

남·서해안과 동중국해 자연산 어류에서 Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) 검출

이월라 · 윤현미 · 김석렬 · 정성주 · 오명주[†]
전남대학교 식품·수산생명의학부

Detection of Viral Hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from marine fish in the South Western Coastal Area and East China Sea

Wol-La Lee, Hyun-Mi Yun, Seok-Ryel Kim, Sung-Ju Jung and Myung-Joo Oh[†]

Division of Food Science and Aqualife Medicine, Chonnam National University,
Yeosu 550-749, Republic of Korea

Viral hemorrhagic septicemia (VHS) is one of the most serious viral disease of farmed rainbow trout and some marine fishes in Europe and North America. It has been reported in various marine fish species of Asian countries and induced cause mass mortality in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) culturing in Korea. The aims of this study were to monitor VHSV in wild marine fishes and to give critical information for controlling the disease through prophylactic methods. Prevalence of the viral disease, geological distribution and reservoir of the virus were investigated using wild marine fishes captured in southern coast and east china sea for two years. (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) RT-PCR results showed that VHSV were detected in 17 (10.6%) out of 160 fish. G gene sequences of viral strains isolated in this study were closely related to that of a reference strain, KVHS01-1, belonging to VHSV genotype I. The results suggest that some of wild marine fishes are VHSV carriers and may spread the pathogen directly to fish farmed in coastal area.

Key words: VHS, Distribution, RT-PCR, Southern coast

VHS는 주로 유럽의 담수 무지개송어 (*Oncorhynchus mykiss*)에 심각한 바이러스성 질병이 었지만, 담수어류 뿐만 아니라 해산어류에도 감염을 일으켰으며 (Mortensen *et al.*, 1999; Smail, 1999), 자연산 대구 (*Gadus morhua*), 청어 (*Clupea harengus*)와 양식된 터봇 (*Scophthalmus maximus*) 등 다양한 해산어류에서도 VHSV가 분리되었다 (Schlotfeldt *et al.*, 1991; Ross *et al.*, 1994; Mortenson *et al.*, 1999; Mayers *et al.*, 1999). 최근에는 일본과 우리나라 양식된 넙치에서 VHS에 의한 대량 폐사가 발생하였고 (Isshiki *et*

al., 2001 ; Kim *et al.*, 2003), Takano *et al.* (2000, 2001)은 자연산 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)에서 MABV와 VHSV 분리를 보고하였으며, 또한 국내에서는 부산인근 해역의 승어 (*Mugil cephalus*)와 포항 인근 해역의 고등어 (*Scomber japonicus*)에서 VHSV가 보고되었다 (Kim and Park, 2004). 따라서 병원성 바이러스인 VHSV가 넓은 숙주역을 가지고 있으며 유럽 뿐만 아니라 아시아의 다양한 해산어류에 발병의 가능성을 내재하고 있다. 또한, VHSV는 G gene 염기서열에 기초하여 3가지 genogroup으로 나누어지는

[†]Corresponding Author : Myung-Joo Oh, Tel : 061-659-3173
Fax : 061-659-3173, E-mail : ohmj@chonnam.ac.kr

데 (Benmansour *et al.*, 1997; Stone *et al.*, 1997), 이들 유전형은 지리적 분리 유래에 따라 American (Genogroup I), British isles (Genogroup II), European (Genogroup III)으로 구분된다고 하였다. VHSV는 자연계 내의 바이러스가 양식환경에 유입되어 질병의 원인이 될 수 있으며 수산자원의 관리를 위하여 해마다 수백만 마리의 수산종묘가 연안에 방류되고 있어 양식산 어류와 자연산 어류에서의 바이러스 검출동향에 대한 이해가 필요하다.

따라서 본 연구에서는 동중국해를 중심으로 한 3지점 및 우리나라 서해안과 남해안의 10지점에서 자연산 어류를 채집하여 자연산 어류에 존재하는 VHSV의 동태를 조사하였으며 검출된 바이러스의 유전자 염기서열을 분석하여 기존에 보고된 바이러스 분리주들과의 유전학적인 상관관계를 비교 검토하였다.

재료 및 방법

실험어

어류 샘플은 2003년 6월 25일부터 6월 30일까지 남해안의 2지점 (A, B), 서해안의 1 지점 (C), 동중국해역의 3지점 (D-F), 2005년 6월 24일부터 6월 28일까지 서해안의 3지점 (G, H, I) 과 남해안의 3지점 (J-L) 그리고 7월 28일 서해안의 1지점(M)에서 어류를 채집하였으며 각 지점은 Fig. 1에 나타내었다. 2003년과 2005년에 샘플된 어류는 외관상 건강해 보이는 어류로 각각 80마리씩 총 160마리 14목 27과 47종을 채집하여 크기를 측정하였다 (Table 1). 샘플의 비장과 신장은 적출하여 실험에 사용하기 전까지 -80°C 에 보관하였다.

