



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

제주도 양식 넙치 (*Paralichthys
olivaceus*)를 대상으로 한
바이러스성 질병 모니터링

濟州大學校 大學院

海洋生命科學科

朴 賢 敬

2016 年 2 月

제주도 양식 넙치(*Paralichthys
olivaceus*)를 대상으로 한
바이러스성 질병 모니터링

지도교수 정준범

박현경

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2016 년 2 월

박현경의 이학석사 학위논문을 인준함

심사위원장 허문수 (서명)

위 원 이제희 (서명)

위 원 정준범 (서명)

제주대학교 대학원

2016 년 2 월

A THESIS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF PHILOSOPHY

Monitoring of viral diseases in
cultured olive flounder, *Paralichthys*
olivaceus in Jeju

Hyun Kyung Park
(Supervised by professor Joon Bum Jeong)

Department of Marine Life Science
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

February, 2016

목 차

목 차	i
Abstract	iii
LIST OF FIGURES	iv
LIST OF TABLES	v
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	5
1. 실험어	5
2. PCR 및 sequencing	5
2.1. Primers 제작	5
2.2. DNA 추출	7
2.3. RNA 추출 및 cDNA 합성	7
2.4. PCR 및 sequencing	8
3. 계통학적 분석	8
4. 바이러스 배양	13
III. 결과	14
1. PCR 결과	14
1.1. 2014년도 바이러스성 질병 모니터링	14
1.2. 2015년도 바이러스성 질병 모니터링	16
1.3. 기타 바이러스성 질병 검사	18

2. 계통분류학적 분석 및 유전자 상동성 비교	20
2.1. VHSV N gene	20
2.2. VHSV G gene	22
3. 바이러스 배양	24
IV. 고찰	25
V. 요약	30
VI. 참고문헌	32
VII. 감사의 글	39

Abstract

Viruses are known as serious pathogens, which can cause severe disease sea fish diseases, especially red seabream iridovirus (RSIV), viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV), viral nervous necrosis virus (VNNV), marine birnavirus (MABV) and hirame rhabdovirus (HRV). VHSV has been a serious viral disease that infects the olive flounder in South Korea. Clinical signs of VHSV infection are skin darkening, abdominal distension and haemorrhages. Outbreaks of fish iridovirus disease was first reported from red seabream, *Pagrus major* farms in Japan. Recently, iridovirus infection have occurred frequently from olive flounder farms in South Korea. VNNV is a worldwide viral disease affecting several species of cultured sea fish such as olive flounder in South Korea. MABV is also causes serious problems in the olive flounder farming industry in Japan. The infectious marine birnavirus are well known fish pathogens in Asian countries such as Korea and China (olive flounder farm). The initial case of HRV was reported from olive flounder farms in Japan. Since then, HRV infections with severe mortalities have occurred at olive flounder farms in South Korea.

In this study, disease surveillance was performed to monitor the prevalence of viral diseases in olive flounder from 2014 to 2015. The fish samples were collected from 60 different farms of Jeju in April, May, September, November and December 2014. In 2015, the fish samples were collected in March (60 farms), May (55 farms), July (52 farms) and October (53 farms) from different farms. RT-PCR or PCR results showed that VHSV were detected in 7 farms (2014-5, 2015-2). In addition, the suspected of viral disease were detected by PCR with each specific primers. RT-PCR or PCR results showed that VHSV were detected in 8 farms (2014-5, 2015-3), but other viral diseases have not been detected in any farms.

The sequences of the nucleocapsid protein (N) gene and glycoprotein (G) gene of 15 VHSV isolates were successfully amplified and sequenced. Phylogenetic analysis was performed using the VHSV sequences reported here together comparison with the nucleotide sequences available from the GenBank database. Phylogenetic analysis indicated that most of Korea VHSV belong to the genotype IVa and closely related to the strains from Japan and China.

LIST OF FIGURES

- Fig. 1. Detection of the VHSV gene by RT-PCR using the N (lane 1-5) or G (lane 6-10) primer set. Lane 1 and 6, 14-PS-10; Lane 2 and 7, 14-SG-01; Lane 3 and 8, 14-NW-03; Lane 4 and 9, 14-DJ-20; Lane 5 and 10, 14-DJ-19; M, 1 kb DNA ladder. 15
- Fig. 2. Detection of the VHSV gene by RT-PCR using the N (lane 1-5) or G (lane 6-10) primer set. Lane 1 and 6, 15-HL-01; Lane 2 and 7, 15-PS-07; Lane 3 and 8, farm 1; Lane 4 and 9, farm 2; Lane 5 and 10, farm 3; M, 1 kb DNA ladder. 17
- Fig. 3. Detection of the VHSV gene by RT-PCR using the N (lane 1-5) or G (lane 6-10) primer set. Lane 1 and 6, 14-NW-02; Lane 2 and 7, 14-NW-12; Lane 3 and 8, 14-PS-17; Lane 4 and 9, 14-SG-03; Lane 5 and 10, 14-SS-25; M, 1 kb DNA ladder. 19
- Fig. 4. Detection of the VHSV gene by RT-PCR using the N (lane 1-5) or G (lane 6-10) primer set. Lane 1 and 6, 15-DJ-25; Lane 2 and 7, 15-PS-03; Lane 3 and 8, 15-SG-04; Lane 4 and 9, farm 1; Lane 5 and 10, farm 2; M, 1 kb DNA ladder. 19
- Fig. 5. Phylogenetic tree showing the genetic relationships among 44 VHSVs based on the nucleotide sequences of the N gene. Phylogenetic analysis indicated that most of Korea VHSVs belong to the genotype IVa. Bootstrap values were transferred to the original maximum likelihood tree derived from the actual data. The scale bar indicates the number of substitutions per nucleotide site. * indicates VHSV isolates in this study. 21
- Fig. 6. Phylogenetic tree showing the genetic relationships among 53 VHSVs based on the nucleotide sequences of the G gene. Phylogenetic analysis indicated that most of Korea VHSVs belong to the genotype IVa. Bootstrap values were transferred to the original maximum likelihood tree derived from the actual data. The scale bar indicates the number of substitutions per nucleotide site. * indicates VHSV isolates in this study. 23
- Fig. 7. Cytopathic effect (CPE) and inverted microscope of VHSV isolates in CHSE-214 cell. Bar=20 μ m. 24

LIST OF TABLES

Table 1.	PCR conditions and primer sequences for the detection of virus from the olive flounder of Korea.....	6
Table 2.	VHSV isolates used in this study for comparison of N gene.....	9
Table 3.	VHSV isolates used in this study for comparison of G gene.....	11
Table 4.	Distribution of virus infection in cultured olive flounder in 2014.....	15
Table 5.	Distribution of virus infection in cultured olive flounder in 2015.....	17

I. 서론

제주지역의 주요 양식대상종인 넙치 양식은 1980년대부터 시작하여 지속적으로 성장해 왔으며 제주도의 양식 넙치 생산량은 2013년에는 23,280톤으로 꾸준히 증가하면서 우리나라 해수어류 생산량의 약 50% 이상을 차지하고 있으나, 최근에 난치성 바이러스성 질병에 의한 대량폐사로 매년 심각한 손실이 발생하고 있는 실정이다. 우리나라 양식 넙치에 질병을 일으키는 대표적인 주요 바이러스는 red seabream iridovirus (RSIV)와 같은 DNA 바이러스와 viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV), viral nervous necrosis virus (VNNV), marine birnavirus (MABV), hirame rhabdovirus (HRV) 등과 같은 RNA 바이러스 질병들이 보고되고 있다 (Cho *et al.*, 2010).

VHSV는 주로 유럽지역의 무지개송어 (*Oncorhynchus mykiss*)나 다른 담수어종에서 큰 피해를 주고 있는 바이러스 질병으로 알려져 왔으나, 이후에 담수 및 해수어류를 포함하여 약 90종에 질병을 유발하는 것으로 확인되었다 (Mortensen *et al.*, 1999). 국내의 경우에는 2000년대 이후부터 동해안 지역의 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)에서 처음 발병된 이후 수온이 낮아지는 겨울과 봄의 저수온기에 비교적 낮은 빈도로 검출되어 양식 산업에 큰 경제적 손실을 유발하는 것으로 밝혀지면서 (Takano *et al.*, 2000; Isshiki *et al.*, 2001), 세계 동물보건기구 (World Organization for Animal Health, OIE)의 수산동물질병 관리법에서 정하는 관리대상전염병으로 지정되어 질병 발생 저하 및 방역을 위한 노력이 확대 요구되고 있는 실정이다. 또한 VHSV는 *Rhabdoviridae*과 *Novirhabdovirus*속에 포함되며 단일 가닥의 RNA를 가진 6개의 gene들은 nucleocapsid protein (N), phosphoprotein (P), matrix protein (M), glycoprotein (G), non-structural protein (NV) 및 RNA polymerase (L)의 순으로 구성된다 (Schutze *et al.*, 1999). Snow *et al.*, (1999)과 Lumsden *et al.*, (2007)은 VHSV의 N과 G 유전자 염기서열의 계통분류학적 분석을 토대로 크게 4가지 genotypes로 구분하고, 이들 유전형은 지리적 위치에 따라 Genogroup I

(European freshwater and sea fish), Genogroup II (British Isles), Genogroup III (North Atlantic and North America), Genogroup IV (Pacific coast, Atlantic, Great Lakes, Japan and Korea)의 4가지의 유전형이 일반화되어 있으며 (Einer-Jensen *et al.*, 2004; Dale *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011), 우리나라는 Genogroup IV에 속하는 북미지역과 일본에서 분리되는 바이러스와 유사하다고 밝혀져 있다 (Nishizawa *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; Lumsden *et al.*, 2007).

RSIV의 경우 1990년 일본의 참돔 (*Pagrus major*) 양식장에서 처음으로 보고된 후 한국, 중국, 동남아시아 지역에서 25℃ 이상의 여름철 고수온기에 발병하는 것으로 확인되었다 (Inouye *et al.*, 1992; Matsuoka *et al.*, 1996). 우리나라의 경우 1998년 남해안 지역의 돌돔 (*Oplegnathus fasciatus*) 양식장에서 처음 발병된 후, 다른 어종인 참돔이나 넙치 등과 같은 해수어에서도 감염되어 국내 양식 산업에 적지 않은 피해를 주고 있다 (Do *et al.*, 2005). 또한 RSIV의 질병 원인 바이러스는 *Megalocytivirus*에 속하며, 현재 계통분석에 의해 4개의 subgroups로 구분하여, subgroup I 은 RSIV, subgroup II는 국내의 매년 돌돔 등에 심각한 폐사를 일으키는 RBIV, subgroup III은 중국의 쏘가리 (*Siniperca scherzeri*)에서 분리된 ISKNV가 대표적이며, subgroup IV는 넙치 (*P. olivaceus*)와 turbot (*Scophthalmus maximus*)으로부터 분리된 TRBIV로 알려져 있다 (He *et al.*, 2001; Do *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2004).

