

## 능성어 양식장에서의 viral nervous necrosis (VNN) 발생양상

김춘섭 · 김위식\* · Nishizawa Toyohiko · 오명주†

전남대학교 수산생명의학과, \*전남대학교 수산과학연구소

### Prevalence of viral nervous necrosis (VNN) in sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus* farms

Choon-Sup Kim, Wi-Sik Kim\*, Toyohiko Nishizawa, and Myung-Joo Oh†

Department of Aquaculture Medicine, College of Fisheries and Ocean Science, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea

\*The Fisheries Science Institute, Chonnam National University, Yeosu 556-901, Korea

Prevalence of viral nervous necrosis (VNN) in sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus* farms was investigated during the period of 2006-2008. The outbreak of the VNN was observed from August (water temperature: 24-26°C) to September or October (20-25°C). The viral infection resulted in acute or chronic mortality of the host, where the mortality rate of juvenile fish was higher than that of the adult fish. Phylogenetic analysis based on partial RNA2 coat protein gene nucleotide sequences revealed that all the isolates from sevenband grouper were classified into the genotype redspotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV). In conclusion, VNN of juvenile and adult sevenband groupers during the summer season (July to October, water temperature: about 24°C) was caused by virus belonging to the genotype RGNNV.

*Key words* : *Epinephelus septemfasciatus*, Prevalence, Viral nervous necrosis

능성어 *Epinephelus septemfasciatus*는 농어목 바리와 능성어속에 속하는 어종으로서 식용으로 기호도가 높으며, 단가가 비싸 고급양식 품종으로 기대되고 있다. 능성어 양식은 현재 인공종묘생산을 통한 양식 방법과 남해안 일대에서 자연산 어류를 포획하여 가두리에 입식시키는 방법으로 이루어지고 있다.

능성어 양식과정에서 발생하는 질병으로는 바이러스성신경괴사증(viral nervous necrosis, VNN)이 보고되어 있다(손 등, 1991; Fukuda *et al.*, 1996; Sohn

*et al.*, 1998). VNN은 여름철 고수온기에 치어뿐만 아니라 성어에 폐사를 유발하는 질병으로서 병어는 뇌와 안구 망막의 신경조직에 공포변성이 나타난다(Fukuda *et al.*, 1996; Sohn *et al.*, 1998). 본 질병의 원인병원체인 신경괴사증바이러스(nervous necrosis virus, NNV)는 크기가 30 nm 정도로 인벨롭이 없는 정이십면체의 RNA 바이러스로서 *Nodaviridae*에 속한다(Fukuda *et al.*, 1996; Sohn *et al.*, 1998; Schneemann *et al.*, 2005). NNV는 4개의 유전자형인 striped jack NNV (SJNNV) type, tiger puffer NNV (TPNNV) type, barfin flounder NNV (BFNNV) type, redspotted grouper NNV (RGNNV) type으로 구분되며(Nishizawa *et al.*,

†Corresponding author: Myung-Joo Oh

Tel and Fax: +82-61-659-7173

E-mail: ohmj@chonnam.ac.kr

1997), 국내 양식어류 및 연안에서 서식하는 자연산 어류에서 검출되는 NNV는 모두 RGNNV type에 속한다고 보고되어 있다(Oh *et al.*, 2005; Cha *et al.*, 2007; Gomez *et al.*, 2008).

우리나라에서의 VNN 연구는 1990-1991년 남해안에서 사육중인 능성어의 대량폐사 원인이 NNV에 의해 발생된다는 것이 보고된 이래로(손 등, 1991; Sohn *et al.*, 1998), 다양한 해산어류에 대한 NNV의 병원성, 양식어종 및 연안에서 서식하는 자연산 어류에서 분리되는 NNV의 유전적 특성, NNV 검출 PCR법을 이용한 미감염 친어선별 등의 다양한 연구가 수행되었다(손과 전, 1999; Oh *et al.*, 2005; 김 등, 2006; Cha *et al.*, 2007; Gomez *et al.*, 2008). 그러나 양식 현장에서의 VNN 발병 특성과 관련된 연구는 보고된바 없다.