주화세포 및 바이러스 배양

바이러스 검출을 위하여 모든 어류의 신장과 비장 조직을 Oh *et al.* (2001)의 방법에 따라 조직무게에 HBSS가 1:9 (0.5g/4.5 mL)가 되게 희석하여 균질화 하였고, 그 균질액을 HA filter

(0.45 μm pore size)로 여과하여 시험 샘플을 제작하였다. 이 시료는 어류 주화세포인 CHSE-214 (Chinook salmon embryo)에 접종하여 세포변성 효과 (Cytopathic effect, CPE)를 관찰하였다.

바이러스 핵산의 분리

160마리 어류의 비장과 신장을 섞어 마쇄한 여과액을 VHSV 검출에 사용하였다. 검사용 바이러스샘플 100 μL 에 Proteinase K (20mg/ml Proteinase K in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5; with Ca^{2+} ion and glycerol as stabilizers. Invitrogen)를 바이러스 샘플 100 μL 의 1/10의 비율로 10 μL 를 첨가하여 55°C 에서 2시간 반응시키고 TRIzol 1 mL와 chloroform (CHCl_3) 200 μL 를 넣고 13000 rpm으로 5분간 4°C 에서 원심분리하고, 상층액을 분리하여 1:1의 비율로 chloroform (CHCl_3) 600 μL 를 첨가하고 13000 rpm으로 다시 5분간 4°C 에서 원심분리를 하였다. 그리고 상층액의 1/10의 비율로 3M sodium acetate (Sodium acetate 40.8g/80 mL DW, pH 5.2)를 첨가한 후, 전체 volume과 동일하거나 그 이상의 isopropyl alcohol ($[\text{CH}_3]_2\text{CHOH}$)을 첨가하여 -20°C 에서 10분간 반응시켰다. 그리고 17000 rpm으로 15분간 4°C 에서 원심 분리하여 상층액은 버리고 pellet만 DW₃ (10.75 μL)로 재부유시켜 RT-PCR (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction)의 template로 사용하였다.

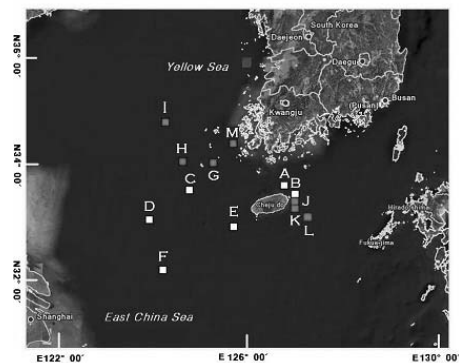


Fig. 1. Sampling sites of the south (A-B, J-L), west coastal area (C, H-I, G-M) and east china sea (D-F) in 2003 (□) and 2005 (■).

Table 1. Samples and Results of VHSV detection from various wild marine fish in 2003

