전염성근괴사증바이러스(IMNV)를 인위감염 시킨 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)의 근육에서 나타난 미세 손상과 염증반응에 대한 조직병리학적 특성 연구

이효은 · 김영숙 · 장진현 · 천원주 · 최가영 · Bambang Hanggono^{*} · 김수미[†]

국립수산물품질관리원 수산방역과, *Center for Brackishwater Aquaculture

Histopathological features of pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, infected with Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) with an emphasis on micro-traumas and inflammatory responses in muscle tissues

HyoEun Lee, YoungSook Kim, JinHyeon Jang, WonJoo Chun, GaYoung Choi, Bambang Hanggono^{*} and SuMi Kim[†]

Aquatic Disease Control Division, National Fishery Products Quality Management Service, Busan 46083, Republic of Korea *Center for Brackishwater Aquaculture, Situbondo 58351, Indonesia

We injected infectious myonecrosis virus (IMNV) to pacific whiteleg shrimp, Litopenaeus vannamei, and observed closely with using light microscope and transmission electron microscope (TEM) for 4-8 days post infection (dpi). As clinical signs, abdominal bodies had mild opaque muscles at 5 dpi. And the mortality was shown at 6 dpi. At 8 dpi, most injected shrimps had severe opaque muscles and humped back that cause of movement disorder. As results of histopathological examinations, local parts of abdominal body muscle had muscle fiber hyalinization, muscle fiber atrophy, rounded muscle fibers, myofibrillar hypertrophy in size, a decrease in number of myofibrils and phagocytosis from the sarcolemmas by multiple hemocytes at 4 dpi. Especially, myofibrillar hypertrophy appeared at the whole or random part of single muscle fiber not in specific locations like the center or edge of muscle fiber. At 6-7 dpi, multiple muscle necrosis, muscle fiber segmentation, myofibril lysis appeared and a few hemocytes were infiltrated at lesions. At 8 dpi, extensive muscle necrosis, multiple myofibril lysis and muscle fiber atrophy were shown, and very few hemocytes were infiltrated. In early stage of infection, local viral myositis with zenker's degeneration were shown. These lesions appeared multiply after the early stage. In late stage of infection, extensive coagulative muscle necrosis appeared with few of inflammatory response such as hemocytes infiltration. The lack of hemocytes infiltration response at the late stage might be disadvantage for Litopenaeus vannamei to defense against IMNV and to recover, because hematocytes (granulocyte, semi-granulocyte) eliminate pathogen and damaged tissues from infection sites and help recover. As results of the TEM observation, IMNVs

[†]Corresponding author: sumikim@korea.kr

E-mail: sumikim@korea.kr

Tel: +82-51-720-3031, Fax: +82-51-720-3039

that had nonenveloped icosahedral capsid which was 30-40 nm diameter were in myofibril and beside tubules of sarcoplasmic reticulum and moved to the certain direction. The micro-tears and micro-traumas in myofibrils caused muscle fiber necrosis. And semi-granulocytes engulfed IMNVs to eliminate virus.

Key words: Infectious myonecrosis virus, *Litopenaeus vannamei*, Muscle degeneration, Granulocyte, Histopathology, Transmission electron microscope (TEM)

서 론

전 세계적으로 새우양식 생산량은 1990년 673,000 톤에서 2019년 6,004,000톤으로 약 10배가량 꾸준 하게 증가하고 있다(Lee et al., 2022). 그중 휜다리 새우(*Litopenaeus vannamei*)는 2018년 4,966,200톤 이 생산되며 큰 비중을 차지하고 있다(Prochaska et al., 2022). 우리나라에서는 1963년 대하(*Penaeus chinensis*) 인공부화를 시작으로 1992년 562톤을 생 산하며 서해안을 중심으로 성장하였으나 흰반점 바이러스(white spot syndrome virus, WSSV) 감염에 의한 대량 폐사를 이유로 횐다리새우를 주 양식 품 종으로 전환하여 2006년부터 사육하였으며, 2016 년 약 5,700톤을 생산하며 우리나라 대표 새우양식 품종으로 자리잡았다(Kwon et al., 2019). 이후 2021 년 9,500톤을 생산하며 지속적인 생산량 증가를 보 이고 있다(KOSIS, 2022).

그러나 새우 양식이 발전함에 따라 질병에 의한 대량 폐사는 산업에 큰 장애가 되고 있다. 전염성 근괴사증(infectious myonecrosis, IMN)은 2002년 8 월 브라질에서 최초 발견되었으며(Lightner et al., 2004), 브라질 동북쪽 해변을 따라 빠르게 전파되 어 2003년 40-60% 폐사율을 보이며 새우양식산업 에 큰 피해를 입혔다(Prasad et al., 2017). 이후 IMN 은 인도와 인도네시아 등 동남아시아로 확산되었 으며(Arulmoorthy et al., 2020), 2015년 우리나라의 휜다리새우 양성장에서도 검출된 사례가 있었다 (Kwon et al., 2019).

