넙치(*Paralichthys olivaceus*) 성어의 viral hemorrhagic septicemia (VHS) 진단사례

김진우 · 조미영 · 이한나 · 한현자 · 오윤경 · 이순정 · 지보영 · 명정인¹ · 원경미^{1*}

국립수산과학원 수산생물방역과, ¹국립수산과학원 남서해수산연구소

Diagnosis Case of Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) in Adult Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*

In-Woo Kim, Mi Young Cho, Han-Na Lee, Hyun Ja Han, Yun Kyeong Oh,
Soon Jeong Lee, Bo Young Jee, Jeong-In Myeong¹ and Kyoung-Mi Won^{1*}

Aquatic Life Disease Control Division, National Fisheries Research & Development Institute, Busan 619-705, Korea

¹Southwest Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research & Development Institute, Yeosu 556-823, Korea

We examined the cause of a disease outbreak in adult olive flounder *Paralichthys olivaceus*, which occurred at a Korean aquaculture farm in Korea in 2011. The principal signs included an expanded abdomen and congested liver, with persistent mortality (a little over two months). At the beginning of the outbreak, farm administrators misjudged the disease as bacterial in origin, because of the aforementioned signs, persistent mortality, and the detection of bacterial species, including *Vibrio* spp. and *Streptococcus* spp. Moreover, the detection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) by reverse transcription-PCR analysis was complicated by use of the VHS-VN primer set, which has been in general use recently, because it produced weak bands in some samples. Therefore, we recommend the use of at least two different primer sets in the diagnosis of VHSV. Our histopathological findings indicate that necrotizing myocarditis could be considered a pathogenic sign of VHSV infection.

Key words: Viral hemorrhagic septicemia (VHS), Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), VHS-VN primer, Diagnosis, Necrotizing myocarditis

서 론

Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)는 1980년대까지 유럽의 무지개송어를 비롯한 담수산 연어과 어류에 국한되어 질병을 야기하는 것으로 알려졌다(Jørgensen, 1980). 그러나 이후 폭넓은 지역에서 다양한 담수 및 해수 어류 모두에 질병을 유발하는 병원체라는 것이 밝혀지면서(Mortensen et al., 1999; Smail, 1999; Kim and Park, 2004), 현재는 VHSV의 감염숙주가 총 90종에 이르는 것으로 확인되었다(세계동물보건기구 OIE, 2009). 이 중 해수 어류에서의 VHSV는 1979년 Atlantic cod *Gadus morhua*에서 첫 보고된 이후(Jensen et

al., 1979), whiting *Merlangius merlangus*, Atlantic herring *Clupea harengus* 뿐 아니라 turbot *Scophthalmus maximus*, Rock bass *Ambloplites rupestris* 등 다양한 야생 해수 어류에서 분리되어 해양 환경 중에 바이러스가 존재한다는 것이 입증되었다(Altuntas and Ogut, 2010; Mortensen et al., 1999). 우리나라에서 VHS가 처음으로 보고된 것은 2001년부터 2004년 사이에 발생한 양식넙치의 대량폐사를 조사하여 그 원인이 VHSV임을 밝힌 것이다(Kim, 2003). 이후 부산 인근 해역의 숭어 *Mugil cephalus*와 포항 인근 해역의 고등어 *Scomber japonicus*에서도 검출되어(Kim and Park, 2004) 자연산 해수 어에서도 확인되었으며, 이후, 치어 뿐 아니라 상품크기의 양

Article history;

Received 13 September 2012; Revised 22 November 2012; Accepted 27 November 2012

*Corresponding author: Tel: +82. 61. 690. 8985 Fax: +82. 61. 685. 9073

E-mail address: kmwon@nfrdi.go.kr

Kor J Fish Aquat Sci 45(6) 666-674, December 2012

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2012.0666>

pISSN:0374-8111, eISSN:2287-8815

© The Korean Society of Fisheries and Aquatic Science. All rights reserved

Table 1. Oligonucleotide primers and conditions used in PCR amplification of this study