Location	Fish species (No. fish examined)	Size (cm)	VHSV (No.detected/No.examined)
A	Claudy catfish, <i>Scyliorhinus torazame</i> (2)	35-40	-
	Sevenband grouper, <i>Epinephelus septemfasciatus</i> (1)	27	-
	Mirror dory, <i>Zenopsis nebulosa</i> (2)	25-31	-
	Common conger, <i>Conger myriaster</i> (1)	78	-
	Scorpion fish, <i>Sebastes marmoratus</i> (2)	20	-
	Blackmouth angler, <i>Lophiomus setigerus</i> (2)	32-41	-
	Red tilefish, <i>Branchiostegus japonicus</i> (2)	28-30	-
	Redseabream, <i>Pagrus major</i> (2)	35-50	-
	Yellowback seabream, <i>Dentex tumifrons</i> (5)	13-15	-
	Striped grouper, <i>Epinephelus latifasciatus</i> (1)	30	-
B	Grouper, <i>Zalanyhias azurnanus</i> (1)	14	-
	Mirror dory, <i>Zenopsis nebulosa</i> (1)	30	-
	Shotted halibut, <i>Eopsetta grigorjewi</i> (1)	25	-
	Cubed snailfish, <i>Liparis tessellatus</i> (1)	27	+(1/1)
	Amoreadweasel-fish, <i>Haplobrotula armata</i> (1)	33	-
	Scorpion fish, <i>Sebastes marmoratus</i> (2)	20	-
	Blackmouth angler, <i>Lophiomus setigerus</i> (2)	32-41	-
	Red tilefish, <i>Branchiostegus japonicus</i> (2)	28-30	-
	Horse mackerel, <i>Trachurus japonicus</i> (1)	24	-
	Horse king fish, <i>Kaiwarinus equula</i> (1)	17	-
	Yellowback seabream, <i>Dentex tumifrons</i> (2)	13	-
	File fish, <i>Thamnaconus modestus</i> (1)	25	-
	Japanese barracuda, <i>Sphyræna japonica</i> (1)	32	-
Slender lizardfish, <i>Saurida elongata</i> (1)	65	-	
C	Finespotted flounder, <i>Pleuronichthy cornuts</i> (4)	20-22	-
	Blackthroat seaperch, <i>Doederleinia berycoides</i> (2)	15	-
	Goldeye rockfish, <i>Sebastes thompsoni</i> (1)	17	-
	Armored weasel-fish, <i>Hoplobrotula armata</i> (1)	34	+(1/1)
	Blackmouth angler, <i>Lophiomus setigerus</i> (1)	33	-
	Skate ray, <i>Raja kenoei</i> (1)	40	-
D	Finespotted flounder, <i>Pleuronichthy cornuts</i> (1)	20	-
	Largehead hairtail, <i>Trichiurus lepturus</i> (1)	65	-
	Cubed snailfish, <i>Liparis tessellatus</i> (2)	20	-
	Blotched eelpout, <i>Zoarces gilli</i> (1)	40	-
	Blackmouth angler, <i>Lophiomus setigerus</i> (1)	30	-
	Yellow croaker, <i>Larimichthys polyactis</i> (1)	20	-
E	Finespotted flounder, <i>Pleuronichthy cornuts</i> (4)	19-21	-
	Largehead hairtail, <i>Trichiurus lepturus</i> (2)	70	+(1/2)
	Amoreadweasel-fish, <i>Haplobrotula armata</i> (2)	22-26	-
	Speamose grenadier, <i>Caelorinchus multispinulosus</i> (2)	26-32	-
	Blackthroat seaperch, <i>Doederleinia berycoides</i> (4)	16-22	-
	Mirror dory, <i>Zenopsis nebulosa</i> (1)	14	-
	Yellowback seabream, <i>Dentex tumifrons</i> (1)	12.5	-
Yellow croaker, <i>Larimichthys polyactis</i> (4)	17-19	-	
F	Belted beard grunt, <i>Hapalogenys mucronatus</i> (1)	18	-
	White croaker, <i>Argyrosomus argentatus</i> (1)	22	-
	Purple pike conger, <i>Muraenesox cinereus</i> (3)	65	-
Total	80	3	

Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) 검출

추출한 total RNA는 95°C에서 10분간 변성시킨 후, 50 nM Tris-HCl, pH 8.3, 75mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTPs, 10 mM DTT, 10 units reverse transcriptase (Bioneer Co. ROK)를 첨가하여 42°C에서 1시간동안 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 Miller 등 (1998)이 glycoprotein에서 디자인한 PCR primer (VG1-VD3/VD3-VD5) set를 사용하여 RT-PCR을 실시하였다. (Fig. 2, Fig. 3) PCR은 AccuPower PCR premix tube (Bioneer Co. ROK)에 cDNA 3 µl를 넣어, Thermal cycler (Perkin-Elmer 2400)를 사용하여 1 step은 95°C 1분, 54°C 1분, 72°C 1분간 30 cycle을 반복하는 조건으로 증폭시켰다. 2 step은 1 step PCR 산물의 핵산 1 µl를 넣어 95°C 1분, 54°C 1분, 72°C 1분간 30 cycle을 반복하는 조건으로 증폭시켰다. PCR 증폭 산물은 1.5% agarose gel을 사용하여 전기 영동한 후 UV transilluminator 상에서 전기 영동상을 확인하였다. PCR products는 gel purification kit (Bioneer Co. ROK)를 이용

하여 정제 후 sequence하여 GenBank에 등재된 다양한 VHSV strain의 sequence data를 이용하여 Genetyx-Win Version 5.1 program으로 분석하였고, Mega 3와 ClustalX 1.8 program을 사용하여 phylogenetic tree (UPGMA)로 연관성을 비교하여 그 유전적 위치를 확인하였다.

결 과

남해안과 동중국해에서 2003년과 2005년 2년간 자연산어류 샘플결과 총 160마리 (14목, 27과, 40종)가 조사되었으며 RT-PCR법을 이용한 VHSV 검출결과 2003년에는 80마리 중 3마리에서 VHSV가 검출되어 검출율 3.7% 그리고 2005년에는 17마리에서 검출되어 검출율 17.5%를 나타내었으며 검출된 어류는 모두 PCR product 산물을 1.5% agarose gel에서 확인한 결과 2 step RT-PCR 444bp에서 특이 밴드가 확인되었다.

