

참돔이리도바이러스 감염 돌돔에서 임상적 변화와 viral genome copy number 간의 상관관계

신동준 · 정이설 · 김민재 · 김국현 · 김광일*

부경대학교 수산생명의학과

Correlation between clinical changes and viral genome copy number in rock bream infected with red sea bream iridovirus

Dong Jun Shin, Yi Seol Jeong, Min Jae Kim, Guk Hyun Kim and Kwang Il Kim*

Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan, 48513, Republic of Korea

In this study, the correlation between clinical changes and RSIV genome copy number was investigated to determine the quantitative criteria for the characteristics of RSIV infection. The rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) was intraperitoneally injected with three different doses (1.0×10^1 , 1.0×10^3 and 1.0×10^5 viral genome copies/fish) as low, medium, and high doses, respectively. The clinical signs (spleen enlargement, death) observation and real-time PCR were conducted at 5, 10 and 14 days post-injection. During the experiment, spleen index as a quantitative indicator for spleen enlargement was continuously increased in the medium- (up to 2.26) and high-dose (up to 4.99) challenge groups, respectively. Notably, when the spleen index was over 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0, a positive correlation was revealed with average viral genome copy numbers of 2.51, 3.37, 4.97 and 5.43×10^7 viral genome copies/mg, respectively. Moreover, the threshold of spleen index over 1.5 was 1.0×10^6 viral genome copies/mg, while the thresholds of spleen index over 2.0 and dead was 2.51×10^7 viral genome copies/mg and the thresholds of spleen index over 2.5 and 3 was 3.98×10^7 viral genome copies/mg. These findings suggest the possibility of quantitatively analyzing the characteristics and development process of RSIV infection.

Key words: RSIV, red sea bream iridovirus, real-time PCR, clinical sign, threshold, correlation, histopathology

서 론

참돔이리도바이러스병(Red sea bream iridoviral disease, RSIVD)은 1990년 일본에서 처음 보고된 이후 우리나라 및 아시아 국가에 발생하여 큰 타격

을 주고 있는 질병이다(Inouye et al., 1992; Gibson-Kueh et al., 2004; Girisha et al., 2020). 특히 우리나라의 경우, 남해안 지역의 양식 돌돔에서 1998년도에 RSIV의 최초 발생이 보고되었으며(Sohn et al., 2000; Jung and Oh, 2000), 특히 돌돔을 비롯한 다양한 해산어류에서 발생하여 양식 업계에 큰 타격을 주고 있는 실정이다(Lee et al., 2007). RSIVD의 원인체인 red sea bream iridovirus

*Corresponding author: Kwang Il Kim
Tel: +82-51-629-5946, Fax: +82-51-629-5938
E-mail: kimki@pknu.ac.kr

(RSIV)는 *Iridoviridae*과 *Megalocyctivirus*속에 속하며, *Megalocyctivirus*는 major capsid protein (MCP) 및 adenosine triphosphatase (ATPase) 유전자 염기서열의 계통분류에 따라 RSIV, infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV), turbot reddish body iridovirus (TRBIV) 및 scale drop disease virus (SDDV)로 분류된다(Kurita and Nakajima, 2012; De Groof et al., 2015).

세계동물보건기구(World Organization for Animal Health, WOAH)에서는 RSIVD의 진단방법으로 임상증상, 병리조직학적 관찰, transmission electronic microscope (TEM), indirect fluorescent antibody test (IFAT), bioassay (세포 배양 및 IFAT 또는 PCR), polymerase chain reaction (PCR)법, 염기서열 분석 등을 권고하고 있으며 특히 RSIV 및 ISKNV 유전자형의 검출을 위한 PCR법의 사용을 권장하고 있다. 최근 RSIV의 정량적 분석을 위한 다양한 real-time PCR 개발이 보고되었다(Lee et al., 2020; Kim et al., 2021; Kim et al., 2022). 하지만, 이러한 PCR 및 real-time PCR은 다양한 분야에서 신속한 진단 방법으로 일반적으로 사용되고 있으나 유전자 염기서열에 기초한 분자생물학적 진단방법은 숙주 생물의 임상적 변화 및 병원체의 발달 과정을 구명하기에 어려움이 있다.

RSIV에 감염된 어류의 감염 특성을 이해하고자 체내 바이러스의 정량적 수준과 비장 비대 수치(spleen index), 바이러스 방출량(viral shedding)에 관한 연구가 수행되어졌다(Jin et al., 2011; Kim et al., 2023). 특히, Jin et al. (2011) 연구에서 RSIV에 의해 감염된 어류의 주요 임상증상인 비장 비대를 기초로 spleen index와 real-time PCR의 정량적 분석 결과의 상관관계를 연구한 바 있으나 비장 비대와 임상적 변화를 유발할 수 있는 viral genome copy 값에 대한 정량적 기준은 설정되지 않았다.

따라서 본 연구에서는 돌돔에 RSIV를 농도별로 인위 감염하여 임상증상, 병리조직학적 병변 및 real-time PCR을 통해 감염 상태를 분석하였으며, spleen index와 viral genome copy number간의 상관관계를 분석하여 RSIV에 대한 감염 특성을 정량화할 수 있는 기준을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

바이러스 배양

본 연구에 사용된 RSIV는 2019년 8월 국내 남해안 양식장에서 RSIV 감염 돌돔으로부터 분리한 19V (RSIV Subtype-II)를 사용하였다. RSIV 배양은 이전 연구에서 개발된 돌돔 지느러미 유래 세포 (rock bream fin; RBF) (Jeong et al., 2021)를 사용하였다. RBF 세포는 10% fetal bovine serum (performance plus grade; gibco, USA), 1% antibiotic-antimycotic solution (gibco, USA)가 첨가된 L-15 배지 (gibco, USA)에서 배양하였다. T75 flask (75 cm² 면적)에서 배양된 RBF 세포(80-90%의 세포 부착 밀도)에 초기 배양액 100 µL를 접종 후 25°C 조건에서 7일간 세포변성효과(cytopathic effect, CPE) 생성 여부를 관찰하고 확인된 배양액은 -50°C에서 동결 및 25°C에서 해동과정을 3회 반복하였다. 이후 배양액을 500 × g로 10분 간 원심분리 후, 상등액을 분리하여 실험 전까지 -80°C에 보관하였다.

