

강원도의 연어과 어류에서 분리된 IHNV 분리주의 계통분류 및 병원성 분석

임종원 · 고은호 · 홍수희[†]

강릉원주대학교 생명과학대학 해양생물공학과

Phylogenetic classification and pathogenicity analysis of IHNV isolated from salmonids in Gangwon-do

Jongwon Lim, Eunho Go and Suhee Hong[†]

Department of Marine Biotechnology, College of Life Science, Gangneung-Wonju
National University, Gangneung, Republic of Korea

This study investigated the phylogenetic classification and pathogenicity of 6 infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) strains isolated from salmonid fish in Gangwon-do, Korea. Based on the nucleotide sequence of mid-G region, all six strains belong to J genotype, of which 5 are J-Nagano type and 1 J-Shizuoka type. In a challenge test, 5 isolates of J-Nagano type IHNV showed a various mortalities as 2 isolates induced a high mortality of 100% and the other 3 isolates induced mortalities of 50, 30, and 20% after intraperitoneal injection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Meanwhile no mortality was occurred by 1 isolate of J-Shizuoka type virus. Thus, it seems that there might be no relation between genotype and pathogenicity within IHNV J genotypes. This is contrary to previous studies where reported a higher pathogenicity of J-Shizuoka type virus than J-Nagano type virus in rainbow trout. Further examination will be required to clarify this since only one J-Shizuoka type virus was analyzed in this study.

Key words: Infectious hematopoietic necrosis, Phylogenetic analysis, Genotype, Pathogenicity, Gangwon-do

서 론

전염성 조혈기 괴사증 (infectious hematopoietic necrosis, IHN)은 1950년대 북미 서부의 연어과 어류에 발생하는 풍토병이었지만, 1970년대에 일본으로 확산되었으며 그 후 1990년대에 들어서 프랑스와 이탈리아를 비롯한 유럽 국가들에도 전파되

었다 (Bootland and Leong, 1999). 이후 전 세계적으로 야생 및 양식 연어에 발병하여 많은 폐사를 야기하고 있으며 현재 세계동물보건기구 (World Organization for Animal Health, OIE)에 등재된 질병이다 (OIE, 2020).

IHN의 원인체인 IHNV는 Rhabdoviridae과의 Novirhabdovirus속에 속하는 바이러스로 음성 단일-가닥의 RNA 바이러스이다. 국내에서는 IHNV에 의한 폐사가 오래전부터부터 보고되어왔지만, 실제로 IHNV에 의한 연어과 어류의 피해는 정확하게 파

[†]Corresponding author: Suhee Hong
Tel, Fax: +82-33-640-2852
E-mail: s.hong@gwnu.ac.kr

약되지 않았다. 바이러스의 게놈은 약 11kb이며, nucleocapsid protein (N), phosphoprotein (P), matrix protein (M), glycoprotein (G), non-virion protein (NV), polymerase protein (L) 5개의 구조 단백질과 Novirhabdovirus 바이러스의 특징인 Non virion (NV) 단백질을 암호화하는 유전자로 구성되어 있다 (Kurath *et al.*, 1985).

IHNV는 지역에 따라 5가지 유전형으로 나뉘는데, 북미의 U, M, L (Kurath *et al.*, 2003) 유전형과 유럽의 E 유전형, 일본의 J 유전형으로 분류된다 (Enzmann *et al.*, 2005, Nishizawa *et al.*, 2006, Kim *et al.*, 2007). IHNV의 유전형은 glycoprotein를 암호화하는 G 유전자의 중간영역인 mid-G의 염기서열을 통해 구분한다 (Troyer *et al.*, 2000, Emmenegger *et al.*, 2000, Emmenegger and Kurath, 2002).

국내에서 IHNV는 1990년 강원도 삼척지역의 송어양식장의 치어에서 처음 검출되어 1993년 보고되었다 (Sohn *et al.*, 1993). 이후 1999년에서 2002년 사이 무지개송어 양식장 성어에서 병독성이 강한 IHNV가 분리되었으며, 일본 유래의 J 유전형으로 확인되었다 (Kim *et al.*, 2007). 또한, 국내에서는 J 유전형의 J-Nagano형과 J-Shizuoka형의 IHNV가 모두 검출되는 것으로 알려져 있다 (Kim, 2010). 이들 J 유전형의 IHNV는 1990년대에 일본으로부터 발안난을 수입하는 과정 중 IHNV가 한국으로 이동되었을 것으로 추정하고 있다 (Kim *et al.*, 2007). 한편, 중국에서는 주로 J-Nagano형이 검출되었으며, 중국 분리주는 달라진 양식 환경에 적응하여 별도의 군집을 구성하였다고 알려졌다 (Jia *et al.*, 2014). 그러나, 최근 연구에 따르면 중국에서 무지개송어로부터 U 유전자형의 IHNV가 보고되어, 국내에서도 J 유전형 외의 다른 유전자형의 출현 가능성을 시사했다 (Huo *et al.*, 2021).

