또한 아가미 뚜껑을 열어보면 아가미 끝부분 또는 아가미자루 부분이 괴사, 변색된 개체도 관찰되었다 (그림 4).

해부학적으로 본 감염어의 특성은 간의 퇴색, 신장 및 비장의 이상 비대 및 전반적인 빈혈이다. 말기 병어의 경우 내장이 전반적으로 괴사, 육안적으로 보기에 변색되고 형체가 뭉개진 상태로 나타난다. 바이러스 감염 진행에 따른 각 기관 기능의 소실 및 그에 기인된 체내 방어기능의 약화로 감염 말기에 이르면 이차적인 세균감염 유발 등으로 체강내 출혈 또는 복수, 장기내 출혈 등의 증상이 나타나기도 하였다 (그림 5).

몇 일에 걸쳐 힘없이 양식장 표면에 떠올라 입울림하는 정도의 개체가 늘어나다가 갑자기 대량 폐사하는 경향이 나타나므로 뚜렷하게 감염동태를 사전에 예측하기 힘든 어려움이 있다. 감염이 시작되는 초기단계의 특이한 점은 수온이 20℃전 후로 상승하는 시기에 체표면 및 지느러미 끝부분에 아주 약하지만 백탁 증상을 나타내는 개체가 무리 중에 몇 마리씩 보이며, 야간에 손전등 등으로 수

면을 조사하면 입을림하는 개체수가 늘어나는 경향을 보인다. 감염 초기단계 기간은 수중의 바이러스량, 수온, 수질조건 및 어체의 건강도에 따라서 차이가 날수 있으나, 수온20℃를 기준으로 약 7~15일정도의 기간을 가지고 어체내에 감염(초기)이후 그 복제 및 전파에 따른 증상의 발현을 계속하는 것(중기)으로 보인다. 급기야 체내의 다양한 기능을 하는 내부장기에 전반적으로 확산되어 손상을 입히게되면 그 기능이 쇠퇴함으로써 폐사체가 나타나게되는데(말기), 이와 같이 말기에 이르러서는 그 회복이 불가능하며 수일에 걸쳐 대량폐사로 이어지게 된다.

이들 대량 폐사의 원인체를 확인하기 위하여 1998년부터 2001년 까지 발병 현상의 대량 폐사어를 채집하여 내외부의 기관 및 장기를 대상으로 육안적인 관찰, 현미경적인 관찰을 행하고, 상법에 따라 기생충, 세균 및 바이러스 분리를 행하였다. 바이러스 검사를 위해 신장과 비장조직을 HBSS와 1:9로 희석 후 균질화하여 5000rpm에서 20분간 원심하여 상등액을 취해 0.45  $\mu\text{m}$  membrane filter (sartorius co.)를 사용하여 여과 후 신중잉어바이러스의 감염유무를 조사하였다. 필요에 따라 ELISA법과 형광항체법을 이용하여 바이러스를 검출하였다. 멸균된 3차 증류수에 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium. GibcoBRL. Co.) powder를 충분히 녹인 후 100 IU/ml의 penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 streptomycin (GibcoBRL. Co.)과 FBS (Fetal Bovine Serum. GibcoBRL. Co.)가 5%가 되게 첨가하여 최종량을 1 l로 조절한 다음  $\text{NaHCO}_3$ 로 pH를 7.5로 맞춘 후 0.22  $\mu\text{m}$  membrane filter (Sartorius AG)로 여과하여 세포배양에 사용하였다. 멸균된 DW<sub>3</sub>에 HBSS (GibcoBRL. Co.) powder를 완전히 용해시킨 후, 100 IU/ml의 penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 streptomycin (GibcoBRL. Co.)를 첨가하고, DW<sub>3</sub>로 최종용량을 1 l로 채운 후  $\text{NaHCO}_3$ 를 이용하여 pH를 7.5로 조정하고 0.22  $\mu\text{m}$  membrane filter (Sartorius AG)로 여과하여 HBSS로 사용하였다. 바이러스 배양을 위한 fish cell line은 본 연구실에서 보유하고 있는 CHSE-214, RTG-2, RTE-2, CHH-1, EK-1, FHM, EPC와 새로 제작한 flounder spleen cell line (FSP)을 24well에 계대배양하여 6

시간 동안 배양한 후 바이러스 접종에 사용하였다.

대량 폐사가 일어난 각 지역에서 수집한 잉어를 대상으로 본 바이러스의 분리를 행하였는데, 대상 샘플의 개체 수는 총 212마리로서 1998년 강원도, 충청북도, 경상북도, 경상남도, 전라북도 및 전라남도 소재 잉어 양식장 11개소의 87미 및 1999년 같은 지역의 19개소에서 샘플한 125미를 사용하였다. 바이러스 분리 결과 212미의 검사 개체 중에서 191미로부터 지금까지 알려져 있지 않은 특성을 가진 세포변성효과 (CPE)를 나타내는 바이러스를 분리할 수 있었으며 (그림 6), 나머지 21미의 샘플은 음성을 나타내었다. 2000년도의 샘플처리 결과의 경우도 총 37개소의 샘플 360미 중에서 342미로부터 바이러스 양성의 분리결과를 얻을 수 있었으며, 이러한 검출 결과는 그 이후 2002년까지의 현장 조사 결과에서도 계속적으로 유사하게 나타났다 (그림 7).

이러한 결과는 외부의 다양한 증상을 나타내는 각 지역의 감염어들이 바이러스에 공통적으로 감염되어져 있었음을 확인할 수 있는 증거가 되어진다. 따라서 잉어류의 대량 폐사의 원인체는 한 종류의 바이러스이며 그 외 각 양식장 단위의 환경수계에 다양하게 분포하고 있는 세균 및 기생충들이 2차적인 감염원으로 작용하여 다양한 형태의 질병 유형이 나타났던 것으로 확인할 수 있었다.



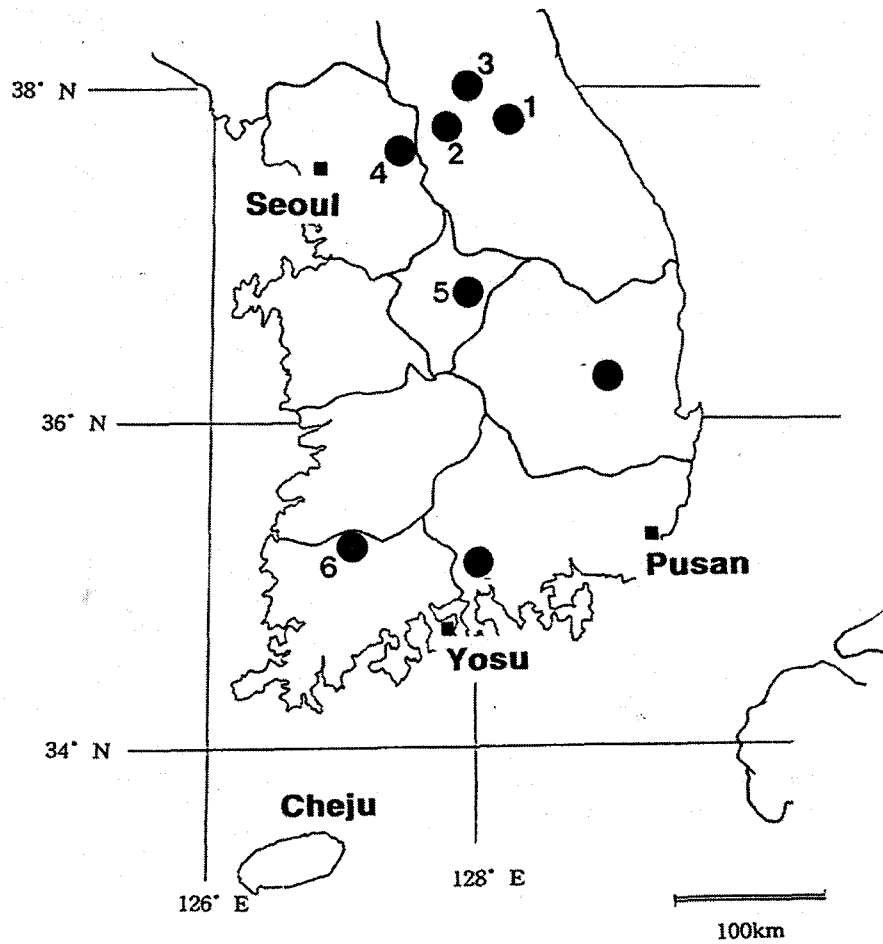
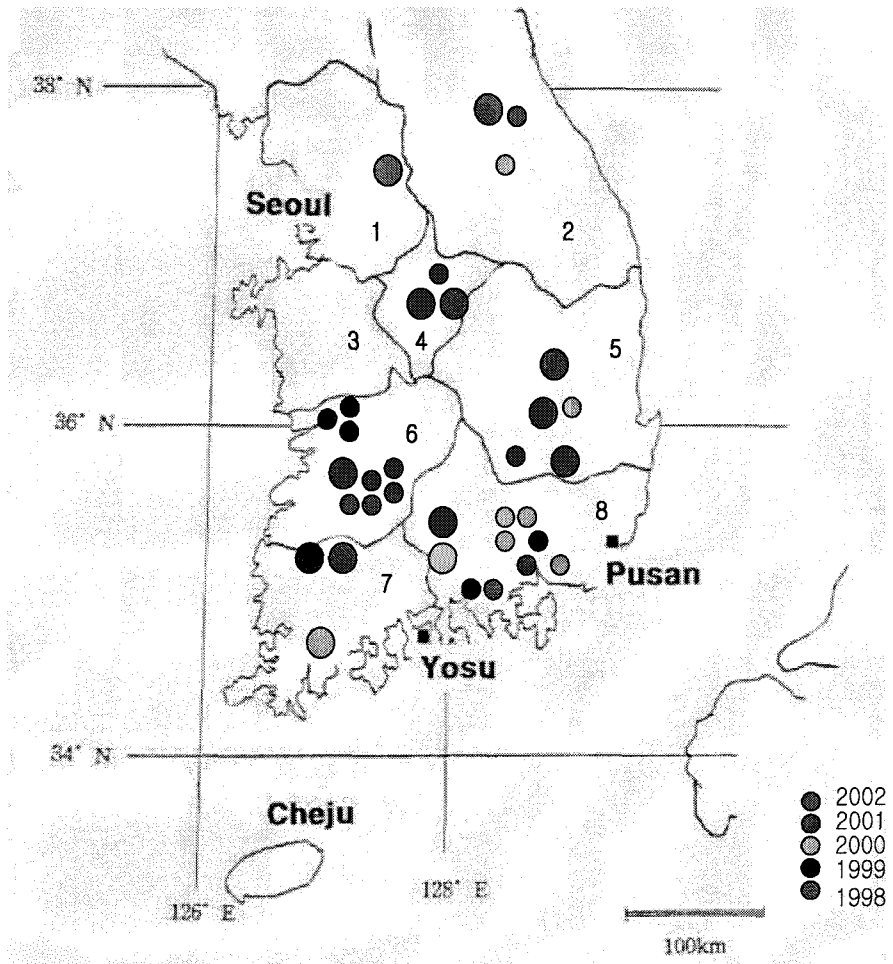


그림 1. 잉어류 대량 폐사가 최초로 발견되어진 장소.



- A low mortality of cultured carp was recorded.
- A high mortality of cultured carp was recorded.

그림 2. 1998년부터 2002년 까지의 잉어류 폐사조사 지역 및 폐사 추이

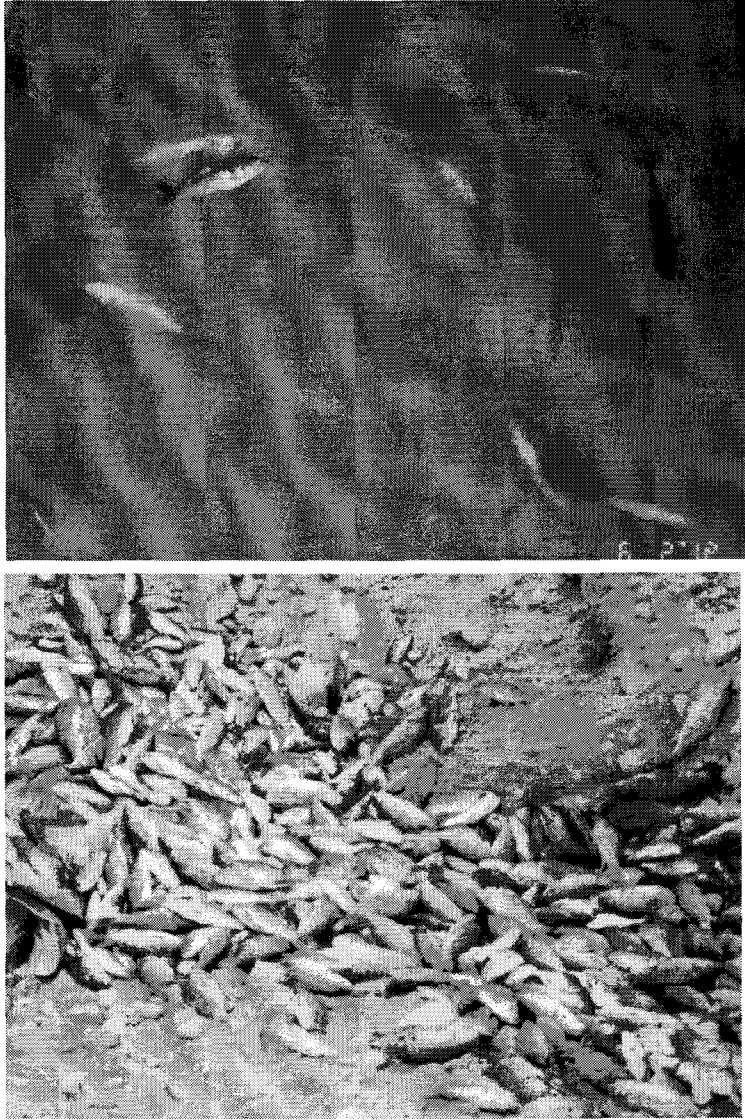


그림 3. 잉어 바이러스 감염에 의한 대량 폐사

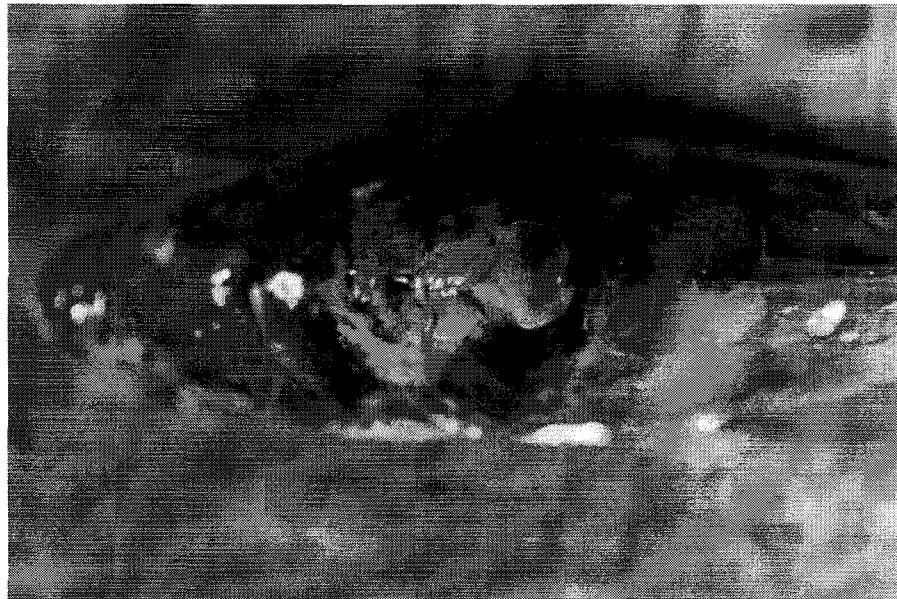


그림 4. 감염어의 외부증상

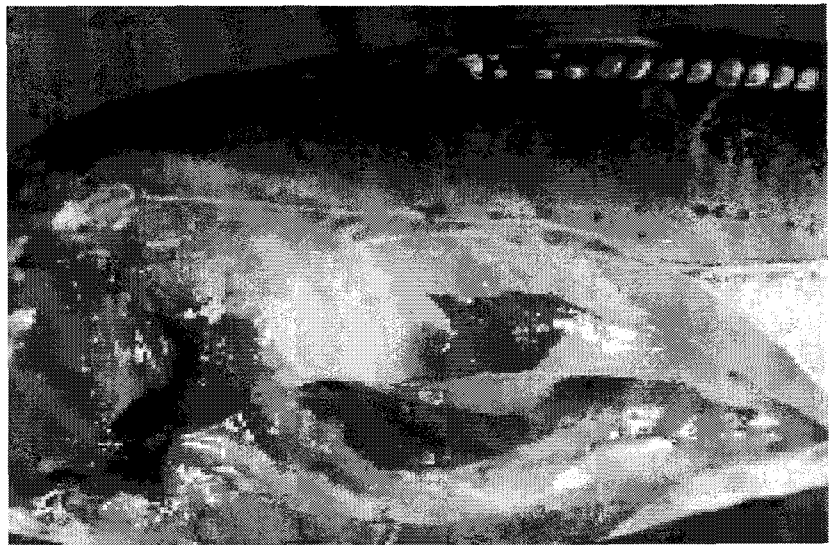
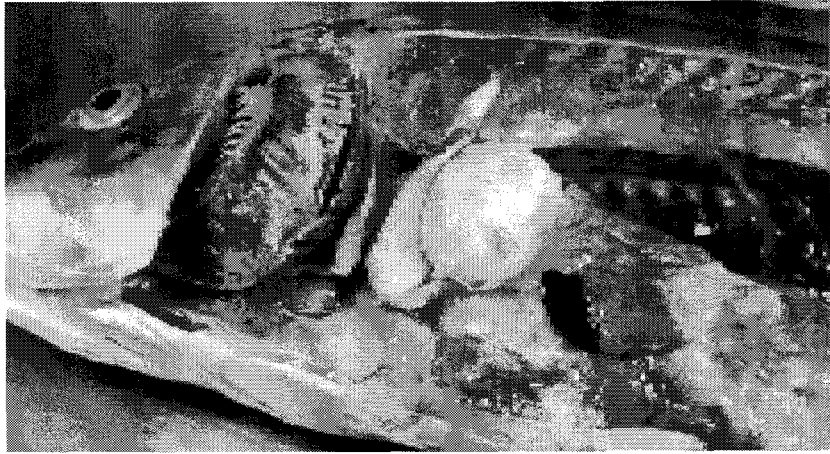


그림 5. 감염어의 내부증상

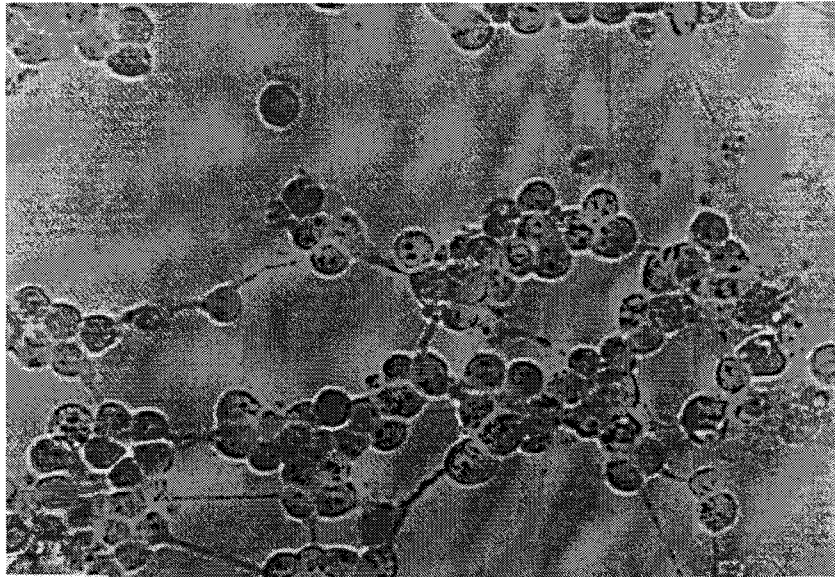


그림 6. FHM 세포상에 나타난 바이러스 증식에 따른 세포변성효과(CPE)

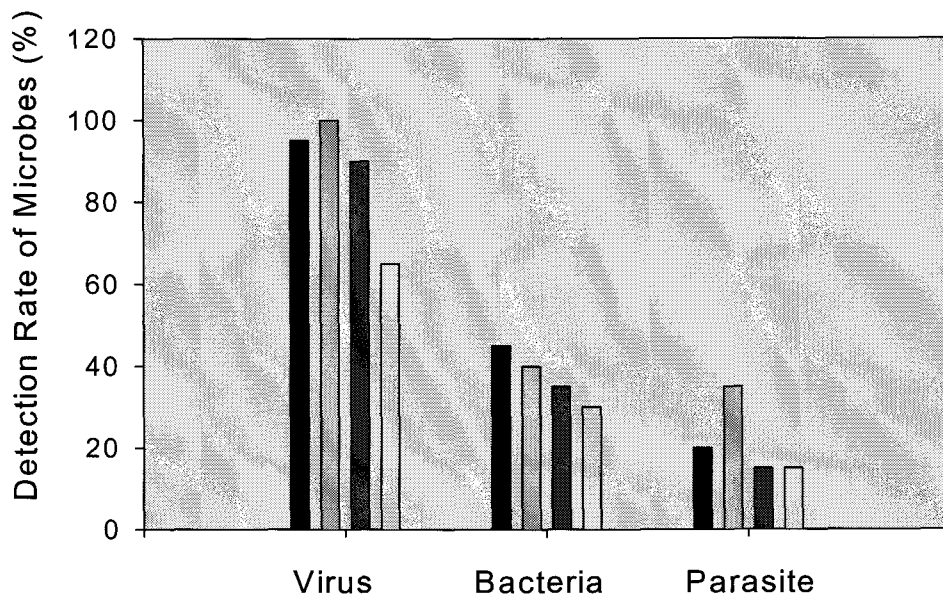


그림 7. 1998년부터 2001년까지의 잉어 폐사 원인체의 조사 추이

## 2. 원인 바이러스의 생화학·물리학적 성상

분리 실험에서 배양되어진 533개의 바이러스 strain을 냉동 보관하고, 서로 다른 연도 및 지역에서 분리되어진 대표 strain을 11개 선택하여 FHM 세포에서 10%의 fetal bovine serum과 50 $\mu$ g/ml penicillin-streptomycin을 포함하고 있는 Minimum Essential Medium (MEM)을 사용하여 각각 배양한 다음 분리 바이러스의 바이러스 성상조사를 행했다 (표 1).

바이러스학적 비교를 위한 대표 바이러스로서는 일본, 미국 등의 담수어류 병원바이러스로 분리·확인되어진 바이러스인 IPNV, IHNV, SVCV, CSV, EVE, EVEX 및 RVS를 분양 받아 본 연구의 분리바이러스와의 성상조사의 비교에 사용했다 (표 2).

핵산의 유형을 결정하기 위한 5-iododeoxyurine (IUdR) 감수성 실험, 바이러스 입자의 외막의 존재여부를 확인하기 위한 ether에 대한 감수성 실험, pH 내성 실험, 열안정성실험, 아크리딘오렌지 염색법에 의한 바이러스 핵산형 및 봉입체 형성 확인 실험을 11개의 분리 strain 및 7종류의 기존의 바이러스와 비교 실험을 행했다. 에테르 감수성 실험은 바이러스 감염 배양액을 여과한 배양 여과액 4ml에 1ml의 디에틸에테르를 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 18시간 반응시킨 후 질소가스로서 에테르를 제거하고 바이러스 감염가의 변화를 측정하였다. 대조실험구는 Hanks' balanced salt solution (HBSS)을 에테르 대신 첨가하여 실험하였다. pH감수성 실험은 pH 3으로 조정된 MEM에 분리 바이러스액을 가하여 15 $^{\circ}$ C에서 3시간 반응시킨 후 바이러스 감염가의 변화를 확인하였다. 대조실험구는 pH 7.2의 MEM10에 동일한 처리를 행하여 감염가를 측정하였다. 열 안정성은 바이러스액을 60 $^{\circ}$ C로 water bath로 조정된 수중에 5분 및 1분간 반응시킨 후 신속히 냉각시켜 바이러스 감염가의 변동을 확인하였다. IUdR에 의한 증식저해 실험은 배양세포에 50 $\mu$ g/ml의 IUdR을 첨가한 MEM10 및 HBSS를 분리 바이러스에 반응시켜 15 $^{\circ}$ C에서 10일간 배양하여 바이러스 감염가의 변동을 조사하였다.



분리된 바이러스는 IUdR 감수성이 없었으며, 에테르에 감수성이 나타나지 않아 인벨롭을 가지지않은 RNA 바이러스이었으며, pH에 대하여 내성을 나타내고 있었고, 60℃에서 30분 및 5분간의 처리를 통해 안정성이 없어졌으며, 세포질내 아크리딘오렌지 양성의 염색반응을 보였다. 이러한 결과는 11종의 대표주를 사용한 전 실험에서 동일한 경향으로 나타났으므로 잉어 폐사와 관련되어 분리되어진 바이러스는 다종의 바이러스가 아닌 1종류의 단일종 바이러스로 판단되어졌다. 비교에 사용한 IPNV, IHNV, SVCV, CSV, EVE, OMV 및 SRV의 결과와 일치되어지는 것이 없어 이들과는 다른 바이러스임을 확인할 수 있었다 (표 3).

표 1. 바이러스 성상조사를 위하여 사용되어진 대표 분리 바이러스

연도	시기	장소	폐사 유무	Strain No.
1998년	6월	소양호	대량폐사	CVSD-8
	7월	안동호	대량폐사	CVA-32
1999년	7월	장성	대량폐사	CVJ-26
	8월	군산	대량폐사	CVK-11
	8월	함안	대량폐사	CVH-3
2000년	3월	창녕	무증상	CVC-2
	5월	함안	경과어	CVH-31
	6월	영월	대량폐사	CVY-46
	6월	강진	대량폐사	CVG-6
	7월	하동	대량폐사	CVHD-25
	10월	구미	대량폐사	CVKM-12

표 2. 성상 조사에 사용되어진 대조 바이러스

IPNV	Infectious Pancreatic Necrosis Virus	VR-299
IHNV	Infectious Hematopoietic Necrosis Virus	HV-1
SVCV	Spring Viremia of Carp	Hokkaido Univ.
CSV	Chum Salmon Reovirus	ToKs-7801
EVE	Eel Virus European	Tokyo Fisheries Univ.
OMV	<i>Oncorhynchus masou</i> Virus	Hokkaido Univ.
SRV	Samonid Retrovirus	BrCo-9221

표 3. 분리된 바이러스의 정상

Strain	Control	Ether	pH	60°C, 30min	IUdR
CVSD-8	4.3	4.1	4.1	4.1	4.1
CVA-32	4.1	3.8	4.1	3.5	3.8
CVJ-26	4.8	4.1	4.5	4.3	4.3
CVK-11	4.3	3.8	4.3	4.1	3.8
CVH-3	4.3	3.8	4.1	3.8	3.8
CVC-2	3.8	3.8	3.5	3.5	3.5
CVH-31	3.8	3.8	3.3	3.5	3.5
CVY-46	4.5	4.1	3.8	4.3	4.3
CVG-6	4.8	4.1	4.3	4.3	4.3
CVHD-25	4.1	3.5	4.1	3.5	3.5
CVKM-12	4.1	3.8	3.8	3.8	3.5
IPNV	7.5	7.1	6.8	7.3	7.3
IHNV	6.8	<1.8	<1.8	<1.8	6.5
SRV	6.5	<1.8	6.5	6.3	6.5
OMV	3.8	<1.8	2.8	<1.8	<1.8
CSV	4.8	4.5	4.3	4.5	4.5

### 3. 원인 바이러스의 혈청학적 성상

11종의 분리 바이러스 strain을 대상으로 기지의 분류되어진 IPNV, IHNV, SVCV, CSV, EVE, OMV 및 SRV바이러스의 항혈청을 이용하여 바이러스 중화 실험을 통하여 그 혈청학적 관련성을 조사하였다. HBSS로 희석한 항IPNV (VR-299 1:100), 항IHNV (HV-1 1:80), 항SVCV (1:100), 항CSV (ToKs-7801 1:80), 항EVE (1:100), 항SRV (BrCo-9221 1:120), 항OMV(8401-H 1:100) rabbit serum과 제작한 잉어바이러스 CVJ-7의 rabbit serum에 100 TCID<sub>50</sub>/ml의 분리 바이러스액 들을 15°C에서 30분간 반응시킨 후, RTG-2세포에 접종하여 바이러스 감염가를 관찰하였다. 바이러스 대조로서는 IPNV, IHNV, SVCV, CSV, EVE, OMV, SRV 및 분리 대표주인 11주의 바이러스를 사용하였다.

분리 바이러스 대표주 11종을 1:100으로 조정한 항 IPNV, IHNV, SVCV, CSV, EVE, OMV 및 SRV rabbit serum과 반응 시켜 그 감염가의 변동을 확인 하여 본 결과 분리 바이러스의 대표주인 CVJ-7을 배양하여 제작한 항토끼 혈청 인 CVJ-7 rabbit serum과의 반응 실험구에서만 그 감염가의 감소가 확인 되었을 뿐, 그 외의 바이러스 항혈청과의 반응 실험구에서는 감염가의 변화가 나타나지 않아 분리 바이러스주 11종은 기존의 담수어 유래의 7종류의 바이러스와는 혈청학적으로 전혀 연관성을 가지고 있지 않음이 확인되어졌다.

즉 본 분리 바이러스는 지금까지 알려져 있는 담수 유래의 바이러스와는 전혀 다른 신종의 바이러스임이 시사되어지는 결과를 얻었다 (표 4).