인위 감염

실험어는 국내 거제에 위치한 양식장에서 질병으로 인한 임상증상을 보이지 않는 돌돔(*Oplegnathus fasciatus*)을 구입하여 사육온도 25°C로 2주 동안 순치하였다. 이후, 실험어 중 무작위로 5마리를 선정하여 세계동물보건기구(WOAH)의 수산동물 진단 테스트 매뉴얼(Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animal)에서 권고하는 PCR 방법(Kurita et al., 1998)과 real-time PCR (Kim et al., 2021)방법에 따라 검사를 수행하고 RSIV에 대한 무병 상태를 확인 후 실험에 사용하였다(Table 1).

돌돔에 바이러스를 1.0×10^1 (저농도), 1.0×10^3 (중농도), 1.0×10^5 (고농도) viral genome copies/fish로 50마리씩 100 µL 용량으로 복강 주사하였다(실험 1). 동일한 농도 조건에서 각 그룹별로 10마리씩 복강 주사하여 20일간 누적 폐사율을 관찰하였고(실험 2), 각 실험의 대조구 10마리에는 PBS를 동량(100 µL) 주사하였다. 해당 돌돔은 55 L 실험 수조에서 25°C의 수온으로 순치되었으며, 사료는 어체중의 2%로 하루에 한 번 급이하였고, 매일 사육수의 50%를 동일 온도의 해수로

Table 1. PCR and qPCR condition in this study

Genomic regions	Primer	Sequence (5' - 3')	Condition	Reference
<i>Pst</i> I fragment (PCR ^a)	1-F	CTC AAA CAC TCT GGC TCA TC	95°C 5min	Kurita et al. (1998)
	1-R	GCA CCA ACA CAT CTC CTA TC	94°C 30s, 58°C 1 min,	
			72°C 1min ×30	
			72°C 7min	
Major capsid protein	RSIV 1094F	CCA GCA TGC CTG AGA TGG A	94°C 10min	Kim et al. (2021)
	RSIV 1221R	GTC CGA CAC CTT ACA TGA CAG G	94°C 10s, 60°C	
(real-time PCR)	RSIV 1177 probe	FAM-TAC GGC CGC CTG TCC AAC G-BHQ1	35 ×40	

^aWOAH recommended PCR assay in Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animal Chapter 2.3.7

환수하였다. 본 연구의 인위 감염 실험은 부경대학교 동물실험윤리위원회로부터 승인을 받아 수행하였다(승인 번호: PKNUIACUC-2022-68).

Spleen index

RSIV 초기 접종 농도에 따른 비장 비대 수치를 정량화하기 위해 상기 2.2의 실험 1에서 접종 후 5, 10, 14일에 저, 중, 고농도 접종 그룹별로 살아있는 돌돔 10마리 및 대조구에서 살아있는 돌돔 3마리와 실험 2에서 폐사한 돌돔을 샘플링하여 spleen index를 Jin et al. (2011)의 연구에서 제시된 바와 같이 아래의 공식으로 spleen index로 산출하였다.

$$\text{Spleen index} = [\text{spleen weight [g]}/\text{body weight [g]} \times 1000]$$

Real-time PCR

돌돔의 비장 조직 내 viral genome copy number를 알아보고자, 상기 2.3에서 샘플링한 개체를 대상으로 real-time PCR을 수행하였다. 샘플링 개체 및 폐사 개체의 비장 조직 10 mg으로부터 yesGTM Cell Tissue mini kit (GenesGen, Busan, South Korea)을 이용하여 DNA를 분리하였다. Viral DNA의 정량 분석을 위해 Kim et al. (2021) 방법에 따라 *Megalocytivirus*의 MCP 유전자를 표적으로 한 primer와 probe set (Table 1)를 이용하여 real-time PCR을 수행하였으며, 95% Limit of Detection (LOD_{95%})를 기준으로 5.297 copies/μL 이하의 시료의 경우 음성으로 판정하였다.

병리조직학적 병변

병리조직학적 병변 분석을 위해 상기 2.3의 실험

1에서 접종 농도 그룹별로 샘플링한 돌돔 10마리 중 5마리를 얼음으로 마취 후 비장을 적출하여 10% 중성 포르말린에 24시간 동안 고정을 실시하였다. 24시간 후, 고정된 장기들을 동일 고정액에 재고정을 실시하고, 70%에서 100% 순차농도 알코올에 탈수, xylene으로 투명화하여 파라핀 친화, 파라핀 포매 후 rotary형 microtome (RM2125RT, Leica LTD)을 사용하여 4 μm 두께의 조직 박편을 얻었다. 이를 H&E 염색(Hematoxylin-eosin staining)을 실시하고 malinol 액으로 봉입하여 광학현미경 (BX50, Olympus LTD.)으로 관찰하여 디지털카메라(DP72, Olympus LTD.)로 사진을 촬영하였다. 비장 조직 표본 1 mm²당 존재하는 이형비대세포를 계수하여 enlarged cells/mm² 단위로 산출하였다.