IMN은 최초 보고에서 특발성 근괴사중(idiopathic myonecrosis)으로 명명되었으며(Lightner et al., 2004), 이후 병원체를 전염성근괴사증 바이러 스(IMN virus, IMNV)로 특정 하였다(Poulos et al., 2006, Tang et al., 2008). IMNV의 주요 표적 조직은 복부 체절 근육(striated skeletal muscles)으로 IMN 은 흰반점병, 노랑머리병, 타우라 증후군과 비교하 여 낮은 폐사율을 보인다(Lee et al., 2022). 하지만 만성적인 질병 진행으로 인해 감염 개체가 지속적 으로 먹이를 소비함으로 사료요구율(feed convertsion efficiency)이 높아지며 또한 상품성 낮은 개체가 생산되어 심각한 경제적 손실을 초래한다(Prasad et al., 2017).

근육에서 나타나는 병변과 괴사는 그 원인과 기 전에 따라 다양한 형태를 보이나 IMNV에 의해 발 생한 근육 병변과 괴사에 대한 조직병리학적 연구 는 체절 근육에서 혈구 침윤을 동반한 응고괴사 (coagulation necrosis)로 묘사하고 있으며(Lee et al., 2022, Prasad et al., 2017, Srisala et al., 2021), 또한 in situ hybridization (Srisala et al., 2021), immunohistochemistry (Kunanopparat et al., 2011) 분석을 통해 바이러스의 장기와 조직 내 위치에 대한 확인과 검출 그리고 IMNV를 정제하여 전자현미경으로 바이러스 형태를 관찰한 것이 대부분이다(Poulos et al., 2006). 근육 조직 내에서 IMNV와 숙주 사이 의 상호작용에 대한 연구가 부족하여 IMNV에 대 한 병리를 명확히 이해하는 것에 어려움이 있다. 또한 다른 원인으로 나타난 근육 병변과 괴사를 구분하기 위한 기준을 제시하는 것에 한계가 있다.

본 연구는 IMNV에 대한 명확한 병리 기전을 밝히기 위한 기초연구이며, 투과전자현미경(transmission electron microscope, TEM)을 이용하여 근육 조 직 내에서 나타나는 IMNV를 확인한 보고이다. 이 를 통해 IMNV와 숙주 사이의 상호작용을 밝히고 감염 후 시간 경과에 따른 병변의 조직병리학적 변화를 추적 관찰하여 바이러스에 의한 백탁 증상 과 근육괴사를 이해하는 것에 목적이 있다.

168

재료 및 방법

실험용 새우

양식장으로부터 횐다리새우 (8.54±0.53 cm)를 분양 받아 실험용 수조실로 옮겨와 전염성피하및 조혈기괴사증바이러스(infectious hypodermal and haematopoietic necrosis, IHHNV), 횐반점바이러스 (white spot syndrome virus, WSV)에 대한 PCR 검사 와 타우라바이러스(taura syndrome virus, TSV), *Macrobrachium rosenbergii nodavirus* (MrNV), IMNV 에 대한 reverse transcription PCR (RT-PCR) 검사를 실시하였으며(Table 1), 음성으로 확인된 개체군을 20℃의 1 ton 유수식 원형수조에서 일주일간 순치 하였다.

인위감염 시험

인도네시아의 Brankishwater aquaculture center로 부터 IMNV (IDR-19-LV)에 감염된 횐다리새우 조

Tabl	le 1	. PCR,	RT-PCR	and	qPCR	conditions
------	------	--------	--------	-----	------	------------

직을 제공받아 인위감염 시험용 바이러스 현탁액 을 제작하였다. 감염된 흰다리새우의 근육 조직을 마쇄용 구슬이 들어간 튜브(Bead beater, Innogene Tech, Korea)에 넣고 PBS를 1.5 ml 첨가하여 마쇄 하고, 4℃에서 9,000 × g로 30분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 총용량이 50 ml이 되도록 상 층액과 PBS를 섞은 후, 0.45 µm 주사필터 (BioFil, China)로 여과하고 quantitative PCR (qPCR)법으로 정량하여(Table 1) IMNV 현탁액으로 사용하였다. 현탁액은 IHHNV, WSV, TSV, MrNV에 대한 PCR, RT-PCR 검사를 실시하여 음성을 확인하였다(Table 1).