VNNV에 의한 질병은 1990년대 후반부터 넙치 (*P. olivaceus*), 줄무늬쩍 (*Pseudocaranx dentex*), turbot (*S. maximus*) 등 다양한 해산어류에 심각한 피해를 야기하는 바이러스 질병으로 보고되었으며, 여름철 고수온기에 치어뿐만 아니라 성어에서도 폐사를 유발하는 병원체로 확인되었다 (Fukuda *et al.*, 1996; Sohn *et al.*, 1998; Watanabe *et al.*, 2000). 우리나라에서는 1990년 능성어 (*Epinephelus septemfasciatus*) 양식장에서 처음 보고된 후, 넙치 (*P. olivaceus*), 숭어 (*Mugil cephalus*), 홍민어 (*Sciaenops ocellatus*)에서도 VNNV가 분리되었다 (Oh *et al.*, 2005; Gomez *et al.*, 2008). 또한 VNNV는 *Nodaviridae*에 속하며 바이러스 외피단백질 유전자 염기서열의 계통분석에 따라 4가지

genotypes로 나누어지는데, SJNNV type 줄무늬재 (*P. dentex*) NNV, TPNNV type 자주복 (*Takifugu rubripes*) NNV, BFNNV type 노랑가자미 (*Verasper moseri*) NNV, RGNNV type 넙치 (*P. olivaceus*)와 붉바리 (*Epinephelus akaara*) NNV로 구분되며 (Nishizawa *et al.*, 1997), 국내 양식어류에서 검출된 VNNV는 모두 RGNNV type에 속하는 것으로 보고되고 있다 (Oh *et al.*, 2005; Cha *et al.*, 2007; Gomez *et al.*, 2008).

MABV에 대한 감염은 일본의 양식 방어 (*Seriola quinqueradiata*) 치어에서 복수증을 주요 증상으로 하는 질병의 병원체로 처음 분리된 후, 한국, 중국, 일본의 넙치 양식장에서 대량 폐사가 발생하였으며 (Chou *et al.*, 1994; Sohn *et al.*, 1995; Takano *et al.*, 2001), 다른 양식 해산어종인 은어 (*Plecoglossus altivelis*), 부시리 (*Seriola lalandi*), 범가자미 (*Verasper variegatus*)에서도 감염 되는 것으로 알려져 있다 (Isshiki *et al.*, 2004). 또한 MABV는 *Birnaviridae*에 속하며, 현재 계통분석학적으로 7가지 genotypes로 구분하고 (Blake *et al.*, 2001; Nishizawa *et al.*, 2005), Genogroup I 은 무지개송어 (*O. mykiss*)를 포함하고 있으며, Genogroup II는 일본의 뱀장어 (*Anguilla japonica*)가 대표적이며, Genogroup III와 IV는 대서양 연어 (*Salmo salar*)를 포함하고 있으며, Genogroup V는 Arctic char (*Salvelinus alpinus*)로부터 분리된 분리주가 포함되며, Genogroup VI는 강꼬치고기 (*Esox lucius*)를 포함하며, Genogroup VII는 넙치 (*P. olivaceus*)와 방어 (*S. quinqueradiata*)로부터 분리된 분리주로 알려져 있다 (Nishizawa *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2013).

HRV는 일본의 넙치 (*P. olivaceus*) 양식장에서 처음 발견되었으며 (Gorie *et al.*, 1985; Kimura *et al.*, 1986), 우리나라에서는 1990년에 이후 늦가을과 겨울철의 저수온기에 넙치에서 매년 발생하여 양식 산업에 많은 어려움을 겪고 있다 (Oh *et al.*, 1998). 또한 HRV는 *Rhabdoviridae*과 *Novirhabdovirus*속에 속하며, 감염된 어류에서 체표나 지느러미 출혈, 복부팽만, 근육 내에서 출혈 등의 증상이 관찰된다 (Kimura *et al.*, 1986; Oseko *et al.*, 1988).

본 연구에서는 제주지역의 넙치 양식장에서 발생하는 바이러스성 질병에 대

한 사전예방 및 확산 방지 등 방역체계 확립에 대한 기초자료 및 수출 검역 단계에서의 유용한 자료를 제공할 목적으로 바이러스성 질병 모니터링을 실시하여 병원체의 감염현황을 조사하였고, 분리된 바이러스의 유전자 염기서열을 분석하여 기존에 보고된 바이러스 분리주들과의 유전학적인 상관관계를 비교하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험어

실험에 사용된 어류는 바이러스성 질병 모니터링을 위해 2014년부터 2015년에 걸쳐 제주도 (제주시/서귀포시)의 양식 넙치를 대상으로 실험을 수행하였다. 2014년도에는 60개소 넙치 양식장으로부터 4월, 5월, 9월, 11월, 12월에 넙치를 수집하였고, 2015년도에는 3월 (60개소), 5월 (55개소), 7월 (52개소), 10월 (53개소)에 넙치를 수집하였다. 추가적으로 일부 넙치 양식장 (2014년도: 15개소, 2015년도: 11개소)에서 바이러스성 질병으로 의심되어 검사 의뢰된 넙치의 질병 검사도 실시하였다.

2. PCR 및 sequencing

2.1. Primers 제작

RSIV의 검사를 위하여 방류수산물 전염병검사 실시 요령 (국립수산과학원 예규 제 84호) 중 RSIVD 정밀검사법에 따라 primer set를 제작하여 PCR 방법에 사용하였고, MABV와 HRV는 특이적으로 증폭시킬 수 있도록 제작된 (Cho *et al.*, 2007)것을 사용하였다 (Table 1). VNNV는 full length open reading frames (ORFs)의 서열을 토대로 본 연구실에서 제작하였고, VHSV에 대한 primers는 계통분류학적 분석을 위해 N-gene의 444 bp forward primer (5'-GAGAGAACTGGCCCTGACTG-3')와 reverse primer (5'-ATGATCCGTCTGGCTGACTC-3')를 Cho *et al.*, (2007)의 방법에 따라 제작하였고, G-gene의 1,340 bp forward primer (5'-ACAGATCACTCAACGACCTC-3')와 reverse primer (5'-ATAGTGACGGCCAAAGACTC-3')는 ORFs의 서열을 토대로 본 연구실에서 제작하여 PCR 방법에 사용하였다 (Table 1).

Table 1. PCR conditions and primer sequences for the detection of virus from the olive flounder of Korea

Target ¹	Oligonucleotide sequences of primer		PCR condition	Product size (bp)
N gene VHSV-N	F	5'-GAGAGAACTGGCCCTGACTG-3'	94°C (30'')-55°C (45'')-72°C (45'')	444
	R	5'-ATGATCCGTCTGGCTGACTC-3'		
G gene VHSV-G	F	5'-ACAGATCACTCAACGACCTC-3'	94°C (30'')-52°C (30'')-72°C (1')	1,340
	R	5'-ATAGTGACGGCCAAAGACTC-3'		
RSIV	F	5'-CTCAAACACTCTGGCTCATC-3'	94°C (30'')-58°C (60'')-72°C (60'')	570
	R	5'-GCACCAACACATCTCCTATC-3'		
VNNV	F	5'-CATCACCGCTTTGCAATCAC-3'	94°C (30'')-55°C (45'')-72°C (45'')	1,061
	R	5'-CACTAGGGAACCGGATGACC-3'		
MABV	F	5'-GCACCACGAAGGTACGAAAT-3'	94°C (1')-55°C (1')-72°C (1')	597
	R	5'-GTACGTTGCCGTTTCCTCAT-3'		
HRV	F	5'-ACCCTGGGATTCCTTGATTC-3'	94°C (30'')-55°C (10'')-72°C (45'')	533
	R	5'-TCTGGTGGGCACGATAAGTT-3'		

¹⁾ VHSV, viral haemorrhagic septicaemia virus; RSIV, red seabream iridovirus; VNNV, viral nervous necrosis virus; MABV, marine birnavirus; HRV, hiram rhabdovirus.

2.2. DNA 추출

RSIV 감염 진단을 위하여, DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (Qiagen Hilden, Germany)를 사용하여 넙치의 비장 조직으로부터 total DNA를 분리하였다. 먼저 각 비장 조직의 10 mg에 ATL buffer 180 μ l와 proteinase K 20 μ l를 첨가하여 56°C에서 조직이 녹을 때까지 반응시켰다. 반응 후, AL buffer 200 μ l를 넣어 섞은 다음 ethanol 200 μ l를 더하여 spin column에 옮겨 6,000 x g (gravity)에서 1분간 원심분리하였다. Column을 새로운 tube로 옮긴 후 AW1 buffer 500 μ l와 AW2 buffer 500 μ l를 이용하여 세척과정을 거친 후, AE buffer 30 μ l를 첨가하여 최종적으로 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA는 실험 전까지 -20°C에 보관하였다.

2.3. RNA 추출 및 cDNA 합성

VHSV, VNNV, MABV 및 HRV에 대한 감염 진단을 위하여, 넙치의 신장 조직을 적출하여 시중에 판매되고 있는 Viral RNA Mini kit (Qiagen Hilden, Germany)를 이용해 RNA를 분리하였다. 먼저 각 신장 조직 10 mg에 nuclease freewater 140 μ l를 첨가하여 homogenizer로 마쇄하였다. 균질화 된 샘플은 AVL buffer 560 μ l를 넣고 15초간 섞은 다음 실온에 10분간 반응 후, ethanol 560 μ l를 더하여 spin column에 옮겨 6,000 x g (gravity)에서 1분간 원심분리하였다. Column을 새로운 tube로 옮긴 후 AW1 buffer 500 μ l와 AW2 buffer 500 μ l를 이용하여 세척과정을 거친 후, AE buffer 30 μ l를 첨가하여 최종적으로 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA는 실험 전까지 -20°C에 보관하였다. RT-PCR은 3 μ l의 viral RNA, 4 μ l의 5 x Reaction buffer, 1 μ l의 reverse transcriptase, 1 μ l의 dNTP, 1 μ l의 Oligo(dT) primer 및 2.4 μ l MgCl₂ 넣고 최종 volume이 20 μ l가 되도록 nuclease freewater 첨가한 후, 25°C에서 5분, 42°C에서 1시간, 70°C 15분간 반응시켜 합성하였다.