검출된 어종현황은 2003년에는 붉은메기, 갈치, 물메기 3종 (3마리)에서 검출되었고 (Table 1),

Virus	primer name	Primer sequence	Product size (bp)
VHS	VG1	5'-ATGGAATGGAACACTTTTTTC-3'	914
	VD3	5'-TGTGATCATGGGTCCTGGTG-3'	
	VD3	5'-TGTGATCATGGGTCCTGGTG-3'	444
	VD5	5'-TCCCGCTATCAGTCACCAG-3'	

Fig. 2. Primer set used for RT-PCR amplification of VHSV glycoprotein.

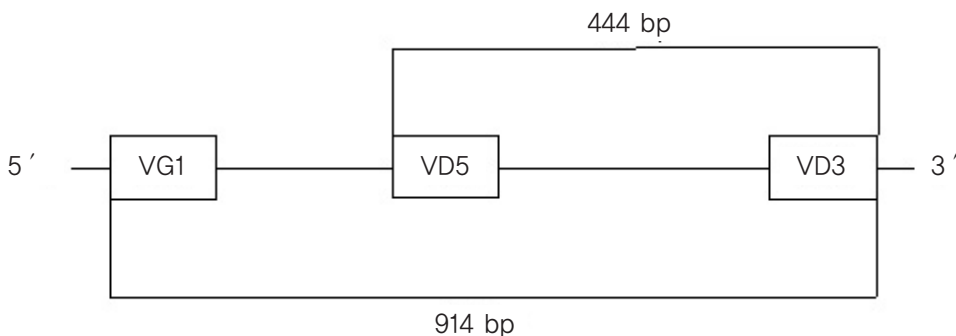


Fig. 3. Schematic illustration of the RT-PCR amplification for VHSV gene detection.

2005년에는 참조기, 기름가자미, 두툽상어, 살살치, 황돔, 병어, 송어에서 검출되어 7종 (14마리)에서 VHSV가 검출되었다 (Table 2). 따라서 농어목 어류인 병어, 황돔, 갈치, 참조기, 썸벵이목 살살치, 참치목 붉은메기 그리고 상어목 두툽상어, 가자미목 기름가자미가 VHSV의 새로운 숙주어종으로 확인되었으며 조사된 어종 중 농어목 어류가 가장 많이 샘플되었으나 VHSV 검출은 상어목에서 가장 높은 검출율을 보였으며 (Fig. 4) 2005년 서해안의 I 지점에서 조사된 상어목의 두툽상어에서는 100% 검출율을 보여 VHSV에 감수성이 높은 어종으로 생각된다 (Table 2).

검출된 지점과 관련하여 2003년에는 남해안의 B, 서해안의 C, 동중국해의 E지역에서 검출되었고 (Table 1) 2005년에는 남해안의 K지점을 제외하고 모든 지역에서 VHSV가 검출 되어 (Table 2) VHSV는 남해안과 동중국해 연안에 폭

넓게 분포함을 확인하였다.

유전학적 유사성 확인을 위하여 검출된 VHSV 중 6종을 G gene에 기초한 염기서열 분석결과 양식어류에서 분리된 분리주 (KVHS01-1)와 비교하여 98.4-99%, 아미노산 염기서열 분석결과 97-99%의 유사성을 나타내어 (Fig. 5) 본연구에

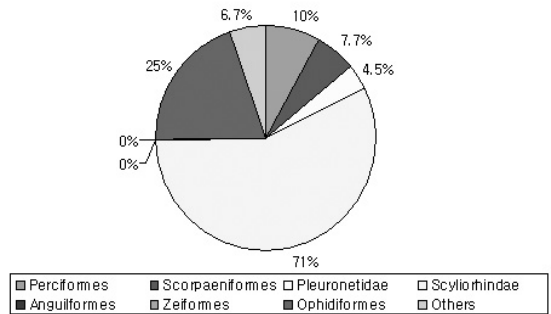


Fig. 4. VHSV detection rate (%) of examined fish grouped by fish order.