이전의 IHNV J 유전형의 병원성에 대한 연구에서는 J-Shizuoka형이 J-Nagano형보다 병원성이 더 높다고 보고된 바 있다 (Mochizuki *et al.*, 2009, Kim *et al.*, 2021). 그러나, 이전의 J 유전형의 병원성에 대한 연구들은 매우 적은 수의 분리주들을 대상으로 행하여 졌으며, IHNV의 병원성이 G 유전자의 돌연변이에 따라 달라진다는 보고와 바이러스 유전자들이 환경변화에 따라 지속적으로 변화하고

있다는 것을 고려할 때 최근에 분리된 보다 많은 균주를 이용하여 병원성을 추가적으로 검토할 필요가 있다 (Chen *et al.*, 2019, Kim *et al.*, 2016).

따라서, 본 연구는 국내 강원도의 연어과 어류에서 분리된 IHNV의 유전형과 병원성을 조사하기 위해, 무지개송어 및 산천어로부터 바이러스를 분리 및 배양하였다. 바이러스 분리주의 유전형을 결정하기 위한 계통발생학적 분석은 IHNV의 mid-G 영역을 염기 분석하여 수행되었다. 또한, 배양하여 분리된 6개의 IHNV 분리주를 무지개송어의 복강내 주사하여 병원성을 확인하였다.

재료 및 방법

바이러스 샘플링

2017년도 09월 ~ 2018년도 02월 사이에 강원도에 위치한 6개의 양식장에서 안구 돌출 및 장출혈 등의 바이러스성 증상을 나타내는 무지개송어 (*Oncorhynchus mykiss*) 및 산천어 (*Oncorhynchus masou masou*)의 신장과 비장을 적출하여 IHNV를 분리 및 동정하였다.

IHNV의 검출 및 동정

무지개송어 및 산천어의 신장과 비장조직은 Qiazol (Qiagen, Germany)을 이용하여 Total RNA를 추출하였다. 분리된 RNA는 BioSpectrometer (Eppendorf, Germany)를 통해 RNA 농도와 순도를 확인 후 1 µg의 RNA를 ReverTra Ace™ qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Toyobo, Japan)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 cDNA를 합성하였다.

IHNV의 검출은 Emmenegger *et al.*, 2000에서 제시한 방법 중에 결합 온도를 50°C에서 58°C로 변경하여 실시되었다. 중합효소연쇄반응 (Polymerase chain reaction, PCR)혼합물은 멸균증류수 4 µl와 prime Taq DNA Polymerase 1.25 unit, 2X reaction buffer, 4 mM MgCl₂, enzyme stabilizer, sediment, loading dye, 0.5 mM each of dATP, dCTP, dGTP, dTTP가 포함된 Premix 10 µl (Genethbio, Korea), 그리고 mid-G 1F와 mid-G 2F (10 pmol)를 각 1 µl씩 첨가하였다. 다음 혼합액에 4 µl의 cDNA를 첨가하여 혼합한 뒤 thermal cycler (Applied Biosys-

Table 1. Primers to amplify virulence genes by PCR

Primer	Sequence (5'-3')	Tm (°C)	Amplicon size (bp)	Reference
mid-G 1F	AGAGATCCCTACACCAGAGAC	61.3	692	Emmenegger <i>et al.</i> , 2000
mid-G 1R	GGTGGTGTGTTTTCCTGCAA	61.3		
mid-G 2F	TCACCCTGCCAGACTCATTGG	63.3	482	
mid-G 2R	ATAGATGGAGCCTTTGTGCAT	57.4		
3F-F	GAGTGTTCTTAGAGATCCCTAC	62.1	938	This study
F3-1R	CGGCAACAGCAAGGAGGA	58.4		

tems, USA)를 이용하여 PCR을 실시하였다. 반응 조건은 94°C에서 5분간 변성시킨 후, 94°C에서 30초 변성, 58°C에서 30초간 결합, 72°C에서 40초간 신장을 35회 반복하였다. 그 후, 72°C에서 10분간 최종 신장 단계를 거쳤다. PCR 산물은 다시 위에 동일한 조건으로 mid-G 2F와 mid-G 2R 프라이머를 이용하여 nested PCR을 수행하였다.