본 연구에서는 VNN 예방을 위한 기초자료로 활용하고자 2006-2008년 남해안 일대의 해상가두리에서 사육중인 능성어에서 발생하는 VNN의 발생양상을 조사하였다.

## 재료 및 방법

2006-2008년 거문도 및 여수에서 해상가두리에 사육중인 능성어에서 VNN에 의한 폐사가 발생하였다(Table 1). VNN의 발생양상을 조사하기 위하여, 각각의 양식장에서의 VNN 발생 이전부터 폐사가 종식되기까지의 사육수온, 발병 시기, 일일폐사율 및 누적폐사율을 조사하였다.

능성어로부터 분리된 NNV의 유전자형을 조사하기 위해 병어의 뇌조직으로부터 RNA extraction kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 RNA를 분리하였고, Nishizawa *et al.*, (1995, 1997)의 방법에 따라 SJNNV의 coat protein gene (RNA2) 으로부터 디자인된 T4 region

primer (F2: 5'-CGTGTTCAGTCATGTGTCGCT-3', R3: 5'-CGAGTCAACACGGGTGAAGA-3', PCR 산물: 427 bp)를 사용하여 RT-PCR을 실시하였다. PCR 증폭 산물은 gel purification kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 정제한 후 ABI PRISM dye terminator sequencing chemistry (Applied Biosystems, USA)를 사용하여 sequencing 하였다. 염기서열은 Genetyx-Win Ver. 5.1 program을 사용하여 분석하였고, GenBank에 등록된 NNV 분리의 sequence data (Nishizawa *et al.*, 1997; Cha *et al.*, 2007)를 이용하여 Clustal X (Thompson *et al.*, 1997)와 MEGA 4 program (Tamura *et al.*, 2007)으로 neighbor-joining method와 bootstrap test를 실시하여 계통 분석을 실시하였다.

## 결과 및 고찰

2006-2008년 거문도 및 여수에서 해상가두리에 사육중인 능성어에서 9.2-89.1%의 폐사가 발생하였다(Table 1, Fig. 1). 병어는 체색이 흑화되고 힘없이 유평하거나 선회 유형하다 폐사되었다. 병리조직학적 검사 결과 병어의 뇌와 망막에서 공포변성이 확인되었고, 병어의 뇌로부터 NNV에 대한 RT-PCR 양성반응이 나타나 폐사의 원인은 VNN으로 확인되었다(data not shown).

VNN에 의한 능성어의 폐사는 8월부터 발생하기 시작하여 9월 또는 10월까지 계속되었다(Table 1, Fig. 1). 2006년 거문도에 위치한 A 양식장의 경우, 능성어 치어(체중: 15-20 g)에서 81.2%의 누적폐사율이 발생하였다(Fig. 1A). 8월 중순(사육수온: 25°C)부터 VNN이 발생하기 시작하였으며, 약 2주후(수온: 26-27°C)에는 10-12.8%로 가장 높은 폐사율을 보였다. 9월 초부터는 폐사율이 감소하기 시작하였으며, 9월 중순(수온: 23°C)에는 질병이 종식되었다. 2007년에는

Table 1. Outbreaks of viral nervous necrosis (VNN) in sevenband grouper farms

Location	Year	Farm	Disease outbreak	Weight (g)	Cumulative mortality % (dead fish/total fish)
Gemundo	2006	A	August - September	15-20	81.2% (8,120/10,000)
Gemundo	2007	A	August - September	20-50	89.1% (8,910/10,000)
			August - September	600-1,000	9.2% (1,840/20,000)
Gemundo	2008	A	August - September	40-55	31% (1,550/5,000)
Gemundo	2008	B	August - September	40-55	40.2% (4,020/10,000)
Yeosu	2008	C	August - October	30-75	65% (3,250/5,000)