Table 2. Results of VHSV detection from various wild marine fish in 2005

Location	Fish species (No. fish examined)	Size (cm)	VHSV (No.detected/No.examined)
G	Yellow croaker, <i>Larimichthys polyactis</i> (6)	9-12	+(2/6)
H	Korean flounder, <i>Glyptocephalus stelleri</i> (10)	22-30	+(1/10)
I	Claudy catshark, <i>Scyliorhinus porazame</i> (5)	35-37	+(5/5)
J	Sting fish, <i>Scorpaena izensis</i> (10)	14-24	+(1/1)
K	Yellowback seabream, <i>Dentex tumifrons</i> (10)	11-12	-
L	Yellowback seabream, <i>Dentex tumifrons</i> (10)	11-18	+(2/10)
M	Common conger, <i>Conger myriaster</i> (8)	32-60	-
	Rock fish, <i>Sebastes schlegeli</i> (6)	18-25	-
	Butter fish, <i>Pampus argenteus</i> (5)	17-20	+(2/5)
	Flathead mullet, <i>Mugil cephalus</i> (3)	17-40	+(1/1)
	Bartail flathead, <i>Platycephalus indicus</i> (2)	28-45	-
	Belted beard grunt, <i>Hapalogenys mucronatus</i> (1)	20	-
	Tongue sole, <i>Cynoglossus semilaevis reliscus rhomaleus</i> (1)	35	-
	Flatfish, <i>Paralichthys olivaceus</i> (1)	20	-
	Dotted gizzard shad, <i>Konosirus punctatus</i> (1)	22	-
	Sand smelt, <i>Sillago sihama</i> (1)	20	-
Total	80		14

KVHS01-1	301'	CTGACTTCAT	AGAGGGGGTT	TGTACAACAT	CACCCTGCCC	AACCCACTGG	CAAGGAGTCT	360
KF-H1		*****	*****	*****	*****	*****	*****	
KF-H4		*****	*****	*****	*****	*****	*****	
BF-M19		*****	*****	*****	*****	*****	*****	
BF-M21		*****	*****	*****	*****	*****	*****	
YB-L2		*****	*****	*****	*****	*****	*****	
LH-E52		*****	*****	*****	*****	*****	*****	
Makah		*****	*****	*****	*****	*****	*****	
Mak-WA88		*****	*****	*****	*****	*****	*****	
Obama 25		*****	*****	*****	*****	*****	*****	
Sc0 95		****T****	*****	*****C*	*G****T*A	***T**T**	**G****T*	
96-43		****T****	*****	**C****C*	*G****T*A	***T**T**	**G****T*	
KRRV9601		****T****	*****	**C****C*	*G****T*A	***T**T**	**G****T*	
KVHS01-1	361'	ACTGGATCGG	TGCTACACCT	CAGGCCCAT	GCCCTACCTC	AGAAACGCTT	AAGGGGCATC	420
KF-H1		*****	C*****	*****	*****	*****	*****	
KF-H4		*****	C*****	*****	*****	*****	*****	
BF-M19		*****	C*****	*****	*****	*****	*****	
BF-M21		*****	C*****	*****	*****	*****	*****	
YB-L2		*****	C*****	*****	*****	*****	*****	
LH-E52		*****	C*****	*****	*****	*****	*****	
Makah		*****	C*****	*****	*****	*****	*****	
Mak-WA88		*****	C*****	*****	*****	*****	*****	
Obama 25		*****	C*****	*****	*****	*****	*****	
Sc0 95		*T**T**	***C****C	ACA*****	***A**G*	G****A**A	G******C*	
96-43		*T**T**	***C****C	ACA*****	***C**GC*	G****A**A	G**A**A**C*	
KRRV9601		*T**T**	***C****C	ACA*****	***C**G*	G****A**A	G**A**A**C*	
KVHS01-1	421'	TGTTCCACCG	GACACATGAT	CACA				444
KF-H1		*****	***C*****	****				
KF-H4		*****	***C*****	****				
BF-M19		*****	***C*****	****				
BF-M21		*****	***C*****	****				
YB-L2		*****	***C*****	****				
LH-E52		*****	***C*****	****				
Makah		*****	***C*****	****				
Mak-WA88		*****	***C*****	****				
Obama 25		*****	***C*****	****				
Sc0 95		*****	A**T*****	****				
96-43		*****	***C*****	****				
KRRV9601		*****	***C*****	****				

Fig. 5. Nucleotide sequence of the RT-PCR products of glycoprotein of VHSV genome from wild fish. Sequence for the VHSV strain KVHS01-1 are shown as a comparison. Dots indicate the same bases as KVHS01-1 strain. VHSV strain and their host fish ; KF-H1: Korean flounder *G. stelleri*, KF-H4: Korean flounder *G. stelleri*, BF-M19: Butter fish *P. arenteus*, BF-M21: Butter fish *P. arenteus*, YB-L2: Yellowback seabream *D. tumifrons*, LH-E52 : Largehead hair tail *T. lepturus*. GenBank accession numbers for nucleotide sequences are as follows: Makah Z93421, Mak-WA88 U28747, Obama 25 AB060725, Sc0 95 U88056, 96-43 AF143862, KRRV-9601 AB060727.