계통학적 분석은 바이러스의 G 유전자 일부분을 표적으로 하는 3F-F와 F3-1R 프라이머를 이용하여 PCR을 진행하였다. PCR 혼합물은 Ex Taq (5 units/ μ l) 0.25 μ l, 10X Ex Taq Buffer (Mg^{2+} plus) (20 mM) 5 μ l, dNTP mixture (2.5 mM) 4 μ l, cDNA 5 μ l, Primer (Forward primer 1 μ l, Reverse primer 1 μ l) (10 pmol/ μ l) 2 μ l, 멸균증류수 33.75 μ l를 혼합하여 총 50 μ l의 볼륨으로 PCR을 진행하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 초기 변성 후, 94°C에서 변성 30초, 55°C에서 결합 30초, 72°C에서 신장 1분을 35회 반복하고 72°C에서 7분간 최종 신장을 진행하였다.

PCR 산물 정제 및 시퀀싱

증폭된 산물을 확인하기 위해 1.5% Agarose gel에서 100V로 전기 영동하였다. 이후, ethidium bromide로 염색 후 증류수로 탈색을 진행하였다. 다음, Gel doc (Biorad, USA)을 이용하여 UV 상에서 Band를 확인하였다.

PCR 증폭산물을 DNA Gel Extraction S&V Kit (Bionics, Korea)를 사용하여 분리 정제하였으며, 정제된 DNA는 마크로젠 (Macrogen, Korea)에 의뢰하여 시퀀싱을 실시하였다.

DNA 염기서열 분석

본 연구에서 분리된 6개의 IHNV의 유전형을 알아보기 위하여 National center for biotechnology information에 등록된 다양한 유전형의 IHNV mid-G 염기서열을 참조서열로 이용하여 분석하였다. 이후 Mega X의 CLUSTAL W를 이용하여 sequence alignment를 진행하고, 계통수는 Maximum likelihood method를 통해 10,000번의 반복으로 신뢰도를 높여 그려졌다.

바이러스 배양 및 역가 분석

바이러스를 분리 및 배양하기 위해, 어류의 신장과 비장을 균질화한 후 3,000 rpm으로 10분간 원심 분리하였다. 이후 상등액을 채취하여 0.45 μ m인 필터로 여과해 바이러스액을 수득하였다. 바이러스액을 잉어 유래 세포인 epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell line에 접종하여 10% fetal bovine serum (Gibco, USA)와 1% antibiotic-antimycotic (Gibco, USA)이 첨가된 Leibovitz's (L)-15 medium에서 20°C로 일주일간 cytopathic effect (CPE)를 관찰하였다. 이후 EPC 세포가 모두 탈락했을 때 원심 분리하여 상등액을 사용 시까지 -70°C에서 보관하였다.

Batts and Winton (1989)의 plaque assay 방법을 이용하여 바이러스의 역가를 측정하였다. EPC 세포를 24-well plate (1×10^6 cells/well)에 seeding 한 뒤 20°C에서 24시간 배양하였다. 각 well에 담긴 배지를 모두 제거하고 7% polyethylene glycol을 100 μ l씩 분주한 뒤 30분 동안 안정화시켰다. L-15 배지로 10배씩 단계 희석한 바이러스액 100 μ l를 각 well에 접종하고, 대조군으로는 바이러스가 포

함되지 않은 L-15 배지를 분주했다. 30분 후 각 well에 methyl cellulose를 1 ml씩 분주하고, 약 5~6일간 배양하여 plaque를 관찰하였다. 끝으로 methylene blue로 염색하고, 멸균증류수로 세척 후에 플라크 수를 계산하였다.

실험어

경기도 해양수산자원연구소에서 무지개송어 (12.32 g ± 0.32)를 분양 받아 공격실험에 사용하였다. 공격실험하기 전에 무지개송어는 이전에 제시된 RT-PCR에 의해 IHNV, 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스, 전염성 췌장 괴사증 바이러스, 감염성 연어 빈혈증 바이러스, 유행성조혈기괴사증 바이러스, 오소레오 바이러스, 연어 알파 바이러스의 비감염 상태를 확인하였다 (Emmenegger *et al.*, 2000, Tapia *et al.*, 2015, Fringuelli *et al.*, 2008, Kibenge *et al.*, 2013, OIE 수생동물 진단 매뉴얼, 2016). 실험어는 강릉원주대학교의 연구실 내 설치된 50 L 사각 수조에 10 마리씩 나누어 사육하였으며, 실험 동안 수온은 12 ± 1°C로 유지되었다.

