

새로운 betanodavirus 재편성체(reassortant)의 어류 치어에 대한 병원성 분석

김영철¹ · 정현도^{2†}

¹국립수산과학원 병리연구과, ²부경대학교 수산생명의학과

Pathogenicity of new reassortant betanodaviruses to various juvenile fishes

Young Chul Kim¹ and Hyun Do Jeong^{2†}

¹Pathology Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

²Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

With the recent isolation of a new betanodavirus in shellfish, Korean Shellfish Nervous Necrosis Virus (KSNNV), it has also been identified the reassortant KSNNV of two RNA segments, in which one segment is KSNNV genotype but the other one is known genotype. In this study, we confirmed that the reassortant KSNNVs obtained in previous screening study of our laboratory for betanodaviruses in shellfish were KS/RGNNV and RG/KSNNV type by performing two consecutive multiplex RT-PCR on each RNA1 and RNA2 segment (R1- and R2-discriminative multiplex two-step RT-PCR, respectively) to determine the genotype of each segment based on the size of amplicon. In the pathogenicity analysis, none of the reassortants induced specific external symptoms or mortality of VNN, but viruses of $2 \times 10^4 \sim 10^5$ copies/mg or more were detected at 14 days after injection (10^7 copies/fish) in brain tissues of 4 species except for crucian carp and common carp among the 6 species of juvenile fish used. In addition, the histopathological features of weak but distinct vacuole formation were also found in the brain of these infected fish, but no difference was found between the two reassortants KS/RGNNV-KG and RG/KSNNV-CM.

Key words: Betanodavirus, Reassortant, Fish virus, Pathogen, VNN; VER

서 론

어류에서 중추신경계의 괴사와 공포가 특징인 신경병리학적 장애를 유발하여 폐사를 일으키는 바이러스성뇌막막증(viral encephalopathy and retinopathy, VER) 또는 바이러스성신경괴사증(viral

nervous necrosis, VNN)의 병원체인 betanodavirus는 지난 2세기 동안 30종이 넘는 담수 및 해산 양식 어류에 감염되어 심각한 경제적 손실을 일으키고 있다(Egusa et al., 2006; Munday et al., 2002; Gomez et al., 2008; Doan et al., 2017; OIE, 2019). 어류의 신경괴사증바이러스(Nervous Necrosis Virus, NNV)인 betanodavirus는 외막이 없고 크기가 24-34 nm 인 정이십면체의 모양을 가지며, (+)sense RNA인 2개의 segment를 가지고 있다. 이 중 RNA 1은 약

†Corresponding author: Hyun Do Jeong
Tel: +82-51-629-5941, Fax: +82-51-629-5938
E-mail: jeonghd@pknu.ac.kr

3.1kb의 크기로 RNA 중합효소를 암호화 하고 있으며, RNA2는 1.4kb의 길이로 주요 외피 단백질을 암호화 하며, 3' 말단에 poly(A) 부위는 없다(Delsert et al., 1997; Mori et al., 1992). Betanodavirus는 계통수 분류에 따라 red spotted grouper- (RGNNV), barfin flounder- (BFNNV), striped jack- (SJNNV) 그리고 tiger puffer nervous necrosis virus (TPNNV)의 총 4개의 유전자형(genotype)으로 나뉜다(Nishizawa et al., 1997). 현재까지 국내 자연산 어류 및 양식 생물에서는 RGNNV genotype만 존재하는 것으로 보고되어 있다(Gomez et al., 2008; Kim et al., 2012).

패류는 filter-feeding 특성에 의하여 해양 환경중의 다양한 병원체를 체내에 축적하여 bio-carrier 또는 bio-reservoir로서의 역할을 할 수 있다고 알려져 있다(Metcalf et al., 1979; Rippey, 1994). 최근 본 연구실에서는 filter feeding에 의하여 패류 조직 내 축적된 betanodavirus를 분석함으로써 해양 환경내에 상존하는 어류 VNN 병원체의 특성을 분석하고자 하였다.