표 4. IPNV, IHNV, SVCV, CSV, EVE, OMV, SRV 및 CVJ-7 바이러스의 항혈청에 대한 분리 바이러스의 중화반응실험 결과

Strain	IPNV	IHNV	SVCV	EVE	OMV	SRV	CVJ-7
CVSD-8	-	-	-	-	-	-	+
CVA-32	-	-	-	-	-	-	+
CVJ-26	-	-	-	-	-	-	+
CVK-11	-	-	-	-	-	-	+
CVH-3	-	-	-	-	-	-	+
CVC-2	-	-	-	-	-	-	+
CVH-31	-	-	-	-	-	-	+
CVY-46	-	-	-	-	-	-	+
CVG-6	-	-	-	-	-	-	+
CVHD-25	-	-	-	-	-	-	+
CVKM-12	-	-	-	-	-	-	+
IPNV	+						-
IHNV		+					-
SVCV			+				-
EVE				+			-
OMV					+		-
SRV						+	-

#### 4. 원인 바이러스 배양용 세포의 선발 및 배양조건

CHSE-214, RTG-2, RTE-2, CHH-1, EK-1, FHM, EPC 등의 어류 주화세포를 이용하여 분리 대표 바이러스 strain 11종을 대상으로 바이러스 분리 및 배양을 위한 가장 유효한 세포주를 선정하기 위하여 주화세포 선택성 실험을 행하였다.

각각의 배양세포는 동일한 배양조건인 10%의 fetal bovine serum과 penicillin-streptomycin(각 50 $\mu$ g/ml)을 포함하고 있는 Minimum Essential Medium(MEM)을 사용하고, 20 $^{\circ}$ C에서 배양하여 그 선택성을 비교하였다.

본 연구의 결과, 본 분리 바이러스는 FHM에서 가장 높은 감염가를 나타내고, 그 이외에 RTG-2에서 낮은 수치이기는 하지만 감염이 성립되어지는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 그 외의 세포들에서는 바이러스 감염에 의한 배양이 되지 않음이 확인되어졌고, 이러한 결과는 11종의 분리 바이러스 strain에서 동일하게 나타났다. 이로서 본 바이러스의 바이러스 배양세포로서 FHM이 가장 효과적으로 사용되어질 수 있음을 확인할 수 있었다 (표 5).

바이러스의 배양적온 및 성장 가능 온도범위를 알기 위하여 상기의 실험에서 선택되어진 FHM 세포를 이용하여 10, 15, 20, 25, 30 $^{\circ}$ C에서 바이러스를 배양하면서 경과 시간별로 titer를 측정하여 바이러스 배양 적온을 확인하는 실험을 행하였다.

분리 바이러스는 15~25 $^{\circ}$ C 범위에서 배양세포상에서 증식가능하며, 가장 적당한 배양온도는 15~20 $^{\circ}$ C의 범위인 것으로 나타났다. 25 $^{\circ}$ C에서도 상대적으로 낮기는 하지만 증식되는 것으로 확인되어졌다.

표 5. 분리 대표 바이러스를 이용한 배양용 세포의 선택

Strain	CHSE -214	RTG-2	RTE-2	CHH-1	EK-1	FHM	EPC
CVSD-8	<1.8	2.1	-	-	-	4.8	-
CVA-32	<1.8	2.1	-	-	<1.8	4.5	<1.8
CVJ-26	<1.8	3.1	<1.8	-	-	4.8	-
CVK-11	<1.8	2.5	-	-	-	4.5	-
CVH-3	<1.8	2.1	<1.8	-	-	4.5	-
CVC-2	-	<1.8	-	-	-	4.3	-
CVH-31	-	<1.8	-	-	-	4.5	-
CVY-46	-	<1.8	-	-	-	4.8	-
CVG-6	-	<1.8	-	-	-	4.8	-
CVHD-25	<1.8	-	-	-	-	4.5	-
CVKM-12	-	<1.8	-	-	-	4.3	-



## 5. 원인 바이러스의 대량배양 및 정제

배양적은 실험에서 20℃의 배양온도 조건에서 가장 높은 증식이 있었던 점을 기준으로 바이러스의 정제 및 분자 생물학적 연구의 진행을 위해 FHM세포를 이용한 원인 바이러스의 대량 배양을 행하였다.

75cm<sup>2</sup> tissue culture flask에 FHM세포를 단일층으로 배양한 후 대표 바이러스 strain 11종을 각각 접종하여 20℃에서 10일간 배양하고 90% 이상의 세포가 파괴된 것을 확인한 후, 4,000×g에서 20분간 원심 분리하여 배양액 내의 세포유래 입자들을 제거하였다. 얻어진 상층액에 PEG-6000을 9%(w/v) 농도가 되게 넣어 4℃에서 16시간 반응시키고, PEG 처리액을 6,000×g에서 30분간 원심분리한 후, 침전물을 TNE 완충용액(0.01 M Tris, pH 8.0, 0.1 M NaCl, 0.001 M EDTA)으로 재 현탁한 후 sucrose step gradient (50%, 25% in TNE (w/w)) 상에서 150,000×g에서 3시간 원심 분리하였다. 25%와 50%의 sucrose 층 사이에 나타난 바이러스 층을 일회용 주사기를 이용하여 모은 다음 150,000×g에서 60분간 원심 분리하여 침전물을 TNE 완충액으로 재현탁 하였다. 바이러스를 연속적인 sucrose 농도구배 (15~50%) 상에서 150,000×g, 2시간 원심 분리하여 바이러스 층을 모은 후 150,000×g, 60분간 원심 분리하여 침전물을 TNE 완충액으로 재현탁하였다. 정제된 바이러스는 TNE 완충용액에 재 현탁하여 -80℃에서 보관하면서 다음 단계의 실험에 사용하였다. 한편 순수 분리된 바이러스의 전체 단백질의 양은 Bradford 방법을 이용하여 측정하였다.

분리 정제를 통하여 얻어진 바이러스 밴드는 40% 정도의 sucrose 연속구배상에서 형성되어졌으며, 그 밀도를 계산하여 본 결과 본 바이러스의 전자 밀도는 1.34g/ml로 측정되어졌다 (그림 8).

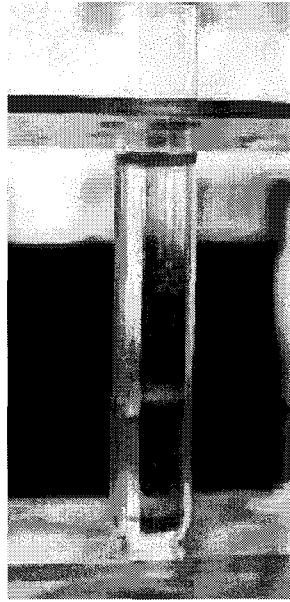


그림 8. 초원심법으로 분리·정제되어진 바이러스 밴드

## 6. 원인 바이러스의 전자현미경적 관찰

분리 바이러스의 대표주인 11종의 strain을 FHM 세포에 MOI가 0.1되게 감염시킨 후 15°C에서 24시간째 배양한 세포를 scraper로 수확하고 1000 xg에서 15분간 원심하여 얻은 펠렛을 2ml의 고정액 (0.05M cacodylate buffer, 0.02% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde)에 넣고 15초간 조사하여 고정시킨 후, 세척용 buffer (0.2M cacodylate buffer, pH 7.0)로 3회 세척 (2 min, 15,000 xg) 하고, 에탄올 탈수를 거쳐 LR white 수지 (EMS)에 넣어 microwave를 이용하여 포매하였다.

LKB ultramicrotome으로 초박절편을 제작하여 5% uranyl acetate 및 0.04% lead citrate으로 중염색하여 투과전자현미경 (TEM, Hitachi 7500)하에서 관찰하였다.

배양액으로부터 정제되어진 바이러스 정제액을 대상으로는 negative stain을 행하고 염색되어진 grid를 동일한 전자현미경으로 관찰하였다.

분리바이러스의 배양단계에서의 세포내 형태를 전자 현미경으로 관찰한 결과, 크기 75-80nm의 외경을 가진 20면체의 외막을 갖지 않는 형태로서 배양세포의 세포질 층에서 확인되어졌다(그림 8).

아울러 분리 정제된 바이러스액을 negative 염색하고 전자현미경으로 관찰한 결과, 세포를 초박절편하여 관찰한 크기와 유사한 20면체의 외피를 가지고 있지 않는 75nm 직경의 비리온을 관찰할 수 있었다 (그림 9).

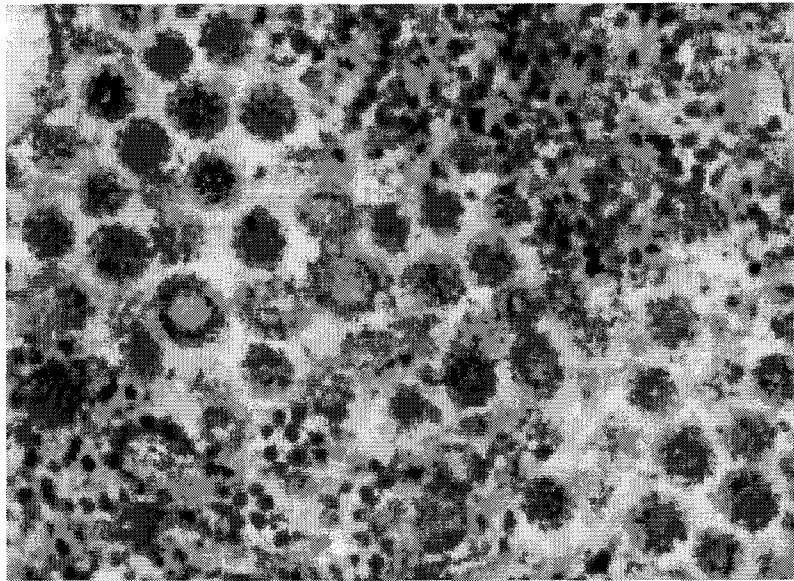


그림 8. FHM 세포내 바이러스를 초박절편하여 관찰한 형태

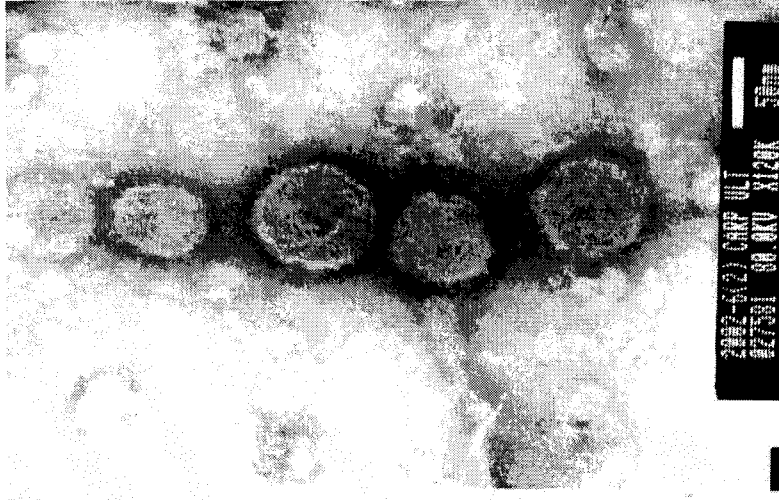


그림 9. 정제된 바이러스를 negative 염색하여 관찰한 형태

## 7. 원인 바이러스의 단백질 및 핵산 구조

순수 분리된 바이러스의 구조 단백질은 SDS-polyacrylamide gel을 이용한 전기영동법(PAGE)을 이용하여 확인되었는데, acrylamide gel의 농도는 10%이며, discontinuous SDS-polyacrylamide slab gel system (Laemmli, 1970)의 원리에 따라 행하였다. 전기영동 후, 겔은 0.1% coomassie brilliant blue R-250로 염색하여 그 결과를 확인하였다.

본 분리 바이러스의 전기영동 결과에서 크게 5종류의 polypeptide를 확인할 수 있었는데, 크기는 각각 34, 47, 70, 124, 그리고 145 KDa이었다.

바이러스 순수분리 과정을 통해 분리된 정제 바이러스로부터 Proteinase K와 1% SDS를 이용하여 핵산을 분리하였고, 분리된 핵산의 종류 및 크기를 확인하기 위해서 핵산을 DNase와 RNase로 각각 처리한 후 효소 처리하지 않은 핵산과 함께 1% agarose gel을 이용하여 전기영동을 실시하였다.

그 결과 RNase로 처리한 시료에서는 핵산이 전혀 분리되지 않았고, DNase로 처리한 핵산에서는 효소를 전혀 처리하지 않은 핵산과 같은 형태의 핵산 band를 확인할 수 있었다. 따라서 이 바이러스는 RNA를 핵산으로 가지는 바이러스로 추정되었다. agarose gel 전기영동을 행하고 확인한 결과 핵산의 크기는 약 13 kb 정도로 측정되었다.

### 제3절 감염어의 병리학적 특성 및 병원성 조사

#### 1. 자연 감염어 및 인위감염어의 병리학적 특성

자연 발병어 중에서 1999년 6월의 장성담, 2000년 6월의 창녕, 2000년 8월의 하동에서 취한 샘플은 경미한 원충류의 감염을 보였으나 세균이 분리되지 않았으며 본 바이러스 감염의 특징적 증상을 보이며 폐사하였으므로 이들 어류를 중심으로 병리조직학적 관찰을 행하였다. 이들 샘플은 양식하던 장소에 관계없이 동일한 병변을 나타내었다. 감염 실험은 2000년 6월의 창녕과 8월의 하동 잉어에서 분리한 바이러스를 이용하였다. 빈사어와 폐사어는 자연 발병어와 동일한 병변을 나타내었다.

##### 가. 신장

조혈조직의 광범위에 걸친 괴사병소가 관찰되었다. 세포는 핵 농축과 핵 파괴, 핵 팽화 및 핵 소실을 보였다. 정상의 세포보다 크기가 크고 호염기성이 강한 염증성세포들이 신장의 전체에서 보였으며, 특징적으로 세포핵이 소실되거나 한쪽으로 치우쳐 있으며 팽화되고 세포질이 투명한 세포가 다수 관찰되었다. 이들은 바이러스가 세포질에서 증식된 다음 방출된 후의 세포형태로 생각되어진다. 신장의 사구체와 세뇨관 내에도 핵이 한쪽으로 치우치고 세포질이 공포화된 세포가 다수 관찰되었다 (그림 10).

##### 나. 비장

비장은 수종화되고 전체에 걸쳐 광범위한 괴사병소와 염증성세포가 관찰되었다. 개체에 따라서는 세포질이 진하게 에오진으로 염색되는 세포가 나타났으며, 신장에서와 마찬가지로 팽화되고 세포질이 투명하며 핵이 한쪽으로 치우친 세포들이 관찰되었다. 갈색소의 침착이 보이는 것도 있었다 (그림 11).

#### 다. 간

간의 유동을 중심으로 염증성세포의 침윤과 실질세포의 괴사, 울혈이 특징적으로 관찰되었다. 염증성세포는 유동 내와 유동의 주위로 침윤되어 있었고 침윤된 염증성 세포 중에는 핵 농축을 일으키며 괴사된 것도 있었다. 유동은 확장되고 파괴되었으며 중증의 울혈을 보이는 개체가 있었다 (그림 12).

#### 라. 췌장

랑게르한스섬과 외분비부의 세포괴사가 관찰되었다. 외분비부의 관상구조는 파괴되고 acinar 세포는 괴사되어 자이모겐 과립이 흩어져 있었다. 혈관 내로는 염증성세포가 관찰되었다 (그림 13).

#### 마. 심장

심장의 심근섬유의 괴사와 심강 내로의 염증성세포의 침윤이 보였다. 심실에서는 자주 충혈이 관찰되었으며 심외막에는 심하게 염증성세포가 침윤되어 심외막염을 일으키고 있었다. 감염 실험어에 있어서는 심장에서의 이러한 증상은 약하게 나타났다 (그림 14).

#### 바. 소화관

소화관의 점막 고유층의 GALT(Gut-associated lymphoid tissue)의 세포에 공포변성과 괴사를 보이는 세포가 다수 관찰되었다. 그러나 상피층과 근육층에는 전혀 이상은 보이지 않았다 (그림 15).

이상의 결과로 본 바이러스 감염성 질병은 국소적인 숙주역을 가지고 발생되어지는 질병과는 다른 체내 전반적인 장기 또는 조직을 대상으로 그 병변을 수반하는 전신성 질병으로 판단되어졌다.



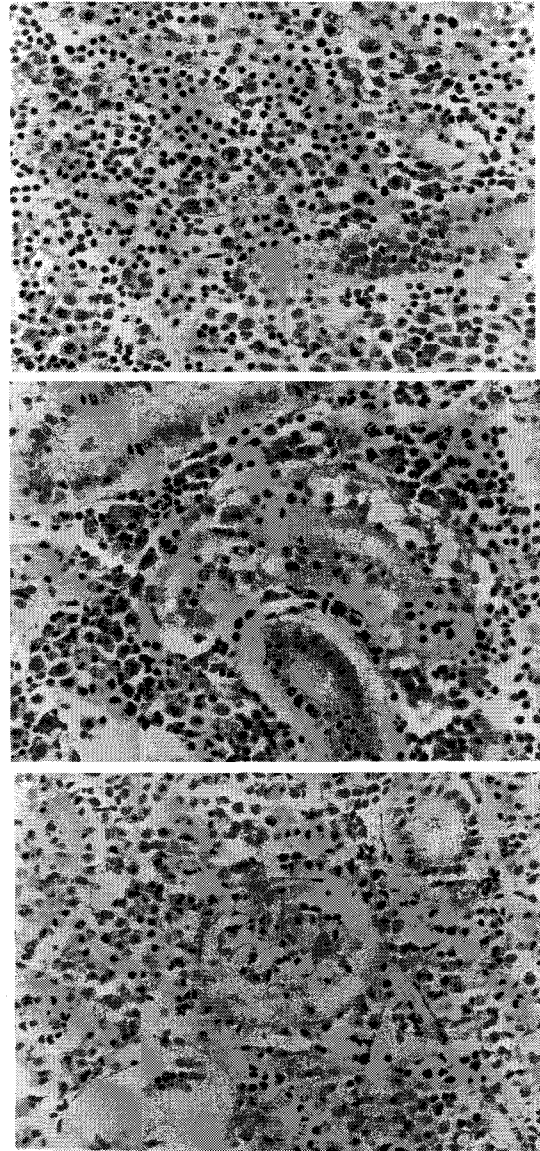


그림 10. 감염 잉어 신장의 병리학 조직학적 관찰상

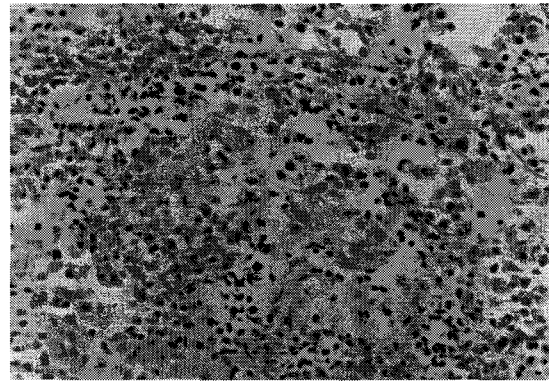
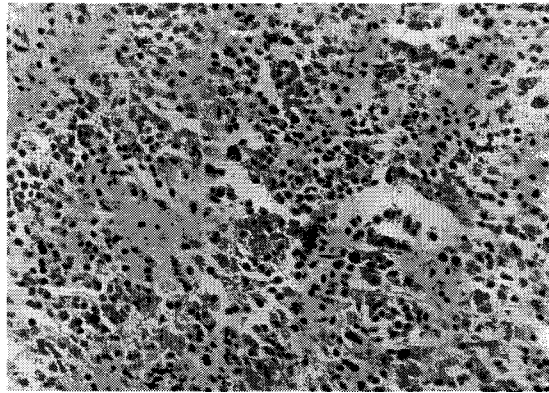


그림 11. 감염 잉어 비장의 병리학 조직학적 관찰상

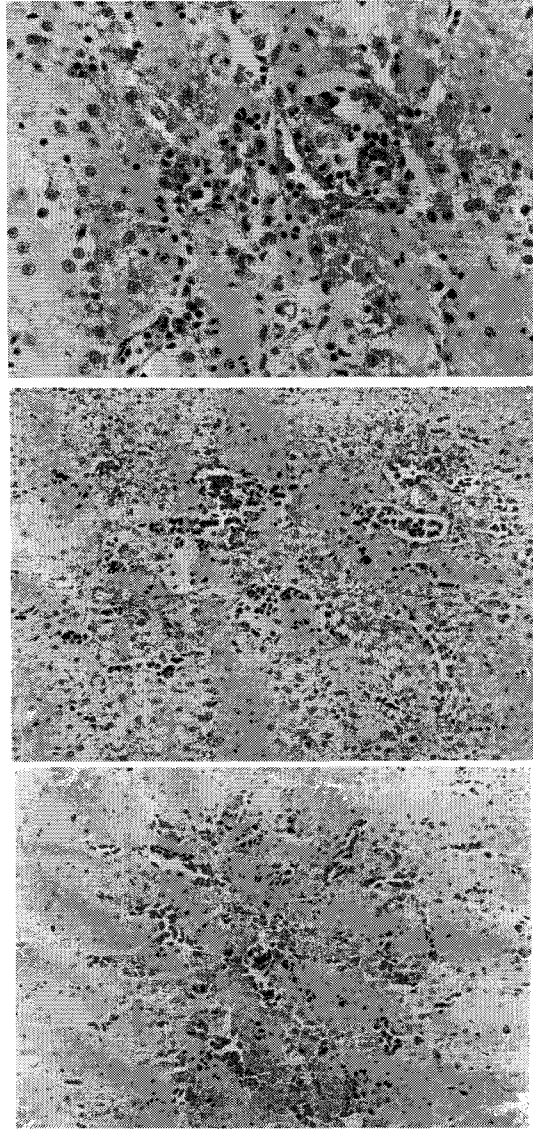


그림 12. 감염 잉어 간의 병리학 조직학적 관찰상

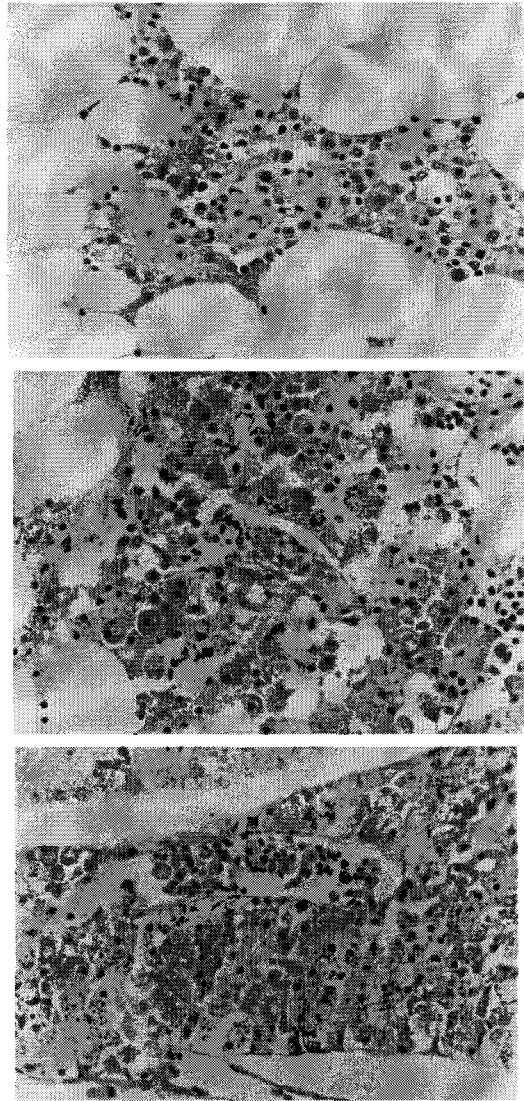


그림 13. 감염 잉어 췌장의 병리학 조직학적 관찰상

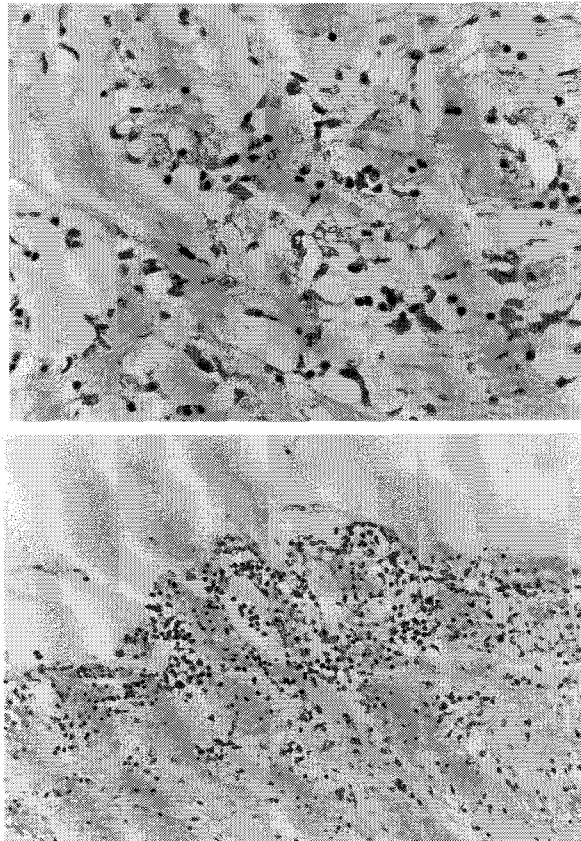


그림 14 감염 잉어 심장의 병리학 조직학적 관찰상

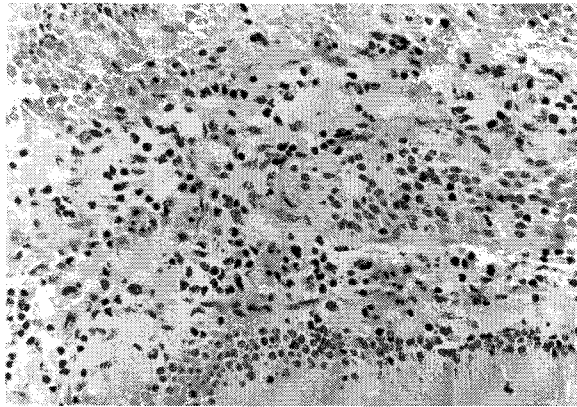


그림 15. 감염 잉어 소화관의 병리학 조직학적 관찰상

## 2. 병원성조사

### 가. 잉어류에 대한 인위감염 실험

분리되어진 바이러스가 잉어류의 폐사에 직접적인 원인으로 작용하는지를 확인하는 단계로서 잉어 및 이스라엘 잉어를 대상으로 병원성 실험을 행하였다. 잉어에서 분리되어진 대표주 CVK-1을 FHM cell에 접종하여 10일간 충분히 배양시켜 세포가 전체적으로 탈락되어지는 시점에 배양액을 얻어, 4000rpm 30분간 원심하여 세포부유물을 제거한 후 상등액을 0.45 $\mu$ m의 여과막으로 여과하여 주사용 바이러스액으로 사용하였다. 주사에 사용되어진 배양액능 FHM세포를 96well에 배양하여 접종한 후 감염가를 측정하였다. 준비 되어진 잉어바이러스 CVK-1 배양액 (LogTCID<sub>50</sub>: 4.0)을 잉어 및 이스라엘 잉어 약 20g의 어체에 각각 미당 0.1 cc 씩 근육주사하고 대조군은 MEM10을 주사하는 방법으로 인위 감염시키고 그 폐사를 15일간 관찰하였다. 잉어에 감염을 행한 실험구에서는 감염 8일째 첫 폐사어가 나타나 이후로 감염후 10일이 경과 되었을때에는 100% 사망하였다. 이스라엘잉어의 경우 감염실험구에서는 감염 7일째 첫 폐사어가 나타나 이후로 감염 9일 이후 실험 종료일까지 80%의 누적폐사율을 나타내었다 (그림 16 및 17).

### 나. 어종별 병원성조사

잉어 및 이스라엘 잉어에 높은 병원성을 나타내는 이 바이러스가 그외의 일반적인 주요 양식어류에게는 어떠한 병원성을 나타내는지 확인하기 위하여 어종별 병원성 조사를 행하였다. 잉어, 이스라엘잉어, 비단잉어, 붕어, 금붕어, 뱀장어, 넙치, 조피볼락 각 10미씩을 대상어로 하여 잉어바이러스 CVK-1 배양액 (LogTCID<sub>50</sub>: 4.0)을 각각 미당 0.1 cc 씩 근육주사하고 대조군은 MEM10을 주사하는 방법으로 인위 감염에 의한 병원성 발현 유무를 조사하였다. 실험용 수조는

100 liter 수조를 각각 사용하였으며, 매일 급이하면서 15일간 사육하였다. 사육기간 중의 수온은  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 를 유지하였다. 사육기간 중의 누적폐사 및 실험 어체 내의 바이러스감염에 의한 폐사 유무를 확인하였다. 지금까지의 실험 결과 본 분리 바이러스는 잉어, 이스라엘 잉어 및 비단잉어에서는 그 병원성이 높은 것이 확인되었으나, 붕어 및 금붕어 그리고 뱀장어에서는 실험기간 중 폐사가 일어나지 않았다. 또한 해산어류인 넙치 및 조피볼락에 근육 주사한 실험구에서도 폐사는 보이지 않았다. 지금까지의 이러한 실험 결과로 본 분리바이러스는 잉어과 어류에만 특징적으로 병원성을 발현하는 것으로 판단되었다 (표 6).