RSIV 감염 돌돔의 임상적 변화와 viral copy number 간의 상관관계 분석

RSIV 감염 돌돔의 비장 비대와 바이러스 복제 수준 간의 상관관계를 알아보고자, viral copy number와 spleen index에 대해 선형회귀 분석하였다. 비장 비대 및 폐사 임계점은 로지스틱 회귀분석(R version 4. 3. 4)을 사용하여 각 모델의 회귀곡선이 0.5 probability와 만나는 지점을 각 임상적 변화에 대한 발현 최소 감염 역가로 산출하였다.

결 과

누적 폐사율

돌돔에 저, 중, 고농도로 인위 감염 후 누적 폐사율을 분석한 결과, 대조구와 저농도 접종 그룹에서는 실험 종료 (20일)까지 폐사가 관찰되지 않았으

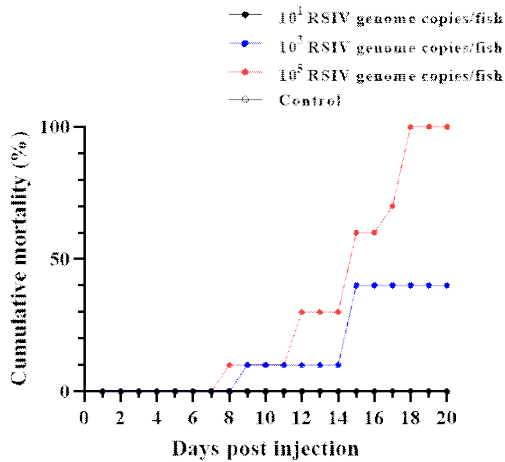


Fig. 1. Cumulative mortality (%) of rock bream after red sea bream iridovirus (RSIV) infections with different dose.

며, 중농도 접종 그룹에서는 접종 후 9일차부터 폐사가 발생하기 시작하여 실험 종료일까지 40%의 누적 폐사율을 나타내었고, 고농도 접종 그룹에서는 접종 후 8일차부터 폐사가 발생하여 접종 후 18일째 모든 실험어가 폐사하여 100% 누적 폐사율을 보였다(Fig. 1).

Spleen index

비장 비대 수준을 분석하기 위해 상기 2.3에서 샘플링한 살아있는 개체들의 spleen index를 산출한 결과, 접종 후 5일차 대조구, 저농도, 중농도 그리고 고농도 접종 그룹에서 각각 0.94 ± 0.21 , 0.99 ± 0.31 , 0.92 ± 0.5 그리고 1.00 ± 0.28 로 나타났다. 접종 후 10일차 대조구, 저농도, 중농도 그리고 고농도 접종 그룹에서 각각 0.99 ± 0.16 , 0.90 ± 0.35 , 0.87 ± 0.31 그리고 1.23 ± 0.43 로 나타났으며 접종 후 14일차 대조구, 저농도, 중농도 그리고 고농도 접종 그룹에서 각각 0.94 ± 0.14 , 0.76 ± 0.15 , 1.02 ± 0.37 그리고 2.77 ± 1.18 로 나타났다. 접종 농도 및 시간별로 spleen index를 one-way ANOVA를 사용하여 분석한 결과, 접종 후 14일차 고농도 접종 그룹에서 저농도, 중농도 접종 그룹과 유의미한 차이를 보였다($P < 0.001$).

상기 2.3에서 샘플링한 폐사 개체들의 spleen index를 산출한 결과, 중농도 및 고농도 접종 그룹에

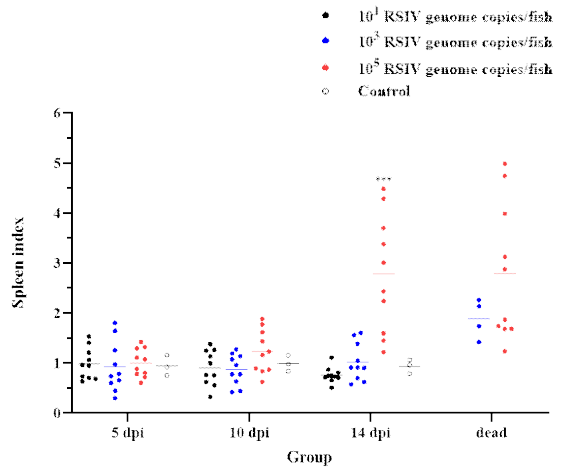


Fig. 2. Spleen index of live rock bream (sampled in experiment 1) and dead rock bream (sampled in experiment 2). The bars represent the mean of spleen index. Asterisks indicate significant differences between the spleen index according to the infected doses and sampling days. *** $P < 0.001$.

서 1.89 ± 0.38 , 2.80 ± 1.37 로 나타났다(Fig. 2).

Viral genome copy number

Real-time PCR을 통해 상기 2.3에서 샘플링한 살아있는 개체들의 viral genome copy 값을 분석한 결과, 대조구 및 접종 후 5일차 저농도 및 중농도 접종 그룹에서는 RSIV가 검출되지 않았으며 고농도 접종 그룹의 개체에서 최소 6.47×10^1 부터 최대 4.84×10^3 으로 평균 8.37×10^1 viral genome copies/mg으로 검출되었다. 접종 후 10일차 저농도, 중농도 그리고 고농도 접종 그룹에서는 각각 평균 2.46×10^2 (최소 6.90×10^1 , 최대 7.04×10^2), 2.44×10^3 (최소 6.75×10^1 , 최대 5.61×10^3) 그리고 4.88×10^6 viral genome copies/mg (최소 3.30×10^5 , 최대 2.08×10^7)으로 검출되었다. 접종 후 14일차 저농도, 중농도 그리고 고농도 접종 그룹에서는 각각 2.78×10^3 (최소 2.37×10^2 , 최대 1.64×10^4), 3.64×10^4 (최소 5.66×10^1 , 최대 2.91×10^5) 그리고 3.55×10^7 viral genome copies/mg (최소 2.56×10^6 , 최대 1.49×10^8)으로 검출되었다.