이를 위하여 먼저 betanodavirus 검출과 이에 대한 분석을 통하여 검출된 betanodavirus의 genotype까지 결정할 수 있는 구별하는 detection and discrimination 이라는 two track 의 multiplex RT-PCR 방법을 개발하였다(Kim et al., 2018a). 이를 통하여 2012~2015년에 수집된 1,162개의 패류 및 어류 시료로부터 481개의 betanodavirus 양성 시료를 얻고 이들이 함유한 betanodavirus의 specific genotype까지 결정하였다(Kim et al., 2018a). 그 결과 우리나라 연안의 양식어류에서 VNN 질병을 야기하는 것으로 알려진 RGNNV type 뿐만 아니라 이전까지 국내 어류에서는 보고된 바 없었던 외래 유전형 BFNNV 또한 bio-carrier로서의 역할을 하는 패류 조직 내에 높은 빈도로 발견된다는 것을 확인하였다. 더 나아가 전 세계적으로 지금까지 보고되지 않은 새로운 betanodavirus 인 KSNNV를 발견하여 이를 5번째의 betanodavirus genotype으로 제안한 바 있다(Kim et al., 2019).

RNA 바이러스인 betanodavirus의 유전적 변화는 각 RNA segment 자체에서의 mutation 뿐만 아니라, influenza virus와 같이 각 바이러스의 서로 다른 segment가 유전적으로 혼합되는 재편성(reassort-

ment) 현상에 의하여 새로운 특성을 지닌 다양한 조합의 신종 재편성체(reassortant)로 발생할 수 있는 변이특성을 갖는다. 지금까지 지중해 연안의 국가에서 RGNNV와 SJNNV genotype 사이에서 확인된 RG/SJNNV (RNA1: RGNNV genotype, RNA2: SJNNV genotype) 및 SJ/RGNNV(RNA1: SJNNV genotype, RNA2: RGNNV genotype)의 reassortant 존재가 보고되었다(Oliveira et al., 2009; Panzarin et al., 2012; Toffolo et al., 2007; Toffan et al., 2017). 그런데 최근, 국내에서도 새로운 바이러스인 KSNNV의 발견과 함께, 이들 바이러스가 국내 연안에 존재하고 있는 RGNNV와의 유전적 reassortment에 의하여 KS/RGNNV 또는 RG/KSNNV라는 새로운 reassortant의 형성에 대한 것을 보고한 바 있다(Kim, 2018). 그러나 패류로부터 순수 분리된 reassortant betanodavirus가 치어기의 어류에 대하여 나타낼 수 있는 병원성 분석 및 위험성에 대한 연구는 아직 보고된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 분리된 KS/RGNNV 또는 RG/KSNNV라는 패류 유래의 reassortant betanodaviruses가 다양한 어종의 치어(juvenile and subadult stage)에서의 바이러스 정량 분석과 병리 조직학적인 변화를 추적하여 reassortant betanodavirus 라는 새로운 감염원이 양식어류에 나타낼 수 있는 잠재적 위험성을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

바이러스

국내산 패류 시료에 대한 betanodavirus의 감염 상태 분석을 수행한 선행 연구의 결과(Kim, 2018), RNA1 segment와 RNA 2 segment의 genotype이 서로 다르게 나타나는 2개의 샘플, 꼬막 (KS/RGNNV type) 그리고 참굴 (RG/KSNNV type)의 장기 조직 100 mg을 취하였다. 이를 pH가 7.2인 PBS 1 ml에 혼합하여 균질화(Pellet Pestle Motor Cordless, Kontes, USA)하고 0.45 μ m syringe filter에 통과 시킨 후 80% confluency를 보이는 T-25 vessel의 E-11 cell line에서 7일간의 배양을 2번 연속 실시하여 상등액을 사용하였다. 표준 RGNNV와 KSNNV는 E-11 cell line에서 7일간 배양한 것을 사용하였다. 모든

배양은 FBS 5%와 gentamycin 100 IU가 포함된 L-15배지를 사용 하였다. 배양된 바이러스 isolates는 각각 KS/RGNNV-KG, RG/KSNNV-CM 이라고 명명하였다.

cDNA 합성

균질화 시킨 실험어의 뇌(25 mg) 또는 배양된 RG/KSNNV-KG와 KS/RGNNV-KG 감염시킨 E-11 세포 상등액(100 µl)을 RNeasy plus mini kit (Qiagen, Germantown, MD, USA)를 이용하여 제조사의 protocol에 따라서 total RNA 100 µl 분리하였다. 이후 cDNA 합성을 위해 RNA 10 µl를 70°C에 5분간 가열한 후, c2VNNR primer (0.5 µM) (Table 1)과 함께 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (200 U/ml, Promega)를 이용하여 42°C에서 60분간 반응시켜 주었다. 반응이 끝난 후 sample은 95°C에서 5분간 가열하여 역전사효소를 불활화시켜주었다.