Virus	Primer	Nucleotide sequence of primer	PCR condition	Size (bp)	Source
RSIV ¹	RSIV1 Forward	5'-CTCAAACACTCTGGCTCATC-3'	94°C(30'')-58°C(1')-72°C(1') 30 cycles	570	OIE ²
	Reverse	5'-GCACCAACACATCTCCTATC-3'			
	RSIV4 Forward	5'-CGGGGGCAATGACGACTACA-3'	94°C(5') 72°C(5')	568	OIE
	Reverse	5'-CCGCCTGTGCCTTTTCTGGA-3'			
VNNV	Forward	5'-CGTGTCTAGTCATGTGTCGCT-3'	95°C(40'')-50°C(40'')-72°C(40'') 25 cycles	427	OIE
	Reverse	5'-CGAGTCAACACGGGTGAAGA-3'			
HRV	Forward	5'-ACCCTGGGATTCCTTGATTC-3'	94°C(30'')-55°C(10'')-72°C(45'') 30 cycles	600	Cho et al., 2007
	Reverse	5'-TCTGGTGGGCACGATAAGTT-3'			
MBV	Forward	5'-GCACCACGAAGGTACGAAAT-3'	94°C(1')-55°C(1')-72°C(1') 30 cycles	430	Cho et al., 2007
	Reverse	5'-GTACGTTGCCGTTTCTGAT-3'			
VN	Forward	5'-ATGGAAGGAGGAATTCGTGAAGCG-3'	94°C(30'')-55°C(30'')-68°C(1') 35 cycles	505	OIE
	Reverse	5'-GCGGTGAAGTGCTGCAGTCCCC-3'			
VHSV	811 Forward	5'-GGGGACCCCAGACTGT-3'	94°C(30'')-52°C(30'')-68°C(1') 35 cycles	811	previous OIE
	Reverse	5'-TCTCTGTCTCACCTTGATCC-3'			
G	Forward	5'-GGTCGAGAACATCTCAACAT-3'	94°C(30'')-55°C(30'')-72°C(30'') 35 cycles	600	unpublished
	Reverse	5'-TTAAGCGTTCTGAGGTAGG-3'			

¹RSIV, red seabream iridovirus; VHSV, viral hemorrhagic septicaemia virus; VNNV, viral nervous necrosis virus; HRV, hirame rhabdovirus; MBV, marine birnavirus.

²OIE, The World Organisation for Animal Health 2009.

식넙치에도 피해를 입히는 것이 밝혀졌다(Kim et al., 2009).

2011년 1월 우리나라 울산광역시 소재의 넙치 양어장에서 200-300 g의 넙치 성어가 복부팽만, 체표궤양을 보이며 폐사하는 사례가 발생하였다. 급작스런 폐사는 발생하지 않았으나 1일 50-60마리 정도의 폐사가 약 2개월 가량 지속되었다. 폐사율이 낮고 복부팽만과 체표궤양과 전형적인 세균성 질병을 징후를 보여 항생제가 투여되었으나, 전혀 호전되지 않았다. 정밀검사결과, VHSV에 감염된 것으로 확인되었으나, 일부 개체에서 병원성 세균이 함께 분리되거나, VHSV의 진단법에 따라 상이한 결과가 도출되는 등의 혼란으로 확정진단이 지연되었다.

이에 본 연구에서는 VHSV에 경감염되거나 병원성 세균에 2차감염된 경우 VHS의 진단에서의 주의점과 이들 병어의 병리조직학적 변화를 관찰함으로써 향후, VHS의 진단이 지연되거나 질병의 원인에서 배제되지 않도록 하고자 하였다.

재료 및 방법

감염어

2011년 1월 울산시 소재 양어장의 넙치 성어(어체중 200-250 g)가 체표궤양, 지느러미 발적 및 복부팽만 증상을 보이며 폐사하였다. 대량폐사는 발생하지 않았으나, 하루 50-60 마리씩 지속적으로 폐사하였다. 이에 증상을 보이는 빈사어 8마리를 시험어로 사용하여 기생충, 세균 및 바이러스 검사를 실시하였다.

감염어의 생검

질병 증상을 보이는 넙치의 아가미, 체표, 지느러미 및 각 내부 장기를 생검시료로 제작한 후 검경하여 조직의 상태 및 기생충 감염 여부를 확인하였다.

Table 2. Diagnosis results of this study

Fish no.	Major sings		Detection of pathogen					
	External sings	Internal sings	Parasite	Bacteria	Virus			
					HRV	RSIV	VHSV	VNNV
1	Skin ulcer	Enlarged spleen Liver congestion	-	-	-	-	+	-
2	Distended abdomen Hemorrhagic on the fins Sloughing of skin Pale coloration of gills	Ascitic fluid Enlarged spleen Liver congestion Hemorrhaging on the opercular area	-	<i>Streptococcus parauberis</i>	-	-	+	-
3	Distended abdomen	Ascitic fluid	-	<i>Vibrio ichthyenteri</i>	-	-	+	-
4	Skin ulcer Hemorrhagic on the fins	-	-	-	-	-	-	-
5	Skin ulcer Hemorrhagic on the mouth	Exudative intestinal fluid Liver congestion	-	-	-	-	+	-
6	Skin ulcer Hemorrhagic on the mouth Distended abdomen	Ascitic fluid Liver congestion	-	-	-	-	+	-
7	Skin ulcer Hemorrhagic on the fins	Hemorrhaging on the intestine Exudative intestinal fluid Liver congestion Enlarged spleen	-	<i>Vibrio ichthyenteri</i>	-	-	+	-
8	Skin ulcer Hemorrhagic on the mouth	Liver congestion	-	-	-	-	+	-