횐다리새우 40마리에 IMNV 현탁액 (3.19×10⁹ virus copies/μl)을 제 3체절 배측 두흉부 방향으로 0.1 메씩 주사 접종하였다. 대조군 (Control group) 비교를 위해 횐다리새우 40마리에 PBS를 0.1 메씩 실험군과 동일한 위치에 주사 접종하였다. 주사 접 종이 끝난 횐다리새우는 바닥면과 윗면이 망으로 덮여진 6.5×11 (diameter × high) cm 크기의 원통형

Virus	Primer	Sequence (5'-3')	Conditions
IMNV (RT-PCR ^a)	4587F 4914R	CGACGCTGCTAACCATACAA ACTCGGCTGTTCGATCAAGT	60°C 30min, 95°C 2min 95°C 45s, 60°C 45s x39 60°C 7min
(qPCR ^b)	IMN 412F IMN 545R IMN p1 probe	GGACCTATCATACATAGCGTTGCA AACCCATATCTATTGTCGCTGGAT 6FAM CCACCTTTACTTTCAATACTACA TCCCCGG TAMRA	50°C 3min, 95°C 15min 95°C 3s, 60°C 30s x40
IHHNV (PCR ^c)	389F 389R	CGGAACACAACCCGACTTTA GGCCAAGACCAAAATACGAA	95°C 5min 95°C 30s 60°C 30s 72°C 30s x35 72°C 5 min
TSV (RT-PCR ^d)	9992F 9195R	AAGTAGACAGCCGCGCTT TCAATGAGAGCTTGGTCC	60°C 30min 94°C 2min 94°C 45s 60°C 45s x40 60°C 7 min
WSV (PCR ^e)	146F 146R	ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACGA	94°C 4min 55°C 1min 72°C 2min 94°C 1min, 55°C 1min 72°C 2min x39 72°C 5min
MrNV (RT-PCR ^{f,g})	MrNVF MrNVR XSVF XSVR	GCGTTATAGATGGCACAAGG AGCTGTGAAACTTCCACTGG CGCGGATCCGATGAATAAGCGCATTAATAA CCGGAATTCCGTTACTGTTCGGAGTCCCAA	52°C 30min 95°C 2min 94°C 40s 55°C 40s 68°C 1min x30 68°C 10min

^aPoulos & Lightner (2006), ^bAndade et al. (2007), ^cTang et al. (2000), ^dNunan et al. (1998), ^eLo et al. (1997), ^fSri et al. (2003), ^gSahul et al (2004).

아크릴 케이지에 한 마리씩 넣은 후 25℃에서 1 ton 유수식 원형수조에 원통형 케이지를 침지하는 방식으로 사육하였다.

정량 및 정성 PCR

인위감염시험 전 횐다리새우와 IMNV 현탁액에 PCR과 RT-PCR 검사를 진행하였고, 감염실험 8 dpi 시점의 횐다리새우 10 마리에 대해 qPCR 검사 를 실시하였다(Table 1). PCR, RT-PCR, qPCR 검사 는 새우의 갑각과 장을 제거한 근육 30 mg을 이용 하여, Maxwell RSC Pure Food GMO and Authentication Kit (Promega, USA)를 이용하여 DNA와 RNA 를 분리하여 사용하였다. RNA는 iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, USA)를 사용하여 cDNA를 합성 하였으며, 이후 세계동물보건기구(WOAH) 수산동 물 진단 매뉴얼에서 권고하는 primers를 사용하여 PCR, RT-PCR, qPCR 검사를 실시하였다(Table 1).

광학 및 전자현미경 시료 처리

광학현미경 관찰을 위해 IMNV를 접종한 새우 와 PBS를 접종한 새우를 4, 5, 6, 7, 8 dpi 시기에 각 3마리씩 채집하여, 1 ml 주사기로 davidson's solution (polysciences, Germany)을 두흉부와 체절 에 주입하고, 동일 고정액에 침지하여 24시간 동안 전고정하였다. 제 2체절의 갑각을 포함하여 0.5 cm 두께로 다듬고 동일한 고정액에 12시간 동안 후고 정하였다. 이후 흐르는 물에 30분간 수세하고 탈 수, 투명화, 파라핀 침투 과정을 거쳐 일반적인 파 라핀 포매법으로 포매하였다. 포매 후 시료들은 4-5 µm 두께의 절편으로 박절하여 Herris's hematoxylin & Eosin (H&E)으로 염색하였다. 완성된 조 직 슬라이드는 whole slide scanner (Easyscan Prol, Motic, China)와 광학현미경(Eclipse Ni-u, Nikon, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

투과전자현미경(TEM) 관찰을 위해 8 dpi 시기 에 IMNV 접종 새우를 3마리 채집하여, 제 2체절의 근육만 1 mm 크기의 정육면체 형태로 다듬어 2.5% glutaraldehyde에서 24시간 전고정하였고, 0.1 M phosphate buffer로 세척한 후 1% osmium tetroxide (OsO₄)로 후고정하였다. 이후 아세톤을 이용하여 탈수 시키고 에폭시수지를 이용하여 포매하였으 며 초미세 박절하여 3% uranyl acetate 와 lead citrate 용액으로 이중염색하였다. 완성된 시료는 투과전 자현미경(LIBRA120, ZEISS, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

결 과

체절 근육에 PBS를 투여한 새우에서는 특이적 인 임상증상과 조직병리학적인 병변이 나타나지 않았다.