Primer design과 multiplex RT-PCRs

우리나라에서 발견되는 betanodavirus의 3가지 genotype인 RGNNV, BFNNV 그리고 KSNNV의 각 RNA1 및 RNA2 segment가 가지고 있는 염기서열을 기반으로 각 유전형에 특이적인 프라이머 제작으로 개발된 2 가지 종류의 multiplex RT-PCR을 실시하였다. 즉, RNA1 segment의 염기서열에 대한 각 유전형의 특이적 염기서열에 부합하는 3가지 프라이머(s1VNNRG2, s1VNNBF2 및 s1VNNKS2)와 보존영역(conserved region)에 대한 프라이머(c1VNNF2)를 혼합하여 사용하는 RNA1-Discriminative multiplex two-step RT-PCRs (R1-DMT-2 RT-PCR)은 각 RGNNV, BFNNV, KSNNV 유전형에 대하여 각각 214, 448, 843 bp의 amplicon을 생성시킨다. 그리고 RNA2 segment의 각 유전형의 특이적 염기서열을 기반으로 한 3가지 primers (s2VNNRG2, s2VNNBF2 및 s2VNNKS2)와 보존영역에 대한 primer (c2VNNF2)를 혼합하여 사용하는 RNA2-Discriminative multiplex two-step RT-PCRs (R2-DMT-2 RT-PCR)은 각각 468, 292, 211 bp의 amplicon을 생성하게 함으로써 각 2개의 RNA segment에 대한 유전형을 구별하였다(Table 1).

염기서열 및 genotype 분석

전기영동으로부터 밴드가 확인된 PCR amplicon은 GeneAll Expin Gel SV kit (GeneAll Biotechnology)를 사용하여, 1.5% agarose gel로부터 분리 및 정제하였으며, 이로부터 분리된 DNA는 pGEM-T Easy vector (Promega)에 삽입하여 *Escherichia coli* (DH5α) 균주에 형질전환하여 클로닝을 수행하였다. 그리고 GeneAll Plasmid SV mini kit (GeneAll Biotechnology)로 plasmid DNA를 분리하였다. 분리된 플라스미드는 Big Dye Terminator Cycle DNA Sequencing Kit (ABI PRISM, Applied Biosystems)와 automatic sequencer를 이용하여 염기서열을 결정하였다. 분석된 염기서열정보는 BioEdit Ver.7.2.1.을 사용하여 정렬하였고, NCBI(National Center for Biotechnology Institute)의 GenBank database를 활용하여 바이러스 genotype을 분석하였다.

Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

균질화한 어류의 뇌(25 mg)로부터 제조한 cDNA 1 µl 와 RNA2 segment의 모든 genotype에서 보존된 영역을 target으로 하는 primer set (c2VNNF2/q2VNNR 각각 500nM) (Table 1), 그리고 LightCycler 480 SYBR Green Master Mixture (Roche)를 사용하여 분석하였다. 증폭 조건은 95°C에서 10초간 denaturation, 60°C에서 15초간 annealing, 72°C에서 20초간 extension 하여 40 cycles을 실시하였다. c2VNNF1/c2VNNR primer set를 이용하여 RGNNV strain의 RNA2에서 증폭한 687bp의 PCR fragment를 pGEM-T Easy Vector System (Promega)에 클로닝하여 제작된 재조합 플라스미드를 사용하여 표준곡선을 제작하였다(Kim et al., 2018a).

인위감염 실험

국내 해산어류 중 sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus* (18.9 ± 3.1 g), rock bream *Oplegnathus fasciatus* (6.4 ± 1.0 g), olive flounder *Paralichthys olivaceus* (9.1 ± 0.9 g) 등 3종의 해산 어류를 국내 남해 양식장에서 구입하였고, 또한 mandarin fish *Siniperca scherzeri* (5.4 ± 0.6 g)와 common carp *Cyprinus carpio* (5.5 ± 0.8 g), crucian carp *Carrasius carassius* (5.2 ± 0.5 g) 3종의 담수산 어류는