공격 실험

초저온 냉동고에 보관 중인 6개의 바이러스 배양액을 멸균 PBS (pH 7.4)로 희석하여, 1×10⁴ PFU/fish의 농도로 준비하였다. 대조군은 PBS를 주사하였으며, 공격 실험에 사용된 바이러스는 Table 2에 제시하였다. 무지개송어의 마취 상태를 유도하기 위해, 사육수에 0.1%의 2-phenoxyethanol (Sigma aldrich, USA)을 무지개송어가 있는 물에 혼합 후, 꼬리지느러미가 힘이 없고 배가 뒤집어질 때 복강에 100 µl를 주사하였다. 실험에서 배출되는 사육

수는 UV-오존 살균장치 (SanyoUV, Korea)로 처리한 뒤 배출하였다. 28일 동안 폐사어의 수를 매일 기록하고 바이러스 감염의 유무는 위에 설명한 RT-PCR 방법으로 확인하였다. 사육 수온은 실험 동안 12 ± 1°C로 유지하였다.

결과 및 고찰

IHNV의 검출 및 분리

바이러스는 6개 양식장의 무지개송어 및 산천어에서 확인되었으며, RT-PCR 방법으로 검출하였다 (Table 2). 1차 PCR 결과, 전기영동에서 약 692bp의 크기를 가진 PCR 산물을 RTDH1709, RTJS1709, MSOK1711, RTYK1711, RTCC1801 그리고 RTHC1802 샘플에서 확인할 수 있었다. Nested PCR 결과에서도 마찬가지로 6개의 바이러스 모두 482bp의 PCR 산물이 확인되었다.

RT-PCR에서 양성으로 확인된 시료의 경우, 신장과 비장 조직을 PBS로 균질화하고 상등액을 추출하였다. 추출된 상등액은 EPC에 접종하여 바이러스를 배양하였다. 대조군으로 EPC세포에 멸균 PBS도 처리하였다. 상등액이 처리된 EPC세포는 배양 1일째부터 몇 개의 세포가 동그랗게 되고, 심한 경우 3일째에 모든 세포가 플라스크로부터 분리되었다 (Fig. 1). 또한 각 바이러스 상등액이 처리된 6개의 샘플은 모두 일주일 이내에 모든 세포가 탈락되었다. PBS만 처리된 EPC세포에서는 아무런 변화가 없었다 (Fig. 1). 이전 연구에 따르면, 바이러스의 CPE는 IHNV에 감염된 어류의 주요 표적 조직인 신장 및 비장 조직에서 가장 잘 관찰된다고 보고되었다 (Bootland and Leong, 1999). 이후 모든

Table 2. Identification of IHNV isolated from salmonid fish using PCR of the mid G region

Strain	Isolated year	Host	Isolated organ	Cytopathic effect of EPC cells	Genotype
RTDH1709	2017.09	Rainbow trout		+	JRt-Nagano
RTJS1709	2017.09	Rainbow trout		+	JRt-Nagano
MSOK1711	2017.11	Masou salmon	*HK, **Sp	+	JRt-Nagano
RTYK1711	2018.01	Rainbow trout		+	JRt-Nagano
RTCC1801	2018.01	Rainbow trout		+	JRt-Shizuoka
RTHC1802	2018.02	Rainbow trout		+	JRt-Nagano

*HK; Head kidney, **Sp; Spleen

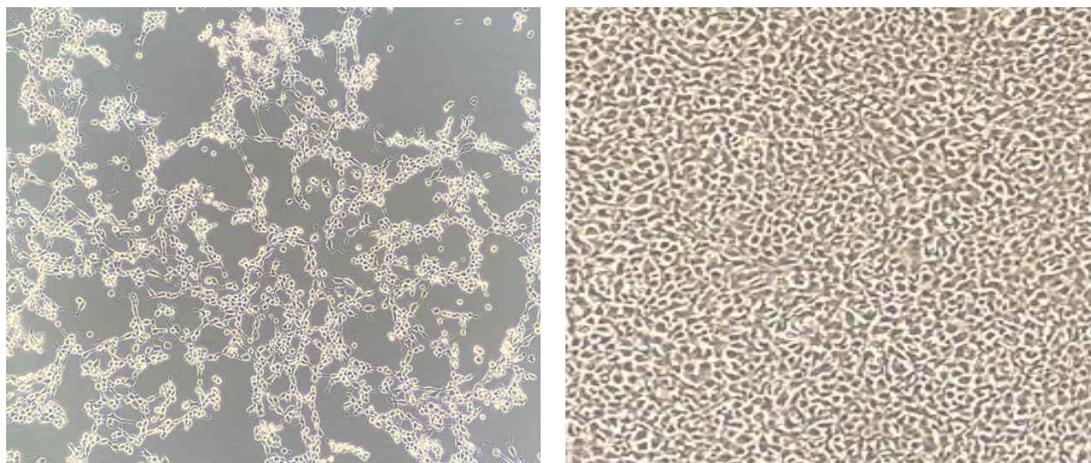


Fig. 1. EPC cell infected with IHNV (Left), and EPC cell not infected with the virus (Right).