반면, IMNV 근육주사 투여 후 시간 경과에 따라 5 dpi 부터 새우 복부 체절 근육(striated skeletal muscles)에서 백탁 증상이 관찰되었다(Fig. 1). 백탁 증상은 국소 부위에 한정되지 않고 복부의 6개 체 절과 두흉부의 근육을 포함하여 새우의 전체 골격 근에서 동시적으로 광범위하게 나타났다. 6 dpi에 서 1마리 폐사가 발생했으며 이후 7,8 dpi에서 각 2마리씩 폐사가 발생하였다. 8 dpi에 모든 개체에 서 심도의 백탁증상이 나타났으며(Fig. 1F and G), 등이 굽어지고 펴지지 않아 유영능력을 상실하는 운동장애 증상이 확인되었다. IMNV 만성감염에 서 주로 나타나는 말단 체절(distal abdominal segments)과 꼬리부채(tail fan)의 적변 증상은 나타나 지 않았다. 본 실험에서 감염된 새우에 나타난 근 육 백탁 증상은 골격근 전체에 광범위하게 발현되 어 심도로 이행되는 전형적인 급성 감염 증상으로 나타났다.

8 dpi 시점의 휜다리새우에 대한 IMNV qPCR 결과 8.8 × 10⁶ - 2.0 × 10⁸ copies/mg로 개체 별로 큰 편차를 보였다.

근육에 대한 조직검사 결과, 4 dpi 1 마리, 5 dpi 2마리 개체에서 근육괴사 소견이 확인되었다(Fig. 2B, C and D). 손상된 근육의 근섬유(muscle fibers) 는 일부 유리질화(hyalinization) 되었으며 둥근 형 태로 변형되었다. 근원섬유(myofibril)의 수적 감소 및 일부 비대와 함께 근섬유의 위축(atrophy)이 나 타났다. 근섬유의 위축은 세포 사이 공간을 확장시 켰으며, 확장된 세포사이질에 다수의 혈구가 침윤 되어 손상된 근섬유를 외부로부터 중심 방향으로 포식하는 염증 소견을 보였다. 6-7 dpi 에서 근육괴 사는 복부 전체에서 산발적으로 나타났으며 혈구 전염성근괴사증바이러스(IMNV)를 인위감염 시킨 휜다리새우(*Litopenaeus vannamei*)의 근육에서 나타난 미세 손상과 염증반응에 대한 조직병리학적 특성 연구



Fig. 1. Control group and IMNV infected *L. vannamei*. A: Control group, B: 4 dpi, C: 5 dpi, D: 6 dpi, E: 7 dpi, F and G: 8 dpi of infected shrimps. F: A cross section of abdominal body, the whole body showed opaque muscle. Arrow: opaque muscle, arrow head: humped back

의 침윤이 거의 나타나지 않았다(Fig. 2E and F). 근 섬유는 작게 분절(segmentation) 되었으며 내부의 근원섬유 또한 융해(lysis)가 진행되고 있었다. 근 육의 다발성 국소 괴사는 8 dpi 에서 전신에 걸친 광범위한 근육괴사로 진행되었으며, 대다수의 근 원섬유가 융해되어 소실되었고, 괴사소에서 염증 성 혈구 침윤은 대부분 확인되지 않거나 매우 경미 하게 나타났다. 손상된 근육의 재생 소견은 보이지 않았다(Fig. 2G and H).

8 dpi에서 백탁 증상이 발현된 근육을 투과전자 현미경을 이용하여 분석한 결과, 근원섬유 내에서 icosahedral shape의 직경 35-40 nm 크기를 지닌 non-enveloped virion이 다수 확인되었다(Fig. 3). 발 견된 IMNV 주위로 다양한 크기의 근형질세망 (tubules of sarcoplasmic reticulum)이 인접하여 형성 되어 있었다. 근원섬유에서 IMNV는 조직에 손상 을 주며 근형질과 세포사이질로 방출되어 인접한 근원세포로 이동하는 것으로 확인되었다(Fig. 3B). 또한 IMNV 일부는 혈구 중 semi-granulocytes에 포 식 되는 것으로 나타났다(Fig. 5).