Table 1. Primers used in this study

Target segment	Name	Sequence (5' to 3')	Position	Expected amplicon size	Specific description
RNA 1	c1VNNF2	GTTCCGTGGTACATGCCAAC	1741-1760	843	conserved region
	s1VNNKSR	AAGCTCGTCAGCCACGATG	2584-2602	214	specific region of KSNNV
	s1VNNRGR	TCTCATTAGCCAATAAAGTTGTTA	1931-1954	448	specific region of RGNNV
	s1VNNBFR	CAGTATCAGTGAGGAGGGTGTGTC	2167-2188		specific region of BFNNV
RNA 2	c2VNNF2	TGCCAAATGGTGGGAAAG	473-490	211	conserved region qRT-PCR
	s2VNNKSR	CGCTTCTGCGTTGTTTGG	757-775	468	specific region of KSNNV
	s2VNNRGR	TTGAAGTTGTCCAGATGC	922-940	292	specific region of RGNNV
	s2VNNBFR	GGTAGAGCCAAGAAGTATTGATTTG	740-764	126	specific region of BFNNV
	q2VNNR	TTGTTGCCGACACACAGG	581-598		qRT-PCR

<Note> These primers for various genotypes were used in the previous study (Kim et al., 2018a).

관상어 수족관에서 구입하여 사용했다. 인위 감염은 c2VNNF2 /q2VNNR primers set를 사용하는 qRT-PCR을 통해 betanodavirus에 감염되지 않았음을 확인한 각 어종의 실험어 10마리를 이용하여 KS/RGNNV-KG 그리고 RG/KSNNV-CM reassortant를 10^7 copies/fish의 농도로 복강 주사하였고, 20 L 수조에 25°C의 수온을 유지하면서 폐사를 관찰하였다. 바이러스 접종 후 14일째 되는 날, 각 그룹당 3마리에 마취제(MS-222)로 마취하여 안락사 시킨 후 시료를 채취하였다.

병리조직학적 분석

인위 감염 14일째의 각 종별 어류의 뇌를 적출하여, 10% 중성 포르말린 용액에 24시간 동안 고정시킨 후, ethanol에 30분간 탈수한 후 파라핀(Paraplast Plus; Diapath)에 포매하였다. 파라핀 절편은 microtome (Reichert-Jung 2050)을 이용하여 5 µm 두께로 연속 박절하여 조직 절편을 제작한 후, H&E (Heamatoxylin & Eosin) 염색을 실시하였다. 완성된 조직 검체는 광학 현미경(Eclipse E-400, Nikon)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

최근 남유럽에서 betanodavirus 유전자 segment의 염기서열을 분석한 연구에서, 자연상태 및 어류에서 RGNNV와 SJNNV의 두 유전형이 재편성된

reassortants가 존재하는 것으로 확인되었다(Toffan et al., 2017). 이에 따라 최근 본 연구실에서는 앞선 실험에서 다양한 패류 조직에서의 모든 유전형의 betanodaviruses를 검출하기 위하여 RNA2의 보존 영역을 target으로 하는 Detection semi-nested two-step RT-PCR (DSN-2 RT-PCR)을 개발하였다(Kim et al., 2018a). 그리고 동 바이러스의 유전형을 구별하기 위해 DSN-2 RT-PCR에서 양성을 보이는 시료는 각 genotype의 RNA1 및 RNA2의 특이적인 서열을 기반으로 제작된 primer를 사용하는 R1- 및 R2-DMT-2 RT-PCR의 template로 사용하였다(Kim et al., 2018b; Kim, 2018). 이러한 분석에서 RNA1와 RNA2 segment의 각 염기서열에 기초한 R1-, R2-DMT-2 RT-PCR에서 결정된 2 segment간 genotype이 서로 일치하지 않는 betanodavirus isolates가 발견되었고, 이는 각기 서로 다른 유전형의 betanodavirus가 자연계의 해양환경에서 서로가 가진 각 RNA segment 하나씩을 교환한 reassortant betanodavirus일 것으로 추정하고 이를 E-11세포에서 분리배양 한 바 있다(Kim, 2018).