바이러스 검사

해산어에서 주로 검출되는 바이러스의 감염 유무를 확인하기 위하여 참돔이리도바이러스(red seabream iridovirus, RSIV), 바이러스성출혈성패혈증바이러스(viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV)를 포함하여 바이러스성신경괴사증바이러스(viral nervous necrosis virus, VNNV), 히라메랩도바이러스(hirame rhabdovirus, HRV) 및 해산 버나바이러스(marine birnavirus, MBV)에 대한 polymerase chain reaction (PCR) 분석을 시행하였다.

검사용 시료는 감염어를 무균적으로 해부하여 적출한 신장, 비장 및 뇌를 사용하였다. PCR을 위한 DNA는 시판되는 High pure PCR template preparation kit (Roche, Germany)를 사용하여 매뉴얼에 따라 분리하였으며, RNA는 매뉴얼에 따라 TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen, USA)로 분리한 후, SuperScript[™] II Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. RSIV의 PCR 분석을 위해 분리된

DNA를 template로 사용하였으며, 그 외 VHSV, VNNV, HRV 및 MBV의 PCR 분석을 위해 분리된 RNA에서 합성한 cDNA를 사용하였다. PCR 분석은 ExTaq[®] hotstart version(TaKaRa, Japan)을 이용하여 매뉴얼에 따랐으며, 사용된 primer set 및 PCR 조건은 Table 1에 나타내었다. 증폭된 PCR 산물은 전기영동으로 band를 확인한 후, Gel SV kit (GeneAll, Korea)로 정제하고 Topo TA cloning[®] (Invitrogen, USA)을 이용하여 cloning하여 염기서열을 확인하였다. 염기서열의 분석에는 Genetyx Ver. 8.0 (SDC Software Development, Japan)을 사용하였으며, NCBI에서 제공되는 BLAST program 정보를 이용하여 상동성을 비교하였다.

세균 검사

시험어를 무균적으로 해부하여 신장, 비장, 간 등의 내부 장기 및 체표 환부를 NaCl 1.5% 첨가 TSA 배지, BHIA 배지, TCBS 배지, SS 배지 등에 접종하여 20℃, 24-48시간 배양하여 균의 성상을 확인하였으며 이를 순수분리하여 이후의 실험

에 사용하였다.

분리균의 genomic DNA 추출과 PCR 분석은 바이러스 검사와 동일하게 High pure template preparation kit(Roche, Germany)와 ExTaq hotstart[®] version (Takara, Japan)을 사용하였다. 분리균의 동정을 위해 Eubac 27F (5'-CTGAGCCAG-GATCAAACCTCT-3')와 Eubac 1429R (5'-CGTTACCTTGT-TACGACTT-3') primer sets를 이용하여 16S rDNA 유전자를 증폭하였으며, 1,505bp의 PCR 산물은 전기영동으로 band를 확인한 후, Gel SV kit (GeneAll, Korea)로 정제하고 Topo TA cloning[®] (Invitrogen, USA)을 이용하여 cloning하여 염기서열을 확인하였다. 염기서열의 분석에는 Genetyx Ver. 8.0 (SDC Software Development, Japan)을 사용하였으며, NCBI에서 제공되는 BLAST program 정보를 이용하여 상동성을 비교하였다.

분리균주에 대한 약제 감수성 시험은 Miller-Hinton agar (BD, USA)를 이용하여 항균제 디스크(Becton Dickinson, USA)법으로 실시하였다. 배양 후 나타난 발육저지대의 지름을 측정하여 BD (BBLTMSensi-DiscTM)의 항균제 감수성 테스트 디스크 사용 설명서 기준으로 내성(resistant), 중간 내성(intermediate resistant), 감수성(susceptible)으로 구분하여 분석하였다(Table 2).