상기 2.3에서 샘플링한 폐사 개체들의 viral genome copy값은 중농도 접종 그룹과 고농도 접종

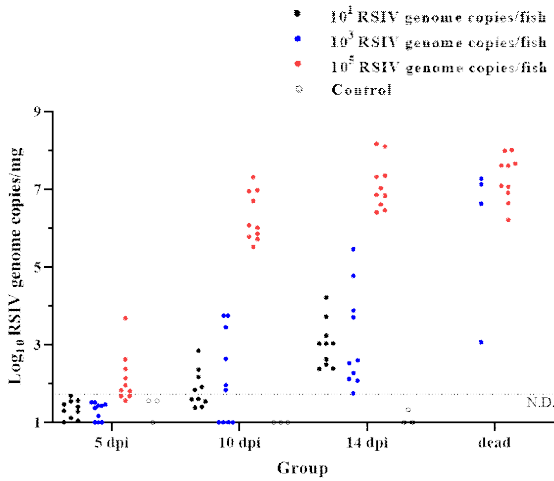


Fig. 3. Viral genome copy numbers of red sea bream iridovirus (RSIV) in live rock bream (sampled in experiment 1) and dead rock bream (sampled in experiment 2) determined by real-time PCR with LOD_{95%} value (5.30×10^1 viral genome copies/mg) denoted as dotted lines. N.D., not detected.

그룹에서 각각 9.13×10^6 (최소 1.17×10^3 , 최대 1.87×10^7), 3.68×10^7 (최소 1.65×10^6 , 최대 1.03×10^8) viral genome copies/mg으로 검출되었다(Fig. 3).

병리조직학적 병변

병리조직학적 소견으로, RSIV 접종 후 5일차의 저농도 접종 그룹에서 대식세포 활성화 증상을 보였으며 중농도 접종 그룹에서 비장의 새망내피계 이상으로 인한 염증 반응, 비장 협조직 비후, 그리고

임파구 활성화 증상을 보였고, 고농도 접종 그룹에서 붕입체가 관찰되었다(Fig. 4). 접종 후 10일차의 모든 그룹에서 붕입체가 관찰되었으며 중농도 접종 그룹에서 핵 농축이 관찰되었으며 고농도 접종 그룹에서는 이형비대 세포(enlargement cell)가 관찰되었다(Fig. 5). 접종 후 14일차에서도 모든 실험그룹의 비장에서 붕입체가 관찰되었으며 중농도 접종 그룹에서 이형비대세포 및 심각한 염증반응과 세포의 약 20%가 괴사 증상을 보였다. 고농도 접종 그룹의 경우 다량의 이형비대세포가 관찰되었으며 매우 두드러지는 괴사 증상을 보였다(Fig. 6). 또한 각 개체들의 이형비대세포를 계수하였을 때, 접종 후 10일차 고농도 접종 그룹에서 평균 10.4 ± 23.26 enlarged cells/mm²으로 나타났다. 접종 후 14일차 중농도 및 고농도 접종 그룹에서는 각각 평균 2.6 ± 5.81 , 133.4 ± 96.78 enlarged cells/mm²으로 나타났다(Table 2). 접종 농도 및 기간별로 이형비대세포수를 one-way ANOVA를 사용하여 분석한 결과, 접종 후 14일차에 고농도 접종 그룹과 저농도 접종 그룹 및 중농도 접종 그룹 간의 유의미한 차이를 보였다($P < 0.01$).

임상적 변화와 viral genome copy number 간의 상관관계 분석

RSIV 감염에 따른 비장 비대와 바이러스 복제 수준 간의 상관관계 분석을 위해 spleen index와 real-time PCR의 정량 분석 결과를 선형회귀분석한 결과, 유의미한 양의 상관관계를 보였으며(Fig. 7),

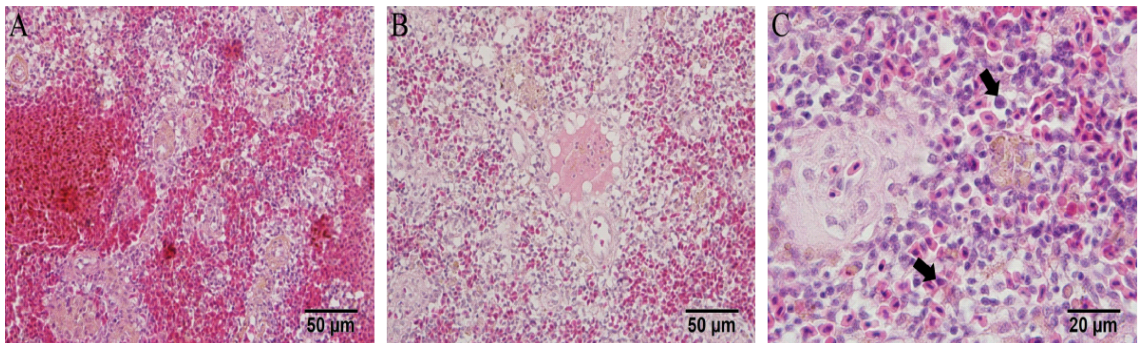


Fig. 4. Histopathological observation of spleen in rock bream at 5 days post-injection with RSIV. A: Appearance of macrophage activation with low dose. B: Appearance of ellipsoid and lymphocyte activation with medium dose. C: Appearance of inclusion body (arrows) with high dose.