2.4. PCR 및 sequencing

PCR은 microtube에 1 μ M의 각 primer, 2.5 mM의 각 dNTP, 10 x G-Taq Buffer, 2.5 U G-Taq DNA polymerase (Gene Pro Themal Cyclor Cosmo, Korea) 및 template DNA로서 추출된 핵산을 첨가한 후 distilled water로 PCR 혼합물의 최종 volume이 20 μ l가 되도록 하였고, PCR의 조건은 (Table 1)에 나타내었다. PCR 후 증폭 산물은 1 \times TAE buffer (40 Mm Tris-acetate, 1 mM EDTA)를 전기영동을 위한 완충액으로 하여, 0.5 μ g/ μ l ethidium bromide가 첨가된 1% agarose gel상에서 전기영동 한 후, UV 검출기에서 결과를 관찰하였다. PCR 증폭 산물은 Gel purification kit (Bioneer, Korea)를 이용해 정제하여, TOPO TA cloning[®]kit (Invitrogen, USA)로 cloning하였고, 염기서열 분석을 의뢰하였다 (Solgent, Korea).

3. 계통학적 분석

염기서열 계통분석은 BioEdit program의 Clustal W (Thompson *et al.*, 1994)를 사용하여 GenBank에 등록된 N gene의 29개의 분리주 (Table 2) 및 G gene의 38개의 분리주 (Table 3)와 함께 alignment 하였다. Alignment된 유전자들은 MEGA program version 4.0 (Tamura *et al.*, 2007)의 neighbor joining criteria를 수행하여 염기서열간의 유전적 거리와 계통 분석을 실시하였다.

Table 2. VHSV isolates used in this study for comparison of N gene

Virus isolate	Year	Origin	Host fish	Genotype	GenBank Accession No.
14-PS-10	2014	Korea	Olive flounder	IVa	Unpublished
14-SG-01	2014	Korea	Olive flounder	IVa	Unpublished
14-NW-03	2014	Korea	Olive flounder	IVa	Unpublished
14-DJ-20	2014	Korea	Olive flounder	IVa	Unpublished
14-DJ-19	2014	Korea	Olive flounder	IVa	Unpublished
14-NW-02	2014	Korea	Olive flounder	IVa	Unpublished
14-NW-12	2014	Korea	Olive flounder	IVa	Unpublished
14-PS-17	2014	Korea	Olive flounder	IVa	Unpublished
14-SG-03	2014	Korea	Olive flounder	IVa	Unpublished
14-SS-25	2014	Korea	Olive flounder	IVa	Unpublished
15-HL-01	2015	Korea	Olive flounder	IVa	Unpublished
15-PS-07	2015	Korea	Olive flounder	IVa	Unpublished
15-DJ-25	2015	Korea	Olive flounder	IVa	Unpublished
15-PS-03	2015	Korea	Olive flounder	IVa	Unpublished
15-SG-04	2015	Korea	Olive flounder	IVa	Unpublished
KR-YGH	2010	Korea	Olive flounder	IVa	JQ651390
KA-CJA	2010	Korea	Olive flounder	IVa	JQ651385
JF00Ehil-JPN	2000	Japan	Olive flounder	IVa	AB490792
KRRV9822-JPN	1998	Japan	Olive flounder	IVa	AB179621
CA-NS04-01	2007	Canada	Brown trout	IVb	HQ168409
CA-NB04-01b	2007	Canada	Brown trout	IVb	HQ168408
15-JUL-2009	2009	USA	Esox masquinongy	IVb	GQ385941
MI03GL	2006	USA	Esox masquinongy	IVb	DQ427105
ON41	2011	USA	Diporeia sp.	IVb	HQ415762
FS280208-V	2010	Norway	Rainbow trout	III	GU121102
V230308-5	2010	Norway	Rainbow trout	III	FJ362515

FA281107	2010	Norway	Rainbow trout	III	EU481506
BV060408-52	2010	Norway	Rainbow trout	III	FJ362510
860/94	1994	Scotland	Turbot	II	AJ130915
F13.02.97	1997	Ireland	Turbot	II	AJ130916
H17/2/95	1995	North sea	Haddock	II	AJ130924
07-71	1997	France	Rainbow trout	I a	AJ233396
FR-07-71	1990	France	Rainbow trout	I a	D00687
DK-3592B	1997	Denmark	Rainbow trout	I a	AF012093
Fil3	1983	Germany	Rainbow trout	I a	Y18263
DE-Fil3-wt	1983	Germany	Rainbow trout	I a	X73873
Cod-Ulcus	1979	Denmark	Atlantic cod	I b	Z93414
SE-SVA-14	2009	Sweden	Rainbow trout	I b	GQ325428
SE-SVA-1033	2009	Sweden	Rainbow trout	I b	FJ460591
DK-5e59	2009	Denmark	Rainbow trout	I b	GQ325429
96-43	2000	Britain	Atlantic herring	I b	AF143862
DK-4p37	1997	North sea	Rainbow trout	I b	FJ460590
UKMLA98/6HE1	2009	Britain	Rainbow trout	I b	GQ325431
DK-1p8	2009	Denmark	Rainbow trout	I b	GQ325430

Table 3. VHSV isolates used in this study for comparison of G gene

Virus isolate	Year	Origin	Host fish	Genotype	GenBank Accession No.
14-PS-10	2014	Korea	Olive flounder	IVa	Unpublished
14-SG-01	2014	Korea	Olive flounder	IVa	Unpublished
14-NW-03	2014	Korea	Olive flounder	IVa	Unpublished
14-DJ-20	2014	Korea	Olive flounder	IVa	Unpublished
14-DJ-19	2014	Korea	Olive flounder	IVa	Unpublished
14-NW-02	2014	Korea	Olive flounder	IVa	Unpublished
14-NW-12	2014	Korea	Olive flounder	IVa	Unpublished
14-PS-17	2014	Korea	Olive flounder	IVa	Unpublished
14-SG-03	2014	Korea	Olive flounder	IVa	Unpublished
14-SS-25	2014	Korea	Olive flounder	IVa	Unpublished
15-HL-01	2015	Korea	Olive flounder	IVa	Unpublished
15-PS-07	2015	Korea	Olive flounder	IVa	Unpublished
15-DJ-25	2015	Korea	Olive flounder	IVa	Unpublished
15-PS-03	2015	Korea	Olive flounder	IVa	Unpublished
15-SG-04	2015	Korea	Olive flounder	IVa	Unpublished
KR-CJA	2010	Korea	Olive flounder	IVa	JQ651388
KR-YGH	2010	Korea	Olive flounder	IVa	JQ651393
CHN-PORV	2005	China	Olive flounder	IVa	KC685626
JF00Ehil-JPN	2000	Japan	Olive flounder	IVa	AB490792
JP990Obama25	1999	Japan	Olive flounder	IVa	DQ401191
Makah	1988	USA	Coho salmon	IVa	U28747
GCVP-03	2010	Korea	Olive flounder	IVa	JQ952776
GCVP-27	2011	Korea	Olive flounder	IVa	JQ952782
GCVP-07	2010	Korea	Olive flounder	IVa	JQ952777
GCVP-12	2010	Korea	Olive flounder	IVa	JQ952779
GCVP-09	2010	Korea	Olive flounder	IVa	JQ952778
GCVP-20	2010	Korea	Olive flounder	IVa	JQ952781

GCVP-01	2010	Korea	Olive flounder	IVa	JQ952775
GCVP-18	2009	Korea	Olive flounder	IVa	JQ952780
FWando05	2005	Korea	Olive flounder	IVa	FJ811900
FJeju05	2005	Korea	Olive flounder	IVa	FJ811902
FWando08	2008	Korea	Olive flounder	IVa	GU265811
FYG08	2008	Korea	Olive flounder	IVa	GU265812
JY-0112	2001	Korea	Olive flounder	IVa	AY167587
JP-KRRV9822	1998	Japan	Olive flounder	IVa	AB179621
Obama25	2002	Japan	Olive flounder	IVa	AB060725
FYeosu05	2005	Korea	Olive flounder	IVa	KF477302
KJ2008	2008	Korea	Olive flounder	IVa	JF792424
U13653	2005	Canada	Drum	IVb	HQ453209
CA-NB00-01	2000	Canada	Mummichog	IVb	EF079896
CA-NS04-01	2004	Canada	Brown trout	IVb	EF079899
DK-4p168	1997	Skagerrak	Herring	III	AY546582
IR-F13.02.97	1997	Ireland	Turbot	III	AY546620
FR-L59X	1987	France	Eel	III	AY546618
DK-1p52	1996	Baltic sea	Sprat	II	AY546576
DK-1p53	1996	Baltic sea	Herring	II	AY546577
DK-1p55	1996	Baltic sea	Sprat	II	AY546578
DK-204022	2004	Denmark	Rainbow trout	I a	JF681347
DK-204038	2004	Denmark	Rainbow trout	I a	JF681342
DK-204062	2004	Denmark	Rainbow trout	I a	JF681314
DK-200070-4	2000	Denmark	Rainbow trout	I a	AY546612
JP96KRRV9601	1996	Japan	Rainbow trout	I b	DQ401190
DK-6p403	1999	Denmark	Herring	I b	AY546584

4. 바이러스 배양

바이러스의 배양을 위해 감염어의 신장조직을 10~20 mg 정량 후에 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (Gibco, USA) 200 μl 을 넣어 조직분쇄기로 균질화 한 후, 800 μl 를 더 첨가하여 4°C에서 5분간 5,000 x g (gravity)로 원심분리하였다. 상층액을 수확하여 10분간 12,000 x g (gravity) 원심분리 후 상층액을 시료로 사용하여 0.45 μm syringe filter (ADVATEC, Tokyo, Japan)로 여과한 뒤 감염어의 조직 마쇄 여과액을 CHSE-214 cell line에 접종한 후 20°C에서 배양하면서 세포변성효과 (cytopathic effect, CPE)를 확인하였다. 세포 배양액은 5% fetal bovine serum (FBS), 1% antibiotic-antimycotic (Gibco BRL)을 첨가한 DMEM으로 사용하였다.

Ⅲ. 결과

1. PCR 결과

1.1. 2014년도 바이러스성 질병 모니터링

제주도의 제주시와 서귀포시에 위치하는 60개소 각각의 넙치 양식장들로부터 2014년 4, 5, 9, 11 및 12월에 넙치를 무작위로 30마리 (5~600g)를 수거하여 1회에 1,800마리씩 총 9,000마리를 대상으로 바이러스성 질병 모니터링을 실시하였다. 전체 조사시료 중에서 검사 대상으로 선정한 5종의 바이러스가 검출된 시료는 총 5개소의 양식장에서 바이러스가 검출되었고, 어류 바이러스가 검출된 개체 중에서 이들 바이러스가 차지하는 비중을 조사해본 결과, VHSV가 5월 3개소 (5%), 11월 1개소 (1.6%), 12월 1개소 (1.6%)인 것으로 확인되었으며 (Table 4), 검출된 각 양식장의 30마리 넙치에 대한 VHSV 검출율은 6.6~33.3%인 것으로 나타났다 (data not shown).