병리조직학적 검사

병든 넙치(n=8)의 각 기관(간, 신장, 비장, 심장, 뇌, 장, 위, 근육)을 적출하여 10% 중성포르말린(10% Neutral Buffer formalin, BNF)에 고정하고 24 시간 후 각 장기를 세절한 다음 동고정액에 재고정하였다. 재고정한 기관은 일반적인 조직처리 과정을 따라 순차농도의 알콜에 탈수·탈지 과정을 거친 후 xylene에 탈알콜시켜 파라핀으로 포매하였다. 파라핀 블록은 microtome (Richert-Jung 820, Leica)으로 박절(4-5 μ m 두께)하여 Hematoxyline-eosin (H-E) 염색한 뒤 광학현미경 (BX50F4, Olympus)으로 검정하였다.

결 과

감염어의 증상

병든 넙치는 개체에 따라 다소 차이가 있었으나, 전반적인 주요 외부증상은 체표 궤양, 지느러미 발적 및 복부팽만이었으며, 주요 내부증상은 복수 및 심한 간을혈이었다(Fig. 1). 단, 8마리 중 1마리(no. 4)는 작은 체표궤양과 지느러미 발적 이외의 증상은 관찰되지 않았으며, 각 개체별 증상은 Table 2에 정리하였다.

감염어의 생검

병든 넙치의 아가미, 체표 및 내부 기관들을 생검하여 현미경

Table 3. Sensitivity of isolates to various chemotherapeutic agents

Chemotherapeutic agents	Disc content (μ g)	Sensitivity ¹		
		OF2 strain	OF3 strain	OF5 strain
Gentamycin	10	R	R	R
Clindamycin	2	R	R	R
Nalidixic acid	30	R	S	S
Clavulanic acid	30	S	R	R
Doxycycline	30	I	S	S
Oxytetracycline	30	R	R	R
Tetracycline	30	R	R	R
Erythromycin	15	R	R	R
Trimethoprim	1.25	R	I	I
Ampicillin	10	S	R	R
Sulfisoxazole	250	R	R	R
Oxolinic acid	2	R	I	I

¹R, resistance; I, intermediate; S, susceptible.

관찰한 결과, 기생충은 관찰되지 않았다(data not shown).

바이러스 검사

해산어에서 주로 검출되는 5종의 바이러스, 즉 RSIV, VHSV, VNNV, HRV 및 MBV에 대한 PCR 분석을 실시한 결과, VHSV 이외의 4 종의 바이러스는 검출되지 않았다(data not shown). 병어의 증상으로 미루어 VHSV 감염이 의심되었으므로, 확진을 위해 VHSV에 대해서는 3가지 특이 primer를 사용하여 PCR 분석을 실시하였다. 그 결과, primer에 따라 다소 상이한 결과를 보였는데, 최근 일반적으로 사용되는 VHS-VN primer set (505 bp, OIE registered primer set)의 경우, 2번과 5번 개체에서만 약한 band를 형성한 반면(Fig. 2A), VHS-N (811 bp) primer (Fig. 2B)와 VHS-G (600 bp) primer (Fig. 2C)에 의해서는 4번 개체를 제외한 7마리 모두에서 VHSV 추정 band를 형성하였다. 증폭된 PCR 산물의 염기서열을 분석한 결과, VHSV (AB490792)와 98.8% 상동성을 보였다.

세균 검사

병든 넙치 8마리에 대한 세균배양을 실시한 결과, 3마리(no.2, 3 및 7)에서 우점적인 colony가 형성되었으나, 그 외의 5마리에서는 배양된 세균이 없었다. 분리된 3 종류의 세균을 각각 OF2, OF3 그리고 OF7로 명명하고 순수분리하여 16S rDNA 유전자 분석을 통한 동정을 실시한 결과, OF2 균주는 *Streptococcus parauberis* KCTC11537과 100% 상동성을 보였으며, OF3과 OF7 균주는 *Vibrio ichthyenteri* HQ010223과 100% 상동성을 보이는 것으로 나타났다(Table 2).

분리균에 대한 약제 감수성 시험 결과는 Table 3에 나타내었다. 시험에 사용한 13 종류의 약제 중에서, OF2 균주는 clavu-

Fig. 1. Diseased olive flounder *Paralichthys olivaceus*. A naturally diseased fish displays hemorrhagic on the fins and skin (A), distended abdomen (B), pale coloration of gills (C-g), accumulation of ascetic fluid (C-af) and a severely congested liver (C-l).

lanic acid 및 ampicillin에 대해서 감수성을 보였으며, OF3과 OF7 균주는 nalidixic acid 및 doxycycline에 대해서만 감수성을 보였다.