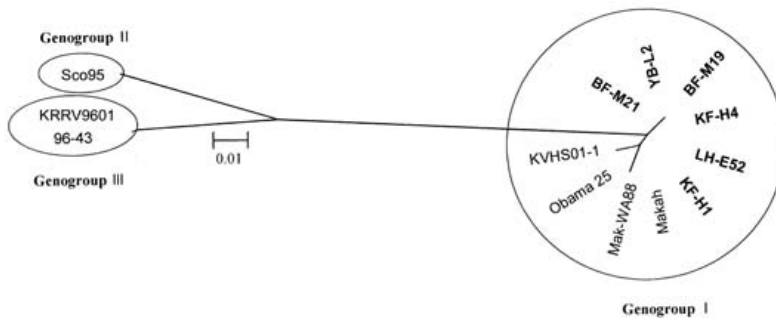


Fig. 6. Phylogenetic tree (UPGMA) represents the relationship of a VHSV strains of wild fish isolates based on nucleotide sequences of glycoprotein. VHSV strain and their host fish ; KF-H1: Korean flounder *G. stelleri*, KF-H4: Korean flounder *G. stelleri*, BF-M19: Butter fish *P. arenteus*, BF-M21: Butter fish *P. arenteus*, YB-L2: Yellowback seabream *D. tumifrons*, LH-E52 : Largehead hair tail *T. lepturus*. GenBank accession numbers for nucleotide sequences are as follows: Makah Z93421, Mak-WA88 U28747, Obama 25 AB060725, Sc0 95 U88056, 96-43 AF143862, KRRV-9601 AB060727.

서 분리된 자연산어류에서의 VHSV 분리주는 참고 strain들과 비교하여 유전학적으로 KVHS01-1, Makah, Mak-WA88, Obama 25와 같은 VHSV Genogroup I에 속하는 것으로 확인되었다 (Fig. 6).

고 찰

본 연구는 자연산 어류에서 VHSV 분포조사를 위해 동중국해역의 3지점, 서해안 5지점 그리고 남해안의 5지점에서 어류를 채집하였다. 본 실험에 사용한 어류 160마리를 어종별로 분류하면 14목, 27과, 40종으로 분류된다. 이 중 농어목 어류가 전체 실험어의 약 43%, 썸뱅이목 16%, 가자미목 14%, 상어목 4%, 뱀장어목 8%, 달고기목과 참치목을 각각 3% 그리고 기타 어종이 9%로 분류되며 VHSV가 검출된 어종은 농어목이 7마리 (41%)로서 가장 많은 비중을 차지하였으나 바이러스 검출율은 상어목에서 가장 높은 검출율 (71%)을 보여 상어목이 VHSV에 감수성이 높은 어종으로 여겨지며 금후 자연산 어류의 목 (Order) 별 감수성 차이에 대한 자세한 조사와 실험이 필요할 것으로 여겨진다.

1980년대 중반까지 VHSV는 유럽전역의 무지개 송어 양식장에서 심각한 질병을 야기하여 연어과 어류의 양식에 특히 중요한 병원체였다. 무지개송어 이외의 감수성 있는 연어과 어류에는 brook trout, lake trout, atlantic salmon, brown trout, golden trout 등이 있으며 비연어과 어류에서도 VHSV가 다수 분리되고 있는데 (Meier *et al.*, 1994) 담수어종으로는 pike, grayling, whitefish, 등이 알려져 있고 해수어종으로는 cod, herring, seabass, turbot, rockling, whiting, Norway pout, Lesser argentine, blue whiting 등이 VHSV에 감수성이 있는 것으로 보고되었다 (Castric and de Kinkelin, 1984; Schlotfeldt *et al.*, 1991; Dixon *et al.*, 1997; Mortensen *et al.*, 1999). 이러한 결과를 토대로 VHSV가 해수 환경에 분포 할 것이며 자연산 해수 어류가 VHSV의 일차적인 병원소

가 될 가능성이 있을 것으로 생각되어졌다 (Betts and Stone, 2000; Dixon *et al.*, 1997). 최근 Watanabe 등 (2002)은 일본의 자연산 넙치와 까나리 (*Ammodytes personatus*)에서도 VHSV가 10%와 2%의 검출율을 보인다고 하였고, 우리나라 연안의 자연산 송어와 고등어에서도 VHSV가 분리되어 세계각지의 해산어에 분포하고 있을 가능성을 나타내었다 (Watanabe *et al.*, 2002; Kim and Park 2004). 본 연구에서 농어목 어류인 병어, 황돔, 갈치, 참조기, 썸뱅이목 살살치, 참치목 붉은메기 그리고 상어목 두툽상어, 가자미목 기름가자미가 VHSV의 새로운 숙주어종으로 확인되었으며 특히 상어목이 VHSV에 감수성이 높은 것으로 여겨진다.