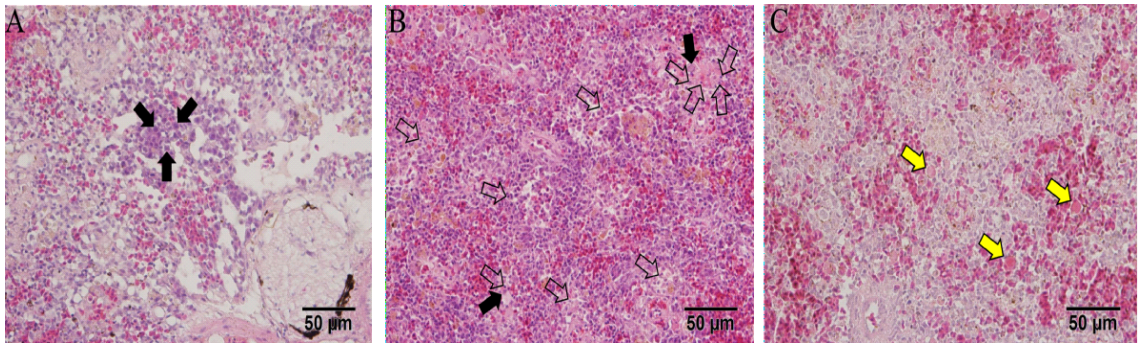


Fig. 5. Histopathological observation of spleen in rock bream at 10 days post-injection with RSIV. A: Appearance of inclusion body (arrows) with low dose. B: Appearance of inclusion body (arrows) and pyknosis (transparent arrows) with medium dose. C: Appearance of enlargement cells (yellow arrows) with high dose.

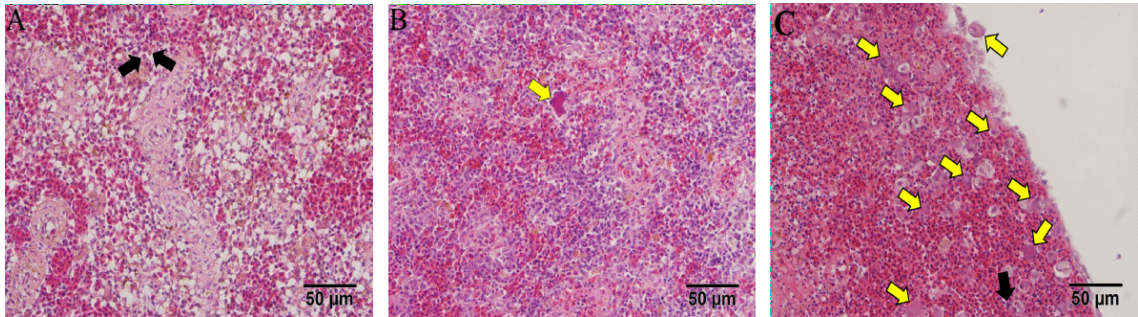


Fig. 6. Histopathological observation of spleen in rock bream at 14 days post-injection with RSIV. A: Appearance of inclusion body (arrows) with low dose. B: Appearance of enlargement cells (yellow arrow) with medium dose. C: Appearance of enlargement cells (yellow arrows) and inclusion body (arrow) with high dose.

Table 2. Enlargement cell numbers in the spleen of RSIV-infected rock bream

Group		Mean of enlarged cell numbers (cells/mm ²)	<i>P</i> value
Sampling day (Days post injection)	Administered dose (RSIV genome copies/fish)		
5 dpi	10 ¹	Not observed	Not significant
	10 ³		
	10 ⁵		
10 dpi	10 ¹	Not observed	Not significant
	10 ³		
	10 ⁵	10.4 ± 23.26	
14 dpi	10 ¹	Not observed	Not significant
	10 ³	2.6 ± 5.81	
	10 ⁵	133.4 ± 96.78	

^a*P* value compared with high-dose and low-dose groups

^b*P* value compared with high-dose and medium-dose groups

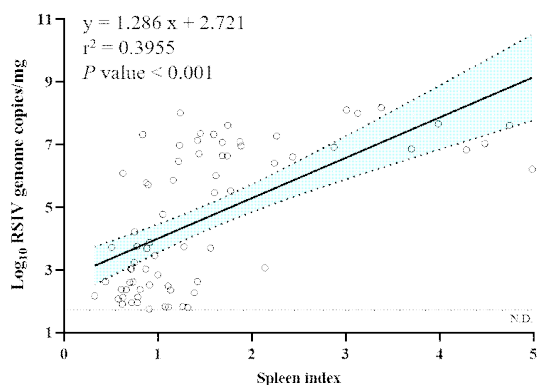


Fig. 7. Linear correlation between spleen index and viral genome copy numbers determined by real-time PCR with LOD_{95%} value (5.30×10^1 viral genome copies/mg) denoted as dotted lines. N.D., not detected.

로지스틱 회귀분석을 사용하여 임상적 변화와 viral genome copy number 간의 상관관계를 분석하여 비장 비대 및 폐사 임계점을 산출하였다. Spleen index 1.5 이상 유발 임계점은 1.0×10^6 viral genome copies/mg, spleen index 2 이상 및 폐사 유발 임계점은 2.51×10^7 viral genome copies/mg, 그리고 spleen index 2.5 및 3 이상 유발 임계점은 3.98×10^7 viral genome copies/mg으로 산출되었으며(Fig. 8), 각 모델에 대한 적합성은 $P < 0.05$ 수준으로 사후 검정하였다(Table 3).