병리조직학적 검사

병어의 비장, 심장 및 체신에서 특징적인 병변을 확인 할 수 있었다. 비장에서는 혈조직의 액화괴사가 관찰되었고(Fig. 3A and 3B), 체신에는 농포가 형성되었으며(Fig. 3C and 3D), 심장의 심근괴사를 확인할 수 있었다(Fig. 3E). 대부분의 감염 어에서 간의 공포변성이 나타났다. 또한 일부 개체에서는 경미한 간세포의 위축소견(data not shown), 췌장선세포의 괴사(Fig. 3F) 그리고 두신에서 조혈조직과 대식세포(macrophage)의 활성화 및 경미한 동모양모세혈관(sinusoidal capillary)의

Fig. 2. Detection of the viral hemorrhagic septicaemia virus (VHSV) gene in diseased olive flounder *Paralichthys olivaceus* tissue samples by reverse transcription PCR (RT-PCR) on various primer sets, VHS-VN primer set (A), VHS-811 primer set (B) and VHS-G primer set (C). Lane 1: 100 bp ladders(Bionner); lane 2 to 9: samples corresponding to isolate 1 to isolate 8, respectively; lane 10: negative control; lane 11 VHSV-positive control.

괴사가 관찰되었고, 아가미의 빈혈 또한 관찰되었다(data not shown). 그러나 아가미, 위, 장 및 근육에서는 특이소견이 없었다.

고 찰

2011년 우리나라 울산광역시 소재의 넙치 양어장에서 200-300 g의 넙치 성어가 복수로 인한 복부팽만, 체표괴양 및 심한 간출혈을 보이며 2개월에 걸쳐 지속적으로 폐사하는 사례가 발생하였다. 폐사율이 낮고 복부팽만과 체표괴양과 같은 증상으로 미루어 세균성 질병으로 오인되어 장기간 항생제가 투여되었다. 그러나 전혀 호전되지 않아, 뒤늦게 질병검사를 실시하였다. 질병검사 결과, 기생충은 관찰되지 않은 반면 2종의 세균이 분리되어 세균성 질병으로 의심되기도 하였다. 그러나 3개체에서만 분리되고 나머지 5개체에서는 세균분리가 되지 않았으며, 또한 1 개체는 *Streptococcus parauberis*, 나머지 2 개체는 *Vibrio ichthyenteri*로 각기 달리 분리되어 어류 폐사의 직접적인 원인으로 보기 힘들었다. 이에 반해 해산어류에 피해를 입히는 바이러스를 특이 primer를 이용하여 분석한 결과, RSIV, VNNV, HRV 및 MBV는 검출되지 않았으나, VHSV에 대한 특이 primer인 VHS-VN primer set (OIE registered, 2009)를 이용한 PCR 분석에서 매우 약한 band를 형성하여 정밀조사가 필요할 것으로 추정되었다. 이에 OIE 2009 개정 이전에 사용되던 primer set (VHS-811, 811 bp)와 본 연구실에서 VHS 진단에 사용하고 있는 VHS-G primer set (600

Fig. 3. Histopathological changes in diseased olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Note the liquefaction necrosis at ellipsoids in the spleen (A box: $\times 200$; B, magnified view of A box: $\times 400$), pus in the body kidney (C box: $\times 200$; D, magnified view of A box: $\times 400$), Zeckler necrosis in the heart (E: $\times 400$) and necrosis in the hepatopancreas (F: $\times 400$).

bp)를 함께 사용하여 분석하였다. 그 결과, 1 개체를 제외한 모든 개체에서 명확한 VHSV 양성 band를 형성하였으며, 이 band의 염기서열 분석을 통해 VHSV (AB490792)와 98.8% 상동성을 보여, 본 발병의 원인을 VHSV로 확정진단할 수 있

었다.

VHSV에 감염된 넙치는 체색흑화, 복수에 기인한 복부팽만, 간 울혈, 비장 및 신장의 비대가 전반적으로 나타나며, 경우에 따라 아가미 탈색과 근육출혈도 관찰된다(Isshiki et al.,

2001; Kim et al., 2004; Kim et al., 2009). 본 연구에서도 복부 팽만, 심한 간 울혈 증상 및 아가미 탈색을 보였으나, 체색흑화, 비장과 신장의 비대 및 근육출혈은 나타나지 않았다. Ghittino (1965)는 무지개송어에 대한 VHS의 감염단계를 급성, 만성, 신경형으로 구분하였다. 유형별 주요증상은 급성형의 경우 체색흑화, 안구돌출, 아가미 빈혈 등의 외부 증상을 보이면서 급속히 폐사하고 내부증상은 근육과 내부장기에 현저한 출혈 증상을 보인다고 하였다. 만성형의 경우 폐사율이 낮으며 체색흑화와 복부팽만의 증상을 보이고 신장이 비대되며 병리조직학적으로는 lymphoid cell이 증가하는 경향이 있다고 하였다. 이에 비해 신경형의 경우, 선회유영을 하고 복부가 수축되며 별다른 증상이 없는 것이 특징적이라고 하였다. 본 연구와는 어종이 다르긴 하지만 이러한 유형별 증상에 비추어 볼 때, 본 발병은 VHS 만성형에 감염된 것으로 판단된다.