고 찰

IMNV는 *Totiviridae*에 속하는 non-enveloped double-stranded RNA (ds-RNA) 바이러스로 직경 약 40 nm icosahedral capsid 형태를 지닌다 (Senapin et al.,



Fig. 2. Fine muscle structure of control group and muscular lesions at abdominal body of IMNV infected *L. vannamei*. A: Control group, normal muscle fibers are full of myofibrils, B and C: 4 dpi infection group, hypertrophied myofibrils are shown, some muscle fibers are hyalinized and become round because of reduced diameter, clear spaces are surrounded, some hemocytes are infiltrated between affected muscle fibers. D: 5 dpi infection group, affected myofibers are segmented and eliminated by surrounded multiple hemocytes. E: 6 dpi infection group and F: 7 dpi infection group, dotted lines identify the boundaries between coagulation necrosis and normal muscle fibers. G and H: 8 dpi infection group, extensive muscle necrosis and atrophy are shown, affected muscle fibers are lysed. Asterisk: myofibrils hypertrophy, arrow: hemocytes infiltration, arrow head: hyalinization, blank arrow: muscle fiber lysis. H&E stain.

2011). IMNV는 흰다리새우 외에도 청새우(*Litope-naeus stylirostris*), 얼룩새우(*Penaeus monodon*) 또 한 실험적으로 감수성을 지닌다(Tang et al., 2005). postlarva, juvenile, adult 시기에 감염되나 임상증상 과 폐사는 juvenile과 adult 시기에서만 확인된다

(Lee et al., 2022, Prochaska et al., 2022). 전파경로는 명확하게 규명되지 않았으나 동족포식(cannibalism)
에 의한 수평감염(Poulos et al., 2006)과 물을 통한 감염으로 추정하고 있다 (Prochaska et al., 2022).
IMNV의 감염 표적 조직 및 세포는 골격근이나 전염성근괴사증바이러스(IMNV)를 인위감염 시킨 횐다리새우(*Litopenaeus vannamei*)의 근육에서 나타난 미세 손상과 염증반응에 대한 조직병리학적 특성 연구



Fig. 3. IMN virus (V) at 8 dpi of infection group. A: IMNVs have icosahedral shape and are located in myofibril (M). B: IMNVs are spilled out. C and D show the details of boxed areas. TEM.



Fig. 4. IMN virus (V) at 8 dpi of infection group. A: multiple various sized tubules of sarcoplasmic reticulum are in a row beside IMNV and B shows the details of the boxed area, C: Various sized tubules are beside IMNVs, D: many IMN virus are beside multiple tubules. Arrow: tubule of sarcoplasmic reticulum. TEM.



Fig. 5. The engulfing of IMN virus (V) by a semigranulocyte. A: The semi-granulocyte is located beside myofibril (M) and has phagosomes full of IMNV particles. B shows the details of the boxed area. G: small granule, m: mitochondria, N: nucleus. TEM.

심근과 같은 가로무늬근(striated muscles), 결합조 직, 혈구, lymphoid organ parenchymal cells 등이다 (Tang et al., 2005). IMN의 주요 증상은 근육백탁과 말단 체절의 적변이 대표적이며, 조직검사 결과 혈 구의 침윤을 동반한 응고괴사가 나타난다고 보고 되고 있다(Lee et al., 2022, Prochaska et al., 2022). 또한 추정진단 단계에서 감별진단을 위해 이를 확인 하도록 권장하고 있다(Taukhid and Nur'aini, 2009). 하지만, 새우에서 나타나는 근육백탁, 적변 등의 임상증상과 근육괴사는 muscle cramp syndrome (Lightner 1998), MrNV (Hameed et al., 2004), Penaeus vannamei nodavirus (PvNV) (Tang et al., 2011) 감염에서도 공통적으로 보고되는 증상으로 IMNV 와의 구분이 명확하지 않아 오진할 위험이 높다고 보고되고 있다(Senapin et al., 2011, Tang et al., 2005). 따라서 보다 정밀한 병리학적인 연구를 통 해 명확하게 구분할 필요가 있다.

본 연구의 결과 IMNV에 감염된 흰다리새우의 근육에 나타나는 변성은 감염초기 국소부에 바이 러스성 근염(viral myositis)이 zenker's degeneration 과 동반하여 발생하였다. 감염중기 다발성 바이러 스성 근염으로 발전한 후, 감염후기에 혈구 침윤이 병변 부위에서 매우 경미하게 나타나거나 확인되 지 않았으며, 광범위한 응고괴사(coagulation necrosis)로 이어지는 모습을 보였다.

특히, IMNV에 의한 근육괴사는 근섬유의 분절 과 초자변성(hyaline degeneration), 근원섬유의 비 대(myofibrillar hypertrophy)가 특징으로 나타났다.