본 연구에서는 우리나라에서 나타나고 있는 betanodavirus 유전형 2종, 즉 지금까지 우리나라 어류에서 바이러스성신경괴사증을 일으키고 있다고 알려져 있는 RGNNV, 그리고 본 연구실에서 2018년에 새롭게 발견한 신종 유전형 바이러스로서 해양 생태계에서 넓은 분포를 보이는 유전형 KSNNV (Kim et al., 2018b) 간에 나타날 수 있는 segment

reassortment에 의한 새로운 reassortant betanodaviruses가 우리나라 주요 해산 및 담수 양식 어류에 미칠 수 있는 위험성을 분석하고자 하였다.

먼저, 세포배양으로 분리시킨 두 reassortant isolates의 각 segment 유전형을 확인하였다. 배양된 KS/RGNNV-KG는 R1-DMT-2 RT-PCR에서 KSNNV genotype에 특이적인 843 bp의 amplicon을, 그리고 R2-DMT-2 RT-PCR에서는 RGNNV genotype에 특이적인 468 bp의 amplicon을 전기영동상 single band로 각각 생성하였고(Fig. 1), RG/KSNNV-CM은 R1- 및 R2-DMT-2 RT-PCR 각각에서 214 bp (RGNNV) 그리고 211 bp(KSNNV)의 amplicon이 생성하여(Fig. 1), 배양된 바이러스는 각각KS/RGNNV와 RG/KSNNV type의 reassortant betanodavirus임이 확인되었다. 결국 2종의 multiplex RT-PCR에 의하여 결정된 reassortants의 RNA1과 RNA2 segment의 genotype은 서로 명확하게 mismatched type betanodavirus라는 결과를 보여 분리된 배양 바이러스는 두 가지 homogeneous genotype 바이러스의 단순 혼합체가 아니라 최근 새롭게 등장한 KSNNV가 우리나라의 해양 생태계에 존재하던 RGNNV type과 유전적으로 서로 reassortment 하여 새로운 reassortant로의 진화에까지도 이르고 있다는 것을 확인시켜 주었다.

하지만 새로운 형태의 reassortant betanodaviruses는 betanodavirus의 숙주인 어류종이 아닌 bio-reservoir로서의 패류에서 발견되고 분리되었다. 그

러므로 betanodavirus의 숙주가 되는 어류에 대한 reassortant 병원성 확인을 위하여 치어기에 있는 우리나라 주요 해산 양식어종 3종 (능성어, 돌돔, 넙치)과 주요 담수 양식어종 3종 (쏘가리, 잉어, 붕어)에 대하여 reassortant의 인위감염을 실시하여 우리나라 어류 양식산업에 대한 감염 위험도 분석을 실시하였다.

Reassortant RG/KSNNV-CM 그리고 KS/RGNNV-KG이 접종된 6종의 치어 그룹 모두 인위 감염 후 선회유영 등의 VNN의 전형적인 외부증상이나 폐사를 유도하지 않았다. 그러나 4종 (능성어, 돌돔, 넙치, 쏘가리)의 치어 뇌 조직에서 바이러스 접종 후 14일 쯤 $2.1 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^5$ copies/mg의 낮은 농도의 감염이 확인 되어졌다(Table 2). 이는 RGNNV에 의한 능성어 치어 폐사체의 뇌에서 나타나는 10^7 copies/mg 감염 수준(Kim et al., 2019)에는 도달하지 않는 것으로 나타나, Kim 등 (Kim et al., 2018b)이 KSNNV의 능성어 치어(약 13 cm)에 대한 공격 실험에서 폐사를 유도하지는 않았지만 뇌 조직내에는 낮은 농도의 바이러스 감염 상태를 보였다는 앞선 결과와 유사하다고 할 수 있다. 한편 4종의 감염 실험어에 대한 병리조직학적인 분석을 실시한 결과 바이러스가 최종 미검출된 잉어와 붕어를 제외한 4종(능성어, 돌돔, 넙치, 쏘가리)의 모든 개체의 조직에서 VNN의 전형적인 병리적 특징인 신경 조직 내 공포화(vacuolation)를 뇌조직에서 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 이러한 결과는 이미 상당한