*Streptococcus parauberis*는 *Streptococcus iniae* 및 *Lactococcus garvieae*와 함께 연쇄구균종의 주요 원인체이다(Toranzo et al., 2005). 1996년 스페인 Galicia 지역의 turbot *Scophthalmus maximus*에서 처음으로 분리된 이후(Domenech et al., 1996), 검출빈도가 뚜렷하게 증가하면서, 최근 우리나라 여름철 고수온기에 검출되는 연쇄구균의 대부분을 차지하고 있다(Jeong et al. 2006; Kang et al. 2007; Cho et al. 2007). *S. parauberis*에 감염된 넙치의 증상은 연구자에 따라 다양하게 보고되고 있다. Jeong et al. (2006)은 체색흑화, 복강 내벽 및 무안축의 출혈, 안구돌출 및 안구출혈을 보고하였고, Kim et al. (2006)은 인위감염시킨 넙치의 증상으로 주둥이와 안구 및 가슴지느러미 주변의 출혈, 간 비대와 탄력 소실, 복강의 복수를 보고하였다. 이에 비해 Kim et al. (2009)은 넙치에 *S. parauberis*를 인위감염시킨 후 증상을 관찰한 결과 체색흑화와 심한 심외막염을 주요 증상으로 판단하였다. *Vibrio ichthyoenteri*는 넙치 자어에 감염되어 장관백탁증을 일으키는 원인체로서, 자·치어기를 지나면 감염이 되지 않는 것으로 알려져 있다. Lee (2005)는 장관백탁증에 감염된 넙치 자어에서 분리된 *V. ichthyoenteri*를 미성어(4-5 g)에 인위감염시켰으나 병원성이 없었다고 보고하여, 현재까지 넙치 성어에서의 병원성은 확인된 바가 없다. 따라서 본 발병의 일부 개체에서 세균이 분리되었으나, 증상과 어체 크기 등을 종합적으로 고려하여 발병의 1차 원인체로 판단하기는 힘든 것으로 사료된다. 더욱이 분리된 세균에 대한 약제감수성 결과, 분리균주에 따라 감수성을 보이는 약제가 다른 것으로 나타났다. 이는 질병발생 초기 세균성 질병으로 오인하여 항생제를 투여하였음에도 불구하고 전혀 치료효과가 나타나지 않은 사실과도 무관하지 않을 것으로 생각된다.

VHS의 진단방법은 크게 세포배양법(Isshiki et al., 2001), 항혈청을 이용한 면역화학적 방법(Olesen et al., 1991), 유전자를 이용한 분자생물학적 방법 등이 정립되어 있다(OIE, 2009). 그 중에서 급속히 발달하는 분자생물학적 기법을 이용하여 VHSV

유전자만을 특이적으로 검출하는 방법인 특이 primer를 이용한 RT-PCR법에 관한 많은 연구가 이루어졌으며(Bruchhof et al., 1995; Einer-Jensen et al., 1995), 특히 Snow et al.(2004)에 의한 특이 primer (VHS-VN, 505 bp)는 OIE의 Manual of diagnostic tests for aquatic animals (OIE, 2009)에 명시되어 있다. 본 연구에서도 이 primer set를 이용하여 VHSV 검출을 시도하였으나, 예상과 달리 일부 시료에서 매우 흐린 band를 형성하였다. 이에 VHSV 감염여부를 확인하기 위해, 다른 2가지 primer (VHS-811와 VHS-G primer set)를 이용하여 분석한 결과, 명확한 추정 band를 형성하였다. VHS-VN primer set는 128 종의 VHSV를 대상으로 제작한 특이 primer set로, Snow et al.(1999)이 정의한 4가지 genotype을 모두 포함하고 있어, 그 유용성을 인정받아 2009년에 개정된 OIE manual에 명시되었다. 그러나, genotype I에 속하는 88 균주, genotype II에 속하는 7 균주, genotype III에 속하는 30 균주에 비해, 본 분리균이 속하는 genotype IV에 속하는 3 균주만을 분석하였으며, 이들은 모두 미국에서 분리한 것으로 각각 은연어 *Oncorhynchus kisutch*, 명태 *Gadus macrocephalus*, 및 청어 *Clupea pallasii* 유래의 균주였다. 하지만 최근에 보고된 Kim et al. (2011)의 보고에 따르면, genotype IV는 우리나라와 일본 분리주인 IVa와 미국 분리주인 IVb로 재분류된다고 하여, 이들 간의 유전적 차이가 밝혀졌다. 실제로 genotype IVa의 유전자와 VHS-VN primer의 상동성을 조사해 본 결과, forward primer 20 base 중 3 base, reverse primer 20 base 중 1 base가 달라서 primer의 특이성이 다소 떨어지는 것으로 추측된다. 따라서 VHS-VN primer를 사용할 경우, PCR 수행조건을 조정하거나, genotype에 따라 특이성이 높은 primer set를 사용하는 등의 조정이 필요할 것으로 생각되며, 앞으로 이에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