고 찰

본 연구에서는 RSIV 농도별 인위 감염 후, 대표

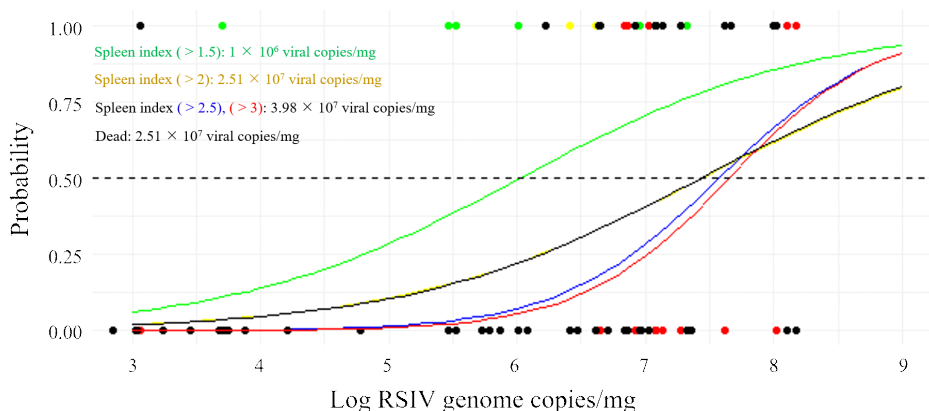


Fig. 8. Correlation with RSIV genome copy numbers and clinical change (splenomegaly). Thresholds for clinical changes of RSIV-infected rock bream, which were determined using logistic regression analysis (0.5 probability denoted as dotted lines).

Table 3. Validation analysis of thresholds for spleen index using logistic regression analysis

Clinical signs	Variable	Coefficient	Std. Error	Wald	Odds ratio	95% CI of odds ratio	P value
Spleen index (> 1.5)	Constant	-5.41832	1.24331	18.9918	—	—	<0.0001
	Viral genome copy	0.90025	0.20256	19.7532	2.4602	1.6541 to 3.6592	<0.0001
Spleen index (> 2)	Constant	-6.45038	1.84258	12.2552	—	—	0.0005
	Viral genome copy	0.86684	0.27318	10.0688	2.3794	1.3929 to 4.0644	0.0015
Spleen index (> 2.5)	Constant	-12.23383	4.62293	7.0031	—	—	0.0081
	Viral genome copy	1.61608	0.64607	6.2571	5.0333	1.4188 to 17.8564	0.0124
Spleen index (> 3)	Constant	-13.19574	5.10548	6.6803	—	—	0.0097
	Viral genome copy	1.725	0.70812	5.9342	5.6125	1.4009 to 22.4866	0.0148
Dead	Constant	-6.53831	1.87654	12.1399	—	—	0.0005
	Viral genome copy	0.88011	0.2778	10.0372	2.4112	1.3988 to 4.1561	0.0015

적인 임상증상인 비장 비대와 병리조직학적 변화 및 viral genome copy 값을 토대로 RSIV의 감염 특성을 조사하였으며, 비장 비대 및 폐사에 대한 viral genome copy 값의 정량적 기준을 제시하고자 하였다.

고농도 접종 그룹은 접종 후 10일차부터 폐사가 발생하여 접종 후 18일에 100%의 누적 폐사율을 보였으며(Fig. 1), 중농도 접종 그룹은 접종 후 9일차부터 폐사가 발생하여 실험 종료일까지 40%의 누적 폐사율을 보였으며 저농도 접종 그룹과 대조구는 실험 종료일(20일)까지 폐사가 일어나지 않았다(Fig. 1). 이는 돌돔($5.90 \pm 1.21\text{g}$)에 RSIV를 1.0×10^5 viral copies/fish로 접종 후 8일차부터 폐사가 발생하여 100%의 누적 폐사율을 나타낸 이전 연구(Kwon et al., 2020)와 유사한 경향을 보였지만 중농도 및 저농도 접종 그룹과는 상이한 경향을 보였다. Jeong et al. (2022)에서는 돌돔을 대상으로 한 서로 다른 RSIV 분리주(17SbTy, 17RbGs)의 병원성 차이를 조사하였으며, 17SbTy와 17RbGs 분리주를 1.0×10^2 viral copies/fish로 접종 시 각각 6.67% 및 80%의 누적 폐사율, 그리고 1.0×10^4 viral copies/fish로 접종 시, 각각 53.33% 및 100%의 누적 폐사율을 나타내어 RSIV의 분리주에 따른 병원성 차이를 확인하였다. 본 연구에서 사용한 바이러스도 기존의 연구(Kwon et al., 2020)와 상이한 분리주이며, 실험에 사용된 돌돔의 어체 중량 또한 18.40 ± 4.12 g으로 크기가 더 크기 때문에 실험어의 생리학적 차이 및 내병성에 따라 바이러스 감수성이 감소하는 경향을 나타낸 것으로 사료된다.