VHSV는 G gene 염기서열에 기초하여 3가지 genogroup으로 나누어지는데 (Benmansour *et al.*, 1997; Stone *et al.*, 1997), 이들 유전형은 지리적 분리 유래에 따라 American (Genogroup I), British isles (Genogroup II), European (Genogroup III)으로 구분된다고 하였다. 일본의 자연산 넙치에서 분리한 Obama 25 분리주는 American type으로 genogroup I에 속하며 양식 넙치에서 분리한 KRRV 9601 분리주는 European 분리주로 genogroup III에 속함을 보고하여 외국으로부터 바이러스가 유입된 것으로 생각하였다 (Nishizawa *et al.*, 2002). Kim 등 (2003)은 우리나라 양식 넙치와 자연산 어류인 고등어와 송어에서 분리되는 VHS는 일본에서 분리한 Obama 25 분리주와 같은 유전형인 genogroup I에 속한다고 보고 하였으며, 본 연구에서 검출된 VHSV 중 6종을 G gene에 기초한 염기서열 분석결과 양식어류에서 분리된 분리주 (KVHS01-1)와 비교하여 98.4-99%, 아미노산 염기서열 분석결과 97-99%의 유사성을 나타내어 (Fig. 5) 본 연구에서 분리된 자연산 어류에서의 VHSV 분리주는 참고 strain들과 비교하여 유전학적으로 KVHS01-1, Makah, Mak-WA88, Obama 25와 같은 VHSV Genogroup I에 속하는 것으로 확인되었다 (Fig. 6). 일반적으로 해수 유래의 VHSV strain은 분리한 지역에

관계없이 담수무지개송어에 병원성이 없거나 약하다고 알려져 있지만 (Ross *et al.*, 1994; Dixon *et al.*, 1997), 일본에서 분리한 genogroup I에 포함되는 KRRV-9601 strain은 양식 넙치에 높은 폐사를 일으키며 분리지역에 관계없이 자연산 해산어에 보균되어 있을 가능성이 높다고 하였다 (Takafumi *et al.*, 2003). 우리나라 연안의 다양한 해산어류에서 VHSV 보균이 확인되었던 점에서 이들 자연수계의 보균어류들은 같은 수역의 양식어류에 대한 질병 발생에 직접적인 영향을 줄 수 있는 가능성이 의심되어지며 양식어류를 통하여 자연수계에 병원체가 확산되고 있을 가능성도 있는 등 양식산어류와 자연산 어류에서의 역학적 관계에 대한 보다 정밀한 연구가 필요할 것으로 여겨진다.

요 약

Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV)는 유럽과 북미지역의 담수 무지개송어에 심각한 바이러스성 질병을 야기하는 원인체였으나 담수어류 뿐만 아니라 해산어류에서도 심각한 질병을 유발하며 최근 일본과 우리나라 양식 넙치에서 VHSV에 의한 대량 폐사 발생이 보고되고 있다. 본 연구는 VHS에 대한 예방학적 접근의 일환으로서 자연산 어류로부터의 VHSV 검출 및 지리적 분포, 보균 어종에 대한 유전학적인 조사를 목적으로 2003년과, 2005년도에 동중국해역 3지점, 서해안 5지점 그리고 남해안 5지점에서 어류를 채집하였다. RT-PCR을 이용한 연구결과 자연산 해산어류 160마리 중 12종 17마리에서 VHSV가 검출되어 검출율 10.6%를 보였으며 조사된 12종의 어류 중 특히 상어목에서 가장 높은 검출율을 보였다. VHSV G gene을 이용한 계통분류학적 분석결과 염기서열 분석에서 양식산어류의 분리주 (KVHS01-1)와 98.4%~99%, 아미노산 분석에서 97~99% 유사성을 나타내어 본 연구에서 조사되었던 자연산 어류에서 분리된 VHSV는 Genogroup I에 속하

였다.