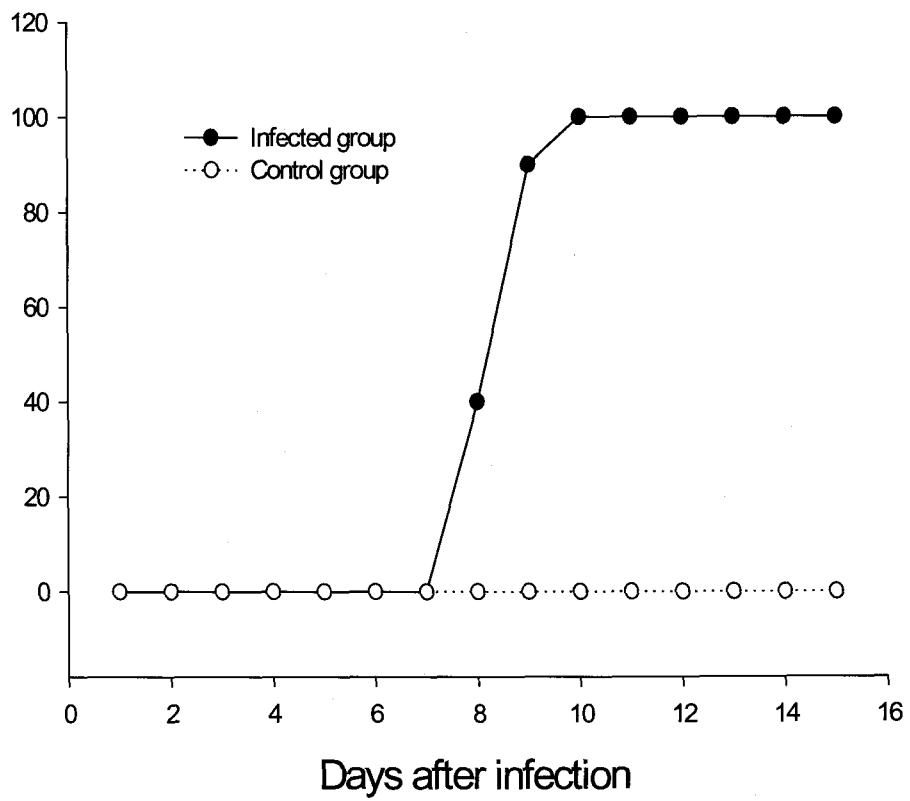


그림 16 . 잉어에 대한 CVK-1의 병원성 실험

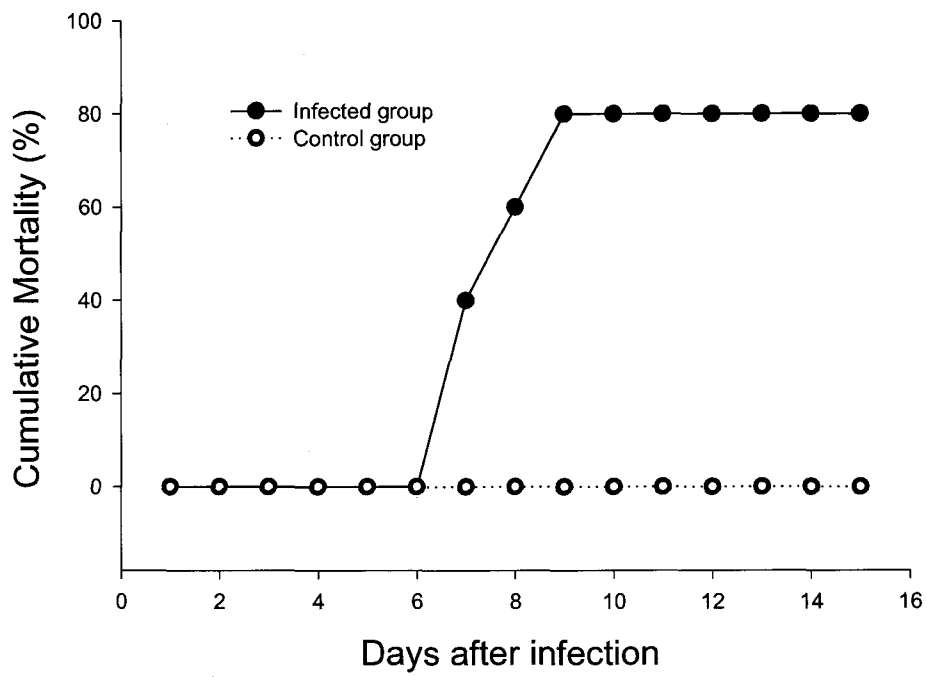


그림 17 . 이스라엘 잉어에 대한 CVK-1의 병원성 실험

표 6. 각종 어류에 대한 신종 잉어바이러스 배양액의 인위 감염에 따른 병원성

실험어종	평균중량	실험 기간	실험미수	폐사미수	폐사율
잉어	20g	30일	10미x3	26	87%
이스라엘잉어	20g	30일	10미x3	28	93%
비단잉어	17g	30일	10미x2	28	93%
붕어	15g	30일	10미x3	0	0%
금붕어	19g	30일	10미x3	2	0%
뱀장어	20g	30일	10미x3	0	0%
넙치	22g	30일	10미x2	0	0%
조피볼락	27g	30일	10미x2	0	0%

## 제4절 외국의 주요 잉어류 병원 바이러스와의 비교

### 1. 유전자 증폭(PCR)법에 의한 비교

현재까지 잉어류의 질병으로 기재돼 있지 않았던 신종 질병인 본 잉어 바이러스가 기존의 잉어바이러스와 연관성이 있는가를 비교하기 위하여 기존에 보고된 잉어 바이러스 검출에 사용되어진 진단용 PCR primer를 사용하여 확인하였다.

실험에 사용된 바이러스는 1999년부터 2002년까지 대표적인 지역의 폐사어 신장과 비장조직을 HBSS로 10배 희석한 다음 균질화시키고, 0.45 $\mu$ m 필터로 여과하여 샘플로 사용하였다 (표 7). GCRV, MABV, 그리고 SVCV 검출을 위해 바이러스에 감염된 FSP와 FHM 세포의 배양액으로부터 추출된 RNA를 70 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성시킨 후 즉시 얼음 위에서 냉각시키고, 여기에 oligo(dT)<sub>15</sub> primer와 reverse transcription reaction mixture를 넣어 전체 20 $\mu$ l 내의 조성을 50mM Tris-HCl (pH 8.3), 75mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM dNTPs, 10mM DTT, 10 units reverse transcriptase (GibcoBRL Co.)가 되게 하였다. 역전사 반응은 42 $^{\circ}$ C에서 60분간 실시하였고 70 $^{\circ}$ C에서 5분간 처리하여 잔존 효소활성을 제거하였으며, 이와 같은 처리로 얻어진 cDNA를 PCR의 주형으로 이용하였다. 한편 KHV 검출을 위해서는 바이러스에 감염된 FSP와 FHM 세포의 배양액으로부터 DNA를 추출하여 PCR의 주형으로 하였다. GCRV, MABV, SVCV 그리고 KHV 검출을 위한 진단용 primer는 바이오니아(주)에 합성의뢰하여 사용하였다 (표 8). PCR은 표 9의 조건으로 실시하였으며, PCR product는 1.5% agrose gel을 이용하여 전기영동을 실시하여 확인하였다. 확인한 결과, 전체적으로 양성대조구로서 확인된 SVCV의 경우에만 PCR product를 확인할 수 있었을 뿐 모두 음성으로 확인되어 본 잉어 바이러스가 SVCV, GCRV, KHV 등과는 다른 새로운 바이러스임을 확인할 수 있었다 (그림 18).

표. 7. PCR법에 의한 유전학적 유사성 검사를 행한 잉어 유래 분리 바이러스

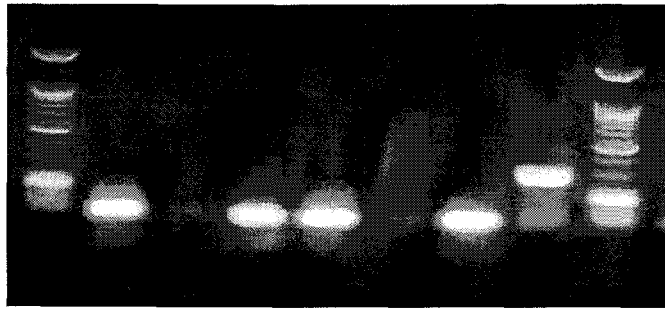
Year	Geographic origin	Host of origin	Cell line
1999	Je-Chon	Carp	FSP
1999	Je-chon	Carp	FSP
2000	Ha-dong	Carp	FHM
2001	Chon-up	Carp	FSP
2001	Chon-up	Carp	FSP
2001	Chon-up	Carp	FSP
2001	Chon-up	Carp	FSP
2001	Chon-up	Carp	FSP

표 8. RT-PCR 및 PCR에 사용되어진 GCRV, SVCV, KHV 및 MABV의 primer set과 그 증폭 cDNA(DNA)의 크기  
(Qiu *et al.*, 2001, Gilad *et al.*, 2002, Oreshkova. *et al.*, 1999, Suzuki *et al.*,1997)

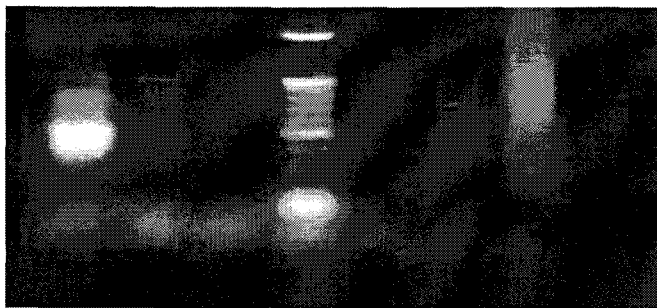
Virus	Primer(sequence)	PCR product length
GCRV	GCRV-3(CCCCGATCATCACCACGAT)	698bp
	GCRV-4(CGCGTTCGCTGATGTAAGG)	
SVCV	G2(AGAATTCTGTAAAGATGGTAT)	439bp
	G4(ATAAGCTTAGGTAACCTGCTGTCTC)	
	G5(GTATATATTGCCATCTAACTC)	
KHV	KHV9/5F(GACGACGCCGGAGACCTTGTG)	484bp
	KHV9/5R(CACAAGTTCAGTCTGTTCCCTCAAC)	
MABV	MP1(TGAGATAGACTTCTCAAGTGA)	170bp
	MP2(TGTGCACTACAGGTATGATGACTC)	
	MP3(CAACACTCTTCCCCATG)	
	MP4(AGAACCTCCCAGTGTCT)	

☒ 9. PCR amplification protocol for each pair of primers

Virus	Primer pair	Amplification				
		Denaturation (°C/min)	Denaturation (°C/sec)	Annealing (°C/sec)	Extension (°C/sec)	Final (°C/min)
GCFV	GCFV-3/ GCFV-4	95/5	94/30	50/60	72/60	72/5
				← 30cycle →		
SVCV	G2/G5 G2/G4	95/5	95/60	54/60	72/90	72/5
				95/60	72/90	
		← 30cycle →				
KHV	5F/5R	95/5	94/60	68/60	72/30	72/5
				← 40cycle →		
MAEV	MP1/MP2 MP3/MP4	95/5	95/30	56/60	72/60	72/5
				95/30	72/60	
		← 30cycle →				



1 2 3 4 5 6 7 8 9



1 2 3 4 5 6 7 8

그림 18. 본 연구 대상의 잉어바이러스는 SVCV, GCRV, KHV의 검출용 primer를 이용한 PCR 결과 모두 음성의 결과를 나타내어 기존의 잉어 바이러스와는 무관한 신종의 바이러스로 판단되어짐  
 상: SVCV primer에 대한 음성결과 (우 2번 line 양성대조),  
 하: GCRV 및 KHV에 대한 음성결과 (좌 1번 line 양성대조)



## 2. 바이러스 검출용 항혈청을 이용한 분리바이러스주의 혈청학적 유사성 검토

분리·확보되어진 잉어바이러스 계 57주를 대상으로 FHM 및 FSP 세포를 이용한 배양을 행하고, 각각의 배양 바이러스액 및 잉어봄바이러스병바이러스 (SVCV)의 배양액을 항원으로 적용하여 본 연구의 분리바이러스의 대표주를 대상으로 생산한 Mab 및 PAb 항혈청 및 잉어봄바이러스병 원인바이러스(SVCV)의 항혈청을 이용하여 96 well plate상의 ELISA를 수행하여 분리 바이러스 중의 유사성 및 혈청학적 공통성을 확인하였다. 본 연구의 수행을 통하여 1998년 이후 확보되어진 국내 잉어 대량 폐사원인 바이러스는 바이러스학 및 혈청학적으로 동일종임을 확인할 수 있었고, SVCV와 관련된 분리주는 확인되어지지 않았다

## 제5절 결과의 요약

본 장에서 행한 연구의 결과를 요약 정리하면 다음과 같다.

양식장 잉어류에서의 대량 폐사는 1998년부터 2002년에 이르기까지 끊이지 않고 지속되어져 왔다. 감염어의 유영특징은 활력을 잃고 수면의 표층으로 올라와 물살에 밀려다니며, 수중 산소가 충분하여도 입을림과 같은 행동을 한다. 감염어의 특이적 외부증상은 체표점액의 다량분비 및 체표면의 백탁증상이다. 체색은 흑화하고, 경우에 따라서는 비늘이 탈락한 개체가 관찰된다. 또한 아가미 뚜껑을 열어보면 아가미 끝부분 또는 아가미자루 부분이 괴사, 변색된 개체도 관찰된다. 감염어의 해부학적 특징은 간의 퇴색, 신장 및 비장의 이상 비대 및 전반적인 빈혈이다. 말기 병어의 경우 내장이 전반적으로 괴사, 육안적으로 보기엔 변색되고 형체가 뭉개진 상태로 나타난다. 바이러스 감염 진행에 따른 각 기관 기능의 소실 및 그에 기인된 체내 방어기능의 약화로 감염 말기에 이르면 이차적인 세균감염 유발 등으로 체강내 출혈 또는 복수, 장기내 출혈 등의 증상이 나타나기도 하였다.

대량 폐사가 일어난 각 지역에서 수집한 잉어를 대상으로 원인체를 조사한 결과 공통적으로 바이러스가 폐사어로부터 분리되어졌다. 분리된 바이러스는 IUdR 감수성이 없었으며, 에테르에 감수성이 나타나지 않아 인벨롭을 가지지않은 RNA 바이러스이었으며, pH에 대하여 내성을 나타내고 있었다. 원인 바이러스의 혈청학적 성상을 조사한 결과 기지의 분류되어진 IPNV, IHNV, SVCV, CSV, EVE, OMV 및 SRV바이러스 등의 항혈청으로는 중화되어지지 않았고, 분리 잉어바이러스 CVJ-7의 rabbit serum에 한하여 전체적으로 중화되어 최근까지 국내에 유입된 적이 없는 새로운 종으로 생각되어졌다. 분리바이러스는 FHM에서 가장 높은 감염가를 나타내고, 그 이외에 RTG-2에서 낮은 수치이기는 하지만 감염이 성립되어지는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 그 외의 세포들에서 배양되어지지

않는 성질을 가지고 있었다. 분리 바이러스는 15~25℃ 범위에서 증식가능하며, 가장 적당한 배양온도는 15~20℃의 범위인 것으로 나타났다. 분리 정체를 통하여 얻어진 바이러스의 밀도는 1.34g/ml로 측정되어졌다. 분리바이러스의 배양단계에서의 세포내 형태를 전자 현미경 관찰한 결과, 크기 75-80nm의 외경을 가진 20면체의 외막을 갖지 않는 형태로서 배양세포의 세포질 층에서 확인되어졌으며, 이는 정제 바이러스액의 negative 염색 관찰에서도 유사하게 확인되어졌다. 분리 바이러스의 전기영동 결과에서 5종류의 주요 polypeptide를 확인할 수 있었는데, 크기는 각각 34, 47, 70, 124, 그리고 145 KDa이었다. 정제 바이러스로부터 핵산을 분리하고, 분리된 핵산의 종류 및 크기를 확인한 결과 RNA를 핵산으로 가지고 핵산의 크기는 약 13 kb정도로 측정되었다.

자연 감염어 및 인위감염어의 병리학적 특성 조사한 결과 본 바이러스 감염성 질병은 국소적인 숙주역을 가지고 발생되어지는 질병과는 다른 체내 전반적인 장기 또는 조직을 대상으로 그 병변을 수반하는 전신성 질병으로 판단되어졌다. 분리되어진 바이러스가 잉어류의 폐사에 직접적인 원인으로 작용하는 지를 확인하기 위해 잉어 및 이스라엘 잉어를 대상으로 병원성 실험을 행한 결과 감염 15일 까지 100 및 80%의 누적폐사율을 나타내어 폐사의 직접적인 원인임을 확인할 수 있었다. 잉어류 이외의 붕어, 금붕어, 뱀장어, 넙치, 조피볼락을 대상으로 인위 감염을 행하였으나 폐사는 보이지 않아 본 분리바이러스는 잉어과 어류에만 특징적으로 병원성을 발현하는 것으로 판단되었다.

현재까지 잉어류의 질병으로 기재돼 있지 않았던 신종 질병인 본 잉어 바이러스가 기존의 잉어바이러스와 연관성이 있는가를 비교하기 위하여 기존에 보고된 잉어 바이러스 검출에 사용되진 진단용 PCR primer를 사용하여 1999년부터 2002년까지 대표적인 지역의 폐사어 신장과 비장조직을 조사한 결과, 모두 음성으로 확인되어 본 잉어 바이러스가 SVCV, GCRV, KHV 등과는 다른 새로운 바이러스임을 확인할 수 있었다. 아울러 폐사어로부터 분리·확보되어진 잉어바이러스 계 57주를 대상으로 잉어봄바이러스병바이러스 (SVCV)의 항혈청을 이용하여

ELISA를 수행하여 분리 바이러스 중의 유사성 및 혈청학적 공통성을 확인하였으나 1998년 이후 대량폐사 지역에서 확보되어진 바이러스는 SVCV와 관련성이 없는 동일한 혈청형을 갖는 새로운 바이러스임을 확인할 수 있었다.

## 제 3 장 질병 신속진단 기술개발

### 제1절 서론

본 연구에서는 바이러스 감염어의 진단방법을 검토하기 위하여 면역학적 진단, 분자생물학적 진단의 내용으로 원인 바이러스의 감염에 따른 질병 진단방법을 검토하였다.

본 바이러스성 질병은 지금까지 지구상에서 알려져 있지 않은 신종의 병원체에 의한 질병이라는 점에서 기존에 연구되어 있는 적용 가능한 진단방법이 전무한 실정이며, 이 바이러스성 질병의 원인으로 최초 발병 이후 수년간 연속적으로 재발되고 있는 점에서 질병의 신속하고 명확한 진단법의 개발이 급선무라는 점에서 그 진단능력이 뛰어난 면역학적 및 분자생물학적 방법을 강구하기 위하여 바이러스 특이적 단클론 항체의 제작 및 바이러스 특이적인 PCR primer의 개발을 통한 진단법을 확립하고자 하였다. 이는 현장 질병의 대처 및 건강어 생산을 위해서도 필수적이므로 본 연구에서는 1) 감염 어체내 항원검출법 2) 감염 어체 내 항체검출법을 확립하고, 3) 분자생물학적 진단방법을 검토하였다.

## 제2절 면역학적 신속진단법의 검토

### 1. Polyclonal antibody의 제작 및 이를 이용한 진단법의 검토

#### 가. Polyclonal antibody의 제작

제 2장에서 확립된 정제법을 이용하여 정제한 바이러스액 (starin CVJ-7) 0.5 ml와 Freund complete adjuvant 0.5ml를 섞어 에멀전 상태로 만든 후, 토끼의 피하에 몇 군데로 나누어 주사하였다. 4주일 경과 후, Freund incomplete adjuvant와 섞은 바이러스 정제액을 피하에 주사하고, 다시 4주일이 경과한 후 바이러스 입자만을 피하에 접종하여 5일 후 채혈하였다. 이 과정 중 booster injection 전에 토끼의 귀 정맥으로부터 1 cc의 혈액을 채혈하여 토끼 체내의 본 바이러스 대응 항체의 형성을 중화반응법으로 확인하였다. 채혈은 전채혈 하였으며 총 150ml의 혈액으로부터 60 ml의 항혈청을 얻었다. 최종 얻어진 항혈청을 이용하여 11종류의 대표 바이러스 starin을 대상으로 중화시험을 행하였다. 제작 항체의 ND<sub>50</sub>를 측정 한 결과 1 : 1280 ~ 1 : 640의 항체가 나타내었다. 아울러 제 2장에서 결과를 제시하였듯이 다른 담수 어류의 분리 바이러스인 IPNV, IHNV, SVCV, CSV, EVE, OMV 및 SRV를 대상으로 행한 중화 반응 실험 결과 본 항혈청에 따른 7종의 바이러스 중화는 확인되어지지 않은 점에서 본 연구를 통하여 얻어진 항혈청은 본 분리바이러스의 특이적인 진단에 활용되어질 수 있는 것으로 판단되어졌다.

#### 나. 효소 항체법 및 형광 항체법에 의한 바이러스 검출법의 확립

분리 바이러스 대표주인 11종의 strain을 멸균 처리된 슬라이드 글라스 위에

배양시킨 FHM세포에 MOI 0.1이 되도록 각각 접종한 후 12시간 경과 후에 100% 메틸알코올 및 acetone 원액으로 고정된 후, 간접효소항체법 및 형광항체법에 의한 분리 바이러스 11종의 strain에 대한 항원 검출능을 본 연구를 통하여 제작한 항혈청을 이용하여 조사하였다. 효소항체법에 사용되어진 2차 항체는 peroxidase conjugated rabbit IgG goat serum(시판)이며, DAB(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)를 기질로 사용하여 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 사용하여 반응을 정지시키고 일반 광학현미경을 이용하여 감염 세포 내의 적갈색으로 염색되어진 세포 내 항원 인식부위를 확인할 수 있었는데 이로써 형광항체법에 의한 세포 내 바이러스 항원 검색에도 충분히 활용되어질 수 있음이 확인되어졌다. 따라서 이를 토대로 인위 감염 어체에 대한 기관 및 장기별 바이러스 검출을 실시하였다.

#### 다. ELISA법에 의한 검출법의 확립

본 연구진에 의해 제작된 항혈청이 감염 세포내의 바이러스 항원을 효소항체법에 의하여 검출하여 질 수 있음에 착안하여 제작한 polyclonal 항체를 이용하여 신속진단방법으로서의 ELISA법의 적용가능성을 검증하였다 (그림 19). 이를 위해 우선 항원량에 따른 ELISA 검출능을 조사하였으며, 이 결과에서 얻어진 검출 가능 항원량을 기준으로 인위적 감염 어체 및 현장에서 발병된 감염 어체를 대상으로 그 효과를 판정하였다 (표 10).

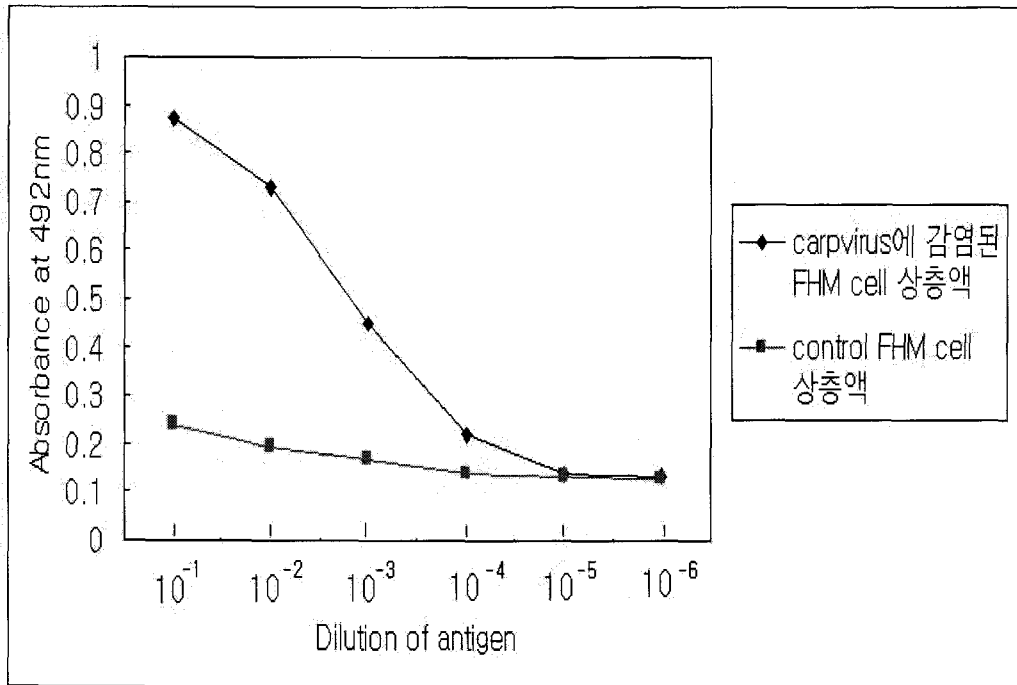


그림 19. Polyclonal 항체 이용 ELISA법에 의한 항원 검출 실험



표 10 . 인위감염 어체와 현장 발병 어체에 대한 ELISA법에 의한 항원 검출

Sample (spleen, kidney)	No. of samples	No. of samples positive in ELISA	Detection rate(%)
인위감염 어체	20	13	65
현장발병 감염 어체	20	16	80

## 2. 바이러스에 대한 monoclonal 항체의 제작

항원의 접종은 정제한 바이러스항원 300 $\mu$ l와 Freund's complete adjuvant 300  $\mu$ l를 섞어 에멀전을 만들어 BALB/c마우스 8주령 암컷 2마리에 복강주사 하였다. 3주 후에 동일항원에 Freund's incomplete adjuvant와 섞어 면역하고 최종 면역은 바이러스정제액 만을 300 $\mu$ l씩 복강에 접종하였다.

최종면역 4일 후에 Myeloma cell과 융합시켰다. Myeloma 세포의 배양은 액체질소에 보존하던 Sp2세포를 온수(44 $^{\circ}$ C)에 넣어 빨리 해동하여 얼음 위에 세워 둔다. 냉각한 증식배지(DMEM에 10%의 FBS를 첨가) 10ml에 해동한 Sp2세포를 넣어 가볍게 피펫팅하여 1600rpm에서 5분간 원심분리하고 펠렛에 10ml의 증식배지를 첨가하여 피펫팅한 후 25cm<sup>2</sup>배양플라스크에 옮겨 CO<sub>2</sub> 6.5%, 37 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 배양하였다. 세포융합 4일 전에 세포부유액중의 생세포를 trypan blue로 계수하여 100ml의 배지가 든175cm<sup>2</sup>의 배양플라스크에 1 $\times$ 10<sup>5</sup>cell/ml가 되도록 첨가한다. 2일간 배양하여 동일한 방법으로 계대하여 4 $\times$ 10<sup>7</sup>cell/100ml정도의 세포를 준비한다. 세포융합을 하기 직전에 세포는 원심관에 옮겨 1000rpm에서 5분간 원심분리하여 생세포를 계수하고 혈청을 첨가하지 않은 DMEM배지에 3회 세정하여 세포융합을 행하기 전까지 실온에 두었다. 비장세포의 준비는 뚜껑이 있는 용기에 에테르로 적신 알코올 솜을 넣고 면역시킨 마우스를 15-30초간 마취시킨다. 심장으로부터 1ml 플라스틱 주사기를 이용하여 채혈한 후, 해부하여 비장을 적출한다. 비장은 DMEM에 가볍게 헹군 후 비장에 부착하고 있는 막을 제거하고 세포를 부유시켜 스테레스메쉬에 세포를 여과하여 50ml의 원심관에 옮긴후 1500rpm에서 5분간 원심분리한다. 세포펠렛에 30ml의 혈청을 첨가하지 않은 DMEM을 첨가하여 3회 세정한후 생세포를 계수하였다. 세포융합은 비장세포 5개당 Sp2세포 1개의 비율로 혼합하여 원심분리한다. 상층액을 완전히 버리고 세포펠렛을 손으로 두드려 세포를 분산시킨다. 여기에 37 $^{\circ}$ C로 덩혀 둔 PEG 1ml를 1분간에 나누어 첨가하여 37 $^{\circ}$ C의 항온수조에서 1분간 가볍게 흔들면서 세포를 용

합시킨다. 37°C의 혈청을 첨가하지 않은 DMEM배지를 1분간 1, 1, 2, 5, 10, 20ml씩 첨가하여 1500rpm에서 5분간 원심분리하여 PEG를 제거하였다. 세포펠렛은 손으로 두드려 세포를 분산시키고 37°C로 가온해 둔 HAT배지를 10ml 첨가하여 피펫팅한 후 350ml의 HAT배지가 든 병에 세포를 부유시켜 1ml씩 24 well plates에 분주하여 CO<sub>2</sub>인큐베이터에서 배양하였다. Hybridoma의 선택배양은 세포융합 다음날 24 well plates에서 0.5ml의 HAT배지를 뽑아내고 0.5ml의 HT배지를 첨가하여 13-15일간 배양한다. 각 well에서 배양액중 100 $\mu$ l를 취해 ELISA법으로 screening에 사용한다. 항체생성양성well은 눈으로 colony를 확인하면서 한 well당 4-5개의 colony를 취해 150 $\mu$ l의 HT배지가 든 96well plates로 옮긴다. 세포가 충분히 자라면 screening하여 양성의 well만을 24well에 배양한다. 24well에서 성장시킨 세포는 96well plates에서 한계희석법에 의하여 4회 clonning한다. Clonning이 끝난 세포는 ELISA에 의해 항체생성 양성세포임을 확인한 후 175cm<sup>2</sup>플라스크에 배양한다. 배양액은 원심분리하여 세포는 10%DMSO를 첨가한 FBS에 넣어 액체질소에 보존하고 배양상층은 -20°C에서 보존하면서 Western blotting과 형광항체법에 사용하였다. Screening은 정제바이러스를 carbonate buffer에 희석하여 immunoplates에 50 $\mu$ l씩 분주하여 2시간 반응시킨 후 PBS-Tween으로 3번 세정한다. Skim milk로 30분간 blocking하여 세정 후 Hybridoma의 배양상층을 각 well에 100 $\mu$ l씩 넣어 1시간 반응시킨다. 세정 후 peroxidase conjugated mouse Ig을 3000배 희석하여 각 well당 100 $\mu$ l씩 넣고 발색이 되면 1/8 황산희석액으로 반응을 정지시킨다. 결과는 490nm의 흡광도에서 ELISA reader로 읽어 확인하였다. 생산된 항체에 대해 ELISA법으로 screening한 결과 다음의 총 27개의 1-1, 18-1, 18-2, 17-4, 27-2, 18-3, 8-3, 18-5, 15-4, 24-1, 24-4, 27-4, 1-4, 8-1, 14-2, 27-3, 27-1, 18-4, 18-2, 22-3, 1-3, 26-4, 14-3①②③, 2-1, 24-3, 26-3, 42-1과 55-1 양성클론들이 얻어졌으며 이 클론들은 대량 배양하여 액체질소에 보존하였다. 그 중 ELISA값이 높은 18-2, 42-1, 55-1을 CV18, CV42, CV55로 명명하여 이하의 실험에 사용하였다.