RSIV 감염 시, 주요 임상 증상은 무기력, 빈혈, 비장 비대, 비정상적인 유행(WOAH, 2021) 등이 있으며, 병리조직학적 주요 병변으로 순환계 전체에서 염증 세포가 나타나고 비장, 신장, 심장, 간, 소화기관, 아가미 등 다양한 조직에서 이형비대세포가 관찰된다(Jung et al., 1997). 특히, WOAH의 수산동물 진단 테스트 매뉴얼에서는 RSIV 진단을 위한 가장 적합한 장기로 비장을 권고하고 있으며, 본 연구에서는 RSIV 감염에 대한 대표적인 임상 증상인 비장 비대 수준을 정량화 하기 위해서 Jin et al. (2011) 방법에 따라 spleen index를 산출하였다. 실험기간 동안 폐사가 발생하지 않은 저농도 접종 그룹과 대조구는 접종 후 14일 동안 spleen

index의 유의미한 차이가 없었고(Fig. 2), 비장 세포에서도 이형비대세포가 관찰되지 않았다. 중농도 접종 그룹 또한 접종 후 14일 동안 spleen index의 유의미한 차이가 없었으나(Fig. 2), 비장 세포에서 이형비대세포가 접종 후 14일차부터 나타나기 시작했다(Fig. 6). 고농도 접종 그룹은 접종 후 14일차부터 spleen index의 유의미한 차이를 보였다(Fig. 2). Spleen index가 유의미한 차이를 보이기 시작한 접종 후 14일차에서 이형비대세포수 또한 고농도 접종 그룹에서 유의미하게 증가하였다(Table 2). 이러한 결과는 이형비대세포의 증가가 비장비대의 원인임을 시사한 연구(Jin et al., 2011)의 경향과 일치하여 주요 임상 증상인 비장 비대와 주요 병리조직학적 병변인 이형비대세포와의 상관관계도 확인할 수 있었다.

RSIV 감염에 따른 비장 비대와 바이러스 복제 수준 간의 상관관계를 알아보고자, spleen index와 viral genome copy number를 선형회귀분석을 수행한 결과, 유의미한 양의 상관관계를 확인하였다(Fig. 7). 또한, 로지스틱 회귀분석을 이용하여 폐사 및 spleen index 수치 구간별 viral genome copy 값의 임계점을 산출한 결과, spleen index 1.5, 2 이상일 때, 각각 1.0×10^6 , 2.51×10^7 viral genome copies/mg로 나타났으며 2.5, 3 이상일 때, 3.98×10^7 viral genome copies/mg로 동일하게 나타났으며 폐사에 대한 임계점은 2.51×10^7 viral genome copies/mg로 나타났다(Fig. 8). 해당 연구결과는 돌돔에 RSIV를 인위 접종한 후, 생존 및 폐사 개체를 분석한 연구(Jung and Jung, 2019; Kawato et al., 2021)에서 제시한 비장 조직 내 viral copy 값과 유사한 경향을 보인다. Jung and Jung(2019)에서 spleen index 3 이상을 보이며 폐사한 돌돔 비장 조직 내 viral copy number는 1×10^7 에서 1×10^8 viral genome copies/ $\mu\text{L}/79\sim 140$ mg로 나타났다. 또한 Kawato et al., (2021)의 연구에서 양식장에서 폐사한 참돔 치어의 신장 및 비장 조직 내 viral copy number는 $1 \times 10^{8.0 \pm 0.4}$ viral genome copies/mg으로 확인되었다. 즉, 이전 연구에서의 폐사 개체에 대한 viral genome copy 값은 본 연구에서 폐사 개체에 대한 임계점인 2.51×10^7 viral genome copies/mg (spleen index 2 이상)과 유사하였으며, 이는 RSIV

감염에 따른 폐사에 대한 정량적 기준에 대한 합리적 근거로 제시할 수 있다.

결론적으로, 본 연구에서는 RSIV를 돌돔에 농도별로 인위 감염한 후 spleen index, 병리조직학적 병변 그리고 viral genome copy 값을 산출하고 상관관계를 분석하여 임상적 변화를 유발할 수 있는 임계점을 조사하였다. RSIV에 감염된 돌돔의 spleen index, viral genome copy 값은 양의 상관관계를 나타냈으며 더불어 병리조직학적 병변의 변화도 확인되었다. RSIV 감염에 따른 폐사 임계점은 2.51×10^7 viral genome copies/mg으로 확인되었으며, 폐사를 유발할 수 있는 spleen index 2 이상을 가장 비대에 대한 정량적인 기준으로 제시할 수 있음을 확인하였다.

유전자 염기서열에 기초한 분자생물학적 진단법은 체내 감염 역가 산출을 통해 보다 신속하고 정확한 진단 방법으로 활용되지만 숙주의 임상적 변화와 감염 역가 간의 상관관계에 대한 연구는 부족한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 분자생물학적 진단법과 임상증상을 상관관계 분석을 통해서 임상증상을 발현할 수 있는 임계값을 제시하여 병원체의 발달과정을 정량적으로 나타내고자 하는 의미 있는 접근법이라 여겨진다. 향후 RSIV 감염 특성을 더 정확히 이해하기 위해 감염 개체에서의 어체중별 임상적 변화와 viral shedding 등을 포함한 다양한 조건에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2022년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업입(No. 2022R1I1A2064371)