검사 대상으로 선정한 5종의 바이러스인 VHSV, RSIV, VNNV, MABV 및 HRV에 대한 PCR을 실시한 결과, VHSV를 제외한 4종의 바이러스는 검출되지 않았으며 (data not shown), VHSV의 경우 N gene (444 bp) 및 G gene (1,340 bp) primer set를 각각 사용한 RT-PCR 방법을 통해 검출된 5개의 분리주는 14-PS-10, 14-SG-01, 14-NW-03, 14-DJ-20, 14-DJ-19로 각각 표기하였다 (Fig. 1).

Table 4. Distribution of virus infection in cultured olive flounder in 2014

Virus	Detection rate (%) (No. of positive / No. of farms)				
	April	May	September	November	December
VHSV	0 (0/60)	5 (3/60)	0 (0/60)	1.6 (1/60)	1.6 (1/60)
RSIV	0 (0/60)	0 (0/60)	0 (0/60)	0 (0/60)	0 (0/60)
VNNV	0 (0/60)	0 (0/60)	0 (0/60)	0 (0/60)	0 (0/60)
MABV	0 (0/60)	0 (0/60)	0 (0/60)	0 (0/60)	0 (0/60)
HRV	0 (0/60)	0 (0/60)	0 (0/60)	0 (0/60)	0 (0/60)

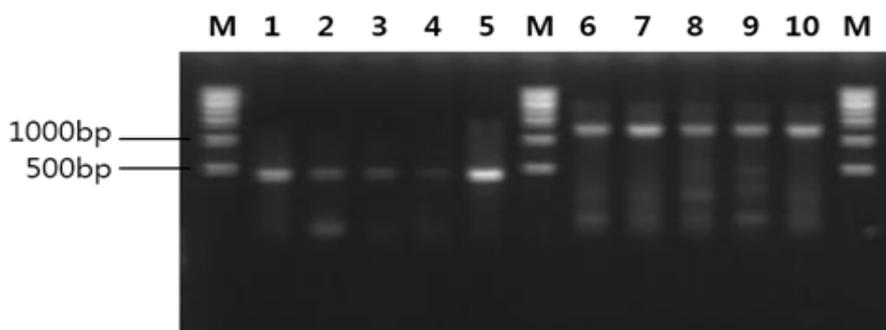


Fig. 1. Detection of the VHSV gene by RT-PCR using the N (lane 1-5) or G (lane 6-10) primer set. Lane 1 and 6, 14-PS-10; Lane 2 and 7, 14-SG-01; Lane 3 and 8, 14-NW-03; Lane 4 and 9, 14-DJ-20; Lane 5 and 10, 14-DJ-19; M, 1 kb DNA ladder.

1.2. 2015년도 바이러스성 질병 모니터링

제주도의 제주시와 서귀포시에 위치하는 각각의 넙치 양식장들로부터 2015년 3월 (60개소), 5월 (55개소), 7월 (52개소), 10월 (53개소)에 넙치를 무작위로 30마리 (5~600g)를 수거하여 총 6,600마리를 대상으로 바이러스성 질병 모니터링을 실시하였다. 전체 조사시료 중에서 검사 대상으로 선정한 5종의 바이러스가 검출된 시료는 총 2개소의 양식장에서 바이러스가 검출되었고, 어류 바이러스가 검출된 개체 중에서 이들 바이러스가 차지하는 비중을 조사해본 결과, VHSV가 3월 2개소 (3.3%)의 양식장에서 확인되었으며 (Table 5), 검출된 각 양식장의 30마리 넙치에 대한 검출율은 6.7%인 것으로 나타났다 (data not shown).

검사 대상으로 선정한 5종의 바이러스인 VHSV, RSIV, VNNV, MABV 및 HRV에 대한 PCR을 실시한 결과, VHSV를 제외한 4종의 바이러스는 검출되지 않았으며 (data not shown), VHSV의 경우 N gene (444 bp) 및 G gene (1,340 bp) primer set를 각각 사용한 RT-PCR 방법을 통해 검출된 2개의 분리주는 15-HL-01, 15-PS-07로 각각 표기하였다 (Fig. 2).

Table 5. Distribution of virus infection in cultured olive flounder in 2015

Virus	Detection rate (%) (No. of positive / No. of farms)			
	March	May	July	October
VHSV	3.3 (2/60)	0 (0/55)	0 (0/52)	0 (0/53)
RSIV	0 (0/60)	0 (0/55)	0 (0/52)	0 (0/53)
VNNV	0 (0/60)	0 (0/55)	0 (0/52)	0 (0/53)
MABV	0 (0/60)	0 (0/55)	0 (0/52)	0 (0/53)
HRV	0 (0/60)	0 (0/55)	0 (0/52)	0 (0/53)

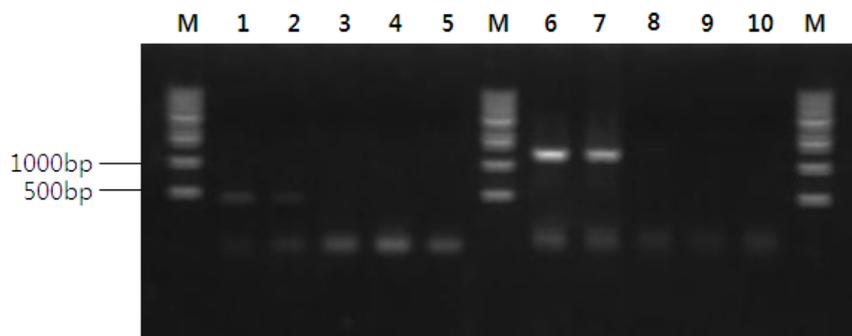


Fig. 2. Detection of the VHSV gene by RT-PCR using the N (lane 1-5) or G (lane 6-10) primer set. Lane 1 and 6, 15-HL-01; Lane 2 and 7, 15-PS-07; Lane 3 and 8, farm 1; Lane 4 and 9, farm 2; Lane 5 and 10, farm 3; M, 1 kb DNA ladder.

1.3. 기타 바이러스성 질병 검사

2014년도 (15개소)부터 2015년도 (11개소)에 걸쳐 제주도의 제주시와 서귀포시에 위치하는 양식장들로부터 바이러스성 질병이 의심되어 검사 의뢰된 넙치를 대상으로 바이러스에 의한 감염을 진단하였다. 검사 대상으로 선정한 5종의 바이러스인 VHSV, RSIV, VNNV, MABV 및 HRV에 대한 PCR을 실시한 결과, VHSV를 제외한 4종의 바이러스는 검출되지 않았으며 (data not shown), VHSV의 경우 2014년도에는 5개소 양식장에서 검출되었으며 (Fig. 3), 2015년도에는 3개소 양식장에서 검출되었다 (Fig. 4).

N gene (444 bp) 및 G gene (1,340 bp) primer set를 각각 사용한 RT-PCR 방법을 통해 검출된 8개의 분리주는 14-NW-02, 14-NW-12, 14-PS-17, 14-SG-03, 14-SS-25, 15-DJ-25, 15-PS-03, 15-SG-04로 각각 표기하였다 (Fig. 3, Fig. 4).

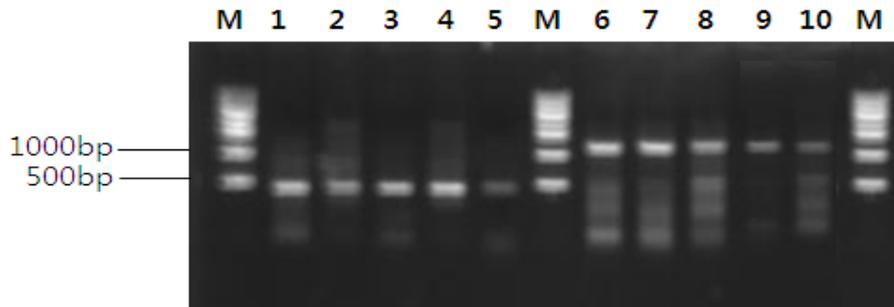


Fig. 3. Detection of the VHSV gene by RT-PCR using the N (lane 1-5) or G (lane 6-10) primer set. Lane 1 and 6, 14-NW-02; Lane 2 and 7, 14-NW-12; Lane 3 and 8, 14-PS-17; Lane 4 and 9, 14-SG-03; Lane 5 and 10, 14-SS-25; M, 1 kb DNA ladder.

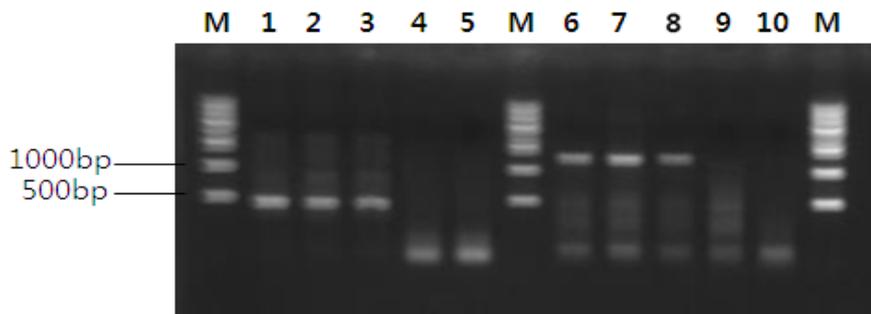


Fig. 4. Detection of the VHSV gene by RT-PCR using the N (lane 1-5) or G (lane 6-10) primer set. Lane 1 and 6, 15-DJ-25; Lane 2 and 7, 15-PS-03; Lane 3 and 8, 15-SG-04; Lane 4 and 9, farm 1; Lane 5 and 10, farm 2; M, 1 kb DNA ladder.

2. 계통분류학적 분석 및 유전자 상동성 비교

2.1. VHSV N gene

VHSV N gene primer set의 PCR product를 gene cloning하여 444 bp의 N gene 염기서열을 밝혔으며, 본 연구에서 검출된 총 15개의 VHSV 분리주들인 14-PS-10, 14-SG-01, 14-NW-03, 14-DJ-20, 14-DJ-19, 14-NW-02, 14-NW-12, 14-PS-17, 14-SG-03, 14-SS-25, 15-HL-01, 15-PS-07, 15-DJ-25, 15-PS-03, 15-SG-04 분리주들과 GenBank database로부터 얻은 29개의 N gene의 염기서열을 비교 분석하였다.