근원섬유의 비대는 감염초기에 영향을 받은 근섬 유 내의 모든 근원섬유에서 동시에 발생하거나 무 작위적인 위치에서 발생하고 있었다. 또한 다수의 보고를 통해 특징으로 알려진 혈구 침윤(Arulmoorthy et al., 2020, Lee et al., 2022)의 경우 본 연구에서는 초기에 확인되었으나 이후 후기에서 는 매우 경미하게 나타나거나 확인되지 않았다. 괴 사 초기에 주로 확인된다고 알려진 근형질막(sarcolemma) 손상에 의한 근섬유의 델타(Δ)변성이나 (Pestronk et al., 1982) 대사이상(metabolic alteration) 으로 인한 근섬유의 퇴색(pale of muscle fiber cytoplasm) (Zierath & Hawley 2004)은 나타나지 않았 고, zenker's degeneration과 응고괴사가 발생했다. TEM을 이용하여 병리학적 감염 특성을 관찰한 결과 근원섬유 내에 바이러스가 위치하여 주위로 근형질세망과 인접하고 있었다. 또한 근원섬유를 가로지르며 근원섬유를 찢는 모습을 보였다. 근원 섬유의 미세손상(micro-tear, micro-trauma)과 이로 인한 근원섬유 비대와 융해는 influenza A, B virus, enterovirus, human immunodeficiency virus, human T-cell leukemia-lymphoma virus type 1, hepatitis virus A, B에서 흔히 나타나는 virus-associated rhabdomyolysis을 동반한 바이러스성 근염(Crum-Cianflone, 2008)과 유사한 것으로 보였다. 특히 손상된 근섬유 주위로 침윤된 semi-granulocytes가 손상된 세포와 함께 바이러스를 포식하여 감염부위로부 터 제거하는 것이 확인되었다. 새우의 혈구 중 granulocytes와 semi-granulocytes는 손상된 세포와 병원체를 제거하기 위한 포식작용을 수행한다고 알려져 있으며 (Aguirre-Guzman et al., 2009, Martin & Graves 1985), 이는 포유류와 어류에서 알려진 병원체 침입에 대한 백혈구를 동반한 염증 반응과 유사한 반응이다.

침윤된 혈구는 감염후기에 매우 경미하게 나타 나거나 확인되지 않았다. Costa et al (2009)에 따르 면 심도의 백탁증상이 나타난 IMNV에 감염된 휜 다리새우의 혈구 수를 분석한 결과 감염되지 않은 횐다리새우보다 전체 혈구 수는 30%, granulocyte 수는 7% 감소하는 것으로 나타났으며 새우 면역에 필수적인 phenoloxidase activity를 감소시켜 IMNV 에 대한 방어에 매우 불리하게 작용했다. 본 연구 의 감염후기 괴사부에 나타난 매우 경미한 혈구 침윤 혹은 혈구 침윤 증상의 부재는 IMNV 감염에 의한 혈구의 수적 감소 현상과 유사한 결과로 추정 되며, 손상된 조직 및 병원체의 제거 그리고 조직 재생에 필요한 적절한 염증반응이 이루어지기 어 렵게 만드는 것으로 보인다.

마찬가지로 IMNV 감염초기에 회복이 가능하다 고 알려져 있는데(Lightner 1993) 이는 초기의 혈구 침윤 및 풍부한 혈구 수와 관련 있을 것으로 사료 된다.

IMN의 폐사율은 40-60%로 흰반점병(폐사율 90-100%), 노랑머리병(폐사율 100%), 타우라 증후군 (폐사율 60-90%)과 비교하여 비교적 낮은 폐사율 을 보인다(Lee et al., 2022). 하지만 만성적 질병 진행에 기인한 낮은 누적폐사율은 감염 개체가 지 속적으로 먹이를 소비하도록 만들어 사료요구율 (feed conversion efficiency)을 높이며 또한 성장하 여 성체가 된 개체는 근육 백탁과 적변으로 인한 상품성 저하로 심각한 경제적 손실을 초래한다 (Prasad et al., 2017).

우리나라에서는 2015년 충청남도에 위치한 흰 다리새우 종묘생산장 한 곳과 양성장 한 곳에서 IMNV가 검출된 사례가 있었으나(Kwon et al., 2019), 감염 개체의 살처분과 치아염소산칼슘을 이용한 질병발생 수조의 소독 그리고 역학조사와 지속적인 질병모니터링 등 신속한 방역 조치와 후 속 관리로 추가적인 질병 발생 보고는 현재까지 없었다. 우리나라는 IMN을 수산생물질병관리법 제 2종 수산생물전염병으로 관리하고 있으며, 국 내 발생 사례가 2015년 1회에 불과한 만큼 철저한 검역과 발병에 대한 지속적인 감시가 필요하다. 또 한 염분 농도와 수온의 급격한 변화, 고농도의 quinaldine 노출, 밀식, 햇빛에 대한 직접적인 노출, 공 기 중 장시간 노출 등의 환경 스트레스를 포함한 기타 원인(Tung et al., 1999)과 IMNV 이외의 다양 한 병원체에 의해서도 유사한 근육 백탁과 근육괴 사가 새우 양식장에서 빈번하게 나타나며(Tang et al., 2005, Senapin., 2011), 이로 인해 진단과 후속 조치에 어려움을 줄 수 있다.