EPC세포는 원심 분리하고 RT-PCR로 IHNV의 감염을 확인하였다. 그 결과, 세포변성효과를 나타낸 샘플에서는 1~2차 PCR에서 모두 양성 결과를 나타냈다 (data not shown).

계통수 분석

본 연구에서 분리된 6개 바이러스주와 NCBI에 등록된 IHNV의 mid-G 염기서열을 Maximum likelihood method로 계통수 분석을 실시하였다. 그 결과, RTDH1709, RTJS1709, MSOK1711, RTYK1711, RTCC1801 그리고 RTHC1802는 J-Nagano형에 속하는 것으로 나타났으며, RTYK1801는 J-Shizuoka형에 속하는 것으로 확인되었다 (Fig. 2).

이는 최근에 연구된 결과와 같은 것으로 2013년 2월에서 2015년 4월 사이에 강원도에서 분리된 13개의 IHNV는 J-Shizuoka형과 J-Nagano형이 모두 나타나 두 가지 유전형이 골고루 분포하는 것으로 보고되었다 (Kim *et al.*, 2016). 그 이전의 국내 분리된 IHNV의 유전형 분포에 대한 연구에서는 2007년, 강원도와 충청도에서 J-Shizuoka형, 전라도에서 J-Nagano형이 분포하는 것으로 보고되었다 (Kim *et al.*, 2007). 따라서, 최근의 강원도에서 IHNV 두 가지 유전형이 모두 확인되는 것은 어류 이동이 질병의 확산 및 전파를 촉진하였기 때문일 것으로 추측된다. 또한, J-Nagano형인 RTCC1801과 RTJS1709, RTHC1802, RTDH1709 분리주들은 계통수

의 가지 끝에 위치하여 이전에 분리된 IHNV 분리주들과 비교하여 보다 최근에 분화된 것으로 보인다.

공격 실험

6개의 IHNV 분리주를 1×10^4 PFU/fish의 농도로 무지개송어 복강 내에 주사하여 공격실험을 실시한 결과, J-Nagano형인 RTCC1801과 RTJS1709 분리주로 주사된 그룹은 100%의 폐사율을 나타냈다 (Fig. 3). 나머지 J-Nagano형인 RTHC1802, RTDH1709 그리고 MSOK1711 분리주가 주사된 그룹들은 50%, 30% 그리고 20%의 폐사율을 각각 나타냈다. 그러나 J-Shizuoka형인 RTYK1711 분리주와 PBS가 주사된 대조군에서는 폐사가 발생하지 않았다.

이전 연구에 따르면, 국내 IHNV 분리주에서 G 유전자의 유전적 차이가 빠르게 증가해왔고 (Kim, 2010), 이 유전자의 돌연변이는 IHNV의 출아와 병원성에 영향을 미칠 수 있다고 보고되었다 (Jia *et al.*, 2019). 숙주에 따른 IHNV 유전형별 병원성의 차이에 대한 이전의 연구에서, IHNV U 유전형은 미국에서 홍연어와 코카니언어에서 높은 폐사율을 보였지만, M 유전형에서는 거의 폐사가 없었다 (Garver *et al.*, 2006). 반면, 무지개송어에서는 M 유전형의 IHNV가 높은 폐사율을 나타냈다 (Garver *et al.*, 2006). 최근, 한국에서 분리된 IHNV J