표 11. 잉어바이러스의 신속진단용으로 선발되어진 모노클로날항체  
CV18, CV42 및 CV55의 바이러스항원 검출능

MAb	바이러스배양액	정재바이러스	무감염세포
CV18	0.230	0.747	0.007
CV42	0.263	0.780	0.004
CV55	0.225	0.740	0.012

### 3. Monoclonal 항체를 이용한 바이러스 특이 검출법의 확립

#### 가. 형광항체법 (FAT)에 의한 신속진단법의 확립

바이러스로 폐사된 양어장에서 구한 잉어의 비장과 신장의 스타프포본에 대해 양성대조군으로 바이러스를 접종하여 CPE가 나타난 FHM세포를, 음성대조군으로는 정상 잉어의 비장과 FHM세포를 사용하여 상법에 따라 형광항체법을 실시하였다 (그림 20). 1차 항체로는 monoclonal 항체인 CV18, CV42, CV55를 사용하였고 2차 항체로는 100배로 희석한 FITC-conjugated anti-mouse rabbit serum을 사용하였다. 확인 결과, 바이러스에 감염된 비장과 신장의 스타프 포본에서 그림 21와 같이 바이러스 특이형광이 검출되었다. 한편 양성대조구인 바이러스를 감염시킨 FHM세포에서도 특이형광이 관찰되었으나 정상잉어조직과 정상 FHM 세포에서는 형광이 관찰되지 않았다 (그림 22).

#### 나. Monoclonal 항체를 이용한 ELISA에 의한 신속진단법의 확립

ELISA실험에 사용된 항원은 CVH-2000에 감염된 FHM cell 상층액을 사용하였고 대조구로는 FHM cell 상층액과 birnavirus에 감염된 FHM cell 상층액을 사용하였다. Mab는 잉어바이러스에 특이적인 단클론 항체 CV42를 사용하여 실시하였다 (그림 23). 이 결과에서 선발되어진 단클론항체는 대조구의 결과와 확실히 구별되어지는 높은 특이 검출능이 있음을 확인할 수 있었다 (그림 24).

1. 조직에서 - 항원(spleen, kidney)을 슬라이드 글라스에 imprint.  
감염된 세포에서 - virus 접종한 세포와 control 세포 항원 준비.
2. methanol or Aecetone로 고정 5-10분.
3. 실온 건조
4. 5-10% skim milk로 1시간 반응. (Blocking)
5. PBS(-)로 washing. 5분/5번
6. Primary antibody(Anti-virus MAb)로 1시간 반응. within wet box.
7. PBS(-)로 washing. 5분/5번
8. Secondary antibody(Anti-mouse IgG FITC conjugate)  
암조건 1시간반응(1:100).
9. PBS(-)로 암조건에서 washing. 5분/5번
10. Mounting. (PBS : Glycerol = 1:1)
11. 형광현미경으로 관찰.

그림 20. MAbCV42를 이용한 형광항체법 (Indirect fluorescent antibody technique)

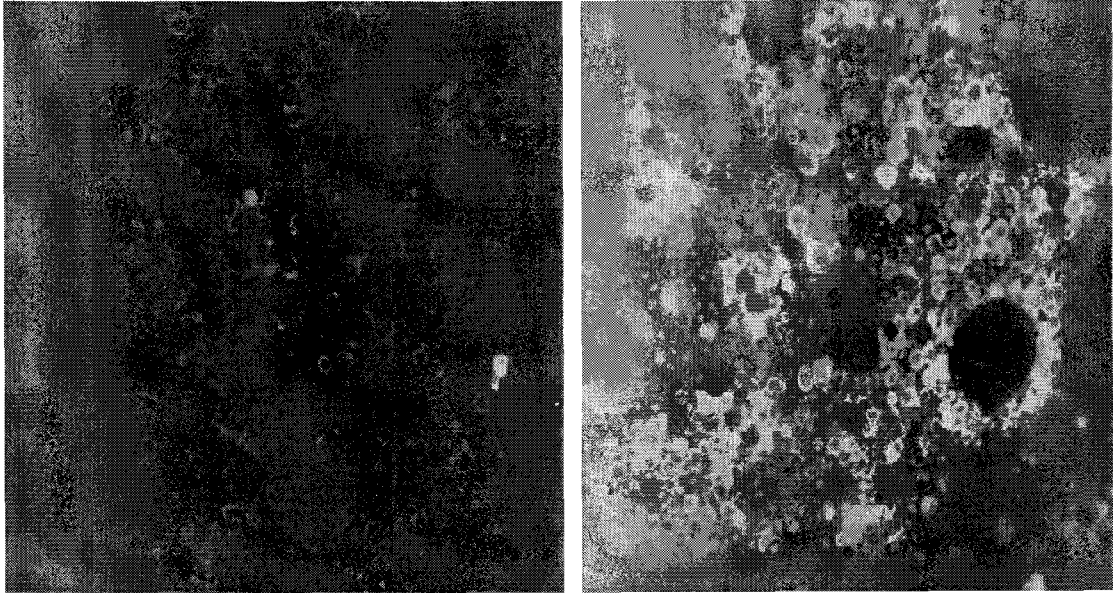


그림 21. 비장stamp 표본과 CV42와의 형광항체반응.

좌:정상잉어, 우:바이러스감염잉어

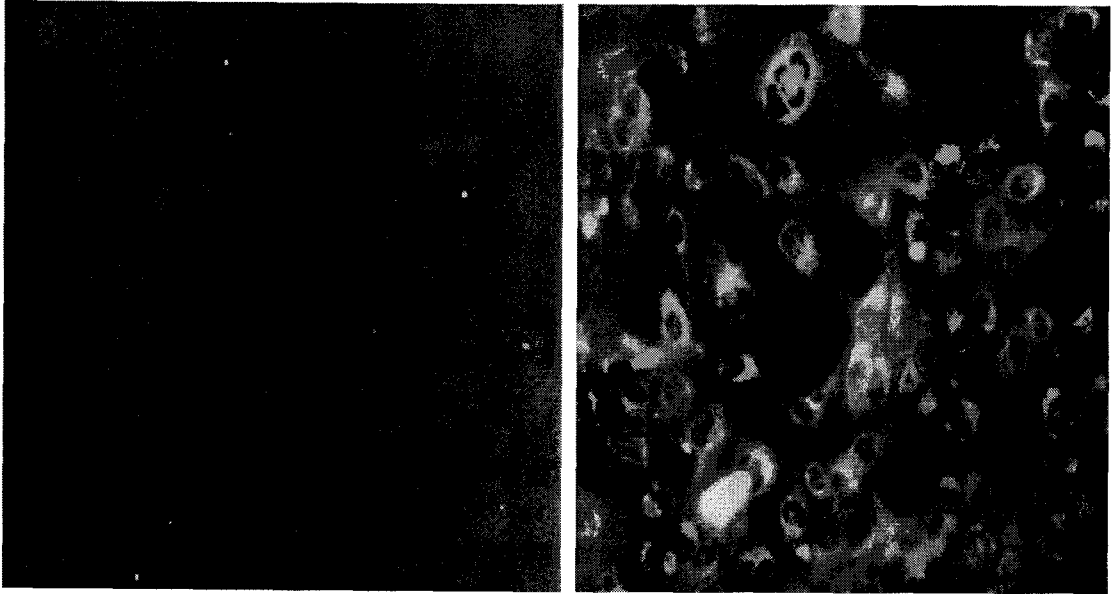


그림 22. FHM cells에서의 CV42를 이용한 형광항체반응.

좌:정상FHM cell, 우: 바이러스접종 FHM cells



1. 항원을 coating buffer로 희석하여 96well에 100ul 접종하여 1시간 반응.
2. PBS-Tween 20으로 washing. 5분/5번
3. 5-10% skim milk 50ul로 1시간 반응. (Blocking)
4. PBS-Tween 20으로 washing. 5분/5번
5. Primary antibody(Anti-viurs MAb) 50ul로 1시간 반응.
6. PBS-Tween 20으로 washing. 5분/5번
7. Secondary antibody (Anti-mouse IgG peroxidase conjugate) 1시간반응(1:3000).
8. PBS-Tween 20으로 washing. 5분/5번
9. 0.1M citric acid, 0.2M phosphate, DW, O. phemylenediamine, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-50ul로 발색
10. stop solution 50ul로 반응 정지.
11. microtiter plate reader로 492nm에서 측정.

그림 23. MabCV42를 이용한 ELISA법 (Enzyme linked immunosorbent assay)

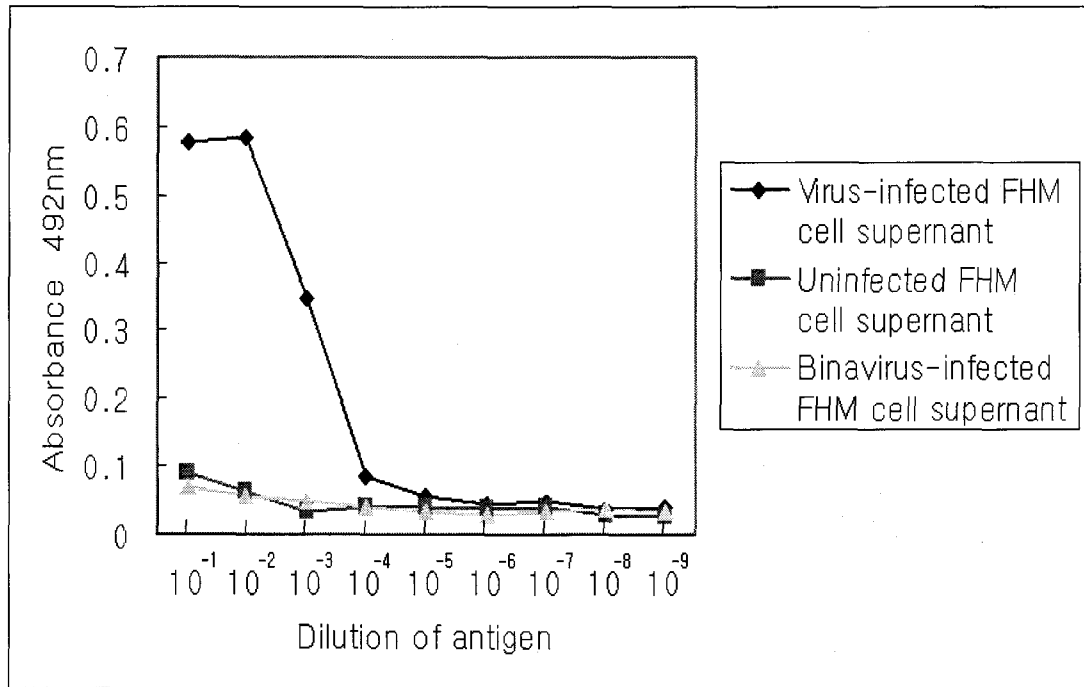


그림 24. 단클론 항체를 이용한 ELISA법의 잉어바이러스 항원 특이적 검출능

#### 4. 혈중 바이러스항체 검출을 위한 ELISA법의 확립

##### 가. 잉어의 IgM의 정제

바이러스가 감염되지 않은 잉어의 미부정맥에서 채혈하여 4°C에서 하룻밤 방치한 후에 원심분리하여 혈청을 취했다. 혈청은 황산암모늄에 의한 염석법으로 정제하였다. 혈청에 2배량의 PBS를 첨가하여 총량의 45%농도가 되도록 황산암모늄을 첨가하여 얼음이 든 용기 안에서 30분간 교반한 후, 1000×g에서 15분간 원심분리하였다. 침전물에 45%의 황산암모늄을 첨가하여 수세한 후에 재 원심하고 침전액에 원래의 혈청 양만큼 PBS를 첨가하여 저속원심분리하여 상층액을 취한 다음 최종농도가 40%가 되도록 황산암모늄을 다시 첨가하여 얼음이 든 용기에서 30분간 교반하여 원심분리한 후 상층액을 버리고 PBS를 첨가하였다. 이것을 투석막에 넣어 PBS에서 하룻밤 투석한 것을 잉어 IgM의 정제액으로 사용하였다. 정제한 IgM을 SDS-PAGE로 전기영동하여 정제액의 순도와 단백질의 분자량을 측정하였다(그림 25). 확인한 결과 2 개의 주요한 밴드가 보였으며 각각의 분자량은 Heavy chain이 81 kDa, Light chain이 39 kDa이었다.

##### 나. 잉어의 IgM monoclonal 항체의 제작

정제한 잉어의 IgM을 이용하여 BALB/c마우스에 3회 면역 실시하였다. 우선 250 $\mu$ l의 정제액에 대해 1회째 면역에는 Fleund's complete adjuvant를, 2회 면역에는 Fleund's incomplete adjuvant를 각각 250  $\mu$ l씩 섞어 에멀전을 만들어 2주일 간격으로 3회 복강 내에 주사하였으며 최종면역은 IgM 정제액 만을 복강에 주사하였으며, 최종면역 4일 후에 비장을 적출하여 Sp2/0-Ag14와 PEG로 융합하였다. 세포는 HAT배지에 혼합하여 24 well에 1 ml씩 분주하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서

배양하다가 4일 후 배지의 반을 HT배지로 교환하였다. 배양시작 13일 후에 24 well로부터 배양액을 취하여 ELISA로 screening을 실시, 양성반응을 보이는 각 well에서 3~6개의 clone을 취하여 96 well에 배양하였다. 세포가 수가 증가하였을 때 2차 screening을 실시하여 양성클론을 clonning하였다. 각각의 클론의 배양 상층액을 취하여 제작된 MAb가 인식하는 항원부위를 western blotting으로 검사하였다. 확인 결과 여기에서 11개의 양성클론을 얻을 수 있었으며, 33A1은 heavy chain을 나머지의 9A1, 11A1, 17A1, 18A1, 21A1, 23A1, 24A1, 25A1, 27A1, 28A1은 light chain을 인식하고 있었다 (그림 26).

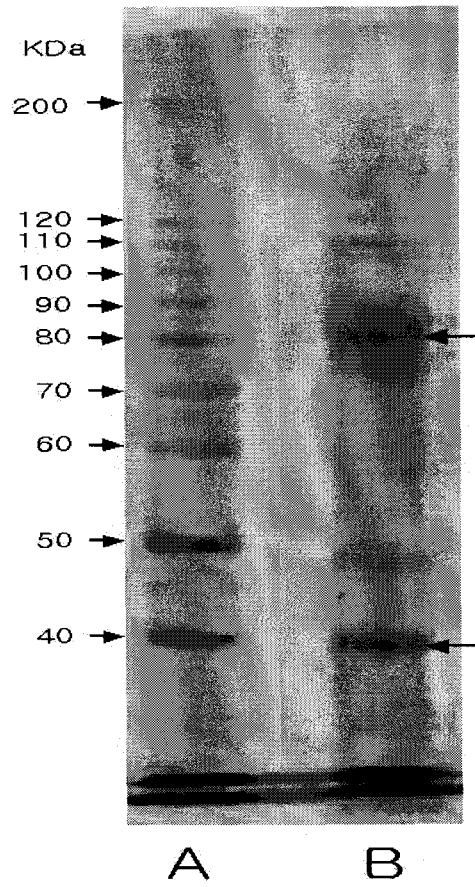


그림 25. 잉어의 IgM 정제액의 SDS-PAGE 상  
 A: Marker, B: 정제 잉어 IgM:

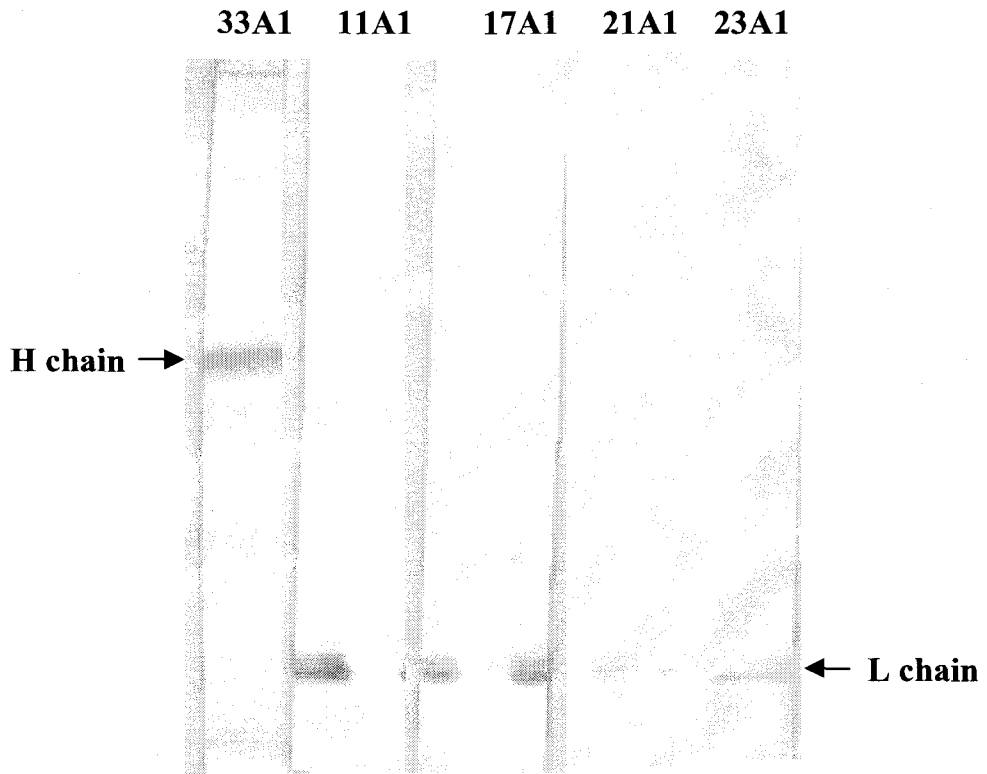


그림 26. 잉어의 IgM으로 제작된 Monoclonal 항체의 Western Blotting상

다. 감염어 혈중 바이러스항체 검출을 위한 ELISA법

잉어로부터 분리되어진 바이러스의 배양액을 항원으로 적용하여 감염 잉어의 혈청내 바이러스항체를 검출하기 위한 방법을 검토하였다. 본 연구 통하여 얻어진 잉어의 IgM에 대응하는 모노클로날항체를 2차항체로 적용하여 간접 ELISA법으로 검출감도를 확인하고 감염음성의 대조 잉어혈청에 대비하여 양성의 반응을 나타내는 결과를 도출해내었다.

실험에 사용되어진 1차 실험혈청은 감염어로 확인되어진 어류의 혈청, 인위감염을 통하여 획득한 어류의 혈청, 무감염어로 확인된 잉어의 혈청 및 실험을 통하여 확보한 SPF 잉어(2년생)의 혈청을 사용하여 검토를 행하였다.

실험어는 본 연구실에서 관리하고 있는 SPF (specific pathogene free) 잉어(전장:38~42cm)에 바이러스를 면역시켜 양성 control 혈청으로 사용하였으며, 여수(본 연구실), 대구(2002년 6월), 의성(2002년 5월), 진주(2002년 5월), 정읍 I(2002년 6월), 정읍 II(2002년 4월)에서 채집한 잉어의 혈청을 대상으로 바이러스에 대한 항체 검출을 실시하였다. 아울러 이들 대상 채집어류는 임상적 증상 및 바이러스의 감염유무를 병행하여 확인하였다. 실험에 사용한 바이러스는 2000년 경북 잉어 양식장에서 채집한 병어로부터 분리한 바이러스주인 CVH-2000과 2001년 전라북도 잉어 양식장에서 채집한 병어로부터 분리한 바이러스주 CVJ-2001를 사용하였다. 정상어체내 바이러스 접종에 의한 체내 면역을 유도하기 위하여 Freund's complete Adjuvant (Difco)와 CVH-2000주를 같은 양으로 섞어 500ul를 복강에 1차 면역시키고, Freund's incomplete Adjuvant (Difco)와 CVH-2000주를 사용하여 2차 면역시켰다. 2주후 CVH-2000주로 최종 면역시키고, 잉어의 혈청을 분리하여 ELISA법을 이용한 잉어바이러스에 대한 특이반응을 확인하였다. 대조구는 같은 방법으로 PBS로 면역시켰다. 혈청분리를 위해 1ml 주사기를 사용하여 잉어의 미부정맥에서 혈액을 채취 후 실온에서 2시간 동안 혈액 응고 과정을 거친후 원심분리(10000g, 10분, 4℃)하여 상층액을 채취하여 실험 전

까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 이들 실험 잉어를 대상으로 잉어 IgM33A1 항체를 사용하여 혈중내 바이러스 관련 항체를 검출하기 위한 ELISA를 실시하였다 (그림 27).

ELISA법을 이용한 신종잉어 바이러스에 대한 항체 검출실험에서 CVJ-2001주를 coating buffer로 5배와 10배 희석하여 ELISA 실험을 한 결과 유사한 결과를 얻을 수 있었으며, 다른 항원 CVH-2000주와 CVJ-2001주를 사용하여 coating buffer로 10배 희석하여 실험을 한 결과에서도 유사한 결과를 얻을 수 있었다 (그림 28 및 29). 항원 부착시간을  $4^{\circ}\text{C}$  overnight, 실온에서 1시간으로 실험해 본 결과 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 본 연구에서 항원을 10배 희석하여 실온에서 1시간 반응시켜 사용했을 경우 경제적, 시간적으로 최적 조건인 것 같으며 CVH-2000주와 CVJ-2001주 모두 항체검출용 항원으로 사용하기에 적합한 것 같다. 다양한 지역에서 양식되어지는 잉어에서 신종잉어 바이러스에 대한 항체 검출 결과에서 항체 검출결과와 바이러스에 감염된 어류의 임상적 증상, 그리고 세포변성효과 (CPE)를 비교해 본 결과 상관관계를 보였다 (표 12). 따라서 이 방법은 신종 잉어 바이러스에 대한 항체 검출을 위한 방법으로 유용하게 쓰일 것 같다.



1. coating buffer로 10배 희석한 바이러스액 (CVH-2000 또는 CVJ-2001주) 100ul를 96well 플레이트의 각 well에 분주하고, 실온에서 1시간 반응시킨다.
2. PBS-Tween 20으로 수세. 5분/5번
3. 5-10% skim milk 50ul로 1시간 반응시킨다.
4. PBS-Tween 20으로 수세. 5분/5번
5. 검사용 잉어혈청은 PBS로 2<sup>o</sup>희석시리즈를 제작하여 100ul, 1시간 반응시킨다.
6. PBS-Tween 20으로 수세. 5분/5번
7. 1차항체 (단클론 잉어 IgM33A1) 50ul로 1시간 반응시킨다.
8. PBS-Tween 20으로 수세. 5분/5번
9. 2차항체 (Anti-mouse IgG peroxidase CONJUGATE) 50ul, 1시간(1:3000배).
10. PBS-Tween 20으로 수세. 5분/5번
11. 발색(0.1M citric acid, 0.2M phosphate, O-phenylenediamine, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 50ul, 10분
12. stop solution 50ul로 반응을 정지
13. microtiter plate reader로 492nm에서 측정.

그림 27. 잉어 IgM33A1 항체를 사용한 혈중바이러스항체검출용 ELISA법

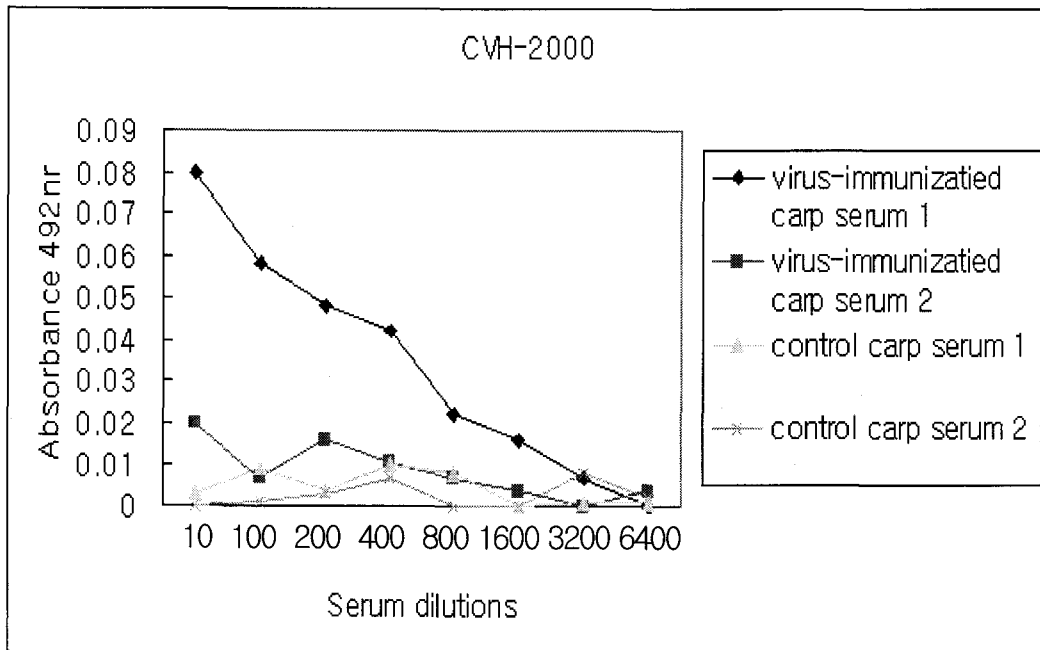


그림 28. CVH-2000 면역에 따른 잉어 체내 생성 항 바이러스항체의 ELISA법에 의한 검출

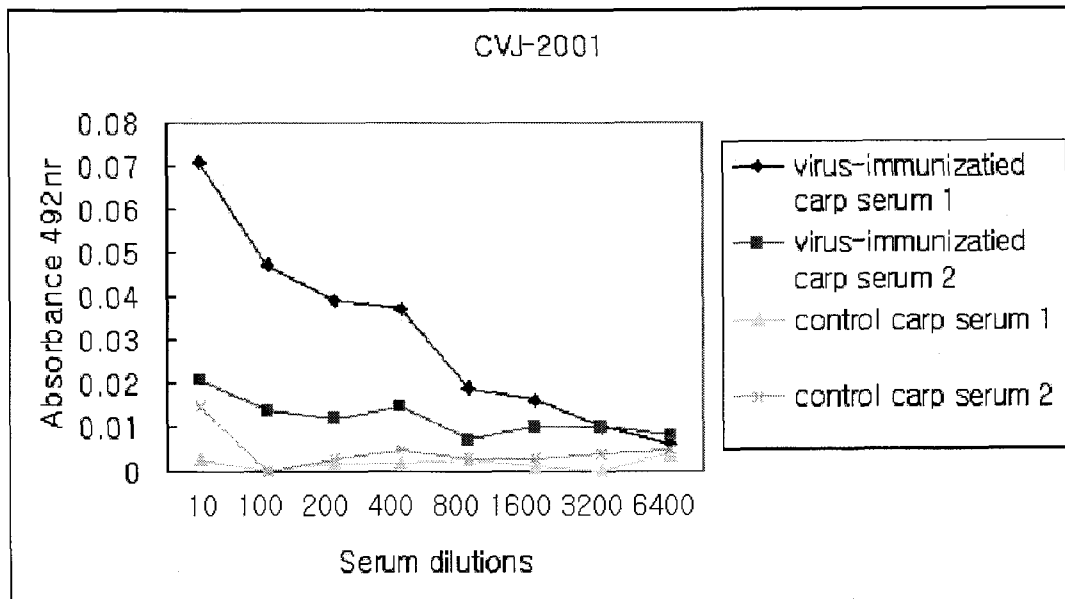


그림 29. CVJ-2001 면역에 따른 잉어 체내 생성 항 바이러스항체의 ELISA법에 의한 검출

표 12. 잉어 혈중 항체 검출 ELISA법에 의한 감염어의 검색 비교

Geographic areas	Clinical signs		Cytopathic effect result		Detection of the carp Antibody against virus	
Yosu carp 1. 2 (Positive control)	-	-	+	+	+	+
Yosu carp 1. 2 (Negative control)	-	-	-	-	-	-
Yosu carp 1. 2	-	-	+	+	+	+
Daegu carp 1. 2	+	+	+	+	+	+
Uiseong carp 1. 2	+	+	+	+	+	+
Cinju carp 1. 2	+	+	+	+	+	-
Jongeup I carp 1. 2	-	-	+	+	-	-
Jongeup II carp 1. 2	-	-	NT		+	-

- : Negative, + : Positive, NT : Not Test.