본 연구에서 나타난 IMNV 감염에 대한 조직병 리학적인 변화는 근섬유의 분절, 초자변성(hyaline degeneration) 그리고 근원섬유의 비대이다. 감염 초기의 혈구 침윤은 감염 후기에 대부분 확인되지 않거나 매우 경미하게 나타났으며 동시에 근섬유 의 위축과 근원섬유의 융해가 나타났다. TEM을 이용한 관찰 결과 IMNV는 근원섬유, 근형질세망 과 가로세관 인근에서 주로 관찰되었다. 본 연구의 결과는 IMN을 IMNV 이외의 원인으로 나타날 수 있는 유사 임상증상을 지닌 질병과의 구분을 위해 추정진단 단계에서 활용할 수 있으며, IMN에 대한 질병 진행 과정을 이해하는데 기초자료로 활용할 수 있다. 추가로 IMN의 보다 특징적이며 명확한 질병의 전파 경로, 진행 양상 그리고 병리 기전에 대한 연구가 필요하다.

감사의 말

이 논문은 국립수산물품질관리원(수산생물 검 ·방역 관리 기술개발, NFQS2022001)의 지원에 의 해 수행되었습니다.

References

- Aguirre-Guzman, G., Sanchez-Martinez, J. G., Campa-Cordova, A. I., Luna-Gonzalez, A., & Ascencio, F. Penaeid shrimp immune system. The Thai Journal of Veterinary Medicine, 39(3), 205-215, 2009.
- Arulmoorthy, M. P., Anandajothi, E., Vasudevan, S., & Suresh, E. Major viral diseases in culturable penaeid shrimps: a review. Aquaculture International, 28(5), 1939-1967, 2020.
- Andrade T.P.D., Srisuvan T., Tang K.F.J. & Lightner D.V. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of infectious myonecrosis virus (IMNV). Aquaculture, 264, 9–15, 2007.
- Costa, A. M., Buglione, C. C., Bezerra, F. L., Martins, P. C., & Barracco, M. A. Immune assessment of farm-reared Penaeus vannamei shrimp naturally infected by IMNV in NE Brazil. Aquaculture, 291 (3-4), 141-146, 2009.
- Crum-Cianflone, N. F. Bacterial, fungal, parasitic, and viral myositis. Clinical microbiology reviews, 21(3), 473-494, 2008.
- Hameed, A. S., Yoganandhan, K., Widada, J. S., & Bonami, J. R. Studies on the occurrence of Macrobrachium rosenbergii nodavirus and extra small virus-like par-

ticles associated with white tail disease of M. rosenbergii in India by RT-PCR detection. Aquaculture, 238(1-4), 127-133, 2004.

- KOSIS, Summary table of fishery production trend, Statistics Korea, 2022
- Kunanopparat, A., Chaivisuthangkura, P., Senapin, S., Longyant, S., Rukpratanporn, S., Flegel, T. W., & Sithigorngul, P. Detection of infectious myonecrosis virus using monoclonal antibody specific to N and C fragments of the capsid protein expressed heterologously. Journal of virological methods, 171(1), 141-148, 2011.
- Kwon, M. G., Kim, S. M., Shin, K. W., Cho, M. Y., Hwang, S. D., Seo, J. S., Hwang, J. Y., Jee, B. Y. Epidemiological Survey of Infectious Myonecrosis in Farmed Whiteleg shrimps(Litopenaeus vannamei) in korea. Fisheries and marine sciences education, 31(1), 94-99, 2019
- Lee, D., Yu, Y. B., Choi, J. H., Jo, A. H., Hong, S. M., Kang, J. C., & Kim, J. H. Viral Shrimp Diseases Listed by the OIE: A Review. Viruses, 14(3), 585, 2022.
- Lightner, D. V. Diseases of cultured penaeid shrimp. CRC handbook of mariculture, 1, 393-486, 1993.
- Lightner, D. V. Diseases of cultured penaeid shrimp and prawns. Developments in Aquaculture and Fisheries Science (Netherlands), 17. 8-10, 1998.
- Lightner, D. V., Pantoja, C. R., Poulos, B. T., Tang, K. F. J., Redman, R. M., Andreas, T., & Bonami, J. R. Infectious myonecrosis (IMN): a new virus disease of Litopenaeus vannamei. Aquaculture, 242, 353, 2004
- Lo C.F., Ho C.H., Chen C.H., Liu K.F., Chiu Y.L., Yeh P.Y., Peng S.E., Hsu H.C., Liu H.C., Chang C.F., Su M.S., Wang C.H. & Kou G.H. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of Penaeus monodon with a special emphasis on reproductive organs. Dis. Aquat. Org., 30, 53-72, 1997.
- Martin, G. G., & Graves, B. L. Fine structure and classification of shrimp hemocytes. Journal of morphology, 185(3), 339-348, 1985.
- Nunan L.M., Poulos B.T. & Lightner D.V. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used for the detection of Taura Syndrome Virus (TSV) in experimentally infected shrimp. Dis. Aquat. Org., 34, 87-91, 1998.
- Pestronk, A., Parhad, I. M., Drachman, D. B., & Price, D. L. Membrane myopathy: morphological similarities to Duchenne muscular dystrophy. Muscle &

Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine, 5(3), 209-214, 1982.