N gene을 사용한 계통분류학적 분석 결과, 국내에서 동정된 15개의 분리주 모두 genotype IVa에 속한 것으로 분석되었으며, 그 중에서도 일본에서 보고된 분리주 (accession number: AB179621, AB490792)와 계통분류학적으로 유사한 것으로 확인하였다 (Fig. 5). 일본의 분리주와 특이적인 염기서열을 비교한 결과, 국내에서 동정된 15개의 분리주와 유전자의 상동성은 97.9~99%인 것으로 나타났으며 (data not shown), 북미지역에서 분리된 genotype IVb와는 구분되는 것으로 확인되었다 (Fig. 5).

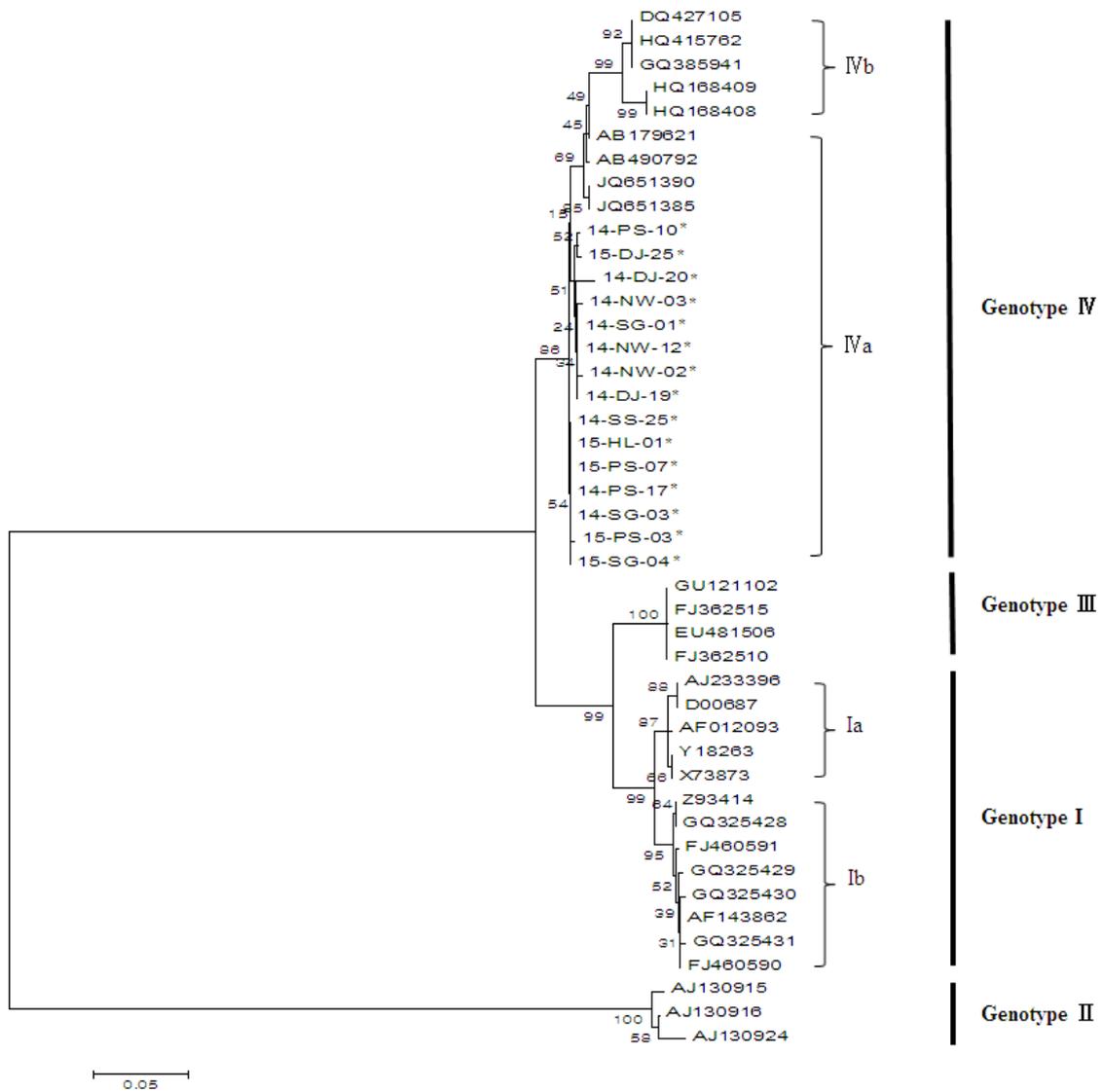


Fig. 5. Phylogenetic tree showing the genetic relationships among 44 VHSVs based on the nucleotide sequences of the N gene. Phylogenetic analysis indicated that most of Korea VHSVs belong to the genotype IVa. Bootstrap values were transferred to the original maximum likelihood tree derived from the actual data. The scale bar indicates the number of substitutions per nucleotide site. * indicates VHSV isolates in this study.

2.2. VHSV G gene

VHSV G gene primer set의 PCR product를 gene cloning하여 1,340 bp의 G gene 염기서열을 밝혔으며, 본 연구에서 검출된 총 15개의 VHSV 분리주들인 14-PS-10, 14-SG-01, 14-NW-03, 14-DJ-20, 14-DJ-19, 14-NW-02, 14-NW-12, 14-PS-17, 14-SG-03, 14-SS-25, 15-HL-01, 15-PS-07, 15-DJ-25, 15-PS-03, 15-SG-04 분리주들과 GenBank database로부터 얻은 38개의 G gene의 염기서열을 비교 분석하였다.

G gene을 사용한 계통분류학적 분석 결과, 15개의 분리주 모두 N gene을 사용한 계통분류학적 분석결과와 동일한 경향을 보였다 (Fig. 6). 그 중, 중국에서 보고된 분리주 (accession number: KC685626) 및 일본에서 보고된 분리주 (accession number: DQ401191, AB490792, KRRV9822, AB060725)와 가장 가까운 것으로 확인되었으며 (Fig. 6), 중국 및 일본 분리주의 염기서열들과 비교 분석한 결과, 99.5~99.8% 및 99.4~99.8%로 각각 높은 상동성이 관찰되었다 (data not shown).

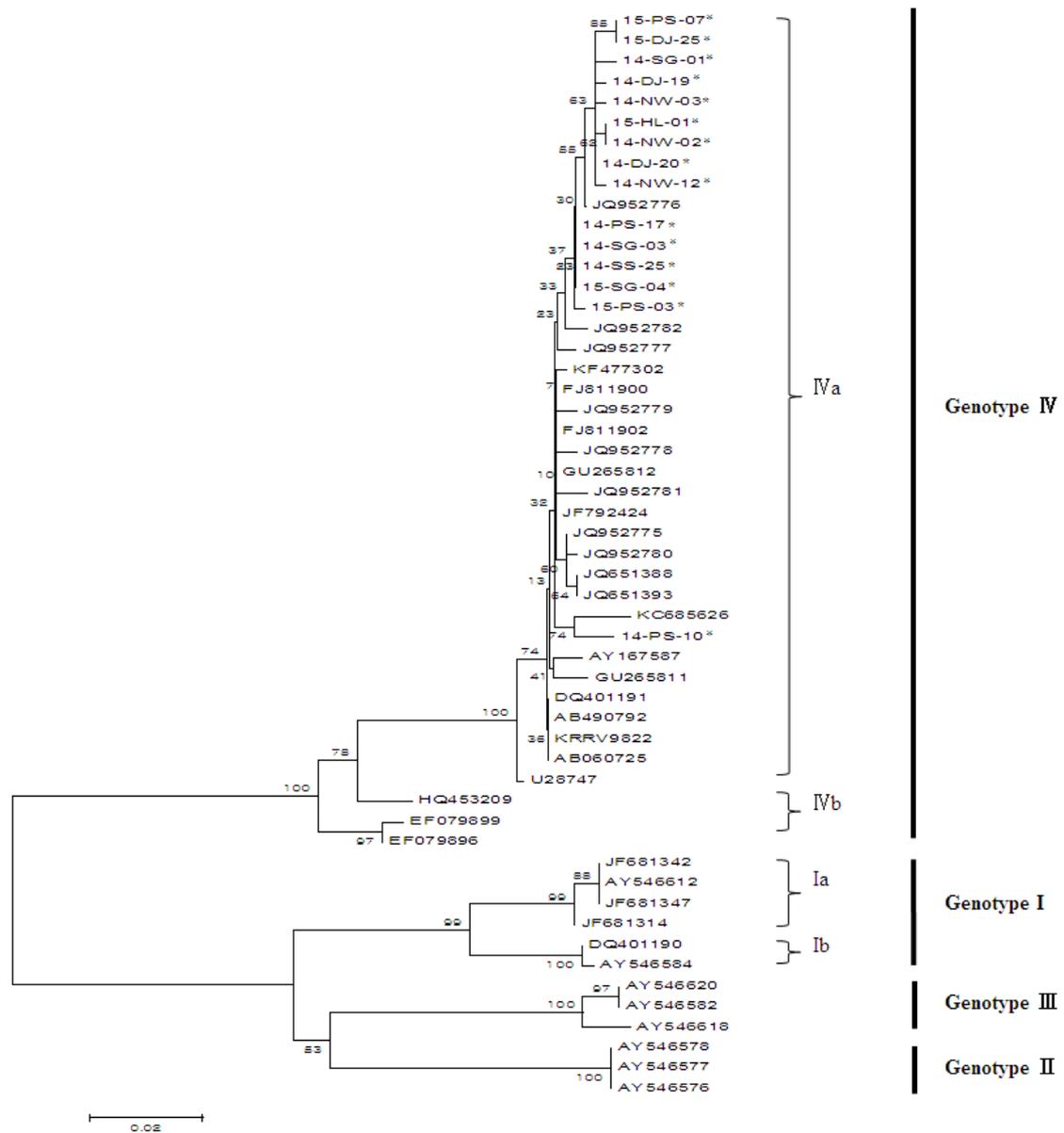


Fig. 6. Phylogenetic tree showing the genetic relationships among 53 VHSVs based on the nucleotide sequences of the G gene. Phylogenetic analysis indicated that most of Korea VHSVs belong to the genotype IVa. Bootstrap values were transferred to the original maximum likelihood tree derived from the actual data. The scale bar indicates the number of substitutions per nucleotide site. * indicates VHSV isolates in this study.

3. 바이러스 배양

PCR에서 양성반응을 나타낸 VHSV의 배양을 위하여 감염조직을 CHSE-214 cell line에 감염시켜 배양 후 도립현미경으로 관찰하였다. 접종한 후 6일째부터, 세포가 구형화되고 포도송이 모양으로 모이다가 바닥에 탈락한 현상을 확인할 수 있었다 (Fig. 7). CPE가 나타나기 시작한 6일째에 멸균된 cell scraper를 사용하여 세포를 모은 다음 사용 전까지 -80°C 에 보관하였다.