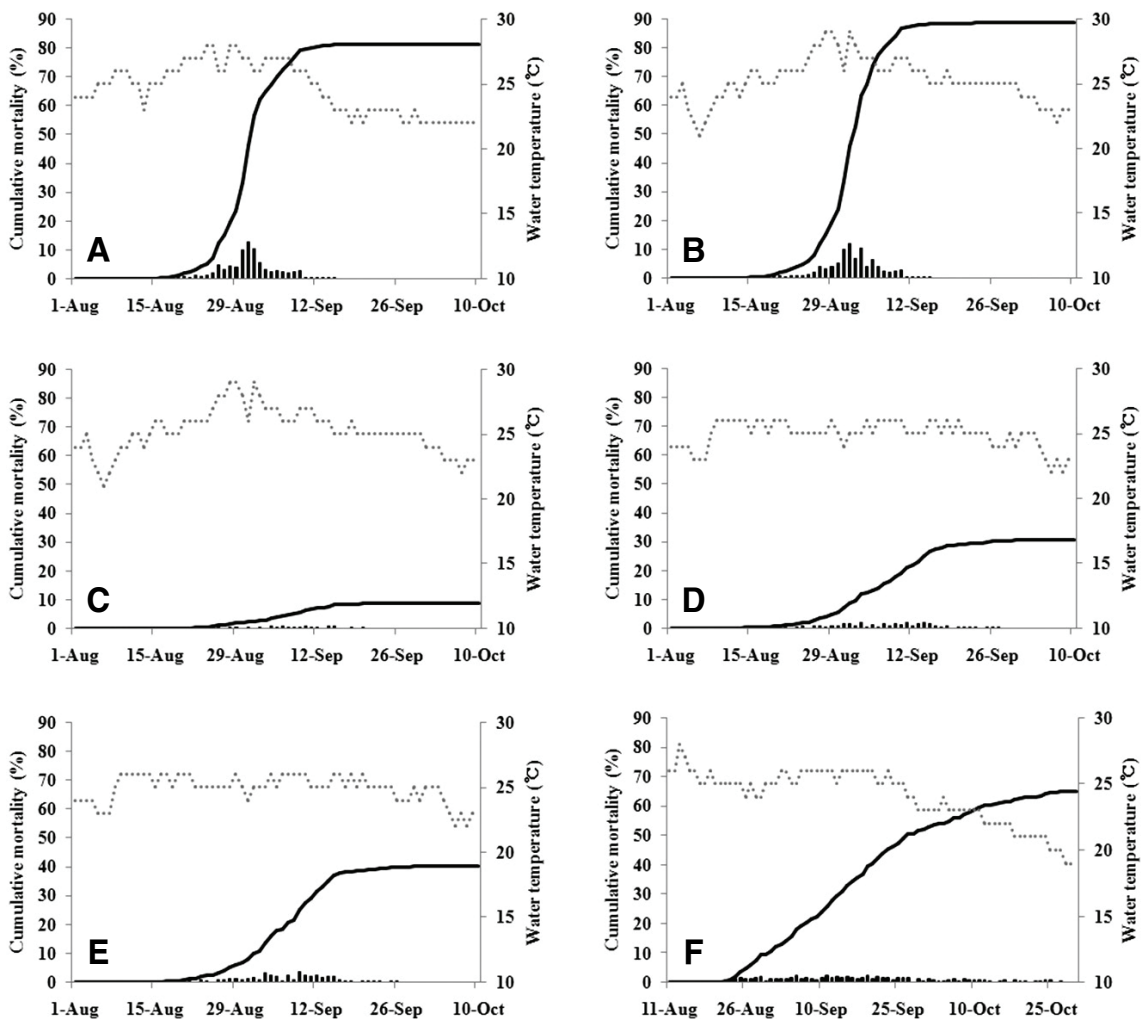


Fig. 1. Daily and cumulative mortality of sevenband grouper with respect to water temperature change in three farms: A farm, Gemmundo in 2006 (A), in 2007 (B: juvenile fish, C: adult fish), in 2008 (D), B farm, Gemmundo in 2008 (E), C farm, Yeosu in 2008 (F). ■: daily mortality, —: cumulative mortality, --: water temperature.