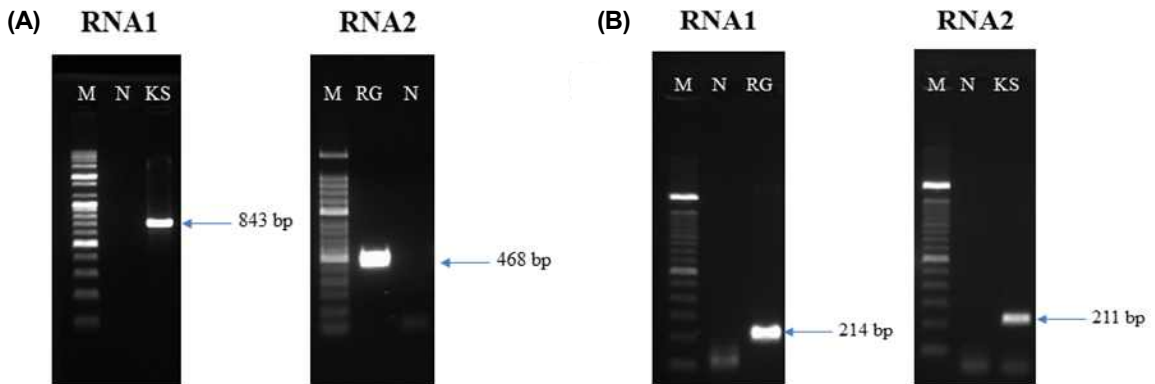


Fig. 1. Application of two different multiplex RT-PCR for the cultured KS/RGNNV-KG and RG/KSNNV-CM reassortants. Mismatched genotype between RNA1 and RNA2 segment of KS/RGNNV-KG (A), RG/KSNNV-CM (B) was confirmed by corresponding size of each amplicon.

Table 2. Virus copies in the brain of six fish species at 14 days after inoculation with KS/RGNNV-KG or RG/KSNNV-CM at 25°C

Fish species	Body weight (g)	KS/RGNNV-KG (copies/mg)	RG/KSNNV-CM (copies/mg)
Sevenband grouper	18.9±3.1	7.5E+04	8.3E+04
Rock bream	6.4±1.0	7.8E+04	2.1E+04
Olive flounder	9.1±0.9	6.5E+04	2.4E+04
Mandarin fish	5.4±0.6	1.0E+05	3.5E+04
Common carp	5.5±0.8	ND*	ND
Crucial carp	5.2±0.5	ND	ND

*Not detected

수의 betanodavirus 감염성 연구에서 뇌 공포가 폐사나 외부증상과 무관하게 진행될 수 있으며, 나아가 어류는 눈 신경이나 뇌의 이러한 공포를 re-generation 시킬 수 있다는 연구까지도 이루어져 있어 치어에 대한 본 연구의 결과가 이례적이라고 할 수 없을 것이다 (Sohn et al., 1998; Hitchcock & Raymond, 1992; Zupanc & Zupanc, 2006, Kim et al., 2018b).

하지만 RGNNV 유전형은 능성어에서 부화자어기 뿐만 아니라 성어기에서도 폐사를 일으킬 수 있다는 보고(Nakai et al., 2009; Tanaka et al., 2004; Qin et al., 2020)와는 차이를 보이며, KSNNV genotype의 병원성 특성인 이들 중의 부화자어기가 아닌 성어에서 폐사를 유발하지 못하는 특성과 유사성을 보인다. 즉 reassortant RG/KSNNV-CM 그리고 역조합의 KS/RGNNV-KG는 2개의 RNA segment 중 적어도 하나는 RGNNV genotype을 함유하고 있음에도 불구하고 둘 다 능성어 치어에 대하여 폐사를 유도하는 강한 병원성을 나타내지 않았다. 그러므로 본 연구의 reassortant 병원성 분석의 결과는 RGNNV가 부화자어 뿐만 아니라 치어 상태의 능성어에까지 강력한 병원성을 나타내는데는 RGNNV type의 RNA1과 RNA2 두 개의 segment가 하나의 virus particle 내에서 각각의 상호 보완적인 역할이 통합적으로 이루어진다는 것을 시사한다.