References

- de Groof, A., Guelen, L., Deijis, M., van der Wal, Y., Miyata, M., Ng, K. S., van Grinsven, L., Simmelink, B., Biermann, Y., Grisez, L., van Lent, J., de Ronde, A., Chang, S. F., Schrier, C. and van der Hoek, L.: A novel virus causes scale drop disease in *Lates calcarifer*. PLoS pathogens, 11(8): e1005074, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005074>
- Gibson-Kueh, S., Ngoh-Lim, G. H., Netto, P., Kurita, J., Nakajima, K. and Ng, M. L.: A systemic iridoviral disease in mullet, *Mugil cephalus* L., and tiger grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* Forsskal: a first report and study. Journal of Fish Diseases, 27: 693-699, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00589.x>
- Girisha, S. K., Puneeth, T. G., Nithin, M. S., Kumar, B. N., Ajay, S. K., Vinay, T. N., Suresh, T., Venugopal M.N., Ramesh, K. S.: Red sea bream iridovirus disease (RSIVD) outbreak in Asian seabass (*Lates calcarifer*) cultured in open estuarine cages along the west coast of India: First report. Aquaculture, 520: 734712, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734712>
- Inouye, K., Yamano, K., Maeno, Y., Nakajima, K., Matsuoka, M., Wada, Y. and Sorimachi, M.: Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*. Fish Pathology, 27: 19-27, 1992. <https://doi.org/10.3147/jsfp.27.19>
- Jeong, M. A., Jeong, Y. J. and Kim, K. I.: Virulence difference between red sea bream iridovirus mixed subtype I/II and subtype II and the expression of viral and apoptosis-related genes in infected rock bream (*Oplegnathus fasciatus*). Fish & Shellfish Immunology, 127:195-202, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.05.041>
- Jeong, Y. J., Kim, Y. C., Min, J. G., Jeong, M. A. and Kim, K. I.: Characterization of rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) fin cells and its susceptibility to different genotypes of megalocytiviruses. Journal of Fish Pathology, 34(2) 149-159. 2021. <https://doi.org/10.7847/jfp.2021.34.2.149>
- Jin, J. W., Cho, H. J., Kim, K. I., Jeong, J. B., Park, G. H. and Jeong, H. D.: Quantitative analysis of the clinical signs in marine fish induced by *Megalocytivirus* infection. Journal of Fish Pathology, 24: 53-64, 2011. <https://doi.org/10.7847/jfp.2011.24.2.053>
- Jung, M. H. and Jung, S. J.: Correlation of virus replication and spleen index in rock bream iridovirus infected rock bream *Oplegnathus fasciatus*. Journal of Fish Pathology, 32(1):1-8, 2019. <http://dx.doi.org/10.7847/jfp.2019.32.1.001>
- Jung, S. J., & Oh, M. J.: Iridovirus-like infection associated with high mortalities of striped beakperch, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et Schlegel), in southern coastal areas of the Korean peninsula. Journal of Fish Diseases, 23(3):223-226, 2000. <https://doi.org/10.1053/j.fdis.2000.23.3.223>

- doi.org/10.1046/j.1365-2761.2000.00212.x
- Kawato, Y., Mekata, T., Inada, M. and Ito, T.: Application of environmental DNA for monitoring Red Sea bream Iridovirus at a fish farm. *Microbiology Spectrum*, 9(2): e00796-21, 2021. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00796-21>
- Kim, K. H., Choi, K. M., Kang, G., Woo, W. S., Sohn, M. Y., Son, H. J., Yun, D. B., Kim, D. H. and Park, C. I.: Development and validation of a quantitative polymerase chain reaction assay for the detection of red sea bream iridovirus. *Fishes*, 7: 236, 2022. <https://doi.org/10.3390/fishes7050236>
- Kim, G. H., Kim, M. J., Choi, H. J., Koo, M. J., Kim, M. J., Min, J. G. and Kim, K. I. : Evaluation of a novel TaqMan probe-based real-time polymerase chain reaction (PCR) assay for detection and quantitation of red sea bream iridovirus. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 24:351-359, 2021.
- Kurita, J. and Nakajima, K. Megalocytiviruses. *Viruses*, 4:521-538, 2012. <https://doi.org/10.3390/v4040521>
- Kurita, J., Nakajima, K., Hirono, I. and Aoki T.: Polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA of red sea bream iridovirus (RSIV). *Fish Pathol.*, 33:17-23, 1998. <https://doi.org/10.3147/jsfp.33.17>
- Kwon, W. J., Choi, J. C., Hong, S., Kim, Y. C., Jeong, M. G., Min, J. G., Jeong, J. B., Jeong, H. D.: Development of a high-dose vaccine formulation for prevention of *megalocytivirus* infection in rock bream (*Oplegnathus fasciatus*). *Vaccine*, 38(51): 8107-8115, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.11.001>
- Lee, E. S., Cho, M., Min, E. Y., Jung, S. H., & Kim, K. I.: Novel peptide nucleic acid-based real-time PCR assay for detection and genotyping of *Megalocytivirus*. *Aquaculture*, 518:734-818, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734818>
- Lee, W. L., Kim, S. R., Yun, H. M., Kitamura, S. I., Jung, S. J. and Oh, M. J.: Detection of red sea bream iridovirus (RSIV) from marine fish in the Southern coastal area and East China Sea. *Journal of fish pathology.*, 20:211-220, 2007. <https://www.ksfp.org/28/3262731>
- Mihm, S., Fayyazi, A., Hartmann, H. and Ramadori, G.: Analysis of histopathological manifestations of chronic hepatitis C virus infection with respect to virus genotype. *Hepatology*, 25(3):735-739, 1997. <https://doi.org/10.2331/fishsci.63.735>
- Sohn, S. G., Choi, D. L., Do, J. W., Hwang, J. Y. and Park, J. W: Mass mortalities of cultured striped beakperch, *Oplegnathus fasciatus* by iridoviral infection. *Journal of fish pathology*, 13(2):121-127, 2000. <https://www.ksfp.org/28/3057924>
- WOAH, World Organization for Animal Health, Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animal. Chapter 2.3.7. Red sea bream iridoviral disease. 2021. https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/2.3.07_RSIVD.pdf

Manuscript Received : Nov 06 2023

Revised : Nov 21 2023

Accepted : Nov 27 2023