### 제3절 PCR을 이용한 진단법의 검토

잉어 바이러스 분리 대표주인 CVK-11을 순수 분리하여 이로부터 바이러스의 핵산을 추출한 후 바이러스의 cDNA clone을 다수 확보하여 바이러스의 유전자에 대한 정보를 얻고, 이들 염기서열을 기초로 하여 CVK-11에 특이적인 primer를 합성하고 이를 감염시료에 적용하여 PCR법에 의한 바이러스의 진단에 적용하고자 다음의 연구를 진행하였다. 연구초기 부터 계속해서 본 잉어 바이러스의 핵산에 대한 순수 분리작업은 계속적으로 진행되어 왔으며 순수 분리 후 확보된 바이러스 유래의 cDNA는 random primer를 이용하여 RT-PCR 과정을 수행하였는데, 이는 현재 본 바이러스와 유사한 잉어 바이러스 질병과 그 원인체에 대한 보고가 전무한 상태에서 대량 배양이 가능한 주화세포가 없다는 현실적인 문제와 연결되어 핵산 자체에 대한 분석 작업이 용이하지 못한 관계로 선택할 수 밖에 없는 과정이었다. 지속적인 random primer를 이용한 RT-PCR 과정을 통해 random primer의 경우, RAPD용 random primer (Operon)를 선정하였는데, 본 연구에서는 No. 1 (5'-CAGGCCCTTC-3'), No. 2 (5'-TGCCGAGCTG-3'), No. 3 (5'-AGTCAGCCAC-3'), No. 4 (5'-AATCGGGCTG-3'), No. 5 (5'-AGGGGTC TTG-3'), No. 9 (5'-GGGTAACGCC-3') 그리고 No. 11 (5'-CAATCGCCGT-3')이 적용되었는데 (그림 30), 특히 No. 9와 11이 타 primer에 비해 비교적 효과적으로 사용되었다. 이 primer들을 이용하여 RT-PCR을 수행하고, 1% agarose gel 전기영동으로 확인한 결과, 그림 31과 같이 바이러스 순수 분리 시에 회수된 각 분획별로 몇 종류의 PCR products를 확인할 수 있었는데 특히, sucrose 20~30% 구간에서 회수된 분획을 primer No. 9으로 증폭했을 때, 그리고 sucrose 30~40% 구간에서 회수된 분획을 primer No. 11으로 증폭했을 때에 0.5~1 kb의 효과적인 크기의 product를 확보할 수 있었다. 그러나 이와 같이 여러 개의 PCR products가 생기는 이유는 사용된 primer가 random primer이기 때문이며, 따라서 상기의 product들의 유래를 확인하기 위해서는 각 product들을 T-easy vector system을

이용하여 direct cloning한 다음, 선별과정을 통해 확인된 재조합 clone의 T-easy vector 내에 존재하는 insert를 확인할 수 있었다. Alkaline lysis method에 의해 추출된 plasmid DNA를 T-easy vector 내에 존재하는 Eco RI restriction enzyme으로 digestion한 결과 그림 32에서처럼 size가 다른 여러 insert가 있음을 확인하였다. 이것은 그림31에서 보였던 PCR product들이 T-easy vector에 클로닝 되었음을 보이는 것으로 이들이 바이러스 genome으로부터 유래하였는지 알아보기 위하여 염기서열의 결정 및 분석 작업을 계속해서 실시하였다.

본 연구기간 동안 다수의 잉어 바이러스 유전자 clone들을 확보하였고, 이 재조합 clone들의 염기서열 분석 결과를 토대로 homology를 가지는 바이러스 유전자를 검색한 결과, retrovirus, flavivirus 등의 RNA 바이러스와 foxvirus, iridovirus 등과 같은 DNA virus에 대해 비교적 높은 homology를 나타내었다. 특히, clone cvk N4는 iridovirus에 대해 95% 이상의 homology를 (그림 33), 그리고 clone cvk N8은 foxvirus에 대해 95% 이상의 homology를 나타내었으며 (그림 34), cvk 9\_9 clone은 retrovirus related sequence, 즉 pol polyprotein(reverse transcriptase)과 아주 높은 homology를 보였다 (그림 35). 한편, 이에 비해 clone cvk N2는 *Oncorhynchus masou*, Kokanee salmon, Cherry salmon 등의 부분 DNA와 90%정도의 homology를 나타냄으로써 어류 주화세포 유래임을 알 수 있다는 점이 본 연구의 신뢰성을 더해 주고 있다 (그림 36).

이상의 결과를 바탕으로 잉어 바이러스에 대한 보다 신속하고 효과적인 진단법 개발을 위해 상기의 clone들 중에서 cvk 9\_9 clone의 염기서열을 활용하여 진단에 필요한 PCR primer를 cvk 9\_9 203F (5'-TCCACCATCGACAGTTGTTG-3')와 cvk 9\_9 673R (5'-GGTTTGTGCCACTGGTAAGA-3')로 각각 디자인하여 제작하고 (그림 37), 바이러스에 감염된 잉어와 감염되지 않은 건강한 잉어의 조직에서 RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행하였다 (그림 38).

1 2 3 4 5 M

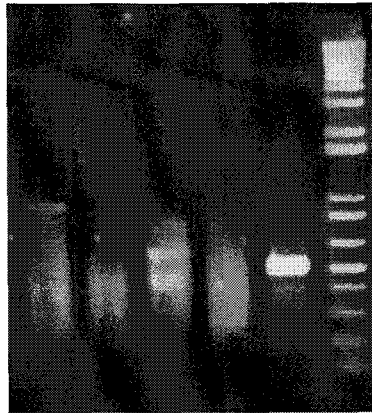


그림 30. Random RT-PCR products electrophoresis on 1% agarose gel

- 1; RAPD No.1 (5'-CAGGCCCTTC-3') primer
- 2; RAPD No.2 (5'-TGCCGAGCTG-3') primer
- 3; RAPD No.3 (5'-AGTCAGCCAC-3') primer
- 4; RAPD No.4 (5'-AATCGGGCTG-3') primer
- 5; RAPD No.5 (5'-AGGGGTCTTG-3') primer

M 1 2 3 4 5 6

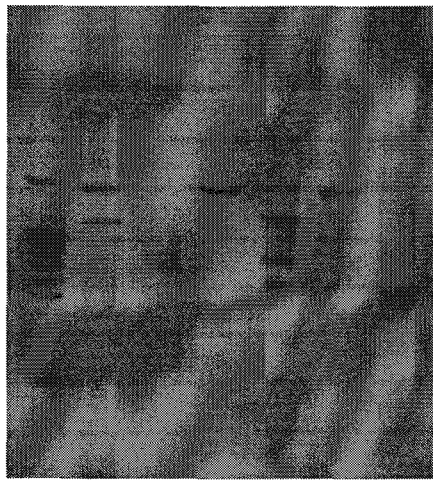


그림 31. The various results of RT-PCR amplification of carp viral gene with RAPD primer No. 9 and 11. M; 1 kb DNA marker, 1 - 6; random amplified products.



1 2 3 4 5 6 7 8 M 9 10 11 12 13 14 15 16

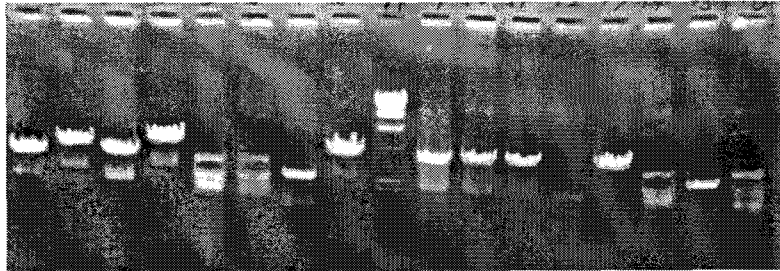


그림 32. Results of Spe I digested plasmids from the recombinant clone on 1% agarose gel. M; 1 kb DNA marker, 1 - 16; Spe I digested plasmid

Chilo iridescent virus complete genome  
Length = 212482 Score = 40.1 bits (20), Expect = 3.1 Identities = 20/20  
(100%)

Query: 205 atttaaaaataattcttctt 224  
|||||  
Sbjct: 100669 atttaaaaataattcttctt 100650

Score = 32.2 bits (16), Expect = 752 Identities = 19/20 (95%)

Query: 119 tttttaaataagtttgattt 138  
|||||  
Sbjct: 43315 tttttaaataatgttgattt 43296

Score = 32.2 bits (16), Expect = 752 Identities = 16/16 (100%)

Query: 205 atttaaaaataattct 220  
|||||  
Sbjct: 121285 atttaaaaataattct 121300

그림 33. Identification of cvk N4 clone with Blast search.

Fowlpox virus, complete genome  
Length=288539 Score=42.1 bits(21), Expect=0.78 Identities=24/25(96%)

Query: 77 tattatggatgatgcagaaaaatta 101  
|||||  
Sbjct: 172688 tattatggataatgcagaaaaatta 172664

Score = 32.2 bits (16), Expect = 752 Identities = 19/20 (95%)

Query: 437 ataaaaatttaagttaata 456  
||||  
Sbjct: 26508 ataataatttaagttaata 26527

Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus, complete genome  
Length=236120 Score=42.1 bits(21), Expect=0.78 Identities=21/21 (100%)

Query: 566 taaaaaatctaataataaaaa 586  
|||||  
Sbjct: 126655 taaaaaatctaataataaaaa 126675

Score = 36.2 bits (18), Expect = 48 Identities = 18/18 (100%)

Query: 91 cagaaaaattaaatgaat 108  
|||||  
Sbjct: 52923 cagaaaaattaaatgaat 52906

Score = 36.2 bits (18), Expect = 48 Identities = 18/18 (100%)

Query: 97 aattaaatgaatatttag 114  
|||||  
Sbjct: 142476 aattaaatgaatatttag 142493

Score = 32.2 bits (16), Expect = 752 Identities = 16/16 (100%)

Query: 97 aattaaatgaatattt 112  
|||||  
Sbjct: 55257 aattaaatgaatattt 55242

그림 34. Identification of cvk N8 clone with Blast search.

Identities = 66/227 (29%), Positives = 116/227 (51%), Gaps = 7/227 (3%)

Query: 15 PEGLRSNVIQWGHCSNVACHPGVNRTKFFVKQFVWPLMARYIHSFVLACSVCATGKTSN 74

P R +I+ H N++ H G +++ +WWP M + I SF+ C+VC N

Sbjct: 802 PSRERYKLIKEAH--NIS-HAGREAVLLKIQENYWWPKMKKDISSFLSTCNVCKMVNPLN 858

Query: 75 RPPDGLLQPLPVPSRPWSHIALDFITALLPSQGNTVVLTVVDRFSKAAHFIPKLPKPSAK 134

P Q + P++P+ +D+I L PS+G VL VVD + P K ++K

Sbjct: 859 LKPIS-PQAIHVHTKPFDFKFMFYMDYIGPLPPSEGYVHVLVVVDAATGFTWLYP-TKAQTSK 916

Query: 135 ETALTVIDHVFRLHGLPTDVVSDRGPQFVSKFWREFCRLXATISLSSGFHPQSNGQTER 194

T + V+++ L +P + SD+G F S+ + ++ + + S+ +HPQS+G+ ER

Sbjct: 917 AT-IKVLNHLTGL-AIPKVLHSDQGSFTSEFAQWAKERNIQLEFSTPYHPQSSGKVER 974

Query: 195 ANQDLERVLRLVSKNPSSWSQQLSMVEYAHNTLPISATDHLHDHSLI 241

N ++++L L+ P W +S V+ A N + +T + H L+

Sbjct: 975 KNSEIKKLLTKLLVGRPLKWNLISSVQLALNTHVVSTKYTPHQLM 1021

그림 35. Comparison of amino acid sequence deduced from the cvk9\_9 clone and retrovirus polymerase protein. Query; cvk9\_9 clone, Subject; pol gene [Feline foamy virus]

Oncorhynchus masou DNA for repeat sequence Hpa I  
 Length=211 Score = 89.7 bits(45), Expect = 4e-15 Identities = 60/65(92%)

```
Query:384 gatcgaatccccgagctgacgaggtaaaaatctgtcattctaccacttagcaaggcagtt 443
          |||
Sbjct: 60 gatcgaatccccgagctgacaaggtaaaaatctgtcattctgcccctgaacaaggcagtt 119

Query: 444 aacc 448
          |||
Sbjct: 120 aacc 124
```

Kokanee salmon DNA, Hpa I repetitive sequence  
 Length=219 Score = 58.0 bits(29), Expect = 1e-05 Identities = 32/33(96%)

```
Query: 386 tcgaatccccgagctgacgaggtaaaaatctgt 418
          |||
Sbjct: 66 tcgaatccccgagctgacgaggtacaaatctgt 98
```

Cherry salmon DNA, Hpa I repetitive sequence  
 Length=224 Score = 58.0 bits(29), Expect = 1e-05 Identities = 65/77(84%)

```
Query:348 ggtttgagtgttgggccagtaaccgaaaatttgctggatcgaatccccgagctgacgagg 407
          |||
Sbjct: 32 ggtagagcggttgactagtaaccgaaaggttgcaagttcgaatccccgagctgacaagg 91

Query: 408 taaaaatctgtcattct 424
          ||
Sbjct: 92 taaaaatctgtcattct 108
```

그림 36. Identification of cvk N2 clone with Blast search.

GGGTAACGCCAACATGAAACAATCAACATGACGTAACATGAGACGAGCAGGAAACAGTGCATTTATGAACCGTG  
ACAGTACCCCTCCTCCTAGTAGACGCCTCCTGGCGTCCCCAGACTCCCTTACCTGTTGAGTGTAATAATCGATA  
AGAGAGTGATCCAGGTGATCCGTAGCTGATATAGGTAATGTATTGTGGGCGTACT**TCCACCATCGACAGTTGTT**  
**GGCTCCAGGAGGAAGGATTCTTGGAGACCAGACATCGCAACACCCTTTCCAAATCTTGGTTGGCTCTCTCGGTT**  
TGACCATTGCTCTGGGGATGAAACCCTGAGGACAGACTTATAGTCGCTCACAACAATCTACAAAACCTCAGGCCA  
AAATTTGGACACAAACTGGGGTCCCCTGTCCGAAACCACGTCTGTCCGGAGGCCATGTAAACGAAAGACATGAT  
CTATGACAGTCAACGCTGTCTCCTTGGGTGAGGGTAATTTGGGCAAGGAATAAAGTGGGCCGcCTTCGAGAAC  
CGGTCCACCACGGTCAAAACTACCGTGTGCCCTGAGAGGGCAGGAGGGCGGTAATAAAATCTAGTGGATATG  
GGACCAGGGTCTCGAAGGGACCGGCAGAGGTTGAAGTAACCCATCAGGGGGTCGATTGGAAG**TCTTACCAGTG**  
**GCACAAACC**GAGCAAGCCAAAACAAAACCTGTGAATGTAACGAGCCATAAGTGGCCACCAGAATTGCTGCTTGAC  
AAAAAATTTAGTACGGTTAACTCCTGGATGACAAGCCACATTGGAACAATGCCCCACTGAATAACGTTGGACC  
GTAATCCCTCCGGCACAAATAATCGATTTCAGTGGCACCCGGGCGGAGGCGTTACCC

그림 37. Nucleotide sequence of the cvk9\_9 clone. Underlined sequences; random primer, Bold sequences ; specific primer

M 1 2 3 4 5 6 7 8

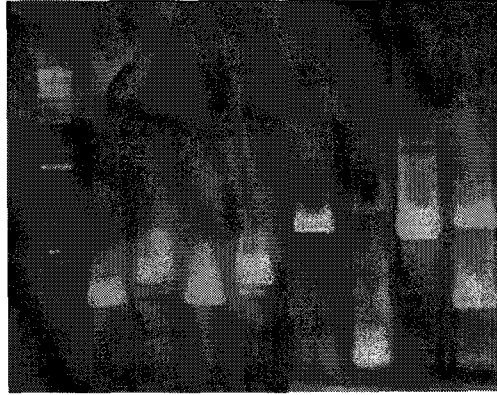


그림 38. RT-PCR with internal specific primer

- 1; healthy carp (cvk\_1 primers)
- 2; healthy carp (cvk\_2 primers)
- 3; virus infected carp (cvk\_1 primers)
- 4; virus infected carp (cvk\_2 primers)
- 5; healthy carp (cvk\_6 primers)
- 6; healthy carp (cvk9\_9 primers)
- 7; virus infected carp(cvk\_6 primers)
- 8; virus infected carp(cvk9\_9 primers)

이들을 확인 결과, 바이러스에 감염된 잉어에서만 특이 밴드가 검출되는 것으로 보아 본 연구를 통하여 제작된 진단용 PCR primer는 본 잉어 바이러스에 특이적이므로 바이러스 검출에 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 판단되었다.



## 제4절 결과의 요약

본 연구에서는 바이러스 감염어의 진단방법을 검토하기 위하여 면역학적 진단, 분자생물학적 진단의 내용으로 원인 바이러스의 감염에 따른 질병 진단법을 검토하였다. 본 바이러스성 질병은 지금까지 지구상에서 알려져 있지 않은 신종의 병원체에 의한 질병이라는 점에서 기존에 연구되어 있는 적용 가능한 진단방법이 전무한 실정이며, 이 바이러스성 질병의 원인으로 최초 발병 이후 수년간 연속적으로 재발되고 있는 점에서 질병의 신속하고 명확한 진단법의 개발이 급선무라는 점에서 그 진단능력이 뛰어난 진단법을 검토하였다.

제 2장에서 확립된 정제법을 이용하여 정제한 바이러스액으로 항토끼 혈청을 제작하여 바이러스 잉어바이러스 특이적인 검출능을 확인하였다. 제작 항체의  $ND_{50}$ 를 측정된 결과 1 : 1280 ~ 1 : 640의 항체가를 나타내었다. 얻어진 항혈청은 본 분리바이러스의 특이적인 진단에 활용되어질 수 있는 것으로 판단되어 효소 항체법, 형광 항체법 및 ELISA법에 의한 진단법을 검토하고 인위적 감염 어체 및 현장에서 발병된 감염 어체를 대상으로 그 효과를 확인하였다. 이들 작업을 통하여 polyclonal 토끼항체를 이용한 간이 진단법을 제시하였다.

바이러스를 특이적으로 신속히 진단하기 위한 목적 및 백신 개발 연구의 목적으로 바이러스에 대한 monoclonal 항체를 제작하였다. 단클론 항체 제작법을 통하여 생산된 항체에 대해 ELISA법으로 screening하여 바이러스 특이적 검출능이 인정되는 MAb 18-2, 42-1, 55-1을 CV18, CV42, CV55를 개발하였으며, 이들을 이용한 바이러스 특이 검출법의 확립을 위하여 형광항체법 (FAT)에 의한 신속 진단법, ELISA에 의한 신속진단법을 확립하였다. 아울러 무감염 친어를 확보할 목적으로 사용되어질 수 있는 혈중 바이러스항체 검출을 위한 ELISA법의 확립을 위하여 잉어의 IgM을 정제하고 그 정제된 IgM에 대응하는 단클론항체를 제작하였다. 잉어로부터 분리되어진 바이러스의 배양액을 항원으로 적용하여 감염 잉어

의 혈청내 바이러스항체를 검출하기 위한 유효한 방법을 수립하였다. 다양한 지역에서 양식되어지는 잉어에서 분리된 신종잉어 바이러스에 대한 항체 검출 결과에서 항체 검출결과와 바이러스에 감염된 어류의 임상적 증상, 그리고 바이러스학적 특성을 비교해 본 결과 매우 특이적으로 본 바이러스의 감염어를 선별해 낼 수 있었다. 따라서 이 방법은 신종 잉어 바이러스에 대한 항체 검출을 위한 방법으로 유용하게 쓰일 것 같다.

잉어 바이러스를 순수 분리하여 이로부터 바이러스의 핵산을 추출한 후 바이러스의 cDNA clone을 다수 확보하여 바이러스의 유전자에 대한 정보를 얻고, 이들 염기서열을 기초로 하여 CVK-11에 특이적인 primer를 합성하고 이를 감염시료에 적용하여 PCR법에 의한 바이러스의 진단연구를 행하였다. 본 연구를 통하여 다수의 잉어 바이러스 유전자 clone들을 확보하였고, 이 재조합 clone들의 염기서열 분석 결과를 토대로 homology를 가지는 바이러스 유전자를 검색하였다. 이들 결과를 바탕으로 잉어 바이러스를 보다 신속하고 효과적으로 진단하기 위한 방법의 개발을 위하여 clone들 중에서 cvk 9\_9 clone의 염기서열을 활용하여 진단에 필요한 PCR primer를 cvk 9\_9 203F (5'-TCCACCATCGACAGTTGTT G-3')와 cvk 9\_9 673R (5'-GGTTTGTGCCACTGGTAAGA-3')로 각각 디자인하여 제작하고 바이러스에 감염된 잉어와 감염되지 않은 건강한 잉어의 조직에서 RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행하였다. 이들을 확인 결과, 바이러스에 감염된 잉어에서만 특이 밴드가 검출되는 것으로 보아 본 연구를 통하여 제작된 진단용 PCR primer는 본 잉어 바이러스에 특이적이므로 바이러스 검출에 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 판단되었다.

## 제 4 장 바이러스 방역대책 기술개발

### 제1절 서론

본 연구에서는 바이러스 감염에 의한 질병의 현장 감염 특성, 발병과 사육환경과의 연계, 어체내 바이러스의 감염 경로, 친어를 통한 수직감염의 유무, 미감염어의 확보기술, 바이러스의 사육환경에서의 구제를 위한 소독기술을 검토하였고, 실험적인 바이러스 백신을 제작하고 그 처리 효과를 검토하는 기초 연구를 통하여 현장 방역 및 예방법으로서의 백신의 적용 가능성을 확인하여 잉어 양식장에서의 본 바이러스 감염에 대한 방제기술로서 사용되어질 수 있는 가능성을 검토하였다

본 바이러스는 신종으로서 아직까지 그 소독을 위한 효과적인 방법이 확인되어 있지 않은 점에서 현재 사용할 수 있는 소독제 및 소독법을 적용하여 본 바이러스의 소독법을 확인하여 현장에서 적용할 수 있도록 검토하였으며, 바이러스의 치료제가 마땅하게 개발되어 있지 않은 현실에서 그 예방을 위한 백신의 개발이 필수적이므로 간편하게 제작할 수 있는 불활화 백신을 제작하여 생체에 적용하였을 경우 그 예방 효과를 검토해 보았다.

이러한 열련의 연구의 목표는 양식장 현장에서의 바이러스 질병 발생을 차단 및 관리할 수 있는 방법, 질병전파를 차단할 수 있는 방법, 감염에 적극적으로 대처하는 방법 등, 감염어 관리 기술을 확립하는데 있다. 전장에서 효율적인 진단법으로 개발되어진 신속진단법을 적용하여 미감염어를 생산하고, 확립된 소독법 및 백신을 적용하여 현장성 있는 방제방법을 제안함으로써 잉어 양식장 내 신종의 바이러스에 대한 종합적인 대책을 수립하는데 있다.

## 제2절 바이러스의 발병특성

### 1. 발병 현장조사

#### 가. 감염어의 육안적, 해부학적, 조직학적 기초조사

감염어의 발병형태의 조사에서 얻어진 결과를 정리하면, 본 바이러스의 감염에 의한 감염 잉어의 행동은 IPNV 및 RVS등의 감염에 의한 송어에서의 초기 증상과 유사하게 감염어류는 활력을 잃고 수면의 표층으로 올라와 배회하며, 봄철의 수온상승기에 일반적인 양식 어류에서 자주 나타나는 산소 부족에 의한 입 올림과 같은 행동을 하지만, 산소의 공급 후에도 그 증상은 없어지지 않고 유지되어지는 특성을 갖는다. 본 바이러스 감염어의 특이적인 외부 증상은 체표점액의 다량분비, 체색의 혼탁, 등지느러미 부위로부터의 약한 궤양소의 형성 및 체표면의 백운증상이 그 주요증상이고, 일반적으로 알려져 있는 심한 궤양소의 발현 및 출혈 등은 2차적인 세균 감염에 의한 것으로서 바이러스 감염과는 직접적인 연관성이 없는 것으로 확인되어졌다. 아울러 본 바이러스 감염어의 공통적인 특징으로 아가미의 부식을 전반적으로 나타내는데 이는 감염어가 성어인 경우에 심하고 치어의 경우는 그에 비하여 심하지는 않으나 모두 같이 아가미에 영향이 나타나는 점이 특징이다. 그러나 이는 일반적으로 알려져 있는 세균성 아가미 부식증의 원인 세균과는 직접적인 연관성이 없는 것으로 확인되었다. 해부학적인 본 질병 감염어의 특성은 간의 퇴색, 신장과 비장의 이상 비대 및 전반적인 빈혈을 특징으로하며 일반적인 병원 세균에 의한 체강 내 출혈 또는 복수, 장기 내 출혈은 본 바이러스 감염에 의한 특징으로는 보여지지 않으며, 본 바이러스 감염에 의한 체질의 약화 및 체내 내성력의 약화로 기인되어지는 2차적인 세균 감염 유발에 의하여 수반되어 나타나는 경우가 많은 것으로 확인되었다.

다음으로 감염어의 병리학적 특성으로, 비장 내 실질세포의 핵 농축 및 핵 팽화를 수반하고 전반적이고 광범위한 괴사 및 공포변성이 특징적이며, 신장의 경우도 비장과 유사한 세포병변이 나타나고 정상보다 거대화된 세포가 다수 출현되어지는 경향이 관찰되어진다. 간의 경우는 실질 세포의 병변은 심하지 않으나 때로 국소적인 괴사가 나타나고, 괴사병변은 파괴된 유동을 중심으로 진행되어져 유동이 확장되어지고, 괴사세포와 염증성 세포들이 혈관의 주위에 많이 관찰되어진다. 췌장의 경우 랑게르한스섬에 심한 괴사가 나타나고, 거의 모든 랑게르한스섬 조직이 파괴되어져있는 형태로 관찰되어진다. 이는 체내 내분비계의 이상과의 연관성을 시사해주는 것으로 생각되어지고, 췌장의 zymogen 과립의 확산이 나타나는 점에서 외분비계의 이상초래와의 관련성도 생각되어졌다. 장관의 경우 장상피와 근육층은 정상이었으나 점막고유층 내에 괴사된 세포가 다수 관찰되어져, 핵 농축 및 파괴가 확인되어졌다. 심장의 경우 심장에서 염증성 세포, 괴사된 세포의 파편이 다수 관찰되어지고, 심외막에 염증성 세포가 다수 침윤되어져 있어 심각한 심외막염이 수반되어진 것으로 판단되어졌다.

이러한 점에서 본 바이러스 감염증의 주요 target organ은 비장, 신장 및 장관의 GALT (gut associated lymphoid organ)등의 lymphoid organ이며, 이들 target organ의 비장상적인 세포들이 다른 기관의 혈관 주위에서 관찰되어지고 있다. 이 감염증의 특징적 병변의 형태는 괴사 및 세포의 비대 이었다. 아울러 이러한 장기 내의 세균은 관찰 되지 않은 점에서 본 바이러스의 감염에 의한 특징적인 증상으로 확인할 수 있었다.

#### 나. 지역별, 사육단계별 발병어의 현장조사 및 환경변화와의 연관성조사

본 연구기간 동안 강원도 2개소, 충청북도 1개소, 전라북도 1개소, 전라남도 1개소, 경상남도 2개소의 잉어 종묘 생산장 및 양식장을 대상으로 최소 월 1회의 샘플링을 통하여 각 양식장 내 어류 및 사육수를 대상으로 본 바이러스의 출현

및 감염증의 출현을 조사하였다. 아울러 각 양식장의 수온 변동을 확인하였으며, 경상남도의 2개소를 지정하여 종묘 생산용 친어에서부터 생산과정중의 난, 정소, 부화자어, 자어, 치어 등 생산 단계별로 지속적인 바이러스의 검출을 행하였으며, 이후 분양되어져 나가는 지역을 추적하여 이동되어져 사육되어지는 동일 친어 유래의 어류로부터의 발병 특성을 조사하였다. 조사 결과, 친어로부터 발병원의 전이는 가능성이 희박한 것으로 확인되어 수직감염에 의한 질병의 확산보다는 수평적인 감염에 의한 질병의 확산이 확률적으로 더 높은 것으로 판단되었다.

## 2. 바이러스 노출에 따른 어체 내 바이러스의 동태

무감염 이스라엘잉어 (평균체중 25g)를 대상으로 사육수온 20℃의 수온구에서 Log TCID<sub>50</sub> 4.0의 바이러스 감염가로 침지법 (24시간 노출)에 의한 감염을 실시하여, 감염개시 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10일째에 실험어를 3미씩 채집하여 신장, 비장, 혈액, 뇌, 안구, 간, 아가미, 근육 내의 바이러스 감염가를 조사하고 각각의 스탬프 표본을 대상으로 MAb를 이용한 형광항체법에 따른 각 장기 내의 바이러스 항원 검출 실험을 행하였다.

감염어 체내의 각 조직으로부터의 바이러스 감염가 조사 결과 신장 및 아가미에서 감염 1일째 나타난 이후로 감염가의 변동은 크게 보이지 않으나 감염 후 5일째 부터는 혈액 및 간 등에서도 바이러스의 감염가가 나타나는 경향을 보여 체내에서의 바이러스 증식이 확인되었다. 아울러 그러한 유형은 스탬프 표본을 대상으로 MAb를 이용한 형광항체법을 적용한 실험에서도 동일하게 확인되었다. 따라서 본 바이러스는 체외에서 체표 및 아가미를 침입 문호로 이용하여 혈관계를 이용하여 1차 신장에 도달하고 그 이후 어체의 생체 조건에 따라 다양하기는 하겠지만 혈관계를 이용하여 감염 후 4일 전후에는 간, 비장 등의 다양한 체내 기관으로 이동함으로써 그 숙주역을 넓힘과 동시에 각 기관 내 세포에 증식하여 전신성의 병변을 유발하게 된다. 또한 이상의 과정을 거친 후, 약 1주일 전후에 이르면 폐사에 도달하는

것으로 해석되어졌다.

표 13. 인위감염후 경과일수에 따른 어체내의 바이러스 및 바이러스항원 검출

검사조직	인위감염 이후의 경과 일수						
	0	1	2	3	5	7	10
Virus CPE 검출							
Gill	0/3	1/3	0/3	0/3	2/3	3/3	3/3
Muscle	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	2/3
Kidney	0/3	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Spleen	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Liver	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	3/3	3/3
Blood	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3
Heart	0/3	0/3	0/3	1/3	3/3	3/3	3/3
Eye	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	3/3
FAT 이용한 항원 검출							
Gill	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Muscle	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	3/3	3/3
Kidney	0/3	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Spleen	0/3	1/3	1/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Liver	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3
Blood	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Heart	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Eye	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3

### 3. 양식 사용수 중의 바이러스 검출 및 수평적인 바이러스 유입 검토

2년간의 현장 샘플링에서 매년 바이러스 양성의 샘플이 확인되었던 전북 A-1 양식장 (감염경과어, 하천수 사용), 전북 A-2 양식장 (미감염어, 하천수 사용) 및 경남 S양식장 (감염경과어, 지하수 사용)을 대상으로 사육용수를 통한 바이러스의 유입경로 및 질병 발생과의 연계성을 검토하기 위하여 주기적으로 1) 양식수원으로 사용하는 하천수 및 지하수 중의 바이러스 검출 및 2) 각 사육원수를 사용하여 양식하는 수조수 및 사육어를 대상으로 바이러스 검출 조사를 행하였다.