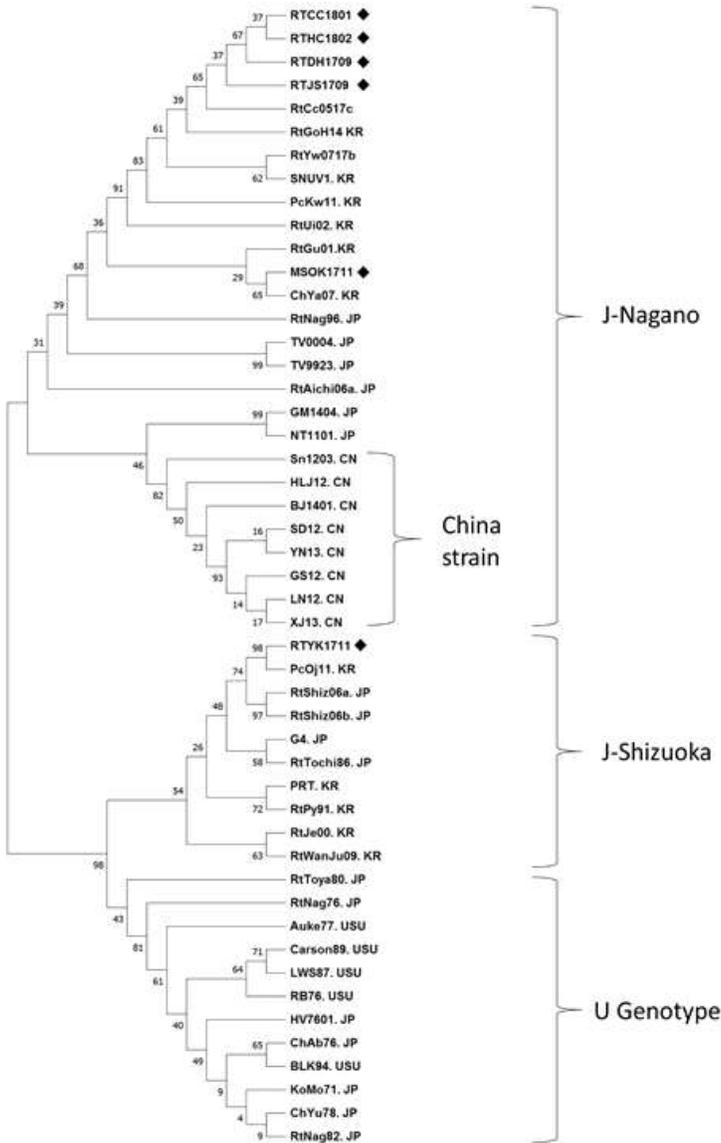


Fig. 2. Phylogenetic analysis of mid-G gene (303 bp) was performed by the maximum likelihood method using Mega software. Bootstrap was set 10,000 times repeat. ◆ indicates the strains used this study.

유전형은 대서양 연어와 은연어에서 큰 차이 없이 병원성이 약했으며, 무지개송어에서는 폐사가 높았다 (Kim *et al.*, 2021). 이는 바이러스가 어류와 상호작용하면서 끊임없이 진화해 왔으며, 숙주의 면역반응을 회피하는 방법들은 다르기 때문일 것이다 (He *et al.*, 2021).

또한, 한국에서 분리된 J 유전형내 2개의 계통에 따른 병원성 차이는 J-Shizuoka가 J-Nagano형보다 병원성이 높은 것으로 보고되었다 (Kim *et al.*,

2016, Kim *et al.*, 2021). 하지만 본 실험의 결과는 이전 보고와 달리 무지개송어에서 J-Shizuoka형인 RTYK1711에서 폐사가 없었으며, J-Nagano형의 바이러스들은 높은 폐사율과 다양한 병원성을 나타냈다. 이러한 결과는 J-Shizuoka형과 J-Nagano형이 병원성과 관련성이 없음을 시사할 수 있지만, 본 연구에서는 단 1개의 J-Shizuoka형이 분석되었기 때문에 추후 유전자형에 따른 병원성 차이에 대한 추가연구가 필요할 것이다. 특히, 최근 밝혀진 바

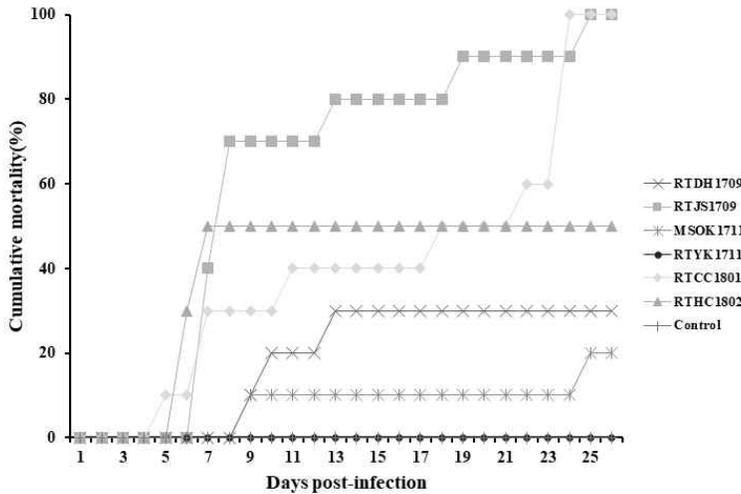


Fig. 3. Cumulative mortality of rainbow trout i.p. injected with IHNV isolates or PBS. Number of dead fish was daily recorded for 28 days.

에 의하면 주요 항원 단백질로 알려진 G 단백질 외에도 IHNV의 NV와 N단백질은 인터페론 경로를 방해하면서 숙주의 면역 차단에 중요하다고 알려져 있기 때문에, G 유전자가 아닌 다른 유전자의 변이 등이 광범위하게 검토될 필요성이 있다 (Wang *et al.*, 2020, Wu *et al.*, 2018).