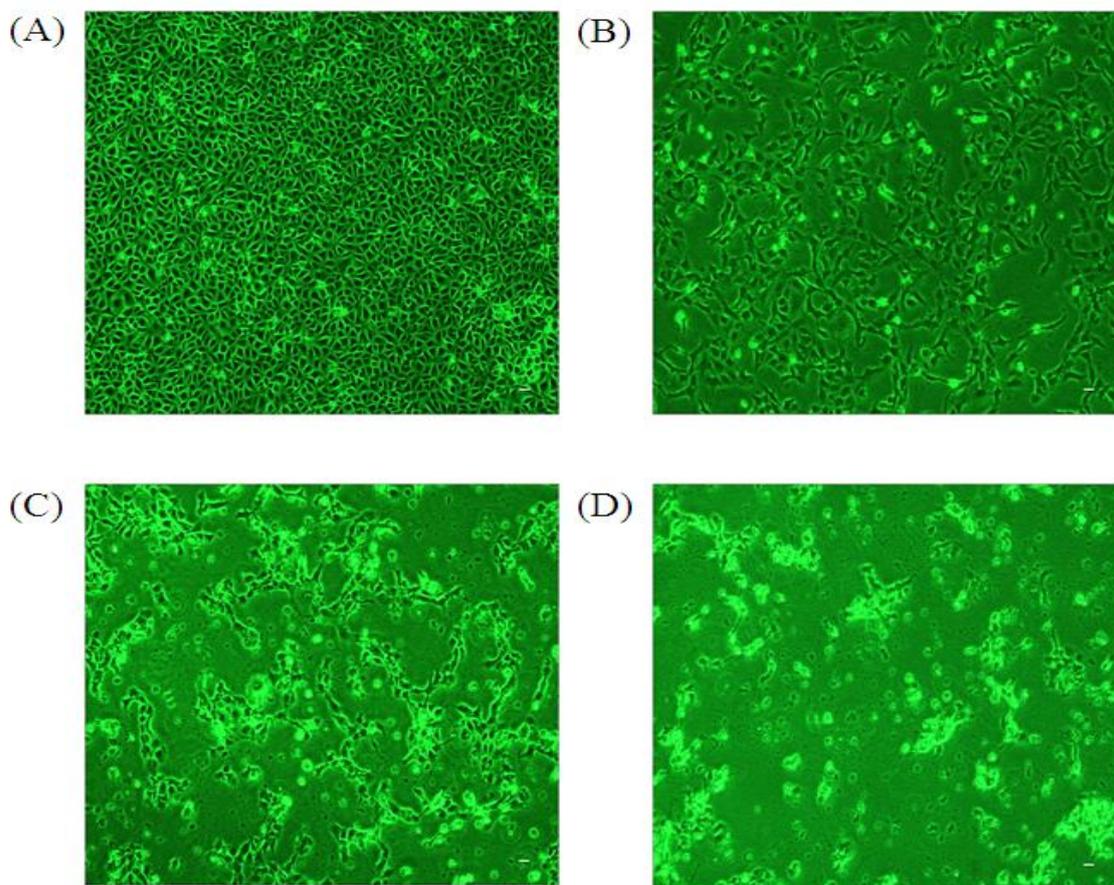


Fig. 7. Cytopathic effect (CPE) and inverted microscope of VHSV isolates in CHSE-214 cell. Bar= $20\mu\text{m}$. (A), control; (B), 1 days; (C), 3 days; (D), 6 days.

IV. 고찰

우리나라의 대표적 양식어종인 넙치는 최근에 국내 양식 현장에서 바이러스성 질병에 대한 관심이 증가하면서 바이러스성 병원체에 대해 많이 보고되고 있지만, 아직 국내의 바이러스성 질병 예방 및 치료에 대한 역학적 연구는 부족한 실정이며, 이로 인하여 예방 및 방역조치도 어려운 실정이다. 현재 이러한 바이러스성 질병은 우리나라 수산동물전염병의 약 70%를 차지하는 어류의 양식 산업에서 중요한 질병으로 전염성이 매우 강하며, 항생제와 같은 화학 요법에 대한 감수성이 없으므로 어류가 바이러스에 감염되면 약제에 의한 치료가 불가능하여 예방적 차원에서 방역관리의 필요성이 높아지고 있다.

이에 본 연구에서는 우리나라 넙치양식의 선두주자인 제주지역을 대상으로 2014년부터 2015년에 걸쳐 바이러스성 질병 모니터링을 실시하여, 검사 대상으로 선정한 5종의 바이러스, 즉 VHSV, RSIV, VNNV, MABV 및 HRV에 대한 병원체의 감염현황 및 분리된 바이러스에 대한 계통분석학적 비교를 실시하여 질병 발생의 사전예방 및 방역체계 확립에 대한 기초자료를 조사하고자 하였다.

VHSV의 경우 제주도의 60개소 넙치 양식장을 대상으로 2014년 4, 5, 9, 11 및 12월에 바이러스성 질병 모니터링 결과, 5월 3개소 (5%), 11월 1개소 (1.6%), 12월 1개소 (1.6%) 등 총 5개소의 양식장에서 VHSV가 검출되었고 (Table 4, Fig. 1), 검출된 각 양식장의 30마리 넙치에 대한 VHSV 검출율은 6.6~33.3%인 것으로 나타났다 (data not shown). 그 중 넙치의 크기가 15cm 미만인 치어 및 30cm 이상인 성어에서도 검출되었다. 이러한 결과는 넙치의 치어 뿐만 아니라 성어에서도 VHSV에 의한 피해가 발생한다는 Kim *et al.*, (2009)의 사례 내용과도 일치하고 있다. VHSV가 검출된 5월, 11월 및 12월의 평균수온은 16~18°C였으며, 14°C에서 VHSV의 최적 증식이 이루어지며, 6~18°C에서도 VHSV의 증식이 가능하다는 보고와 일치하였다 (MEST, 2010).

2015년도에도 3월 (60개소), 5월 (55개소), 7월 (52개소) 및 10월 (53개소)에 바

이러스성 질병 모니터링을 실시하여 VHS가 3월 2개소 (3.3%)의 양식장에서 확인되었으며 (Table 5, Fig. 2), 검출된 각 양식장의 30마리 넙치에 대한 검출율은 6.7%인 것으로 나타났다 (data not shown). VHSV가 검출된 3월의 평균수온은 15°C 이하였으며, 수온이 10~15°C 이하의 저수온 환경에서 주로 피해가 확산되는 것으로 확인되었으며, 이는 이전의 보고내용과 일치하였다 (Kim *et al.*, 2003). 또한 수온이 낮아지는 봄에 발병하는 것으로 보아 수온의 변동에 따른 어류의 스트레스로 인한 면역체계의 활성 저하가 감염 발생에 관여하는 것으로 판단된다.

추가적으로 2014년도 (15개소)부터 2015년도 (11개소)에 걸쳐 제주도의 제주시와 서귀포시에 위치하는 양식장들로부터 바이러스성 질병이 의심되어 검사 의뢰된 넙치를 대상으로 바이러스 감염 진단한 결과, VHSV가 2014년도에는 5개소 양식장에서 검출되었으며 (Fig. 3), 2015년도에는 3개소의 양식장에서 검출되었다 (Fig. 4). VHSV에 감염된 넙치는 체색흑화, 복부팽만, 점상출혈 등의 증상이 관찰된다 (TaKano *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003). 본 연구에서도 체색흑화, 복부팽만, 점상출혈 등의 전형적인 외부증상이 관찰되어 질병 발생의 원인이 VHSV임을 추정하였다.

넙치에서의 RSIV에 의한 감염은 연근해지역에서 서식하는 자연산 어류와 양식 넙치에서 검출되었으며 (Cho *et al.*, 2009), 감염된 어류는 체색흑화, 몸 표면의 출혈, 복부팽만, 비장과 신장의 비대가 육안적으로 관찰된다 (Do *et al.*, 2005). VNNV의 경우 1994년 일본의 넙치 자·치어에서 체색흑화, 척추만곡 및 이상 유영을 하며 대량 폐사하였다 (Nguyen *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 2004). 이러한 증상은 육안으로 관찰이 가능하였으며, 친어로부터 난 및 자어에 감염되는 수직감염이 주된 감염경로로 알려졌다 (Nishizawa *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 2000). 국내 양식 넙치의 MABV에 의한 감염증은 Park *et al.*, (2009) 보고에 의하면 충남 태안 및 부산 지역에서 서식하는 넙치에서 검출되어 MABV에 대한 유전자를 비교 분석함으로써 국내 MABV 유전형은 genogroup VII인 것으로 보고하였다. HRV는 국내의 경우 1997년

넙치 양식장에서 검출되었으며 (Oh *et al.*, 1998), VHSV와 증상이 유사하여 진단에 어려움이 있다 (Kimura *et al.*, 1989).

최근 넙치에서 RSIV, VNNV, MABV 및 HRV의 검출에 대한 연구는 전무한 실정이다. 본 연구의 RSIV, VNNV, MABV 및 HRV의 감염검사 결과, 조사기간 동안 검출되지 않았고 (Table 4, Table 5), 전형적인 각 바이러스 질병의 감염증상이 관찰되지 않았다 (data not shown). 이는 제주지역에서의 RSIV, VNNV, MABV 및 HRV에 의한 질병 예방 및 대처에 대한 관리가 양호한 것으로 평가할 수 있으며, 특정 질병에 대한 청정화 지역임을 증명할 수 있는 기초자료가 될 것으로 판단된다.

본 연구의 양식 넙치에서 분리한 총 15개의 VHSV 분리주들은 N gene (444 bp) 및 G gene (1,340 bp)의 PCR product를 gene cloning 하여 염기서열을 밝혔고, 그 유전자를 계통분류학적으로 분석한 결과, 현재까지 우리나라에서 보고된 VHSV isolates는 동일한 genotype을 가지는 것으로 밝혀졌다 (Nishizawa *et al.*, 2002). 그리고 GenBank database로부터 얻은 29개의 N gene과 38개의 G gene의 염기서열은 Rhabdovirus의 유전자 중 계통분석에 있어서 적절한 유전자로 보고된 자료를 사용하여 비교 분석하였다 (Bourhy *et al.*, 1992).