수중 바이러스를 효과적으로 농축하기 위한 방법으로는 Oh 등(2000, 2002)의 방법인 중공사한외여과막 (Daelim Co., PAN100,000)과 centicon (Millipore Co., Plus-20)을 이용한 바이러스 농축법을 적용하였으며, 20,000배로 농축시킨 실험샘플을 대상으로 FSP 및 FHM cell line에 접종하여 바이러스의 특이 CPE를 확인하고 감염 세포내의 바이러스 항원에 대해 MAb를 이용한 FAT법으로 바이러스의 유·무를 확인하였다. 사육어에서의 바이러스 확인에 대해서도 배양을 통한 CPE 확인과 함께 다수의 샘플들을 효과적으로 검출하기 위한 방법으로서 농축샘플 내의 항원을 ELISA법으로 검색하는 방법을 적용하였다.

이상의 어체, 사육수, 유입수에 대한 바이러스 검출결과, 지하수를 사용하여 사육하고 있는 경남 S 양식장의 경우 2년생의 어체를 대상으로 한 조사에서는 바이러스에 감염된 개체가 일부 발견되었지만 전 조사기간에 걸쳐 사육수와 유입수에서는 바이러스가 검출되지 않았으며, 해당 양식장에서 조사기간 중 바이러스 감염에 의한 폐사는 일어나지 않았다. 해당 양식장은 송어 양식장을 개조하여 잉어양식을 행하고 있는 양식장으로 연중 수온의 변동이 심하지 않는 사육수를 충분히 사용하여 매우 낮은 밀도로 양식을 행하고 있었다.

하천수를 사육수로 사용하고 있으며 전년도에 바이러스의 감염이 있었음이 확인되었던 2년생의 잉어를 사육하고 있는 전북 A-1 양어장의 조사에서는 3월 이후 전 샘플링 어체에서 신종 잉어 바이러스가 체내에 존재하고 있음을 확인할 수



있었으나 폐사 상황의 발현은 6월 초순에 이르러 나타났고, 이 시기의 수온의 변동 및 강우로 인한 유입수의 수질 안정도는 매우 낮은 상태이었다. 발병에 이르기까지 수중 총 세균수는 폐사시기를 전후로 폐사 이전의 평균 세균수에 비하여 2 order 정도 증가한 경향이 나타났다. 또한 이 양식장의 경우 조사 초기부터 하천으로부터의 유입수에서 버나바이러스의 특징을 갖는 CPE가 확인되었으며 이를 PCR로 확인한 결과 IPNV에 포함되는 바이러스가 자연 수계에 방출되어진 상태로 있다가 잉어 양식용의 원수로 유입되어지고 있음을 확인할 수 있었다. 하지만 이들 바이러스가 원수 및 사육수에서 확인되었던 시기 동안의 어체 내 버나바이러스 검출 및 수중의 바이러스 감염가의 변동을 조사한 결과 어체 내 버나바이러스가 검출되지 않은 점 및 수중의 바이러스 감염가 변동폭이 유입수와 사육수의 샘플에서 차이가 없었던 점 등에서 이들 버나바이러스는 잉어의 발병 및 폐사에는 영향을 주지 않은 것으로 판단되었다. 특히 IPNV 유사바이러스의 경우, 5월의 샘플링까지 계속 유입수 및 사육수 중에 존재하였으나 그 이후의 샘플링에서는 검출이 되지 않은 반면, 잉어 바이러스는 조사 초기이었던 초봄의 양식 어체에서 일부 확인된 것을 시작으로 검출율이 점차 증가되어 폐사가 일어난 6월의 경우 폐사어 및 생존어 전체에서 감염이 확인되었다. 이 시기까지의 하천으로부터의 유입수에서는 바이러스의 검출이 음성이었으나, 그 이후 9월까지의 조사 기간 중 자연수계인 하천 유입수에서 지속적으로 잉어바이러스가 확인되었다 (표 14).

이는 조사 대상의 양식장에서 뿐 아니라 인근의 다른 양식장에서도 발생되어진 본 바이러스에 의한 질병으로 동일 수계 내에서 바이러스 확산이 이루어진 결과로 해석되어진다. 따라서 하천수의 직접적인 사육수로의 이용은 병원체 특히 조사대상이 되어지는 잉어바이러스의 감염원으로 충분히 작용되어질 수 있음을 추측케 하는 결과로 판단할 수 있다.

표 14. Detection of the carp virus from various geographic areas

sampling	Site								
	KyungNam-S			ChunPuk-A1			ChunPuk-A2		
samples	F	R	I	F	R	I	F	R	I
sampling date									
<b>2002. March</b>									
Carp virus CPE	+/-	-	-	+	-	-	-	-	-
Other virus CPE	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<b>2002. April</b>									
Carp virus CPE	+/-	-	-	+	-	-	-	-	-
Other virus CPE	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<b>2002. May</b>									
Carp virus CPE	+/-	-	-	+	+	-	-	-	-
Other virus CPE	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<b>2002. June</b>									
Carp virus CPE	+/-	-	-	+	+	-	+	+	+
Other virus CPE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>2002. July</b>									
Carp virus CPE	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Other virus CPE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>2002. August</b>									
Carp virus CPE	+/-	(+/-)	-	+	+	+	+	+	+
Other virus CPE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>2002. September</b>									
Carp virus CPE	-	-	-	+	+	-	+	+	+
Other virus CPE	-	-	-	-	-	-	-	-	-

F: fish sample, I: influx water, R: reared water

+: virus positive, -: virus negative

#### 4. 바이러스 보유 친어를 통한 수직감염

경남의 D양어장의 친어용 어류 중 20마리를 임의로 샘플링하여 각 개체로부터 혈액을 2~3ml씩 채취하고 혈청을 분리하여 먼저 바이러스 항체의 보유를 확인한 다음 바이러스 감염이 확인된 개체를 5미 선정하여 체내 신장, 비장 및 난 또는 정액을 대상으로 바이러스를 분리 실험하였다. 아울러 경남의 J양어장의 친어에 대해서도 바이러스 감염을 확인한 후, 무감염 및 감염이 확인된 친어군을 나누어 종묘 생산을 행하여 각각의 실험구에서 생산되어진 치어를 대상으로 바이러스의 감염을 확인하였다.

한편, 경남 D양어장의 산란용 친어를 대상으로 행한 실험에서는 20마리의 친어 중에서 바이러스의 감염이 확인된 개체는 18미로서 90%의 감염보유가 확인되었 으며, 이들 중 암컷 3개체 및 수컷 2개체를 해부하여 체내의 장기 및 난 또는 정액 중의 바이러스의 검출을 행한 결과, 기타 장기에서는 바이러스의 검출이 양성이었음에도 불구하고 난 및 정자를 대상으로 행한 바이러스 검출결과는 모두 음성을 나타내어 난과 정자를 경유하여 수정·부화되는 치어로의 수직감염은 본 바이러스의 경우 인정되지 않을 확률이 높은 것으로 판단되었다. 이들 친어군으로부터 생산되어진 치어들을 대상으로 부화 일령 3~5일의 자어를 채집하여 10마리씩의 full sample을 생리식염수로 세척한 후 마쇄하여 바이러스의 검출을 행한 결과에서도 바이러스는 확인되지 않았다. 이러한 결과를 바탕으로 본 연구 대상의 잉어바이러스는 감염병학적인 의미에서 어미(친어군)로부터 생식소를 경유하여 생산되어진 치어에게로 직접적인 병원체의 전달 즉, 수직감염은 인정되어지지 않음이 확인되어졌다.

하지만, 양식 현장의 종묘생산과정을 생각해 볼 때, 친어사육-산란-부화로 이어지는 일련의 종묘생산이 동일한 장소(수조 또는 못)에서 행해지는 경우에는 감염된 친어로부터 생산된 종묘로의 넓은 의미에서의 수직감염은 충분히 발생할 수 있을 것으로 예측되므로 종묘생산 시 친어의 감염유무에 대한 관리는 질병의 확

산과 지속적인 발생을 감소시키기 위해서 필수적으로 행해야 할 것으로 생각된다.

#### 5. 어류병원세균의 혼합감염 및 영양·환경요인과 바이러스 발병과의 연계성

조사기간 중 바이러스 감염어 조사과정에서 잉어류의 폐사와 관련된 바이러스는 본 연구의 대상 바이러스 1종류만이 전체적으로 확인되어졌음에도 불구하고 샘플장소 및 시기에 따라 바이러스 감염어의 조사과정에서 본 바이러스 이외에 에로모나스 속, 비브리오 속, 플렉시박터 속 등의 세균류, 텔로하넬루스 속, 믹소블루스 속 등의 포자충류 및 아가미흡충류, 섬모충류 등과 같은 외부 기생충들이 각기 다양하게 혼합되어져 검출되었다. 따라서 그 필요성에 따라 연구과정을 통해 분리되어진 에로모나스 속 세균 및 플렉시박터 속 세균에 대해 잉어바이러스와의 혼합감염 및 연쇄감염의 조건을 설정하여 그 발병 특성에 대하여 조사하였다.

아울러, 잉어 바이러스의 인위감염 실험 중 동일한 조건의 바이러스 적용에도 불구하고 수온에 따른 폐사율에 차이가 있었던 점, 그리고 양식 현장의 사육관리 상황에 따라 잉어바이러스의 체내 검출이 발견됨에도 불구하고 폐사로 이어지는 상황이 다르다는 점, 본 질병이 알려지기 시작하던 시기에 주요 잉어 양식방법이었던 가두리양식장에서 주로 봄철 수온상승기에 최대의 피해를 나타냈던 점 등을 고려하여 잉어의 대량 폐사요인을 영양결핍 상태 즉, 체력이 저하되어지고 면역력이 약한 상태에서의 수온 변화에 의한 스트레스와 바이러스 감염에 의한 발병과의 연관성에 대해서도 조사하였다.

실험어는 친어관리를 통하여 생산되어진 무감염 잉어(SPF)로서 체중 2.3~5.5 g, 체장 5.5~10cm의 당년생어를 사용하였고, 인위적인 공격실험을 하기 위한 수조장치에서 1주일간 순치 후 실험을 행하였다. 사육은 지수식 사육방법으로 관상어용 여과장치를 부착시킨 플라스틱 수조에 사육하였으며 폭기시켜 염소를 제거

한 수돗물 40 l를 수온 20~22°C이 되도록 유지하였다. 실험에 사용한 바이러스 주는 CVJ-2001을, 세균 주는 각기 다른 지역의 잉어로부터 분리한 에로모나스 속 PB-2002균주와 콜룸나리스 속 JB-2000을 BHIB배지에서 배양하여 사용하였다.

혼합 감염 조건에서의 병원성의 발현의 차이를 확인하기 위한 실험은 A, B, C, D, E, F의 6개의 시험구로 나누어 실시하였다. 실험구는 A(CVJ-2001와 JB-2000의 혼합감염), B(CVJ-2001와 PB-2002의 혼합감염), C(CVJ-2001의 바이러스감염), D(JB-2000의 세균감염), E(PB-2002의 세균감염)이며, 대조구는 F(HBSS)로 설정하였다. 바이러스는  $10^2$  TCID<sub>50</sub>/ml로 복강에 100 $\mu$ l를 접종하였으며, 세균은 40 l의 수조에 D는  $1.24 \times 10^5$ /ml, F는  $1.64 \times 10^5$ /ml으로 침지시켰다. 대조구는 복강에 HBSS 100 $\mu$ l를 접종하여 27일간 관찰하였다. 빈사상태의 개체 및 폐사개체에 대해서는 해부 후 세균분리와 바이러스의 감염가를 측정하였다. 실험 결과 바이러스와 에로모나스 속이 혼합감염된 조건의 B 시험구(CVJ-2001와 PB-2002의 혼합감염)에서는 95%의 높은 폐사율을 보였고, 에로모나스 속 세균만을 감염시킨 E 시험구(PB-2002의 세균감염)에서는 40%의 폐사가 관찰되었으나, 바이러스와 콜룸나리스 속 세균의 혼합감염구인 A 시험구(CVJ-2001와 JB-2001의 혼합감염), 바이러스만을 저농도 노출시킨 C 시험구(CVJ-2001의 바이러스감염) 및 콜룸나리스만을 노출시킨 D 시험구 (JB-2001의 세균감염)에서는 대조군인 F시험구(HBSS)와 유사하게 10% 범위의 매우 낮은 폐사율을 보였다 (그림 39).

그리고 바이러스 잠복감염 조건에서의 세균의 2차 감염에 따른 폐사를 확인하기 위한 실험은 A, B의 2개의 시험구로 나누어 실시하였다. A 시험구는 CVJ-2001주를  $10^2$  TCID<sub>50</sub>/ml로 복강에 100 $\mu$ l를 접종하였고 B 시험구에는 HBSS 100 $\mu$ l를 복강에 접종하였다. 30일 경과 후 A와 B 실험구에 PB-2002주를  $1.04 \times 10^6$ /ml으로 침지시킨 후 25일간 관찰하였다. 빈사상태의 개체 및 폐사개체에 대해서는 해부 후 세균의 수를 측정하였으며 바이러스의 감염가를 측정하였다. 실험 결과 발병에 이르지 않은 저농도의 바이러스를 감염시킨 후 한달이 경과한

바이러스 보유어에 에로모나스 세균을 침지 공격한 A 시험구 (CVJ-2001잠복, PB-2002 침지)에서는 90% 이상의 폐사율을 나타내었으나, 바이러스를 보유하지 않은 정상 사육어에 에로모나스를 공격한 B 시험구 (HBSS 바이러스프리, PB-2002 침지)에서는 40%의 폐사율을 보였다 (그림 40). 이러한 결과로서 지금까지 나타난 바이러스 감염이 확인되어진 대량폐사의 주 요인은 결국 신종잉어바이러스이며 사육지에 함께 노출되어지는 병원성을 발하는 세균의 감염으로 인해 폐사율이 더욱 높아지는 경향이 나타났음을 알 수 있었다. 아울러 발병을 하지 않은 상태라 하더라도 사전에 바이러스가 체내에 들어가 보유하고 있는 잠복감염어체는 정상 어체에 비하여 기타 병원 세균의 노출에 더욱 약한 저항성을 나타내었음을 확인할 수 있었다.

한편 기아(2개월 절식) 및 저수온 스트레스 상태의 어체를 대상으로 바이러스의 감염에 의한 폐사율의 변화에 대한 실험에서는 실험기간 중 폐사율 뿐 아니라 샘플링된 어체들(폐사어 및 생존어)을 대상으로 한 체내 바이러스 감염가의 검사 결과에서 예상되어진 것처럼 뚜렷한 차이를 확인할 수 있었다 (그림 41).

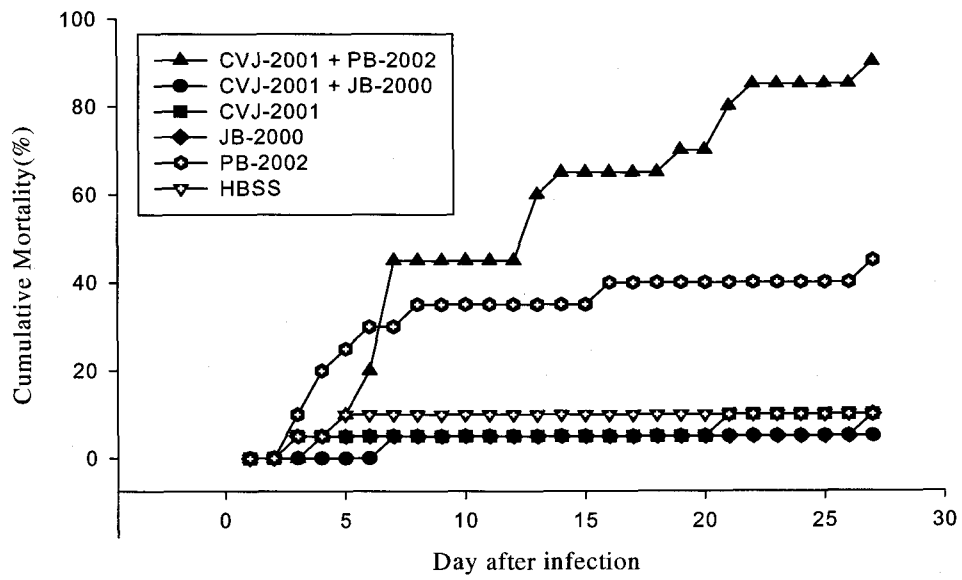


그림 39. 혼합 감염 조건에서의 병원성의 발현의 차이

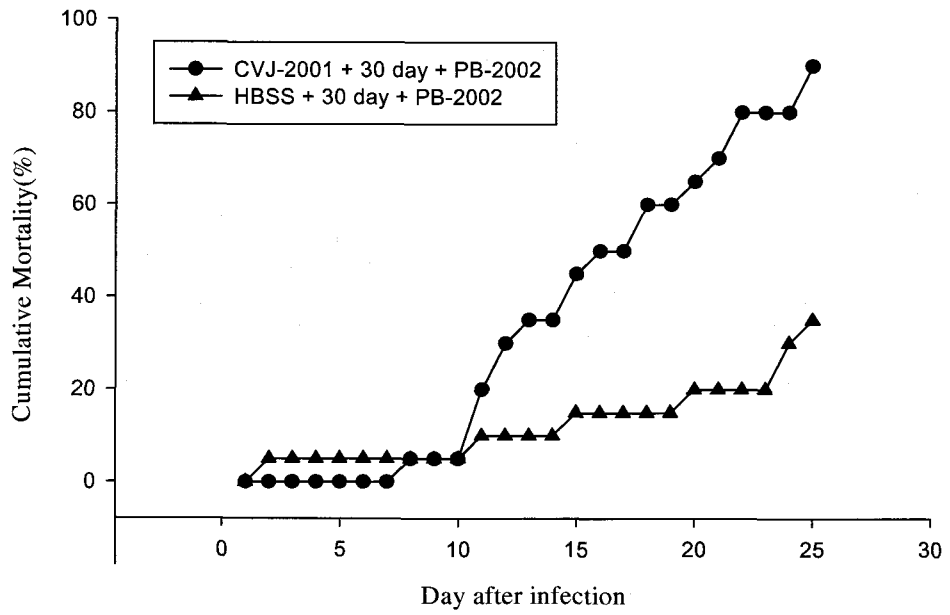


그림 40. 바이러스 잠복감염 조건에서의 세균의 이차감염에 따른 폐사율



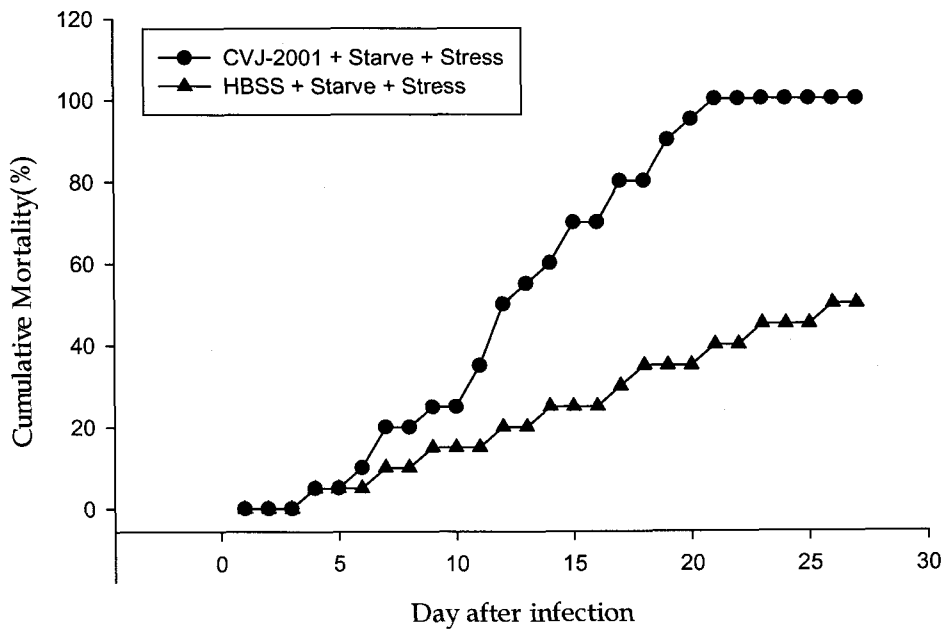


그림 41. 기아 및 저수온 스트레스 상태의 어체를 대상으로 바이러스 감염에 의한 폐사율.

### 제3절 무감염 친어의 확보 및 효율적인 소독법을 이용한 건강종묘생산

#### 1. 무감염어의 확보

친어용으로 사용되어지는 어류의 잠복감염에 의해 발생될 수 있는 자어로의 감염의 전이가능성을 확인하기 위한 연구의 일환으로 경남 및 전남 일원의 4개소의 양어장 친어를 대상으로 어체내 잠복감염을 조사하였다. 계 68마리의 검사미수를 대상으로 오 등 (2000)의 방법으로 난소액 및 정소를 각각 1ml 정도씩 채취하여 FHM세포를 이용한 바이러스 배양과 함께 동일 어체로부터 채취한 혈청을 대상으로 혈청내 본 분리바이러스에 대한 항체의 형성유무를 상기 제작된 MAb를 이용하여 확인하였다. 즉 무감염 친어를 선별하기 위해 tag한 잉어 10마리 (♂:5마리, ♀:5마리)의 혈청을 채취하여 ELISA (항체검출법)을 실시하여 잉어 바이러스에 대한 항체 존재유무를 확인하였다. 지하수를 사용하여 tag한 잉어를 사육하였으며, 항체 검출어와 미검출어는 각각 분리하여 난을 산출하였다. 또한 노지에서 사육중인 24 마리의 친어에 대해 잉어바이러스의 항체 존재 유무를 확인하였다. 검사용 혈청시료는 5 ml 주사기를 사용하여 친어의 미부 정맥에서 혈액을 채취 후 실온에서 2시간 동안 혈액응고 과정을 거친 후 원심분리 (10000g, 10분, 4℃)하여 상층액을 채취하여 실험에 사용하였다. 잉어 바이러스 특이 항체에 음성을 보인 친어로부터 부화한 치어를 마쇄하여 HBSS와 1:9로 희석 후 균질화하여 5000rpm에서 20분간 원심하여 상등액을 취해 0.45  $\mu$ m membrane filter (Satorius co.)를 사용하여 여과 후 신종잉어바이러스의 감염유무를 조사하였다. 바이러스 배양을 위해 FSP cell line을 24 well에 계대 배양하여 20℃에서 6시간 동안 배양한 후, 전 처리한 어체 시료를 접종하여 20℃에서 15일간 배양하면서 세포변성효과(CPE)를 관찰하였다. 잉어 IgM에 대한 단클론

항체인 잉어 IgM33A1를 사용하여 ELISA법을 실시하여 혈청 중의 잉어바이러스 대 응 항혈청을 검출하였다. 항체 검출을 위한 ELISA법을 간단히 요약하면, 바이러스 CVJ-2001주를 coating buffer로 10배 희석하여 100  $\mu$ l로 microtiter well에 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. PBS-Tween 20(PBS-T, 0.05%, Bio-Rad)으로 5번 수세 후 10% skim milk로 blocking하고 각 well에 친어 혈청을 PBS로 100배 희석하여 1시간 반응시켰다. 그후 PBS-Tween 20으로 수세하고 1차 항체 (단클론 항체인 잉어 IgM32-1) 50 $\mu$ l로 1시간 반응시킨 후 PBS-Tween 20으로 수세한다. Anti-mouse IgG peroxidase (SIGMA)를 1:3000으로 희석하여 1시간 반응시키고 well은 발색액 (0.1M citric acid, 0.2M phosphate, DW, O. phenylenediamine, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)을 사용하여 발색 후 microtiter plate reader(Bio-Rad)를 사용하여 492nm에서 측정하였다. 이상의 실험을 통한 결과 tag한 잉어 친어 10중 4마리 (40%)에서는 잉어 바이러스에 대한 항체를 검출 할 수 있었으며 6마리 (60%)에서는 항체를 검출할 수 없었다 (표 15). 잉어 바이러스에 대한 항체 미검출어에서 부화한 치어로부터 잉어 바이러스는 분리 되지 않았다. 또한 항체 검출어에서 부화한 치어에서도 바이러스 감염 유무를 확인할 수 없었다. 노지에서 사육하고 있는 친어 24마리에서 중 5마리에서 항체를 검출 할 수 있었으며 21마리에서는 검출할 수가 없었다. 잉어 바이러스에 대한 항체 미검출어와 검출어에서 부화한 치어로부터 잉어 바이러스가 분리되지 않았고 감염 친어 체내 혈중에는 잉어 바이러스에 대한 특이항체를 가지고 있었다. 본 연구의 결과를 기초로 감염 친어를 선별하는 방법으로 본 방법을 적용할 수 있을것으로 판단되어졌으며, 비록 감염어로부터의 생산치어의 수직 감염은 확인 되어지지 않았으나, 현장에서의 잉어의 종묘생산 법이 친어의 산란과정에서 생식소 유래이외의 분비 성 물질등으로 감염이 일어날 위험이 있는 것으로 생각되어지므로, 질병의 전파를 차단하기 위한 적극적인 방법의 한가지로서 이러한 방법을 적용한 친어의 선별이 엄격하게 실시되어질 필요가 있을 것으로 생각되어졌다.

Æ 15. Detection of the virus antibody from the serum of carp

Group	Serum	
	Positive (+)	Negative (-)
Tag Females(n=5)	2 (40%)	3 (60%)
Tag Males(n=5)	2 (40%)	3 (60%)
Females+Males(n=24)	5 (21%)	19 (79%)

## 2. 효과적인 소독법의 검토

수중 바이러스의 효과적인 소독법을 검토하기 위하여 바이러스 배양법을 이용하여 자외선 및 오존처리를 이용한 원인 바이러스의 불활성화 효과, 시판 소독제를 이용한 소독효과를 검토하였다. 자외선의 처리조건은  $3.0 \times 10^3 \mu W \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$ 에서  $3.0 \times 10^4 \mu W \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$ 의 범위에서 30초간의 노출을 주는 조건으로 5회 실험한 결과, 실험조건의 범위 내에서 99% 이상의 불활화 효과가 나타났으며, 오존발생기를 이용하여 수중 TRO 농도를 0.3~1.0 ppm이 되도록 설정한 오존 농도조건의 실험구에서는 각각 2분 및 30초의 처리시간으로 99% 이상의 바이러스가 불활화 되어짐을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 수중의 원인 바이러스는 자외선 및 오존처리에 의하여 충분히 제거될 수 있음이 확인되어졌다. 또한 시판 소독용 크레졸수를 이용한 살균효과 검사에서는 100 ppm의 농도에서 10분간의 처리조건으로 바이러스 감염가를 상실하는 것이 확인되어졌으며, 염소계 소독제를 이용하였을 경우에는 30 ppm 이상의 농도조건에서 10분간의 처리로 소독효과가 확인되어졌다. 아울러 포비돈 요오드를 이용한 소독효과 실험에서는 100 ppm에서 1분 또는 10 ppm에서 10분의 처리조건으로도 충분히 바이러스 감염가가 상실되어짐을 확인할 수 있었다 (표 16). 이러한 시험관 조건의 실험결과를 바탕으로 효과적인 양식장의 소독법을 선택해 볼 수 있을 것으로 판단되어졌다.

사육용수로 사용되어지는 자연 수계에서부터 원인 바이러스가 검출되어지는 점 및 어류의 초기 종묘시기의 바이러스 감염에 의한 피해가 매우 높은 점에서 우선 종묘생산 과정의 초기사육 시에 사용되어지는 사육수의 관리는 매우 중요한 요건으로 생각되어진다. 따라서 아직 잉어의 종묘생산 등에는 적용되어지고 있지는 않지만 우선 해산어 종묘생산 시의 바이러스 병원체 관리를 위하여 설치된 본 연구실의 오존처리 사육시스템을 이용하여 수중 잉어바이러스의 인위적인 유입에 따른 바이러스 제어 효과를 검토하였다. 오존처리장치는 공기압축기, 수분제거기, 유분제거기, 오존발생기, 접촉조 및 활성탄조로 구성하였다. 원료가스는 압축산소를 사용하지

않고 일반 공기를 가압하여 수분 및 유분제거장치를 통과시킨 것을 사용하였으며, 오존발생기는 무성방전식 오존발생장치로서 0.5 ppm의 발생농도를 유지하는 조건으로 2시간 1회전의 순환여과식 사육시스템의 수중에 FSP 세포주를 이용하여 대량 배양하여 확보한 바이러스를  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/liter가 되도록 시스템 수중에 확산시킨 후 오존처리에 따른 사육수 중의 바이러스불활화 효과를 반응개시 후 매 시간별로 수중 바이러스의 농축에 의한 검출법을 적용하여 3회 반복 실험을 행한 결과, 시험용 사육수 내의 노출 바이러스는 시스템 가동 후 전체 수조수의 2회전 처리시간에 해당하는 3시간 이후에는 수중 바이러스가 검출되지 않아 매우 효과적으로 사용할 수 있을 것으로 판단되었다.

따라서 이상의 결과를 토대로 건강종묘생산에 대한 보다 효율적인 시스템을 갖춘다면 바이러스에 의한 대량폐사에 대해 보다 근본적인 해결책으로 제시될 수 있을 것으로 판단된다.