요 약

IHNV는 국내 연어 양식업에서 경제적 손실을 발생시켜왔으며, 연어과 어류에 높은 폐사율을 초래한다. 본 연구에서는 강원도의 연어과 어류로부터 분리된 IHNV 분리주의 계통발생적 분류와 병원성을 조사하였다. 계통발생학적 분석은 IHNV의 303bp를 해당하는 mid-G 영역을 염기 분석하여 수행되었다. 바이러스주 모두 J 유전자형으로 RTDH 1709, RTJS1709, MSOK1711, RTYK1711, RTCC 1801 그리고 RTHC1802는 J-Nagano형이며, RTYK 1801는 J-Shizuoka형에 속하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 이전 연구와 일치하게 강원도에서는 두 가지 유전형이 분포한다는 것을 시사한다. 또한, 6개 분리주를 무지개송어 치어의 복강에 주사하여 병원성을 시험한 결과, J-Nagano형인 RTCC 1801와 RTJS1709 바이러스주로 주사된 그룹은 100%의 폐사율을 나타냈다. 그 뒤로, J-Nagano형인 RTHC1802, RTDH1709 그리고 MSOK1711 분리주가 주사된 그룹들은 50%, 30% 그리고 20%의 폐

사율을 나타냈다. 그러나 J-Shizuoka형인 RTYK 1711 분리주와 대조군에서는 폐사가 발생하지 않았다. 이러한 결과는 J-Shizuoka형이 J-Nagano형 바이러스 분리주보다 높다고 보고한 기존의 연구결과와 상반되며 J 유전자형 내에서 유전자형과 병원성간의 상관관계가 없는 것을 시사한다. 하지만 본 연구에서는 1개의 J-Shizuoka형 분리주만이 분석되었기 때문에 J 유전자형 내에서 유전자형과 병원성간의 상관관계를 확실하게 알기 위해서는 J 유전자형의 병원성에 대한 추가 조사가 필요할 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 해양수산부가 지원하는 강원씨그랜트 사업에 의해 이루어진 것이며, 이에 감사드립니다.

References

- Bootland, L. M., and Leong, J. C.: Infectious hematopoietic necrosis virus. In *Fish diseases and disorders; Viral, bacterial and fungal infections*, Vol. 3, pp.57-121, Woo, P.T.K., Bruno, D.W. (eds). CABI Publishing, NY, 1999.
- Batts, W. N., and Winton, J. R.: Enhanced detection of infectious hematopoietic necrosis virus and other fish viruses by pretreatment of cell monolayers with polyethylene glycol. *J Aquat Anim Health*, 1: 284-290, 1989.