VHSV의 유전형은 N과 G 유전자 염기서열의 계통분류학적 분석을 토대로 크게 4가지 genotypes로 구분하고 있으며 (Snow *et al.*, 1999; Lumsden *et al.*, 2007), 지리적 위치에 따라 Genogroup I (European freshwater and sea fish), Genogroup II (British Isles), Genogroup III (North Atlantic and North America), Genogroup IV (Pacific coast, Atlantic, Great Lakes, Japan and Korea)의 4가지 유전형으로 구분하고 있다 (Einer-Jensen *et al.*, 2004; Dale *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011). 이러한 결과는 본 연구에서도 동일한 결과를 나타내어 N gene을 사용한 계통분류학적 분석 결과, 국내 양식 넙치에서 분리한 총 15개의 VHSV 분리주들은 모두 genotype IV에 속한 것으로 분석되었다 (Fig. 5). VHSV genotype IV는 북미 지역과 아시아 지역의 분리주가 포

함된 IVa와 IVb subgroups로 구분되며, 15개의 분리주는 국내에서 보고된 VHSV 유전형인 genotype IVa와 일치하는 것으로 조사되었다 (Snow *et al.*, 1999; Einer-Jensen *et al.*, 2004; Lumsden *et al.*, 2007). 또한, 국내에서 동정된 15개의 VHSV 분리주들은 일본에서 보고된 분리주 (accession number: AB179621, AB490792)와 계통분류학적으로 유사한 것으로 확인하였다 (Fig. 5). 이는 Nishizawa *et al.*, (2002)의 보고와 일치하였으며, 일본의 분리주와 본 연구에서 동정한 15개의 분리주의 염기서열을 비교한 결과, 유전자의 상동성은 97.9~99%인 것으로 나타났으며 (data not shown), 북미지역에서 분리된 genogroup IVb 분리주와는 구분되는 것으로 나타났다 (Fig. 5).

G gene을 사용한 계통분류학적 분석결과, 15개의 분리주 모두 N gene을 사용한 계통분류학적 분석결과와 동일한 경향을 보였다 (Fig. 6). 그 중, 중국에서 보고된 분리주 (accession number: KC685626) 및 일본에서 보고된 분리주 (accession number: DQ401191, AB490792, KRRV9822, AB060725)와 더 가까운 것으로 확인되었으며 (Fig. 6), 중국 및 일본 분리주의 염기서열들과 비교 분석한 결과, 99.5~99.8% 및 99.4~99.8%로 각각 높은 상동성이 관찰되었다 (data not shown).

N gene과 G gene의 계통분류학적 분석결과를 종합하면 한국의 VHSV의 경우 genotype IVa 계열에 속하며, 일본과 중국의 분리주와 더 가까운 위치에서 확인되었으나 (Fig. 5, Fig. 6), genotype IVa 계열 내에서도 지리적 위치와 관련된 유전적 다양성을 보이고 있으며, 일본과 중국의 분리주들 경우에 같은 genotype에 속해 있으나 본 연구의 2014년도에 동정된 10개의 분리주인 14-PS-10, 14-SG-01, 14-NW-03, 14-DJ-20, 14-DJ-19, 14-NW-02, 14-NW-12, 14-PS-17, 14-SG-03, 14-SS-25의 분리주들과 2015년도에 동정된 5개의 분리주인 15-HL-01, 15-PS-07, 15-DJ-25, 15-PS-03, 15-SG-04의 VHSV 분리주들은 기존에 보고된 한국 분리주와 미세하게 국가 지역적으로 그룹화되어 분류되는 것으로 나타났다 (Fig. 5, Fig. 6). 이는 한국 VHSV의 경우 서로 상호 밀접한 분자역학적 상관관계를 가지고 있음을 알 수 있으며,

각 지역별 VHSV 분리주들이 국가 지역적으로 특이적인 변이가 발생하여 구분되는 것으로 판단된다.

본 연구에서 수행된 5종의 바이러스인 VHSV, RSIV, VNNV, MABV 및 HRV에 대한 감염 모니터링은 국내의 넙치 양식장에 대한 바이러스성 질병 발생의 사전예방 및 확산방지 등 방역 체계 확립에 대한 유용한 기초자료 및 양식어류의 수출 검역 단계에서 도움이 되어 긍정적으로 영향을 발휘할 수 있을 것으로 사료되며, VHSV 질병 확산 시에는 이동제한, 소독 및 살처분 등의 방역조치가 필요할 것으로 판단된다. 현재까지 양식어류에 대한 질병 모니터링은 지속적으로 수행되어야 할 사안이며, 보다 폭넓은 지역, 어종 및 병원체에 대한 질병 모니터링을 통하여 향후 질병 방역에 대한 체계적인 구축이 필요한 것으로 생각된다.

V. 요약

바이러스는 심각한 병원체로, 특히 red seabream iridovirus (RSIV), viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV), viral nervous necrosis virus (VNNV), marine birnavirus (MABV) 및 hirame rhabdovirus (HRV)는 해수어류에 심각한 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다. VHSV는 한국 넙치의 심각한 바이러스성 질병으로 VHSV에 감염되면 체색흑화, 복부팽만, 출혈증상이 관찰된다. 어류 iridovirus 질병은 일본의 참돔으로부터 처음 보고된 후, 최근에 한국의 넙치 양식장에서도 빈번히 발생하고 있다. VNNV는 한국의 넙치와 같은 해수어에 광범위하게 퍼져 있는 바이러스성 질병이다. MABV의 경우 일본의 넙치 양식장에서 심각한 문제를 일으키고 있으며, 한국과 중국에서도 marine birnavirus 감염이 확인되었다. HRV는 일본의 넙치 양식장에서 처음 보고되었으며, 이후에 한국의 넙치 양식장에서 비교적 잦은 빈도로 발생하여 심각한 폐사가 일어나고 있다.

이에 본 연구에서는 2014년도부터 2015년도에 걸쳐 넙치의 바이러스성 질병에 대한 예방을 위해 모니터링을 실시하였다. 실험어는 2014년도에 제주도 (제주시/서귀포시)에 위치한 60개소 넙치 양식장들로부터 4월, 5월, 9월, 12월에 넙치를 수집하였고, 2015년도에는 3월 (60개소), 5월 (55개소), 7월 (52개소), 10월 (53개소)에 넙치를 수집하여 실험을 수행하였다. RT-PCR 및 PCR 결과, VHSV는 7개소의 양식장 (2014-5, 2015-2)에서 검출되었으나, 조사기간 동안 다른 바이러스성 질병은 검출되지 않았다. 추가적으로 바이러스성 질병이 의심되어 검사 의뢰된 넙치에서 각 바이러스의 특이적인 primer를 사용하여 PCR를 수행한 결과, VHSV는 8개소의 양식장 (2014-5, 2014-3)에서 검출되었으나, 조사기간 동안 다른 바이러스성 질병은 검출되지 않았다.

본 연구에서 분리된 15개의 VHSV 분리주들은 N gene과 G gene을 사용하여 염기서열을 분석한 후, GenBank에 등록된 VHSV 분리주의 염기서열을 기초로 비교 분석하였다. VHSV의 N gene 및 G gene의 계통 분류학적으로 분

석한 결과, 국내 VHSV 분리주는 모두 genotype IVa에 속하는 일본 및 중국에서 분리된 분리주와 가까운 위치에 있는 것을 확인할 수 있었다.

VI. 참고문헌

- Blake, S., Ma, J.Y., Caporale, D.A., Jairath, S. and Nicholson, B.L.: Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment A cDNA. *Dis. Aquat. Org.*, 45: 89-102, 2001.
- Bourhy, H., Kissi, B., Lafon, M., Sacramento, D. and Tordo, N.: Antigenic and molecular characterisation of bat rabies virus in Europe. *J. Clin. Microbiol.*, 30: 2419-2426, 1992.
- Cha, S.J., Do, J.W., Lee, N.S., An, E.J., Kim, Y.C., Kim, J.W. and Park, J.W.: Phylogenetic analysis of betanodaviruses isolated from cultured fish in Korea. *Dis. Aquat. Org.*, 77: 181-189, 2007.
- Cho, M.Y., Kim, M.S., Kwon, M.G., Jee, B.Y., Choi, H.S., Choi, D.L., Park, G.H., Lee, C.H., Kim, J.D., Lee, J.S., Oh, Y.K., Lee, D.C., Park, S.H. and Park, M.A.: Epidemiological study of bacterial diseases of cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* from 2005 to 2006 in Korea. *J. Fish Pathol.*, 20(1): 61-70, 2007.
- Cho, M.Y., Jee, B.Y., Park, G.H., Lee, C.H., Lee, D.C., Kim, J.W., Park, M.S. and Park, M.A.: Monitoring of fish pathogens in wild marine fish of Korean coastal offshore water in 2008. *J. Fish Pathol.*, 22(1): 75-83, 2009.
- Cho, M.Y., Park, G.H., Jee, B.Y. and Kim, J.W.: Statistical data on fish virus of cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* from 2005 to 2007. *J. Fish Pathol.*, 23: 155-162, 2010.
- Chou, H.Y., Li, H.J. and Lo, C.F.: Pathogenicity of a birnavirus to hard clam (*Meretrix lusoris*) and effect of temperature stress on its virulence. *Fish Pathol.*, 29: 171-175, 1994.

- Dale, O.B., Ørpetveit, I., Lyngstad, T.M., Kahns, S., Skall, H.F., Olesen, N.J. and Dannevig, B.H.: Outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHSV) in seawater-farmed rainbow trout in Norway caused by VHS virus Genotype III. *Dis. Aquat. Org.*, 85: 93-103, 2009.
- Do, J.W., Moon, C.H., Kim, H.J., Ko, M.S., Kim, S.B., Son, J.H., Kim, J.S., An, E.J., Kim, M.K., Lee, S.K., Han, M.S., Cha, S.J., Park, M.S., Park, M.A., Kim, Y.C., Kim, J.W. and Park, J.W.: Complete genomic DNA sequence of rock bream iridovirus. *Viol.*, 325: 351-363, 2004.
- Do, J.W., Cha, S.J., Kim, J.S., An, E.J., Lee, N.S., Choi, J.H., Lee, C.H., Park, M.S., Kim, J.W., Kim, Y.C. and Park, J.W.: Phylogenetic analysis of the major capsid protein gene of iridovirus isolates from cultured flounders *Paralichthys olivaceus* in Korea. *Dis. Aquat. Org.*, 64: 193-200, 2005.
- Einer-Jensen, K., Ahrens, P., Forsberg, R. and Lorenzen, N.: Evolution of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicaemia virus. *J. Gen. Virol.*, 85: 1167-1179, 2004.
- Fukuda, Y., Nguyen, H.D., Furuhashi, M. and Nakai, T.: Mass mortality of cultured sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, associated with viral nervous necrosis. *Fish Pathol.*, 31(3): 165-170, 1996.
- Gomez, D.K., Baeck, G.W., Kim, J.H., Choresca Jr, C.H. and Park, S.C.: Molecular detection of betanodavirus in wild marine fish populations in Korea. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 20: 38-44, 2008.
- Gorie, S., Nakamoto, K. and Katashima, K.: Disease of cultured hirame (Japanese flounder) *Paralichthys olivaceus* I. Preliminary report on a disease of marine pen cultured flounder may be caused by viral infection. *Bull. Hyogo Pref. Fish. EXP. Stn.*, 23: 66-68, 1985.