또한 KS/RGNNV type과 RG/KSNNV type의 reassortants는 감염 어종의 범위에 있어서 서로 뚜렷한 차이를 나타내지 않은 것은 RGNNV 및 KSNNV의 감염성 또는 항원성 결정에서 중요한 역할을 하는 capsid의 주요 motif 아미노산 서열들을 서로 동일한 위치에 유사하게 가지고 있기 때문일 수

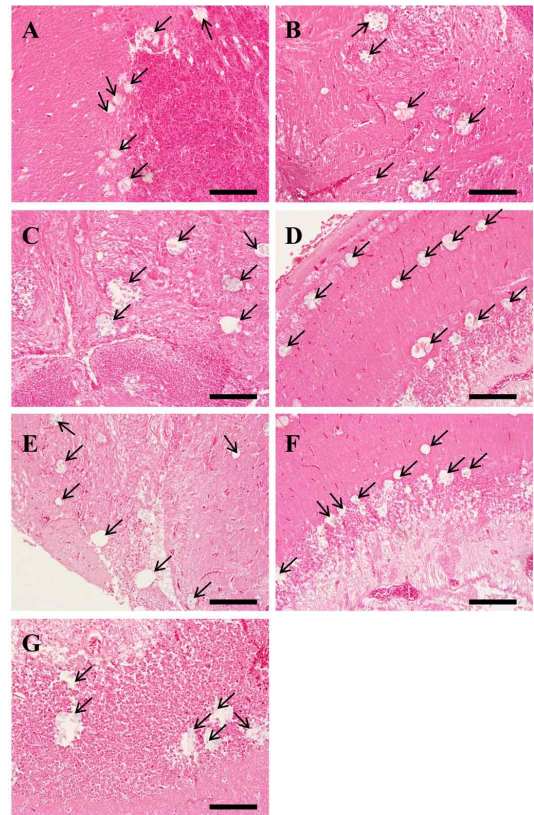


Fig. 2. Histopathology of the infected brain tissue of experimental fish (H&E). Multiple vacuolations (arrows) were observed under light microscope in brains collected from various species of juvenile fish infected with reassortant at 14 days post injection (dpi) at 25°C. KS/RGNNV-infected sevenband grouper (*Epinephelus septemfasciatus*) (A), rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) (B), olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) (C), mandarin fish (*Siniperca scherzeri*) (D). RG/KSNNV-infected rock bream (E), olive flounder (F), mandarin fish (G). Scale bar = 100 μ m.

있다(Kim et al., 2019). 한편 사용된 어류 중 능성어, 돌돔, 넙치 그리고 쓰가리는 betanodavirus에 대한 감수성 연구가 보고되어져 있으나(Kim et al., 2018b; Tu et al., 2016; Yoshikoshi and Inoue, 1990), 잉어 및 붕어에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 그러므로 본 연구 결과는 국내 뿐만 아니라 세계적으로 양식되고 있는 두 어종에 대한 reassortant betanodaviruses의 감염정보에 관해서도 비민감성을 나타낸다는 것을 실험적으로 제시하고 있는 점 또한 충분히 새로운 정보가 될 수 있을 것이다.

향후 betanodavirus의 주된 target이 되는 embryo stage의 어류를 병원성 분석에 사용한다면 해양 생태계에 최근 새롭게 출현한 KSNNV와 기존의 betanodavirus 간의 reassortment가 어류의 대량 폐사를 유도 할 수 있는 새로운 바이러스성신경괴사증 병원체로의 진화라는 잠재적 위험성을 보다 명확하게 제시할 수 있을 것이다.

사 사

이 논문은 2020년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업입(No. 2020R1I1A3065380)

References

Delsert, C., Morin, N. and Comps, M.: Fish nodavirus lytic cycle and semipermissive expression in mammalian and fish cell cultures. *J. Virol.*, 71: 5673-5677, 1997.

Doan, Q.K., Vandeputte, M., Chatain, B., Morin, T. and Allal, F.: Viral encephalopathy and retinopathy in aquaculture: a review. *J. Fish Dis.*, 40: 717-742, 2017.

Egusa, S., Wakabayashi, H. and Muroga, K.: Infectious and parasitic diseases of fish and shellfish. Life Science Publishing Co.: 54-58, 2006.

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

Hitchcock, P.F. and Raymond, P.A.: Retinal regeneration. *Trends Neurosci.*, 15: 103-108, 1992.

Kim, Y.C.: Isolation and characterization of new betanodaviruses from shellfish as pathogenic agents of viral nervous necrosis (VNN) in fish. Thesis of degree of doctor of philosophy, Pukyong National University, 2018.

Kim, C.S., Kim, W.S., Nishizawa, T. and Oh, M.J.: Prevalence of viral nervous necrosis (VNN) in sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* farms. *J. Fish Pathol.*, 25: 111-116, 2012.