VHS에 감염된 어류의 병리학적 변화 중 가장 두드러진 특징은 신장과 비장의 조혈영역에 광범위한 괴사병변이 관찰되며 자연 발병어의 경우 심장의 심근괴사가 특징적인 것으로 알려져 있다(Kim et al. 2003). 또한 Ross et al. (1994)은 VHSV에 감염된 turbot에 대해서 연구한 결과 ventricular fibers의 심한 괴사증상을 보고한 바 있고 저서생물에 있어 심장의 기능 상실은 폐사의 직접적인 원인이 된다고 하였으며, Isshiki et al. (2001)은 넙치의 VHSV 감염증을 "VHS-viral Necrotizing Myocarditis of Hiram"라는 명칭을 제시할 만큼 심장의 과소조건이 뚜렷함을 보고하였다. 이들 결과와 유사하게 본 연구에서 밝힌 넙치 성어의 VHSV 감염증에서도 비장과 심장의 조혈영역을 중심으로 괴사병변이 폭넓게 확인되었으며, 그 중에서도 가장 두드러진 병리조직학적 특징으로서 심근 괴사(Zenker necrosis)를 관찰할 수 있었다. 한편, 본 연구에서의 넙치 VHSV 감염증에서는 해부시 육안적으로 간의 울혈 및 출혈 증상이 심하게 나타난 것과는 달리, 병리조직학적 검사에서는 간세포 괴사 및 공포변성 이외의 병리조직학적 변화는 볼 수

없었다. 넙치 감염성 VHSV는 간 실질 세포를 직접 손상시킨다기 보다는 복수에 의해 생체막 성분이 손상되었거나 질병 진행 단계에 따른 율혈 증상으로 사료되며, 이와 유사한 결과를 Kim (2003)이 보고한 바 있다. 이 외에 세균성 질병으로 추정될 만한 특이 병리소견은 관찰되지 않았다.

본 연구에서는 2011년 1월 양식 넙치에서 발생한 VHS의 진단법과 병리조직학적 특성을 기술함으로써, VHS에 경감염되거나 개체마다 각기 다른 세균에 2차 감염된 어류의 질병진단 과정에서 VHS의 진단이 지연되거나 놓치는 경우가 생기지 않도록 하고자 하였다. 향후, 우리나라에서 발생하는 VHS의 진단에 보다 적합한 PCR 방법에 대한 추가적인 논의가 필요할 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 국립수산물과학원의 지원(RP-2012-AQ-118)으로 운영되었기에 감사를 드립니다.