- Chen, Y., Li, J., Li, D., Guan, X., Ren, X., Zhou, Y., Feng, Y., Gao, S., Wang, N., Guan, X., Shi, W., and Liu, M.: The L-domains in M and G proteins of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) affect viral budding and pathogenicity. *Fish Shellfish Immunol*, 95: 171-179, 2019.
- Emmenegger, E. J., Meyers, T. R., Burton, T. O., and Kurath, G.: Genetic diversity and epidemiology of infectious hematopoietic necrosis virus in Alaska. *Dis Aquat Org*, 40: 163-176, 2000.
- Emmenegger, E. J., and Kurath, G.: Genetic characterization of infectious hematopoietic necrosis virus of coastal salmonid stocks in Washington State. *J Aquat Anim Health*, 14: 25-34, 2002.
- Enzmann, P. J., Kurath, G., Fichtner, D., and Bergmann, S. M.: Infectious hematopoietic necrosis virus: monophyletic origin of European isolates from North American genogroup. *M Dis Aquat Org*, 66: 187-195, 2005.
- Fringuelli, E., Rowley, H. M., Wilson, J. C., Hunter, R., Rodger, H., and Graham, D. A.: Phylogenetic analyses and molecular epidemiology of European salmonid alphaviruses (SAV) based on partial E2 and nsP3 gene nucleotide sequences. *J Fish Dis*, 31: 811-823, 2008.
- Garver, K. A., Batts, W. N., and Kurath, G.: Virulence comparisons of infectious hematopoietic necrosis virus U and M genogroups in sockeye salmon and rainbow trout. *J Aquat Anim Health*, 18: 232-243, 2006.
- He, M., Ding, N. Z., and He, C. Q.: Novirhabdoviruses versus fish innate immunity: a review. *Virus Res*, 198525, 2021.
- Huo, C., Ma, Z., Li, F., Xu, F., Li, T., Zhang, Y., Jiang, N., Xing, W., Xu, G., Luo, L., and Sun, H.: First isolation and pathogenicity analysis of a genogroup U strain of infectious hematopoietic necrosis virus from rainbow trout in China. *Transbound Emerg Dis*, 2021.
- Jia, S., Ding, G., Wang, C., Feng, B., Wang, Z., Wang, L., Jiang, Y., Cui, W., Qiao, X., Tang, L., Li, Y., and Xu, Y.: N-linked glycosylation sites in G protein of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) affect its virulence and immunogenicity in rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol*, 89: 537-547, 2019.
- Jia, P., Zheng X. C., Shi, X. J., Kan S. F., Wang, J. J., He, J. Q., Zheng, W., Yu, L., Lan, W. S., Hua, Q. Y., Liu, H., and Jin, N. Y.: Determination of the complete genome sequence of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) Ch20101008 and viral molecular evolution in China. *Infect Genet Evol*, 27: 418-431, 2014.
- Kibenge, M. J., Iwamoto, T., Wang, Y., Morton, A., Godoy, M. G., and Kibenge, F. S.: Whole-genome analysis of piscine reovirus (PRV) shows PRV represents a new genus in family Reoviridae and its genome segment S1 sequences group it into two separate sub-genotypes. *Virology*, 10: 230, 2013.
- Kim, H. J.: Phylogenetic analysis of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) isolated from cultured rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in Korea. *J Fish Pathol*, 23: 1-8, 2010.
- Kim, K. I., Cha, S. J., Lee, C., Baek, H., Hwang, S. D., Cho, M. Y., Jee, B. Y., and Park, M. A.: Genetic relatedness of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) from cultured salmonids in Korea. *Arch Virol*, 161: 2305-2310, 2016.
- Kim, S. S., Kim, K. I., Yoo, H. K., Han, Y. S., Jegal, M. E., Byun, S. G., Lim, H. J., Park, J. S., and Kim, Y. J.: Differential virulence of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) isolated from salmonid fish in Gangwon Province, Korea. *Fish Shellfish Immunol*, 119: 490-498, 2021.
- Kim, W. S., Oh, M. J., Nishizawa, T., Park, J. W., Kurath, G., and Yoshimizu, M.: Genotyping of Korean isolates of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) based on the glycoprotein gene. *Arch Virol*, 152: 2119-2124, 2007.
- Kurath, G., Ahern, K. G., Pearson, G. D., and Leong, J. C.: Molecular cloning of the six mRNA species of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus, and gene order determination by R-loop mapping. *J Virol*, 53: 469-476, 1985.
- Kurath, G., Garver, K. A., Troyer, R. M., Emmenegger E. J., Einer-Jensen, K., and Anderson, E. D.: Phylogeography of infectious haematopoietic necrosis virus in North America. *J Gen Virol*, 84: 803-814, 2003.
- Mochizuki, M., Kim, H. J., Kasai, H., Nishizawa, T., and Yoshimizu, M.: Virulence change of infectious hematopoietic necrosis virus against rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* with viral molecular evolution. *Fish Pathol*, 44: 159-165, 2009.
- Nishizawa, T., Kinoshita, S., Kim, W. S., Higashi, S., and Yoshimizu, M.: Nucleotide diversity of Japanese isolates of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) based on the glycoprotein gene. *Dis Aquat Org*, 71: 267-272, 2006.
- OIE aquatic manual: Manual of diagnostic tests for Aquatic animals, 2020.

- Sohn, S. G., Park, M., and Park, J. W.: Studies on Viral Disease of masu salmon, *Oncorhynchus masou*-II Isolation of infectious hematopoietic necrosis virus from masu salmon fry. *J Fish Pathol*, 6: 87-92, 1993.
- Tapia, D., Eissler, Y., Torres, P., Jorquera, E., Espinoza, J. C., and Kuznar, J.: Detection and phylogenetic analysis of infectious pancreatic necrosis virus in Chile. *Dis Aquat Org*, 116: 173-184, 2015.
- Troyer, R. M., LaPatra, S. E., and Kurath, G.: Genetic analyses reveal unusually high diversity of infectious haematopoietic necrosis virus in rainbow trout aquaculture. *J Gen Virol*, 81: 2823-2832, 2000.
- Wang, Z. X., Zhou, Y., Lu, L. F., Lu, X. B., Ni, B., Liu, M. X., Guan, H. X., Li, S., Zhang, Y. A., and Ouyang, S.: Infectious hematopoietic necrosis virus N protein suppresses fish IFN1 production by targeting the MITA. *Fish Shellfish Immunol*, 97: 523-530, 2020.
- Wu, Y., Wang, L., Guo, T., Jiang, Y., Qiao, X., Sun, L., Liu, M., Tang, L., Xu, Y., and Li, Y.: Identification of amino acid residues in infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) NV protein necessary for viral replication and pathogenicity. *Fish Shellfish Immunol*, 79: 294-302, 2018.

Manuscript Received : Nov 16, 2021

Revised : Nov 23, 2021

Accepted : Dec 13, 2021