- Poulos B.T. & Lightner D.V. Detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) of penaeid shrimp by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Dis. Aquat. Org., 73, 69-72, 2006
- Poulos, B., Tang, K., Pantoja, C., Bonami, J. R., & Lightner, D. Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. JOURNAL-OF-GENERAL-VIROLOGY, 87, 987-996, 2006.
- Prasad, K. P., Shyam, K. U., Banu, H., Jeena, K., & Krishnan, R. Infectious Myonecrosis Virus (IMNV)
 An alarming viral pathogen to Penaeid shrimps. Aquaculture, 477, 99-105, 2017
- Prochaska, J., Poompuang, S., Koonawootrittriron, S., Sukhavachana, S., & Na-Nakorn, U. Evaluation of a commercial SPF Litopenaeus vannamei shrimp breeding program: Resistance to infectious myonecrosis virus (IMNV), Taura syndrome virus (TSV), and white spot syndrome virus (WSSV) from laboratory challenges. Aquaculture, 554, 738145, 2022.
- Sahul Hameed A.S., Yoganandhan K., Sri Widada J. & Bonami J.R. Studies on the occurrence of Macrobrachium rosenbergii nodavirus and extra small virus-like particles associated with white tail disease of M. rosenbergii in India by RT-PCR detection. Aquaculture, 238, 127-133, 2004.
- Senapin, S., Phiwsaiya, K., Gangnonngiw, W., & Flegel, T. W. False rumours of disease outbreaks caused by infectious myonecrosis virus (IMNV) in the whiteleg shrimp in Asia. Journal of negative results in biomedicine, 10(1), 1-5, 2011
- Sri Widada J., Durand S., Cambournac I., Qian D., Shi Z., Dejonghe E., Richard V. & Bonami J.R. Genome-based detection methods of Macrobrachium rosenbergii nodavirus, a pathogen of the giant fresh water prawn, Macrobrachium rosenbergii:dot-blot, in situ hybridization and RT-PCR. J. Fish Dis., 26, 583-590, 2003.
- Srisala, J., Sanguanrut, P., Thaiue, D., Laiphrom, S., Siriwattano, J., Khudet, J., Powtongsook, P., Flegel,

T.W., Sritunyalucksana, K. Infectious myonecrosis virus (IMNV) and Decapod iridescent virus 1 (DIV1) detected in captured, wild Penaeus monodon. Aquaculture, 545, 737262, 2021.

- Tang K.F.J., Durand S.V., White B.L., Redman R.M., Pantoja C.R. & Lightner D.V. Postlarvae and juveniles of a selected line of Penaeus stylirostris are resistant to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection. Aquaculture, 190, 203-210, 2000.
- Tang, J., Ochoa, W. F., Sinkovits, R. S., Poulos, B. T., Ghabrial, S. A., Lightner, D. V., Baker, T. S & Nibert, M. L. Infectious myonecrosis virus has a totivirus-like, 120-subunit capsid, but with fiber complexes at the fivefold axes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(45), 17526-17531, 2008.
- Tang, K. F., Pantoja, C. R., Poulos, B. T., Redman, R. M., & Lightner, D. V. In situ hybridization demonstrates that Litopenaeus vannamei, L. stylirostris and Penaeus monodon are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV). Diseases of aquatic organisms, 63(2-3), 261-265, 2005.
- Tang, K. F., Pantoja, C. R., Redman, R. M., Navarro, S. A., & Lightner, D. V. Ultrastructural and sequence characterization of Penaeus vannamei nodavirus (PvNV) from Belize. Diseases of aquatic organisms, 94(3), 179-187, 2011.
- Taukhid & Nur'aini, Y.L. Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) in Pacific White Shrimp (Litopenaeus vannamei) in Indonesia. The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh, 61(3), 255-262, 2009.
- Tung, C. W., Wang, C. S., & Chen, S. N. (1999). Histological and electron microscopic study on Macrobrachium muscle virus (MMV) infection in the giant freshwater prawn, Macrobrachium rosenbergii (. de Man), cultured in Taiwan. Journal of Fish Diseases, 22(4), 319-323.
- Zierath, J. R., & Hawley, J. A. Skeletal muscle fiber type: influence on contractile and metabolic properties. PLoS biology, 2(10), e348, 2004.

Manuscript Received : Nov 01, 2022 Revised : Nov 24, 2022 Accepted : Dec 06, 2022