표 16. 일반소독법을 적용한 잉어바이러스의 불활화 효과조사(20℃)

Method	Inactivation effects (≥99.9%)
UV light	$1.0 \times 10^4 \text{uW} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$ 30초
Ozone	0.5ppm 1분
(시판)크레졸수	5000ppm 1분
포르말린(시판용)	-, 효과없음
과망간산칼륨(시약용)	-, 효과없음
요오드	100ppm 1분
차아염소산나트륨	100ppm 1분
NaCl	-, 효과없음

## 제4절 바이러스 백신의 제작 및 처리 효과

본 연구실에서 SPF로 부화 사육·관리중인 잉어(전장: 25cm~32cm)를 사용하여 면역시키고 폐사 및 항체가의 변화를 확인하였다. 멸균된 3차 증류수에 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GibcoBRL, Co.) powder를 충분히 녹인 후 100 IU/ml의 penicillin, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 streptomycin (GibcoBRL, Co.)와 FBS (Fetal Bovine Serum, GibcoBRL, Co.)가 5%가 되게 첨가하여 최종량을 1ℓ로 조절한 다음  $\text{NaHCO}_3$ 로 pH를 7.5로 맞춘 후 0.22  $\mu\text{m}$  membrane filter(Sartorius AG)로 여과하여 세포배양에 사용하였다. Flounder spleen cell line(FSP)를 75 Flask에 계대 배양하여 20℃에서 6시간 동안 배양한 후, CVJ-2001주를 접종하여 20℃에서 15일간 배양하여 바이러스를 분리하였다.  $10^{3.5}$  TCID<sub>50</sub>의 바이러스 배양액에 0.3%가 되게 포르말린을 처리하여 4℃에서 1일간 방치하여 포르말린 처리 백신을 제작하고 생백신으로  $10^{3.5}$  TCID<sub>50</sub>의 바이러스 배양액을 사용하였다. 포르말린 처리 백신 및 생백신을 2주 간격으로 3회 면역 후 백신의 효과를 항체가의 변화로 확인하기 위해 2주 간격으로 면역시킨 잉어의 혈청을 채취하여 실험 전까지 -80℃에 보관하여 사용하였다. 대조구는 같은 방법으로 HBSS로 면역시켰다. 혈청분리를 위해 1 ml 주사기를 사용하여 잉어의 미부정맥에서 혈액을 채취 후 실온에서 2시간 동안 혈액응고 과정을 거친 후 원심분리(10000×g, 10분, 4℃)하여 상층액을 채취하여 실험 전까지 -80℃에 보관하였다. 잉어 IgM에 대한 단클론 항체인 잉어 IgM32A1를 사용하여 ELISA법을 실시하였다 (그림 41 및 그림 42). 4 종류의 백신을 제작하여 처리한 결과 면역 후 항체가의 증가를 보인 2 종류의 백신을 선별하였다.

또한 백신의 실제 적용에 따른 효과를 검토하기 위하여 친어관리 및 사육관리를 통하여 SPF로 생산한 2년생 잉어를 적용하여 백신을 투여한 후 인위적인 공격에 의한 면역효과검증을 실시하였다. 실험어인 잉어 (170~190 g)는 4 ton 용량의 우수식



사육조에 300 L 가두리식 수조를 설치하여 시험구별로 30 마리씩 수용하였다. 시험기간 동안 사육수온은  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ 로 일정하게 유지하였으며 2주 동안 순치시킨 후 실험에 사용하였다. 백신의 제작은 원인 바이러스를 FSP cell line에서 대량 배양하여 CPE를 확인한 후 원심분리 및 초원심분리법으로 바이러스를 정제하고, 0.4% 포르말린 처리 또는  $60^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 가온 처리하는 방법으로 백신을 제작하였다. 실험어를 아미노안식향산에틸로 마취시킨 후 포르말린처리 백신과 가온처리 백신을 각각 0.2 ml씩 복강 주사하고 2주 후 동일한 방법으로 boost 처리하였다. 대조구에는 동일한 방법으로 MEM을 주사하였다. 각 실험군 중의 어류로부터 매주 간격으로 채혈을 행하여 혈청을 분리한 후 실험 사육이 끝난 (2개월 사육) 시기까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보존하였으며, 이들 채취된 혈청을 대상으로 기 확립되어진 항체 검출 ELISA법을 이용하여 확인 (표 16) 하는 한편, 이들 면역구의 어류를 대상으로 원인 바이러스를 투여하여 생존율을 확인한 결과 (그림 43), 대조구에 비해 높은 생존율을 나타내었다.

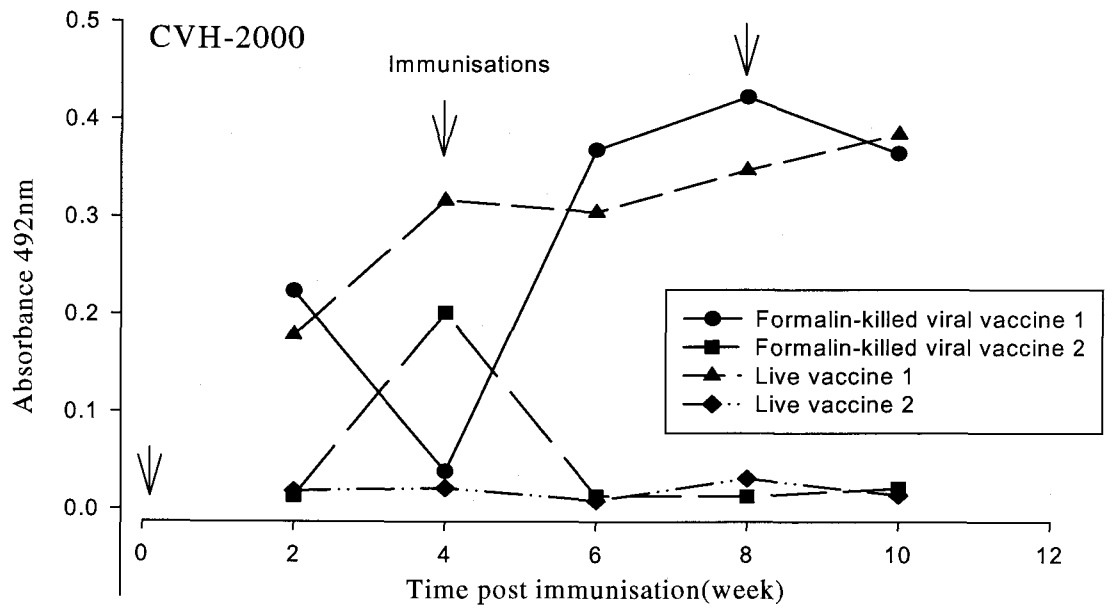


그림 41. Anti-carpvirus ELISA titer versus time (weeks) for fish administered intraperitoneal injections of Formalin-killed carpvirus and Live carpvirus: (ELISA antigen: CVH-2000).

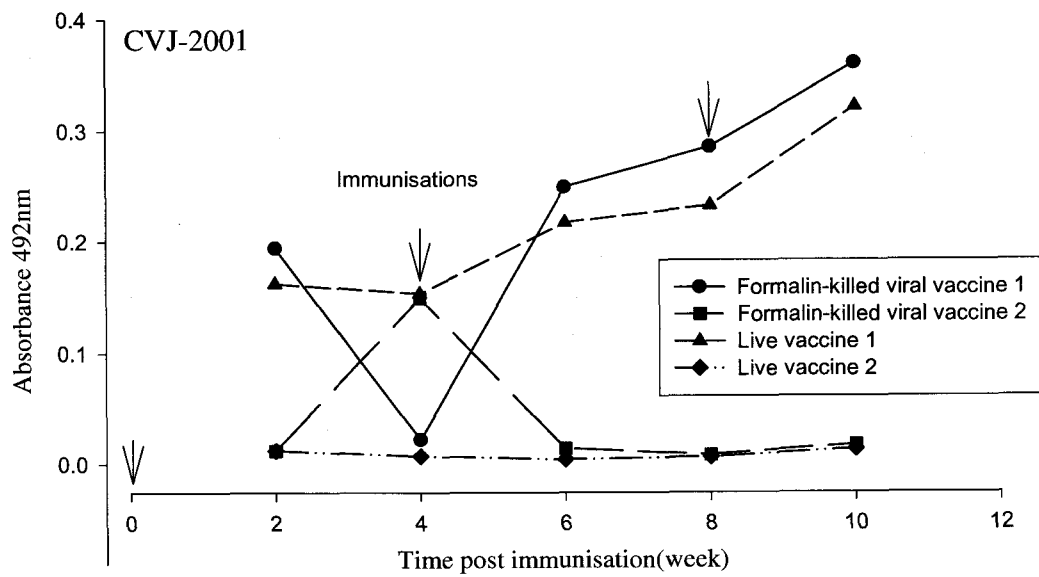


그림 42. anti-carpvirus ELISA titer versus time (weeks) for fish administered intraperitoneal injections of Formalin-killed carpvirus and Live carpvirus: (ELISA antigen: CVJ-2001).

표 16. 포르말린 처리백신과 가온 처리백신 처리구 및 대조구의 혈청을 이용한 항체 검출.

Time post-immunization (weeks)	Vaccinated group		Control group
	FKC (OD value)	HKC (OD value)	(OD value)
1	0.20	0.13	0.08
2	0.14	0.12	0.09
4	0.11	0.09	0.07
6	0.11	0.10	0.09
8	0.12	0.11	0.08

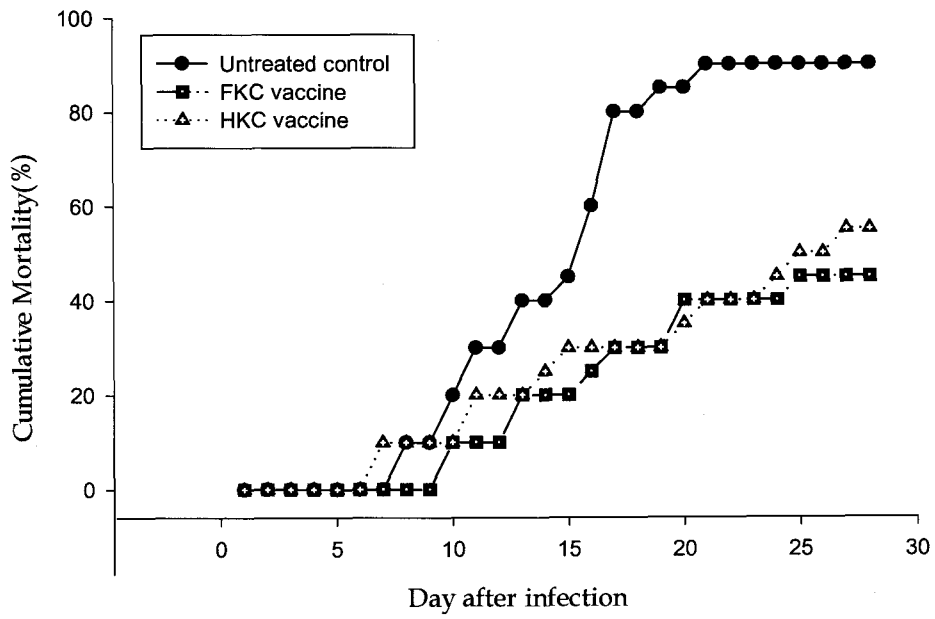


그림 43. 백신을 처리한 후 인위적인 공격에 의한 생존율을 확인.

## 제5절 결과의 요약

본 바이러스성 질병의 방제를 위한 소독법을 확립하고, 개발 가능한 백신을 검토하여 방역법을 수립하기 위한 목적으로 친어용으로 사용되어지는 어류의 잠복감염에 의해 발생되어지는 자어로의 감염의 전이가능성을 확인하기 위해 친어를 대상으로 한 어체 내 잠복감염을 조사하고, 바이러스 질병 발생 현장을 대상으로 다양한 물질을 적용한 질병 구제 및 예방효과를 검토하였으며, 수중 바이러스의 효과적인 소독법 제시를 위하여 시판소독제를 이용한 소독효과를 검토하여 그 효과적인 처리법을 확인하고자 하였다.

감염어의 발병형태의 조사에서 본 바이러스 감염어의 특이적인 외부 증상은 체표점액의 다량분비, 체색의 혼탁, 등지느러미 부위로부터의 약한 궤양소의 형성 및 체표면의 백운증상이고, 일반적으로 알려져 있는 심한 궤양소의 발현 및 출혈 등은 2차적인 세균 감염에 의한 것으로서 바이러스 감염과는 직접적인 연관성이 없는 것으로 확인되어졌다. 본 바이러스 감염증의 주요 target organ은 비장, 신장 및 장관의 GALT (gut associated lymphoid organ)등의 lymphoid organ이며, 이들 target organ의 비장상적인 세포들이 다른 기관의 혈관 주위에서 관찰되어지고 있다. 이 감염증의 특징적 병변의 형태는 괴사 및 세포의 비대이었다. 아울러 이러한 장기 내의 세균은 관찰되지 않은 점에서 본 바이러스의 감염에 의한 특징적인 증상으로 확인할 수 있었다.

본 연구기간 동안 강원도 2개소, 충청북도 1개소, 전라북도 1개소, 전라남도 1개소, 경상남도 2개소의 잉어 종묘 생산장 및 양식장을 대상으로 최소 월 1회의 샘플링을 통하여 각 양식장 내 어류 및 사육수를 대상으로 본 바이러스의 출현 및 감염증의 출현을 조사하였다. 아울러 각 양식장의 수온 변동을 확인하였으며, 경상남도의 2개소를 지정하여 종묘 생산용 친어에서부터 생산과정중의 난, 정소, 부화자어, 자어, 치어 등 생산 단계별로 지속적인 바이러스의 검출을 행하였으며, 이후 분양되어져 나가는 지역을 추적하여 이동되어져 사육되어지는 동일 친어

유래의 어류로부터의 발병 특성을 조사하였다. 조사 결과, 친어로부터 발병원의 전이는 가능성이 희박한 것으로 확인되어 수직감염에 의한 질병의 확산보다는 수평적인 감염에 의한 질병의 확산이 확률적으로 더 높은 것으로 판단되었다.

무감염 이스라엘잉어를 대상으로 바이러스를 감염시켜 신장, 비장, 혈액, 뇌, 안구, 간, 아가미, 근육 내의 바이러스 감염가를 조사하고 각각의 스탬프 표본을 대상으로 MAb를 이용한 형광항체법에 따른 각 장기 내의 바이러스 항원 검출 실험을 행한 결과 본 바이러스는 체외에서 체표 및 아가미를 침입 문호로 이용하여 혈관계를 이용하여 1차 신장에 도달하고 그 이후 어체의 생체 조건에 따라 다양하기는 하겠지만 혈관계를 이용하여 감염 후 4일 전후에는 간, 비장 등의 다양한 체내 기관으로 이동함으로써 그 숙주역을 넓힘과 동시에 각 기관 내 세포에 증식하여 전신성의 병변을 유발하게 되며, 또한 이상의 과정을 거친 후, 약 1주일 전후에 이르면 폐사에 도달하는 것으로 해석되어졌다.

2년간의 현장 샘플링에서 매년 바이러스 양성의 샘플이 확인되었던 양식장을 대상으로 사육용수를 통한 바이러스의 유입경로 및 질병 발생과의 연계성을 검토하였다. 잉어 바이러스는 동일 수계 내에서 확산에 따른 전파가 이루어짐이 확인되었으며, 하천수의 직접적인 사육수로의 이용은 주의하여야 할 것으로 보였다.

친어용 어류를 임의로 샘플링하여 각 개체로부터 혈액을 채취하고 혈청을 분리하여 바이러스감염을 확인하고 무감염 및 감염이 확인된 친어군을 나누어 종묘 생산을 행하여 각각의 실험구에서 생산되어진 치어를 대상으로 바이러스의 감염을 확인하였다. 친어 중에서 바이러스의 감염이 확인된 개체를 해부하여 체내의 장기 및 난 또는 정액 중의 바이러스의 검출을 행한 결과, 기타 장기에서는 바이러스의 검출이 양성이었음에도 불구하고 난 및 정자를 대상으로 행한 바이러스 검출결과는 모두 음성을 나타내어 난과 정자를 경유하여 수정·부화되는 치어로의 수직감염은 본 바이러스의 경우 인정되지 않을 확률이 높은 것으로 판단되었다. 이들 친어군으로부터 생산되어진 치어들을 대상으로 부화 일령 3~5일의 자어를 채집하여 바이러스의 검출을 행한 결과에서도 바이러스는 확인되지 않았다.

즉, 수직감염은 인정되어지지 않음이 확인되어졌다. 하지만, 양식 현장의 종묘생산과정을 생각해 볼 때, 친어사육-산란-부화로 이어지는 일련의 종묘생산이 동일한 장소(수조 또는 못)에서 행해지는 경우에는 감염된 친어로부터 생산된 종묘로의 넓은 의미에서의 수직감염은 충분히 발생될 수 있을 것으로 예측되므로 종묘생산 시 친어의 감염유무에 대한 관리는 질병의 확산과 지속적인 발생을 감소시키기 위해서 필수적으로 행해야 할 것으로 생각된다.

바이러스 감염어 조사과정에서 본 바이러스 이외에 에로모나스 속, 비브리오 속, 플렉시박터 속 등의 세균류, 텔로하넬루스 속, 믹소볼루스 속 등의 포자충류 및 아가미흡충류, 섬모충류 등과 같은 외부 기생충들이 각기 다양하게 혼합되어져 검출되었다. 따라서 그 필요성에 따라 연구과정을 통해 분리되어진 에로모나스 속 세균 및 플렉시박터 속 세균에 대해 잉어바이러스와의 혼합감염 및 잠복감염의 조건을 설정하여 그 발병 특성에 대하여 조사하였다. 아울러 본 질병이 알려지기 시작하던 시기에 주요 잉어 양식방법이었던 가두리양식장에서 주로 봄철 수온상승기에 최대의 피해를 나타냈던 점 등을 고려하여 잉어의 대량 폐사요인을 영양결핍 상태 즉, 체력이 저하되어지고 면역력이 약한 상태에서의 수온 변화에 의한 스트레스와 바이러스 감염에 의한 발병과의 연관성에 대해서도 조사하였다. 실험결과 바이러스와 에로모나스 속이 혼합감염된 조건의 시험구에서 바이러스 및 세균 단독 감염구에 비하여 매우 높은 폐사율을 보였고, 바이러스 잠복감염 조건에서의 세균의 2차 감염에 따른 폐사를 확인하기 위한 실험 결과 발병에 이르지 않은 저농도의 바이러스를 감염시킨 후 한달이 경과한 바이러스 보유어에 에로모나스 세균을 침지 공격한 시험구의 폐사율이 바이러스를 보유하지 않은 정상 사육어에 에로모나스를 공격한 실험구에 비하여 50%나 높은 폐사율을 보였다. 이러한 점에서 대량폐사의 주요인은 신종잉어바이러스이며 사육지에 함께 노출되어지는 병원성을 발하는 세균의 감염으로 인해 폐사율이 더욱 높아지는 상승 effect가 있음을 알 수 있었다. 아울러 발병을 하지 않은 상태라 하더라도 사전에 바이러스가 체내에 들어가 보유하고 있는 잠복감염 어체는 정상 어체에 비하여



기타 병원 세균의 노출에 더욱 약한 저항성을 나타내었음을 확인할 수 있었다. 기아나 수온 스트레스 또한 어류의 발병에 관련되어짐을 확인 할 수 있었다.

친어용으로 사용되어지는 어류의 잠복감염에 의해 발생될 수 있는 자어로의 감염의 전이가능성을 확인하기 위한 연구에서 미 감염 친어를 확보하여 건강한 어류를 생산해 낼 수 있었고, 비록 감염어로부터의 생산치어의 수직 감염은 확인되어지지 않았으나, 현장에서의 잉어의 종묘생산 법이 친어의 산란과정에서 생식소 유래이외의 분비성 물질등으로 감염이 일어날 위험이 있는 것으로 생각되어지므로, 질병의 전파를 차단하기 위한 적극적인 방법의 한가지로서 이러한 방법을 적용한 친어의 선별이 엄격하게 실시되어질 필요가 있을 것으로 생각되어졌다.

수중 잉어 바이러스의 효과적인 소독법을 위해 자외선의 처리조건은  $3.0 \times 10^3 \mu W \cdot sec/cm^2$ 에서  $3.0 \times 10^4 \mu W \cdot sec/cm^2$ 의 범위에서 30초간의 노출을 주는 조건, 소독용 크레졸수를 이용한 살균효과 검사에서는 100 ppm의 농도에서 10분간의 처리조건, 염소계 소독제를 이용하였을 경우에는 30 ppm 이상의 농도조건에서 10분간의 처리로 소독효과가 확인되어졌다. 아울러 포비돈 요오드를 이용한 소독효과 실험에서는 100 ppm에서 1분 또는 10 ppm에서 10분의 처리조건으로도 충분히 바이러스 감염가가 상실되어짐을 확인할 수 있었다.

또한 백신의 실제 적용에 따른 효과를 검토하기 위하여 친어관리 및 사육관리를 통하여 SPF로 생산한 2년생 잉어를 적용하여 백신을 투여한 후 인위적인 공격에 의한 면역효과검증을 실시하였다. 실험어의 혈청을 대상으로 기 확립되어진 항체 검출 ELISA법을 이용하여 확인하는 한편, 이들 면역구의 어류를 대상으로 원인 바이러스를 투여하여 생존율을 확인한 결과 대조구에 비해 높은 생존율을 나타내었다.

## 제5장 결 론

1998년 5월 하순부터 여름철에 이르기까지 약 2~3개월의 기간동안 소양호를 시작으로 춘천호, 화천호, 청평호, 충주호, 장성호, 안동호의 가두리 양식장에서 사육 중이던 잉어류 (이스라엘잉어, 잉어, 비단잉어)의 연쇄 대량폐사가 발생하였다. 이들 어종의 폐사는 댐 및 호소에 한정되지 않고 전국적인 단위로 일반 지수식 노지 양식장 및 육상시설 양식장에서도 발생되었다. 이와 같은 피해는 1999년 5월 초반부터 장성댐, 청평댐 및 남부지방의 노지 및 시설양어장의 사육 잉어류에서 다시 발생하였으나, 그 원인체를 알 수 없는 상황에서 대책 수립이 시급한 실정에 이르렀다.

본 연구진들은 발병 현장 어류를 대상으로 다수의 배양세포를 이용한 바이러스의 분리를 행하여 일부의 세포주에 나타나는 배양 선택성, 세포변성효과(CPE) 확인, 병리조직학적 관찰을 통한 바이러스 특이적 병리소견, 전자현미경 관찰을 통한 바이러스 입자의 확인, 잉어류에 있어 인위적 감염에 따른 병원성의 확인 및 감염 병원체의 재 분리 등과 같은 기초 연구 결과를 근거로 이 질병이 잉어류에서 아직까지 세계적으로 발견 및 보고된 예가 없는 신종 바이러스 유사 병원체에 의한 감염성 질병일 가능성이 높은 것으로 판단하여 본 질병에 대한 어민들의 불안을 해소하고, 산업적으로 안정되고 경쟁력이 유지되어지는 담수어 양식 환경을 조성하기 위하여, 원인 바이러스를 대상으로 그 발병 기구 및 원인 바이러스의 특성을 구명하고, 진단법을 개발하며, 질병 발생조건을 구명하여 현장에서의 대비책을 강구할 목적으로 본 연구를 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다..

양식장 잉어류에서의 대량 폐사는 1998년부터 2002년에 이르기까지 끊이지 않고 지속되어져 왔다. 감염어의 유영특징은 활력을 잃고 수면의 표층으로 올라와 물살에 밀려다니며, 수중 산소가 충분하여도 입을림과 같은 행동을 한다. 감염어의 특이적 외부증상은 체표점액의 다량분비 및 체표면의 백탁증상이다. 체색은

흑화하고, 경우에 따라서는 비늘이 탈락한 개체가 관찰된다. 또한 아가미 뚜껑을 열어보면 아가미 끝부분 또는 아가미자루 부분이 괴사, 변색된 개체도 관찰된다. 감염어의 해부학적 특징은 간의 퇴색, 신장 및 비장의 이상 비대 및 전반적인 빈혈이다. 말기 병어의 경우 내장이 전반적으로 괴사, 육안적으로 보기에 변색되고 형체가 뭉개진 상태로 나타난다. 바이러스 감염 진행에 따른 각 기관 기능의 소실 및 그에 기인된 체내 방어기능의 약화로 감염 말기에 이르면 이차적인 세균감염 유발 등으로 체강내 출혈 또는 복수, 장기내 출혈 등의 증상이 나타나기도 하였다. 대량 폐사가 일어난 각 지역에서 수집한 잉어를 대상으로 원인체를 조사한 결과 공통적으로 바이러스가 폐사어로부터 분리되어졌다. 분리된 바이러스는 IUdR 감수성이 없었으며, 에테르에 감수성이 나타나지 않아 인벨롭을 가지지 않은 RNA 바이러스이었으며, pH에 대하여 내성을 나타내고 있었다. 원인 바이러스의 혈청학적 성상을 조사한 결과 기지의 분류되어진 IPNV, IHNV, SVCV, CSV, EVE, OMV 및 SRV바이러스 등의 항혈청으로는 중화되어지지 않았고, 분리 잉어바이러스 CVJ-7의 rabbit serum에 한하여 전체적으로 중화되어 최근까지 국내에 유입된 적이 없는 새로운 종으로 생각되어졌다. 분리바이러스는 FHM에서 가장 높은 감염가를 나타내고, 그 이외에 RTG-2에서 낮은 수치이기는 하지만 감염이 성립되어지는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 그 외의 세포들에서 배양되어지지 않는 성질을 가지고 있었다. 분리 바이러스는 15~25°C 범위에서 증식가능하며, 가장 적당한 배양온도는 15~20°C의 범위인 것으로 나타났다. 분리 정제를 통하여 얻어진 바이러스의 밀도는 1.34g/ml로 측정되어졌다. 분리바이러스의 배양단계에서의 세포내 형태를 전자 현미경 관찰한 결과, 크기 75-80nm의 외경을 가진 20면체의 외막을 갖지 않는 형태로서 배양세포의 세포질 층에서 확인되어졌으며, 이는 정제 바이러스액의 negative 염색 관찰에서도 유사하게 확인되어졌다. 분리 바이러스의 전기영동 결과에서 5종류의 주요 polypeptide를 확인할 수 있었는데, 크기는 각각 34, 47, 70, 124, 그리고 145 KDa이었다. 정제 바이러스로부터 핵산을 분리하고, 분리된 핵산의 종류 및 크기를 확인한 결과 RNA를 핵산

으로 가지고 핵산의 크기는 약 13 kb 정도로 측정되었다. 자연 감염어 및 인위감염어의 병리학적 특성 조사한 결과 본 바이러스 감염성 질병은 국소적인 숙주역을 가지고 발생되어지는 질병과는 다른 체내 전반적인 장기 또는 조직을 대상으로 그 병변을 수반하는 전신성 질병으로 판단되어졌다. 분리되어진 바이러스가 잉어류의 폐사에 직접적인 원인으로 작용하는 지를 확인하기 위해 잉어 및 이스라엘 잉어를 대상으로 병원성 실험을 행한 결과 감염 15일 까지 100 및 80%의 누적폐사율을 나타내어 폐사의 직접적인 원인임을 확인할 수 있었다. 잉어류 이외의 붕어, 금붕어, 뱀장어, 넙치, 조피볼락을 대상으로 인위 감염을 행하였으나 폐사는 보이지 않아 본 분리바이러스는 잉어과 어류에만 특징적으로 병원성을 발현하는 것으로 판단되었다. 현재까지 잉어류의 질병으로 기재돼 있지 않았던 신종 질병인 본 잉어 바이러스가 기존의 잉어바이러스와 연관성이 있는가를 비교하기 위하여 기존에 보고된 잉어 바이러스 검출에 사용되진 진단용 PCR primer를 사용하여 1999년부터 2002년까지 대표적인 지역의 폐사어 신장과 비장조직을 조사한 결과, 모두 음성으로 확인되어 본 잉어 바이러스가 SVCV, GCRV, KHV 등과 다른 새로운 바이러스임을 확인할 수 있었다. 아울러 폐사어로부터 분리·확보되어진 잉어바이러스 계 57주를 대상으로 잉어봄바이러스병바이러스(SVCV)의 항혈청을 이용하여 ELISA를 수행하여 분리 바이러스 중의 유사성 및 혈청학적 공통성을 확인하였으나 1998년 이후 대량폐사 지역에서 확보되어진 바이러스는 SVCV와 관련성이 없는 동일한 혈청형을 갖는 새로운 바이러스임을 확인할 수 있었다.