치어(20-50 g)의 경우, 2006년도와 유사한 발병 패턴을 보였다(Fig. 1B). VNN은 8월 중순부터(수온: 24°C) 발생하기 시작하여 약 2주후(수온: 26-29°C)에는 10-12%로 가장 높은 폐사율을 보였으며, 9월 초부터는 폐사율이 천천히 감소하여 89.1%의 누적폐사율이 나타났다. 이에 반해, 성어(600-1000 g)에서는 치어보다 1주일 늦은 8월 말(수온: 26°C)부터 VNN이 발생하기 시작하였고, 급성 대량폐사는 발생하지 않았으나 0.04-0.7%의 폐사가 지속적으로 발생하여 9월 말까지 9.2%의 누적폐사율을 보였다(Fig. 1C). 2008년 거문도에 위치한 A와 B 양식장에서는 각각 31%와 40.2%의 누적폐사율이 관찰되었다(Fig. 1D, E). 두 양식장 모두 8월 중순(사육수온: 26°C)부터 폐사어가 관찰되기 시작하였으며, 0.04-3.6% 폐사가 9월까지 지속되었다. 2008년 여수에 위치한 C 양식장의 경우는 8월 말(수온: 25°C)부터 VNN이 발생하기 시작하였고 0.04-2.4% 폐사가 10월 말(수온: 20°C)까지 지속되어 65%의 누적폐사율을 보였다(Fig. 1F). 이상의 결과, 능성어 양식장에서는 사육 수온이 24-26°C 범위인 8월부터 VNN에 의한 폐사가 발생하기 시작하여 수온이 20-25°C 범위인 9-10월까지 지속됨이 확인되었다. 또한 성어 보다는 치어에서 폐사율이 높게 나타나는 것으로 확인되었고, 폐사되는 패턴으로는 급성으로 인한 대량폐사와 소량으로 지속적으로 폐사되는 경우가 확인되었다. 유사한 발병 패턴으로서 손 등(1991)은 남해안 해산가두리에서 사육중인 능성어(8-19 cm)에서 7월 초부터 VNN 증상이 발생하기 시작하여 11월 초까지 50-80%의 누적폐사율을 보였다고 보고하였고, Oh *et al.* (2012)은 능성어 치어(80 g)에서 9월 말(수온: 24°C)부터 VNN이 발생하여 10월 중순(수온: 20°C)까지 29%의 누적폐사율을 보였다고 보고하였다. 본 연구의 결과에서는 VNN은 8월부터 발생하는 것으로 나타났으나 손 등(1991)과 Oh

*et al.* (2012)의 연구에서는 수온이 상승하는 시기인 7월 초와 수온이 낮아지는 시기인 9월 말에도 VNN이 발생하는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 종합하면, 능성어 양식장에서의 VNN은 치어뿐만 아니라 성어에서 여름철 7-9월, 사육수온이 약 24°C에서 발생하는 것으로 확인되었다. 따라서 위의 시기에서는 VNN에 대한 각별한 주의가 요구된다. 현재 VNN 예방방법으로서 포르말린 불활화 백신, 재조합백신 등의 다양한 종류의 백신이 개발되어 있다(Yuasa *et al.*, 2002; Sommerset *et al.*, 2005; Yamashita *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Thiéry *et al.*, 2006). 본 연구에서 조사된 VNN 발생양상은 VNN 백신 사용 시기를 결정하는데 있어 유용한 정보로서 제공될 수 있을 것으로 사료된다.