Kim, Y.C., Kwon, W.J., Kim, M.S., Kim, K.I., Min J.G. and Jeong, H.D.: High prevalence of betanodavirus barfin flounder nervous necrosis virus as well as red-spotted grouper nervous necrosis virus genotype in shellfish. *J. Fish Dis.*, 41: 233-246, 2018a.

Kim, Y.C., Kwon, W.J., Min, J.G. and Jeong, H.D.: Isolation and initial characterization of new betanodaviruses in shellfish. *Transbound. Emerg. Dis.*, 65: 1557-1567, 2018b.

Kim, Y.C., Kwon, W.J., Min, J.G., Kim, K.I. and Jeong, H.D.: Complete genome sequence and pathogenic analysis of a new betanodavirus isolated from shellfish. *J. Fish Dis.*, 42: 519-531, 2019.

Mori, K.I., Nakai, T., Muroga, K., Arimoto, M., Mushiake, K. and Furusawa, I.: Properties of a new virus belonging to Nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. *Virology*, 187: 368-371, 1992.

Munday, B.L., Kwang, J. and Moody, N.: Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *J. Fish Dis.*, 25: 127-142, 2002.

Metcalf, T.G., Mullin, B., Eckerson, D., Moulton, E. and Larkin, E.P.: Bioaccumulation and depuration of enteroviruses by the soft-shelled clam, *Mya arenaria*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38: 275-282, 1979.

Nakai, T., Sugaya, T., Nishioka, T., Mushiake, K. and Yamashita, H.: Current knowledge on viral nervous necrosis (VNN) and its causative betanodaviruses. *Isr. J. Aquac.*, 61: 198-207, 2009.

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

OIE. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Viral encephalopathy and retinopathy (VER); World Organization for Animal Health: Paris, France, 2019.

Olveira, J.G., Souto, S., Dopazo, C.P., Thiéry, R., Barja, J.L. and Bandín, I.: Comparative analysis of both genomic segments of betanodaviruses isolated from epizootic outbreaks in farmed fish species provides

- evidence for genetic reassortment. *J. Gen. Virol.*, 90: 2940-2951, 2009.
- Panzarin, V., Fusaro, A., Monne, I., Cappellozza, E., Patarnello, P., Bovo, G., Capua, I., Holmes, E.C. and Cattoli, G.: Molecular epidemiology and evolutionary dynamics of betanodavirus in southern Europe. *Infect. Genet. Evol.*, 12: 63-70, 2012.
- Qin, Y., Liu, J., Liu, W., Shi, H., Jia, A., Lu, Y. and Liu, X.: First isolation and identification of red-grouper nervous necrosis virus (RGNNV) from adult hybrid Hulong grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*×*Epinephelus lanceolatus*) in China. *Aquaculture*, 529: 735662, 2020.
- Rippey, S.R.: Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. *Clin. Microbiol. Rev.*, 7: 419-425, 1994.
- 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: 97-104, 1998.
- 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.
- Toffan, A., Pascoli, F., Pretto, T., Panzarin, V., Abbadi, M., Buratin, A., Quartesan, R., Gijón, D. and Padrós, F.: Viral nervous necrosis in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) caused by reassortant betanodavirus RGNNV/SJNNV: an emerging threat for Mediterranean aquaculture. *Sci. Rep.*, 7: 1-12, 2017.
- Toffolo, V., Negrisolo, E., Maltese, C., Bovo, G., Belvedere, P., Colombo, L. and Dalla Valle, L.: Phylogeny of betanodaviruses and molecular evolution of their RNA polymerase and coat proteins. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 43: 298-308, 2007.
- Tu, J., Chen, W., Fu, X., Lin, Q., Chang, O., Zhao, L., Lan, J., Li, N. and Lin, L.: Susceptibility of Chinese perch brain (CPB) cell and mandarin fish to red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) infection. *Int. J. Mol. Sci.*, 17: 740, 2016
- Yoshikoshi, K. and K. Inoue.: Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis.*, 13: 69-77, 1990.
- Zupanc, G.K. and Zupanc, M.M.: New neurons for the injured brain: mechanisms of neuronal regeneration in adult teleost fish. *Regen. Med.*, 1: 207-216. 2006.

Manuscript Received : Nov 17, 2021

Revised : Nov 26, 2021

Accepted : Dec 09, 2021