바이러스 감염어의 진단방법을 검토하기 위하여 면역학적 진단, 분자생물학적 진단의 내용으로 원인 바이러스의 감염에 따른 질병 진단법을 검토하였다. 본 바이러스성 질병은 지금까지 지구상에서 알려져 있지 않은 신종의 병원체에 의한 질병이라는 점에서 기존에 연구되어 있는 적용 가능한 진단방법이 전무한 실정이며, 이 바이러스성 질병의 원인으로 최초 발병 이후 수년간 연속적으로 재발되고 있는 점에서 질병의 신속하고 명확한 진단법의 개발이 급선무라는 점에서 그 진단능력이

뛰어난 진단법을 검토하였다. 확립된 정제법을 이용하여 정제한 바이러스액으로 항토끼 혈청을 제작하여 바이러스 잉어바이러스 특이적인 검출능을 확인하였다. 제작 항체의 ND<sub>50</sub>를 측정된 결과 1 : 1280 ~ 1 : 640의 항체가 나타내었다. 얻어진 항혈청은 본 분리바이러스의 특이적인 진단에 활용되어질 수 있는 것으로 판단되어 효소 항체법, 형광 항체법 및 ELISA법에 의한 진단법을 검토하고 인위적 감염 어체 및 현장에서 발병된 감염 어체를 대상으로 그 효과를 확인하였다. 이들 작업을 통하여 polyclonal 토끼항체를 이용한 간이 진단법을 제시하였다. 바이러스를 특이적으로 신속히 진단하기 위한 목적 및 백신 개발 연구의 목적으로 바이러스에 대한 monoclonal 항체를 제작하였다. 단클론 항체 제작법을 통하여 생산된 항체에 대해 ELISA법으로 screening하여 바이러스 특이적 검출능이 인정되는 MAb 18-2, 42-1, 55-1을 CV18, CV42, CV55를 개발하였으며, 이들을 이용한 바이러스 특이 검출법의 확립을 위하여 형광항체법 (FAT)에 의한 신속진단법, ELISA에 의한 신속진단법을 확립하였다. 아울러 무감염 친어를 확보할 목적으로 사용되어질 수 있는 혈중 바이러스항체 검출을 위한 ELISA법의 확립을 위하여 잉어의 IgM을 정제하고 그 정제된 IgM에 대응하는 단클론항체를 제작하였다. 잉어로부터 분리되어진 바이러스의 배양액을 항원으로 적용하여 감염 잉어의 혈청내 바이러스항체를 검출하기 위한 유효한 방법을 수립하였다. 다양한 지역에서 양식되어지는 잉어에서 분리된 신종잉어 바이러스에 대한 항체 검출 결과에서 항체 검출 결과와 바이러스에 감염된 어류의 임상적 증상, 그리고 바이러스학적 특성을 비교해 본 결과 매우 특이적으로 본 바이러스의 감염어를 선별해 낼 수 있었다. 따라서 이 방법은 신종 잉어 바이러스에 대한 항체 검출을 위한 방법으로 유용하게 쓰일 것 같다. 잉어 바이러스를 순수 분리하여 이로부터 바이러스의 핵산을 추출한 후 바이러스의 cDNA clone을 다수 확보하여 바이러스의 유전자에 대한 정보를 얻고, 이들 염기서열을 기초로 하여 CVK-11에 특이적인 primer를 합성하고 이를 감염시료에 적용하여 PCR법에 의한 바이러스의 진단연구를 행하였다. 본 연구를 통하여 다수의 잉어 바이러스 유전자 clone들을 확보하였고, 이 재조합 clone들의 염기서열

분석 결과를 토대로 homology를 가지는 바이러스 유전자를 검색하였다. 이들 결과를 바탕으로 잉어 바이러스를 보다 신속하고 효과적으로 진단하기 위한 방법의 개발을 위하여 clone들 중에서 cvk 9\_9 clone의 염기서열을 활용하여 진단에 필요한 PCR primer를 cvk 9\_9 203F (5'-TCCACCATCGACAGTTGTT G-3')와 cvk 9\_9 673R (5'-GGTTTGTGCCACTGGTAAGA-3')로 각각 디자인하여 제작하고 바이러스에 감염된 잉어와 감염되지 않은 건강한 잉어의 조직에서 RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행하였다. 이들을 확인 결과, 바이러스에 감염된 잉어에서만 특이 밴드가 검출되는 것으로 보아 본 연구를 통하여 제작된 진단용 PCR primer는 본 잉어 바이러스에 특이적이므로 바이러스 검출에 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 판단되었다.

본 바이러스성 질병의 방제를 위한 소독법을 확립하고, 개발 가능한 백신을 검토하여 방역법을 수립하기 위한 목적으로 친어용으로 사용되어지는 어류의 잠복감염에 의해 발생되어지는 자어로의 감염의 전이가능성을 확인하기 위해 친어를 대상으로 한 어체 내 잠복감염을 조사하고, 바이러스 질병 발생 현장을 대상으로 다양한 물질을 적용한 질병 구제 및 예방효과를 검토하였으며, 수중 바이러스의 효과적인 소독법 제시를 위하여 시판소독제를 이용한 소독효과를 검토하여 그 효과적인 처리법을 확인하고자 하였다. 다수의 잉어 종묘 생산장 및 양식장을 대상으로 샘플링을 통하여 각 양식장 내 어류 및 사육수를 대상으로 본 바이러스의 출현 및 감염증의 출현을 조사하였다. 조사 결과, 친어로부터 발병원의 전이는 가능성이 희박한 것으로 확인되어 수직감염에 의한 질병의 확산보다는 수평적인 감염에 의한 질병의 확산이 확률적으로 더 높은 것으로 판단되었다. 무감염 이스라엘잉어를 대상으로 바이러스를 감염시켜 신장, 비장, 혈액, 뇌, 안구, 간, 아가미, 근육 내의 바이러스 감염가를 조사하고 각각의 스탬프 표본을 대상으로 MAb를 이용한 형광항체법에 따른 각 장기 내의 바이러스 항원 검출 실험을 행한 결과 본 바이러스는 체외에서 체표 및 아가미를 침입 문호로 이용하여 혈관계를 이용하여 1차 신장에 도달하고 그 이후 어체의 생체 조건에 따라 다양하기는 하겠지만 혈관계를 이용하여 감염 후 4일 전후에는 간, 비장 등의 다양한 체내

기관으로 이동함으로써 그 숙주역을 넓힘과 동시에 각 기관 내 세포에 증식하여 전신성의 병변을 유발하게 되며, 또한 이상의 과정을 거친 후, 약 1주일 전후에 이르면 폐사에 도달하는 것으로 해석되어졌다. 2년간의 현장 샘플링에서 매년 바이러스 양성의 샘플이 확인되어진 양식장을 대상으로 사육용수를 통한 바이러스의 유입경로 및 질병 발생과의 연계성을 검토하였다. 잉어 바이러스는 동일 수계 내에서 확산에 따른 전파가 이루어짐이 확인되어졌으며, 하천수의 직접적인 사육수로의 이용은 주의하여야 할 것으로 보였다. 친어용 어류를 임의로 샘플링하여 각 개체로부터 혈액을 채취하고 혈청을 분리하여 바이러스감염을 확인하고 무감염 및 감염이 확인된 친어군을 나누어 종묘 생산을 행하여 각각의 실험구에서 생산되어진 치어를 대상으로 바이러스의 감염을 확인하였다. 친어 중에서 바이러스의 감염이 확인된 개체를 해부하여 체내의 장기 및 난 또는 정액 중의 바이러스의 검출을 행한 결과, 기타 장기에서는 바이러스의 검출이 양성이었음에도 불구하고 난 및 정자를 대상으로 행한 바이러스 검출결과는 모두 음성을 나타내어 난과 정자를 경유하여 수정·부화되는 치어로의 수직감염은 본 바이러스의 경우 인정되지 않을 확률이 높은 것으로 판단되었다. 이들 친어군으로부터 생산되어진 치어들을 대상으로 부화 일령 3~5일의 자어를 채집하여 바이러스의 검출을 행한 결과에서도 바이러스는 확인되지 않았다. 즉, 수직감염은 인정되어지지 않음이 확인되어졌다. 하지만, 양식 현장의 종묘생산과정을 생각해 볼 때, 친어사육-산란-부화로 이어지는 일련의 종묘생산이 동일한 장소(수조 또는 못)에서 행해지는 경우에는 감염된 친어로부터 생산된 종묘로의 넓은 의미에서의 수직감염은 충분히 발생할 수 있을 것으로 예측되므로 종묘생산 시 친어의 감염유무에 대한 관리 는 질병의 확산과 지속적인 발생을 감소시키기 위해서 필수적으로 행해야 할 것으로 생각된다. 바이러스 감염어 조사과정에서 본 바이러스 이외에 에로모나스 속, 비브리오 속, 플렉시박터 속 등의 세균류, 텔로하넬루스 속, 믹소볼루스 속 등의 포자충류 및 아가미흡충류, 섬모충류 등과 같은 외부 기생충들이 각기 다양하게 혼합되어져 검출되었다. 따라서 그 필요성에 따라 연구과정을 통해 분리되어

진 에로모나스 속 세균 및 플렉시박터 속 세균에 대해 잉어바이러스와의 혼합감염 및 잠복감염의 조건을 설정하여 그 발병 특성에 대하여 조사하였다. 아울러 본 질병이 알려지기 시작하던 시기에 주요 잉어 양식방법이었던 가두리양식장에서 주로 봄철 수온상승기에 최대의 피해를 나타냈던 점 등을 고려하여 잉어의 대량 폐사요인을 영양결핍 상태 즉, 체력이 저하되어지고 면역력이 약한 상태에서의 수온 변화에 의한 스트레스와 바이러스 감염에 의한 발병과의 연관성에 대해서도 조사하였다. 실험결과 바이러스와 에로모나스 속이 혼합감염된 조건의 시험구에서 바이러스 및 세균 단독 감염구에 비하여 매우 높은 폐사율을 보였고, 바이러스 잠복감염 조건에서의 세균의 2차 감염에 따른 폐사를 확인하기 위한 실험 결과 발병에 이르지 않은 저농도의 바이러스를 감염시킨 후 한달이 경과한 바이러스 보유어에 에로모나스 세균을 침지 공격한 시험구의 폐사율이 바이러스를 보유하지 않은 정상 사육어에 에로모나스를 공격한 실험구에 비하여 50%나 높은 폐사율을 보였다. 이러한 점에서 대량폐사의 주요인은 신종잉어바이러스이며 사육지에 함께 노출되어지는 병원성을 발하는 세균의 감염으로 인해 폐사율이 더욱 높아지는 상승 effect가 있음을 알 수 있었다. 아울러 발병을 하지 않은 상태라 하더라도 사전에 바이러스가 체내에 들어가 보유하고 있는 잠복감염 어체는 정상 어체에 비하여 기타 병원 세균의 노출에 더욱 약한 저항성을 나타내었음을 확인할 수 있었다. 기아나 수온 스트레스 또한 어류의 발병에 관련되어짐을 확인할 수 있었다. 친어용으로 사용되어지는 어류의 잠복감염에 의해 발생할 수 있는 자어로의 감염의 전이가능성을 확인하기 위한 연구에서 미 감염 친어를 확보하여 건강한 어류를 생산해 낼 수 있었고, 비록 감염어로부터의 생산치어의 수직 감염은 확인 되어지지 않았으나, 현장에서의 잉어의 종묘생산 법이 친어의 산란과정에서 생식소 유래이외의 분비성 물질등으로 감염이 일어날 위험이 있는 것으로 생각되어지므로, 질병의 전파를 차단하기 위한 적극적인 방법의 한가지로서 이러한 방법을 적용한 친어의 선별이 엄격하게 실시되어질 필요가 있을 것으로 생각되어졌다. 수중 잉어 바이러스의 효과적인 소독법을 위해 자외선의 처리조건은



$3.0 \times 10^3 \mu W \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$ 에서  $3.0 \times 10^4 \mu W \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$ 의 범위에서 30초간의 노출을 주는 조건, 소독용 크레졸수를 이용한 살균효과 검사에서는 100 ppm의 농도에서 10분간의 처리조건, 염소계 소독제를 이용하였을 경우에는 30 ppm 이상의 농도 조건에서 10분간의 처리로 소독효과가 확인되어졌다. 아울러 포비돈 요오드를 이용한 소독효과 실험에서는 100 ppm에서 1분 또는 10 ppm에서 10분의 처리조건으로도 충분히 바이러스 감염가가 상실되어짐을 확인할 수 있었다. 또한 백신의 실제 적용에 따른 효과를 검토하기 위하여 친어관리 및 사육관리를 통하여 SPF로 생산한 2년생 잉어를 적용하여 백신을 투여한 후 인위적인 공격에 의한 면역효과검증을 실시하였다. 실험어의 혈청을 대상으로 기 확립되어진 항체 검출 ELISA법을 이용하여 확인하는 한편, 이들 면역구의 어류를 대상으로 원인 바이러스를 투여하여 생존율을 확인한 결과 대조구에 비해 높은 생존율을 나타내었다.

앞으로 본 연구과정을 통하여 개발되어진 진단법을 양식 현장에서 신속히 활용할 수 있도록 진단 kit화하는 추가적인 연구 및 현장에서 얻어진 질병 발생 특성과 방제 연구 결과를 기반으로 감염을 미리 차단하는 예방 사육 manual을 제작하여 양식어민 교육 및 홍보에 활용하고, 아울러 백신 개발을 위한 추가적인 연구를 통하여 현장성있는 백신을 개발 보급하는데 관심을 기울여야 할 것으로 생각된다.

## 제 6 장 참고문헌

Ahne, W. (1978a): Uptake and multiplication of spring viraemia of carp virus in carp, *Cyprinus carpio* L. Journal of Fish Diseases. 1: 265-268.

Anderson, E.D., Mourich D.V., Fahrenkrug S.C., LaPatra S., Shepherd J. and Leong J.A. (1996): Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious haematopoietic necrosis virus. Mol. Mar. Biol. Biotechnol, 5.

Arimoto, M., Mushiake K., Mizuta Y., Nakai T., Muroga K. and Furusawa I. (1992): Detection of striped jack nervous necrosis virus by ELISA. Fish Pathol. 27.

Brian, W.J., et al. (1996): Virology methods manual. Academic press.

Cann, A.J. (1999): Virus culture [A practical approach]. Oxford university press

Cann, A.J. (2000): DNA Viruses [A practical approach]. Oxford university press.

Cann, A.J. (2000): RNA Viruses [A practical approach]. Oxford university press.

Chang, P.H., Lee S.H., Chiang H.C., Jong M.H. (1999): Epizootic of Herpes-like Virus Infection in Goldfish. *Carassius auratus* in Taiwan.

- Fish Pathology 34(4): 209-210.
- Chen, Y., Jiang Y. (1983): Studies on the morphological and physico-chemical characterization of the hemorrhagic virus of grass carp. *KeXue TongBao(Foreign Lang Edn)*. 28: 1138-1140.
- Christie, K.E. (1997): Immunization with viral antigens: infectious pancreatic necrosis. *Dev. Biol. Stand.* 90.
- Clive, P., et al. (2001): Multiple groups of novel retroviral genomes in Pigs and related species. *J. Virol.* 75. 2771-2775.
- Dimmock, N.J. (1994): Introduction to modern Virology(forth edition). Blackwell science.
- Ding, Q., Yu L., Wang X., Ke L. (1991): Study on infecting other fishes with grass carp hemorrhagic virus. *Chin J Virol* 6(4): 371-373.
- Dixon, P. (1997): Immunization with viral antigens: viral diseases of carp and catfish. *Dev. Biol. Stand.* 90.
- Dixon, P.F., Hattenberger-Baudouy A.M., Way K. (1994): Detection of carp antibodies to spring viraemia of carp virus by a competitive immunoassay. *Dis Aquat Org* 19: 181-186.
- Elisabeth, H., et al. (1998): Retroviral diversity and distribution in vertebrates. *J. Virol.* 72. 5955-5966.
- Ellis, A.E. (1990): Lysozyme assays. In "Techniques in Fish Immunology".

- Stolen, J. S. Flecher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S. & van Muiswinkel, W.B., eds. pp. 101-103. Fair Haven, NJ:SOS Publication.
- Ellis, A.E. (2001): Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* 25: 827-839.
- Ericsson, T., et al. (2001): Identification of novel porcine endogenous betaretrovirus sequences in miniature swine. *J. Virol.* 75:2765-2770.
- Faisal, M. and Ahne W. (1984): Spring viraemia of carp virus (SVCV): comparison of immunoperoxidase, fluorescent antibody and cell culture isolation techniques for detection of antigen. *Journal of Fish Diseases.* 7: 57-64.
- Fang, Q., Attoui H., Biagini J.F., Zhu Z., de Micco P., de Lambalerie X. (2000): Sequence of genome segments 1, 2 and 3 of the grass carp reovirus(Genus aquareovirus, family reoviridae). *Biochem. Biophys Res Commun.* 274(3): 762-766.
- Fijan, N.N., Matasin Z., Soney Z., Olah S. and Zwillenberg L.O. (1971): Isolation of viral causative agent from the acute form of infectious dropsy in carp. *Vet. Arb.* 41.
- Franki, R. (1991): Classification and nomenclature of viruses. Springer-Verlag Press, New York.
- Gilad, O., Yun S., Andree K.B., Adkison M.A., Zlotkin A., Bercovier H., Eldar A., Hedrick R.P. (2002): Initial characteristics of koi herpesvirus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in

- koi, *Cyprinus carpio koi*. Dis Aquat Org 48: 101-108.
- Hah, Y.C., Hong S.W., Kim M.H., Fryer J.L. and Winton J.R. (1984): Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from goldfish (*Carassius auratus*) and chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in Korea. Kor. J. Microbiol. 22.
- Hedrick, R.P., Gilad O., Yun S., Spangenberg J.V. (2000): A Herpesvirus Associated with Mass Mortality of Juvenile and Adult Koi, a Strain of Common Carp. Journal of Aquatic Animal Health. 12: 44-57.
- Hoffmann, B., Schütze H., Mettenleiter T.C. (2002): Determination of the complete genomic sequence and analysis of the gene products of the virus of Spring Viremia of Carp, a fish rhabdovirus. Virus Research. 84: 89-100.
- Ishima, S., Yoshimizu M., Oh M.J. and Ezura Y. (1994): Nervous necrosis virus isolated from barfin flounder. Proceedings of the Japanese Society of Fish Pathology.
- Jung, S.J. and Miyazaki T. (1995): Herpesviral haematopoietic necrosis of goldfish, *Carassius auratus* (L.). Journal of Fish Disease. 18: 211-220.
- Jung, S.J. and Oh M.J. (1999): Iridovirus-like infection associated with high mortality in south coastal area of the Korean peninsula. J. Fish Dis. 40. 234-237.
- Jung, S.J. and Oh M.J. (2000): Iridovirus-like infection associated with high mortalities of striped beakperch, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et Schlegel), in southern coastal areas of the Korean peninsula. J. Fish Dis.

23. 223-226.

Kaku, Y., Yamada Y. and Wakabayashi H. (1999): Characterization of atypical *Aeromonas salmonicida* isolated from an epizootic ulcerative disease in carp (*Cyprinus carpio*). Fish Pathol. 34. 155-162.

Ke, L., Fang Q. and Cai Y. (1990): Characteristics of a new isolation of hemorrhagic virus of grass carp. Acta Hydrobiol Sin. 14(2): 153-159 (in Chinese with English abstract).

Kellam, P. (1998): Molecular identification of novel viruses. Trends in Microbiology. 16(4).

Kim, Y.J. Choi, W.C. Kim, H.R. Kim, J.H. Jung S.J. and Oh, M.J. (1999): Detection of white spot baculovirus from *Penaeus chinensis* in Korea. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.. 19. 4.

Kurita, J., Nakajima K., Hirono I. and Aoki T. (1998): Polymerase Chain Reaction(PCR) Ampification of DNA of Red Sea Bream Iridovirus(RSIV). Fish Pathol. 33. 1.

Lenoir, G. and Kinkelin P. DE. (1975): Fish Rhabdoviruses: Comparative Study of Protein Structure. Journal of Virology. 259-262.

Leong, J.C., Anderson E., Bootland L.M., Chiou O.W., Johnson M., Kim C., Mourich D., Trobridge G. (1997): Fish vaccine antigens produced or delivered by recombinant DNA technologies. Dev. Biol. Stand, 90.

Leong, J.C., Fryer J.L. and Winton J.R. (1988): Vaccination against Infectious

- Haematopoietic Necrosis, In "Fish Vaccination" (ed. by A. E. Ellis). Academic Press.
- Levy, J.A. (1993): The Retroviridae. Plenum Press, New York.
- Li, J., Wang T., Lu R., Chen H. (1999): Advance in reseach of hemorrhagic virus of grass carp. *Oceanol Limnol Sin.* 30(4): 445-453 (in Chinese with English abstract).
- Lorenzen, N. and Olesen N.J. (1997): Immunization with viral antigens: viral haemorrhagic septicaemia. *Dev. Biol. Stand.* 90.
- Misao, A., Keiichi M., Younosuke M., Toshihiro N., Kiyokuni M. and Iwao F. (1992): Detection of Striped Jack Nervous Necrosis (SJNNV) by Enzyme-Linked Immunosrbent Assay (ELISA). *Fish Path.* 27. 4.
- Miyazaki, T., et al. (2001): Histopathology of viremia-associated ana-aki-byo in combination with *Aeromonas hydrophila* in color carp *Cyprinus carpio* in Japan. *Dis. Aquat. Org.* 44: 109-120.
- Miyazaki, T., Kageyama T., Miura M. and Yoshida T. (2001): Histopathology of viremia-associated ana-aki-byo in combination with *Aeromonas hydrophila* in color carp *Cyprinus carpio* in Japan. *Dis Aquat Org.* 44: 109-120.
- Miyazaki, T., Okamoto H., Kageyama T. and Kobayashi T. (2000): Viremia-associated ana-aki-byo, a new viral disease in color carp *Cyprinus carpio* in Japan. *Dis Aquat Org.* 39: 183-192.

- Mushiake, K., Nishizawa T., Nakai T., Furusawa I. and Muroga K. (1994): Control of VNN in Striped Jack: Selection of Spawners Based on the Detection of SJNNV Gene by Polymerase Chain Reaction(PCR). *Fish. Path.* 29. 3.
- Nakajima, K. and Sorimachi M. (1995): Production of Monoclonal Antibody against Red Sea Bream Iridovirus. *Fish path.* 30. 1.
- Nakajima, K., Maeno Y., Fukudome M., Fukuda Y., Tanaka S., Matsuoka S. and Sorimachi M. (1995): Immunofluorescence Test for the Rapid Diagnosis of Red Sea Bream Iridovirus Infection using Monoclonal Antibody. *Fish path.* 30(2): 115-119.
- Nakajima, K., Maeno Y., Kurita J. and Inui Y. (1995): Vaccination Against Red Sea Bream Iridoviral Disease in Red Sea Bream. *Fish Path.* 32. 4.
- Noonan, B., Enzmann P.J. and Trust T.J. (1995): Recombinant infectious haematopoietic necrosis virus and haemorrhagic septicaemia virus glycoprotein epitopes expressed in *Aeromonas salmonicida* induce protective immunity in rainbowtrout(*Oncorhynchus mykiss*). *Appl. Environ. Microbiol.* 61. 10.
- Oh, M.J. (1997): Effects of the UV irradiation, ozonization and disinfectants on the infectivity of the retrovirus of salmonid. *Bull. Yos. Nat. Univ.* 11.
- Oh, M.J. and Jung S.J. (1998): Viral diseases of fish in Korean mariculture. In *Proceedings of fifth international symposium on the efficient application and preservation of marine biological resources* (ed. by J.A Shin, S.J. Jung, J.M. Kim and W.K. Lee). Oct. 1999, Yos, Korea. pp25-32.



- Oh, M.J. and Yoshimizu M. (1997): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of RVS (retrovirus of salmonid). *J. Fish Pathol.* 9. 2.
- Oh, M.J. Jung S.J., Choi T.J., Kim H.R., Rajendran K.V., Kim Y.J., Park M.A. and Chun S.K. (2001): A Viral Disease Occurring in Cultured Carp *Cyprinus carpio* in Korea. *Fish Pathol.* 36(3): 147-151.
- Oreshkova, S.F., Shchelkunov I.S., Tikunova N.V., Shchelkunova T.I., Puzyrev A.T. and Ilyichev A.A. (1999): Detectin of spring viremia of carp virus isolates by hybridization with non-radioactive probes and amplification by polymerase chain reaction. *Virus Research.* 63: 3-10.
- Oyamatsu, T., Hata N., Yamada K., Sano T. and Fukuda H. (1997): An Etiological Study on Mass Mortality of Cultured Colorcarp Juveniles Showing Edema. *Fish Pathol.* 32.
- Oyamatsu, T., Hata N., Yamada K., Sano T. and Fukuda H. (1997): An etiological study on mass mortality of cultured colorcarp juveniles showing edema. *Fish Pathol.* 32. 81-88.
- Park, J.W., Lee J.J., Geong G.J. and Hah Y.C. (1989): Characterization of the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) isolated from cultured rainbow trout in Korea. *Kor. J. Microbiol.* 27.
- Plumb, J.A. (1988): Vaccination against Channel Catfish virus, In "Fish Vaccination" (ed. by A. E. Ellis). Academic Press.

- Qiu, T., Lu R.H., Zhang J. and Zhu Z.Y. (2001): Complete nucleotide sequence of the S10 genome segment of grass carp reovirus(GCRV). *Dis Aquat Org.* 44: 69-74.
- Rangel, A.A.C., Rockemann D.D., Hetrick F.M. and Samal S.K. (1999): Identification of grass carp hemorrhagic virus as a new genogroup of aquareovirus. *J Gen Virol.* 80: 2399-2402.
- Rodák, L., Pospíšil Z., Tománek J., Veselý T., Obr T. and Valíček L. (1993): Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for the detection of spring viraemia of carp virus(SVCV) in tissue homogenates of the carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Diseases.* 16: 101-111.
- Sakai, M., Miyama K., Atsuta S. and Kobayashi H. (1996): The chemiluminescent responses of phagocytic cells of coho salmon, rainbow trout and carp against *Renibacterium salmoninarum*. *Fish and shellfish Immunol.* 6: 71-73.
- Sano, N., Moriwake M. and Sano T. (1993b): *Herpesvirus cyprini*: Thermal Effects on Pathogenicity and Oncogenicity. *Fish Pathology.* 28(4): 171-175.
- Sano, N., Sano M., Sano T. and Hondo R. (1992): *Herpesvirus cyprini*: detection of the viral genome by *in situ* hybridization. *Journal of Fish Disease.* 15: 153-162.
- Sano, T., Fukuda H., Furukawa M., Hosoya H. and Moriya Y. (1985): A herpesvirus isolated from carp papilloma in Japan. *Fish shellfish Pathol.* 32: 307-311.

- Sano, T., Hukuda H., Furukawa M., Hosoya H. and Moriya Y. (1985): A Herpesvirus isolated from carp papilloma in Japan. In "Fish and Shellfish Pathology" (ed. by A. E. Ellis). Academic Press, London.
- Sano, T., Morita N., Shima N. and Akimoto M. (1991b): *Herpesvirus cyprini*: lethality and oncogenicity. Journal of Fish Diseases. 14: 533-543.
- Satoru, S., Hosono N. and Kusuda R. (1997): Detection of aquatic birnavirus gene from fish using a combination of reverse transcription- and nested PCR. J. Mar. Biotechnol. 5.
- Scott, A.L. and Klesius P.H. (1981): Chemiluminescence : A novel analysis of phagocytosis in fish. Develop. Biol. Standard. 49: 243-254.
- Sharon, B., William B.S., Philip E.M., Lee M.K., John T.S. and Bruce L.N. (1995): Detection and Identification of Aquatic Birnaviruses by PCR Assay. J. Clin. Microbiol. 33.
- Shchelkunov, S. and Shchelkunova T.I. (1990): Infectivity experiments with *Cyprinus carpio* iridovirus(CCIV), a virus unassociated with carp gill necrosis. Journal of Fish Diseases. 13: 475-484.
- Sohn, S.K., Park M.A., Oh M.J. and Chun S.K. (1998): A fish nodavirus isolated from cultured sevenband grouper. J. Fish Pathol. 11.
- Wang, T., Chen H., Liu H., Yi Y. and Guo W. (1994): Preliminary studies on the susceptibility of *Gobiocypris rarus* to hemorrhagic virus of grass carp. Acta Hydrobiol Sin. 18(2): 144-149 (in Chinese with English

abstract).

Watanabe, K. and Yoshimizu M. (1998): Disinfection of Equipments for Aquaculture and Fertilized Eggs by Ozonated Seawater. Fish Path. 33. 3.

Winton, J.R. (1997): Immunization with viral antigens: infectious haematopoietic necrosis. Dev. Biol. Stand, 90.

Yoshinaga, T., Yoshimizu M. and Ezura Y. (1997): Simultaneous detection of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) by reverse transcription (RT-) polymerase chain reaction (PCR). Fish. Sci. 64.

Zhu, X., Jia L. and Zang M. (1985): Haemathologic study of hemorrhagic disease on the grass carp fingerlings in the latency and development period. Pages 56-57 in Asian symposium of freshwater fish culture, Beijing, Peoples Republic of China. October 10-15. Abstract.

박명애, 손상규, 박정우, 정영기. (1994): 전염성 조혈기 괴사 바이러스 (IHNV)의 항원 유도 단백질 특성. 한국어병학회지. 7. 1.

오명주, 김석렬, 정성주, 김형락, 김홍윤, 여인규. (2000): 한외여과막을 이용한 해수내 어류 병원바이러스 농축법. 한국어병학회지. 13(1): 61-65.

오명주, 김홍윤, 조현서. (1999): 오존 처리법에 의한 양어용수 살균에 대하여-1. 해산 어류 병원 세균의 오존 감수성. 한국어병학회지. 12. 1.

오명주, 박명애, 김형락. (1998): 국내 양식산 무지개송어 및 연어과 어류의 바이러스 감염 분포. 한국어병학회 학술발표 요지집.

- 오명주, 정성주, 김영진. (1999a): 중합효소반응법(PCR)을 이용한 양식산 해산어로부터의 버나바이러스의 검출. J. Fish Pathol. 12. 1.
- 오명주, 정성주, 김영진. (1999c): 중합효소연쇄반응법에 의한 남해안 해산어의 이리도바이러스 감염에 대한 연구. J. Fish Pathol. 12. 1.
- 오명주, 정성주, 김형락. (1999b): 한국산 넙치에서 분리된 버나바이러스의 IPNV 및 MABV (Marine birnavirus)와의 비교. J. Fish Pathol. 12. 1.
- 오명주, 최태진, 심두생, 박명애, 손상규, 김진우, 김영진. (1997): HRV (Rhabdovirus olivaceus), FBV (flounder birnavirus) 및 RVS (retrovirus of salmonid)의 감염가에 미치는 해수의 영향. 한국어병학회지. 10. 2.
- 오명주, 최태진. (1998): 양식산 넙치로부터 HRV-like rhabdovirus의 분리. 한국어병학회지. 11. 2.
- 차승주, 도정완, 김현주, 조화자, 문창훈, 박정민, 박명애, 김수미, 손상규, 방종득, 박정우. (1998): Polymerase Chain Reaction(PCR)을 이용한 Iridovirus의 검색, J. Fish. Pathol. 11. 1.