참 고 문 헌

- Benmansour, A., Basurco, B., Monnier, A.F., Vende, P., Winton. J.R., Kinkelin. P., 1997. Sequence variation of the glycoprotein gene identifies three distinct lineages within field isolates of viral hemorrhagic septicaemia virus, a fish rhabdovirus. *J. Gen. Virol.* 78, 2837-2846.
- Betts, A.M., Stone, D.M., 2000. Nucleotide sequence analysis of the entire coding regions of virulent and avirulent strains of viral hemorrhagic septicaemia virus. *Virus Genes.* 20, 259-262.
- Dixon. P.F., S., Kehoe, E., Parry, L., Stone. D.M., Way, K., 1997. Isolation of viral hemorrhagic septicaemia virus from Atlantic herring *Clupea harengus* from the English Channel. *Dis. Aquat. Org.* 30, 81-89.
- Isshiki T., Nishizawa T., Kobayashi T., Nagano T., Miyazaki T., 2001. An outbreak of VHSV (Viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. *Dis Aquat Org.* 47, 87-99.
- Jensen N.J., Bloch B., Larsen J.L., 1979. The ulcer-syndrome in cod (*Gadus morhua*) III. A preliminary virological report. *Nord Vet Med.* 31, 436-442.
- Kim, S.M., Park, S.I., 2004. Detection of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) in wild marine fishes in the coastal region of Korea. *J. Fish pathol.* 17, 1-10.
- Kim, S.M., Lee, J.I., Hong, M.J., Park, H.S., Park, S.I., 2003. Genetic relationship of the VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) isolated from cultured olive flounder, *Paralichthys*

- olivaceus* in Korea. J. Fish Pathol. 16, 1-12.
- King, J.A., Snow, M., Skall, H.F., Raynard, S., 2001. Experimental susceptibility of Atlantic salmon *Salmo salar* and turbot *Scophthalmus maximus* to European freshwater and marine isolates of viral hemorrhagic septicemia virus. Dis Aquat Org. 29, 25-31.
- Meyers, T. R., Short S., Lipson K., 1999. Isolation of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) associated with epizootic mortality in species of Alaskan marine fish. Dis Aquat Org. 38, 81-86.
- Miller, T. A., Rapp, J., Wastlhuber, U., Hoffmann, R. W., Enzmann, P.J., 1998. Rapid and sensitive reverse transcriptase polymerase chain reaction based detection and differential diagnosis of fish pathogenic rhabdoviruses in organ samples and cultured cells. Dis. Aquat. Org. 34, 13-20.
- Mortensen, H.F., Heuer, O.E., Lorenzen, N., Otte, L., Olesen, N.J., 1999. Isolation of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from wild marine fish species in the Baltic Sea, Kattegat, Skagerrak and the North Sea. Virus Res. 63, 95-106.
- Nishizawa, T., Iida, H., Takano, R., Isshiki, T., Nakajima, K., Muroga, K., 2002. Genetic relatedness among Japanese, American and European isolates of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) based on partial G and P genes. Dis. Aquat. Org. 48, 143-148.
- Ross K., McCarthy U., Huntly P.J., Wood B.P., Stuart D., Rough E.I., Smail D.A., Bruno D.W., 1994. An outbreak of viral hemorrhagic septicemia (VHS) in turbot (*Scophthalmus Maximus*) in Scotland. Bull Eur Assoc. 14, 213-214.
- Schlotfeldt H.J., Ahne W., Vestergård-Jørgensen P.E., Glende W., 1991. Occurrence of viral hemorrhagic septicemia in turbot (*Scophthalmus maximus*) a natural outbreak. Bull. Eur. Assoc. 11, 105-107.
- Stone D.M., Way K., Dixon P.F., 1997. Nucleotide sequence of the glycoprotein gene of viral hemorrhagic septicemia (VHS) viruses from different geographical areas: a link between VHS in farmed fish species and viruses isolated from North Sea cod (*Gandus morhua*). J. Gen. Virol. 78, 1319-1326.
- Takafumi I., Mori K.I., Arimoto M., Kazuhiro N., 2004. Virulence of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) isolates from Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* in Rainbow Trout and several species of Marine Fish. Fish Pathol. 39, 103-2004.
- Takano R., Mori K., Nishizawa T., Arimoto M., Muroga K., 2001. Isolation of viruses from wild Japanese flounder *paralichthys olivaceus*. Fish Pathol. 36, 153-160.
- Takano R., Nishizawa T., Arimoto M., Muroga K., 2000. Isolation of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from wild Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 20, 186-193.
- Watanabe L., Pakingking R. Jr., Iida H., Nishizawa T., Iida Y., Arimoto M., Muroga K., 2002. Isolation of aquabirnavirus and viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from wild marine fishes. Fish Pathology 37, 189-191.

Manuscript Received : October 24, 2007

Revision Accepted : November 26, 2007

Responsible Editorial Member : Jung-Woo Park
(Ulsan Univ.)