- He, J.G., Deng, M., Weng, S.P., Li, Z., Zhou, S.Y., Long, Q.X., Wang, X.Z. and Chan, S.M.: Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. *Virology.*, 291: 126-139, 2001.
- Inouye, K., Yamano, K., Maeno, Y., Nakajima, K., Matsuoka, M., Wada, Y. and Sorimachi, M.: Inidovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol.*, 27: 19-27, 1992.
- Isshiki, T., Nishizawa, T., Kobayashi, T., Nagano, T. and Miyazaki, T.: An outbreak VHSV (viral haemorrhagic septicaemia virus) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. *Dis. Aquat. Org.*, 47: 87-99, 2001.
- Isshiki, T., Nagano, K., Kanehira., S. and Suzuki, S.: Distribution of marine birnavirus in cultured marine fish species from Kagawa Prefecture, Japan. *J. Fish Dis.*, 27(2): 89-98, 2004.
- Kim, S.M., Lee, J.I., Hong, M.J., Park, H.S. and Park, S.I.: Genetic relationship of the VHSV (viral haemorrhagic septicemia virus) isolated from cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea. *J. Fish Pathol.*, 16(1): 1-12, 2003.
- Kim, W.S., Kim, S.R., Kim, D.W., Kim, J.O., Park, M.A., Kitamura, S.I., Kim, H.Y., Kim, D.H., Han, H.J., Jung, S.J. and Oh, M.J.: An outbreak of VHSV (viral haemorrhagic septicaemia virus) infection in farmed olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea. *Aquaculture.*, 296: 165-168, 2009.
- Kim, W.S., Jung, S.J., Kim, J.O., Kim, D.W., Kim, J.H. and Oh, M.J.: Genetic positioning of Korean viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from cultured and wild marine fishes. *J. Fish Pathol.*, 24: 1-9, 2011.

- Kim, W.S., Choi, S.Y., Kim, D.H. and Oh, M.J.: A survey of fish viruses isolated from wild marine fishes from the coastal waters of southern Korea. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 25: 750–755, 2013.
- Kimura, T., Yoshimizu, M. and Gorie, S.: A new rhabdovirus isolated in Japan from cultured hirame (Japanese flounder), *Paralichthys olivaceus*, and ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Dis. Aquat. Org.*, 1: 209–217, 1986.
- Kimura, T., Yoshimizu, M., Oseko, N. and Nishizawa, T.: Rhabdovirus olivaceus (Hirame rhabdovirus). In L Ahne W, Kurstak E (eds) *Viruses of lower vertebrate*. Springer Verlag Berlin.: 388–395, 1989.
- Lumsden, J.S., Morrison, B., Yason, C., Russell, S., Yong, K., Yazdanpanah, A., Huber, P., Al-Hussiney, L., Stone, D. and Way, K.: Mortality event in freshwater drum *Aplodinotus grunniens* from Lake Ontario, Canada, associated with viral haemorrhagic septicaemia virus, Type IV. *Dis. Aquat. Org.*, 76: 99–111, 2007.
- Matsuoka, S., Inonye, K. and Nakjima, K.: Cultured fish species infected by red seabream iridoviral disease from 1991 to 1995. *J. Fish Pathol.*, 31: 233–234, 1996.
- MEST (Ministry of Education and Science Technology). 2010. *Atlas of Fish Diseases*.
- Mortensen, H.F., Heuer, O.E., Lorenzen, N., Otte, L. and Olesen, N.J.: Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild marine fish species in the Baltic Sea, Kattegat, Skagerrak and the North Sea. *Virus Res.*, 63: 95–106, 1999.
- Nguyen, H.D., Mekuchi, T., Imura, K., Nakai, T., Nishizawa, T. and Muroga, K.: Occurrence of Viral Nervous Necrosis (VNN) in Hatchery-reared juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries science.*

60(5): 551-554, 1994.

Nishizawa, T., Furuhashi, M., Nagai, T., Nakai, T. and Muroga, K. Genomic classification of fish nodavirus by molecular phylogenetic analysis of the coat protein genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 1633-1636, 1997.

Nishizawa, T., Iida, H., Takano, R., Isshiki, T., Nakajima, K. and Muroga, K.: Genetic relatedness among Japanese, American and European isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) based on partial G and P genes. *Dis. Aquat. Org.*, 48: 143-148, 2002.

Nishizawa, T., Kinoshita, S. and Yoshimizu, M.: An approach for genogrouping of Japanese isolate of aquabirnaviruses in a new genogroup VII, based on the VP2/NS junction region. *J. Gen Virol.*, 86: 1973-1978, 2005.

Oh, M.J. and Choi, T.J.: A new rhabdovirus (HRV-like) isolated in Korea from cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Pathol.*, 11: 129-136, 1998

Oh, M.J., Jung, S.J. and Kitamura, S.I.: Comparison of the coat protein gene of nervous necrosis virus (NNV) detected from marine fishes in Korea. *J. World Aquat. Society.*, 36(2): 223-227, 2005.

Oseko, N., Yoshimizu, M., Dorie, S. and Kimura, T.: Histopathological study in diseased hirame (Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*) infected with *Rhabdovirus olivaceus* (Hirame rhabdovirus; HRV). *Fish Pathol.*, 23: 117-123, 1988.

Park, S.H., Park, M.A. and Cho, M.Y.: Phylogenetic analysis of marine birnavirus (MABV) isolated from cultured starry flounder *Platichthys stellatus* and olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea. *J. Fish Pathol.*, 22(3): 211-218, 2009.

- Schutze, H., Mundt, E. and Mettenleiter, T.C.: Complete genomic sequence of viral haemorrhagic septicaemia virus, a fish rhabdovirus. *Virus Genes.*, 19: 59–65, 1999.
- Shi, C.Y., Wang, Y.G., Yang, S.L., Huang, J. and Wang, Q.Y.: The first report of an iridovirus-like agent infection in farmed turbot *Scophthalmus maximus* in China. *Aquaculture.*, 236: 11–25, 2004.
- Snow, M., Cunningham, C.O., Melvin, W.T. and Kurath, G.: Analysis of the nucleoprotein gene identifies distinct lineages of viral haemorrhagic septicaemia virus within the European marine environment. *Virus Res.*, 63: 35–44, 1999.
- Sohn, S.G., Park, M.A., Do, J.W., Choi, J.Y. and Park, J.W.: Birnavirus isolated from cultured flounder in Korea. *Fish Pathol.*, 30: 279–280, 1995.
- Sohn, S.G., Park, M.A., Oh, M.J. and Chun, S.K.: A fish nodavirus isolated cultured sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *J. Fish Pathol.*, 11(2): 97–104, 1998.
- Takano, R., Nishizawa, T., Arimoto, M. and Muroga, K.: Isolation of viral haemorrhagic septicaemia (VHSV) from wild Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 20: 186–192, 2000.
- Takano, R., Mori, K., Nishizawa, T., Arimoto, M. and Muroga, K.: Isolation of viruses from wild Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Pathol.*, 36: 153–160, 2001.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S.: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0, *Mol. Biol. Evol.*, 24: 1596–1599, 2007.

- Tanaka, S., Takagi, M. and Miyazaki, T.: Histopathological studies on viral nervous necrosis of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, at the grow-out stage. J. Fish Dis., 27: 385-399, 2004.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J.: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res., 22: 4673-4680, 1994.
- Watanabe, K., Nishizawa, T. and Yoshimizu, M.: Selection of brood stock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. Dis. Aquat. Org., 41(3): 219-223, 2000.

Ⅶ. 감사의 글

설렘과 꿈을 가지고 석사생활을 시작할 때가 엇그제 같은데, 벌써 2년이라는 시간이 지나 꾸준히 연구를 했던 논문이 드디어 마무리를 짓고 한 권의 책으로 나오게 되어 너무나 기쁘고 뿌듯합니다. 먼저 부족함이 많은 제 논문에 관심과 애정 어린 조언을 아끼지 않으셨던 저의 지도교수님인 정준범 교수님께 감사드리고 싶습니다. 교수님의 지도를 통해 연구자의 길은 무엇인가에 대해 많은 것을 느꼈고, 제가 어떤 방향으로 나아가야 할지에 대한 답을 얻을 수 있었습니다. 앞으로 교수님의 제자로서 부끄럽지 않은 연구자가 될 수 있도록 노력하겠습니다. 그리고 한결 같은 소중한 충고와 조언으로 저를 성장시켜 연구에 대한 가장 큰 원동력을 주신 전려진 박사님께도 감사의 말씀을 드립니다. 항상 바쁘신 와중에도 언제나 저를 격려해주며 실험을 가르쳐 주셨던 전려진 박사님의 도움이 없었다면 석사 졸업은 꿈도 꾸지 못했을 것 같습니다. 또한 논문 심사과정에서 제 학위논문의 심사위원을 맡아주시고 날카로운 코멘트를 해주신 허문수 교수님, 이제희 교수님께 진심으로 감사드리며, 석사과정을 하면서 수업시간에 아낌없는 가르침을 주신 송춘복 교수님, 전유진 교수님, 여인규 교수님, 이승현 교수님께도 감사드립니다. 석사생활 2년동안 저와 함께 지냈던 실험실 사람들에게도 고마운 마음을 전하고 싶습니다. 처음 논문 쓸 때 어렵다고 고민하고 있는 나에게 자기 일처럼 도와준 방장 승민오빠, 잘 웃는 명립오빠, 보고픈 송이언니, 구피짱 다윈, 바쁜 성훈이에게도 고맙고, 그 동안의 즐거운 추억들이 영원했으면 좋겠습니다. 그리고 저를 격려해주고 논문 발간을 기뻐해준 실험의 대가 송헌오빠, 패션왕 종경오빠, 불타는 학구열정 현식삼촌, 심심해 우태, 내사랑 유정이, 케로로 은란이, 귀요미 혜선이, 박사 진학하는 초롱언니와 저의 석사 대학원 동기들 준영오빠, 은영이, 지연언니, 진언니, 혜원이에게도 고맙다는 말 전합니다. 그리고 제가 하고 싶은 공부를 마음껏 할 수 있도록 응원해주고, 경제적으로 지원해준 엄마, 아빠, 핏줄 현수오빠에게 고맙고 사랑한다는 말을 전하고 싶습니다. 항상 내 옆에 있어 힘들 때 큰 힘이 되어준 나의 미래 윤택오빠에게도 고맙고, 사랑한다는 말 전합니다. 끝으로 고마운 사람을 일일이 언급 하지 못했지만 그 동안 저를 아끼고 사랑해준 모든 분들께 진심으로 감사드립니다.