참고문헌

- Altuntas C and Ogut H. 2010. Monthly occurrence and prevalence of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) in whiting *Merlangius merlangus*. Dis Aquat Org 88, 107-113.
- Bruchof B, Marquardt O and Enzmann PJ. 1995. Differential diagnosis of fish pathogenic rhabdoviruses by reverse transcriptase-dependent polymerase chain reaction. J Viral Meth 55, 111-119.
- Cho MY, Oh YK, Lee DC, Kim JH and Park MA. 2007. Geographical comparison on different methods for identification of *Streptococcus parauberis* isolated from cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. J Fish Pathol 20, 49-60.
- Domenech A, Ferenández-Garayzábal JF, Pascual C, Garcia JA, Cutuli MT, Moreno MA, Collins MD and Dominguez L. 1996. Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis*. J Fish Dis 19, 33-38.
- Einer-Jensen K, Ahrens P, Forsberg R and Lorenzen N. 2004. Evolution of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicaemia virus. J Gen Virol 85, 1167-1179.
- Einer-Jense K, Olsen JJ, Lorenzen N and Vestergard-Jorgense PE. 1995. Use of the polymerase chain reaction (PCR) to differentiate serologically similar viral haemorrhagic septicaemia (VHS) virus isolates from Europe and America. Vet Res 26, 464-469.
- Ghittino P. 1965. Viral haemorrhagic septicemia (VHS) in rainbow trout in Italy. Ann NY Aca Sci 126, 468-478.
- Isshiki T, Nishizawa T, Kobayashi T, Nagano T and 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 NJ, Bloch B and Laesen JL. 1979. The ulcus-syndrom in cod(*Gadus morhua*) III. A preliminary virological report. Nord Vet Med 31, 436-442.
- Jeong YU, Kang CY, Kim MJ, Heo MS, Oh DC and Kang BJ. 2006. Characterization of Streptococcosis occurrence and molecular identification of the pathogens of cultured flounder in Jeju Island. Korean J Microbiol 42, 1999-204.
- Jorgense PEV. 1980. Egtved virus: the susceptibility of brown trout and rainbow trout to eight isolates and significance of the findings for the VHS control. In: Ahne W. (ed) Fish disease. Third COPRAQ session. Springer Verlag, Berlin, Germany. 3-7.
- Kang CY, Kang BJ, Moon YG, Kim KY and Heo MS. Germany 2007. Characterization of *Streptococcus parauberis* isolated from cultured Olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in the Jeju Island. J Fish Pathol 20, 109-117.
- Kim JH, Gomez DK, Baeck GW, Shin GW, Heo GJ, Jung TS. and Park SC. 2006. Pathogenicity of *Streptococcus parauberis* to Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish Pathol 41, 171-173.
- Kim JW, Cho MY, Won KM, Kim BS, Chi HJ, Han MC and Park MA. 2009. Pathological changes of the heart of olive flounder *Paralichthys olivaceus* in experimental *Streptococcus parauberis* infection. J Fish Pathol 22, 253-262.
- Kim SM. 2003. Infection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. PhD thesis. Pukyong National University, Busan, Korea.
- Kim SM and Park SI. 2004. VHSV (Viral hemorrhagic septicemia virus) infection of culturing olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea. J Ocean Sci & Tech 1, 92-100.
- Kim WS, Jung SJ, Kim JO, Kim DW, Kim JH and Oh MJ. 2011. Genetic positioning of Korean viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from cultured and wild marine fishes. J Fish Pathol 24, 1-9.
- Kim WS, Kim SR, Kim DW, Kim JO, Park MA, Kitamura SI, Kim HY, Kim DH, Han HJ, Jung SJ and Oh MJ. 2009. An outbreak of VHSV (viral haemorrhagic septicemia virus) infection in farmed olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea. Aquaculture 296, 165-168.
- Lee H. 2005. characteristics of *Vibrio ichthyenteri* isolated from the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* of culturing size. PhD thesis. Pukyong National University, Busan, Korea.
- Mortensen HF, Heuer OE, Lorenzen N, Otte L and Olesen NJ. 1999. 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.
- OIE. 2009. Manual of diagnostic tests for aquatic animals. World animal health organization, Paris, France.

- Olesen NJ, Lorenzen N and Vestergard-Jorgensen PE. 1991. Detection of rainbow trout antibody to Egtved virus by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunofluorescence (IF), and plaque neutralization tests (50% PNT). *Dis Aquat Org* 10, 31-38.
- Ross K, McCarthy U, Huntly PJ, Wood BP, Stuart D, Rough EI, Smail DA and Bruno DW. 1994. An outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in turbot (*Scophthalmus maximus*) in Scotland. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol* 14, 213-214.
- Smail DA. 1999. Viral haemorrhagic septicaemia. In: *Fish disease and disorders*, vol. 3, Viral, bacterial and fungal infections. P.T.K. Wood, d.W. Bruno (ed), CABI publishing, New York, U.S.A., 123-147.
- Snow M, Cunningham CO, Melvin WT and Kurath G. 1999. Analysis of the nucleoprotein gene identifies distinct lineages of viral haemorrhagic septicaemia virus within the European marine environment. *Virus Res* 63, 35-44.
- Snow M, Bain N, Black J, Taupin V, Cunningham CO, King JA, Skall HF and Raynard RS. 2004. Genetic population structure of marine viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV). *Dis Aquat Org* 61, 11-21.
- Toranzo AE, Magarinos B and Romalde JL. 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246, 37-61.