능성어 NNV 분리주들의 유전자형을 조사하기 위해 NNV의 coat protein gene을 분석한 결과, 능성어 분리주들은 서로간에 97.1-99.7%의 상동성을 보였고 우리나라에서 다양한 어종(넙치 *Paralichthys olivaceus*, 송어 *Mugil cephalus*, 돌돔 *Oplegnathus fasciatus*)에서 분리되는 RGNNV type의 분리주(JFNNV-PH, JFNNV-WD, GMNNV-SS, RBNNV-TY)와 97.4-98.7%의 상동성을 나타내었으며, RGNNV, BFNNV, SJNNV, TPNNV 유전자형에 속하는 분리주와 각각 84-99%, 76-77%, 67.3-68.8%, 66.4-67.7%의 상동성을 보였다(data not shown). 이상의 결과로 능성어로부터 분리된 NNV 분리주들은 모두 RGNNV 유전자형으로 확인되었다. 어류 nodavirus의 유전자형은 혈청형과 밀접한 연관성이 있다고 보고되어 있다(Mori *et al.*, 2003). SJNNV type와 TPNNV type의 분리주는 각각의 유전자형에 속한 바이러스에 대한 항혈청에만 중화되며, RGNNV 및 BFNNV type의 분리주는 RGNNV 또는 BFNNV에 대한 항혈청에 모두에 중화된다. 능성어 분리주는 동일한 유전형인 RGNNV type에 속하므로,

능성어에 대한 VNN 백신 개발시, 능성어 분리주들 모두는 VNN 백신의 항원으로 유용할 것으로 사료된다.

능성어 양식과정에 있어 고등어, 멸치, 전갱이 등의 다양한 자연산 어종들은 생사료로서 사용되고 있다. Gomez *et al.* (2008)에 연구에 따르면 국내 연안에서 채집한 고등어, 전갱이, 참돔 등의 21종의 자연산 해산어류에서 RGNNV 유전형에 속하는 NNV가 검출된다고 보고하였다. 따라서 능성어 양식장에서 사용되는 생사료는 NNV의 vector로서 작용할 가능성이 있을 것으로 추정된다.

### 요 약

본 연구에서는 2006-2008년 남해안 일대의 해상가 두리에서 사육중인 능성어에서 발생하는 viral nervous necrosis (VNN)의 발생양상을 조사하였다. VNN은 사육 수온이 24-26°C 범위인 8월부터 발생하기 시작하여 수온이 20-25°C 범위인 9-10월까지 지속되었고, 성어 보다는 치어에서 폐사율이 높게 나타나는 것으로 확인되었다. 폐사되는 패턴으로는 급성으로 인한 대량 폐사와 소량으로 지속적으로 폐사되는 경우가 확인되었다. 능성어로부터 분리된 NNV 분리주들의 coat protein gene을 계통분석한 결과, 분리주들은 모두 RGNNV 유전자형에 속하였다. 이상의 결과로 능성어 양식장에서의 VNN은 RGNNV type의 NNV에 의해 여름철 7-9월(사육수온: 약 24°C)에 치어뿐만 아니라 성어에서 발생하는 것으로 확인되었다.

### 감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 수산기술개발사업의 지원에 의해 수행되었습니다.

### 참고문헌

- 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.
- 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: 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.
- Liu, W., Hsu, C.H., Chang, C.Y., Chen, H.H. and Lin, C.S.: Immune response against grouper nervous necrosis virus by vaccination of virus-like particles. *Vaccine*, 24: 6282-6287, 2006.
- Mori, K., Mangyoku, T., Iwamoto, T., Arimoto, M., Tanaka, S. and Nakai, T.: Serological relationships among genotypic variants of betanodavirus. *Dis. Aquat. Org.*, 57: 19-26, 2003.
- Nishizawa, T., Furuhashi, M., Nagai, T., Nakai, T. and Muroga, K.: Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 1633-1636, 1997.
- Nishizawa, T., Mori, K.I., Furuhashi, M., Nakai, T., Furusawa, I. and Muroga, K.: Comparison of the coat protein genes of five fish nodaviruses, the causative agents of viral nervous necrosis in marine fish. *J. Gen. Virol.*, 76: 1563-1569, 1995.
- 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 Aquac. Society, 36: 223-227, 2005.
- Oh, M.J., Takami, I., Nishizawa, T., Kim, W.S., Kim, C.S., Kim, S.R. and Park, M.A.: Field tests of poly (I:C) immunization with nervous necrosis virus (NNV) in sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, (Thunberg). J. Fish Dis., 35: 187-191, 2012.
- Schneemann, A., Ball, L.A., Delsert, C., Johnson, J.E. and Nishizawa, T.: Family *Nodaviridae*. In Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. and Ball, L.A., editors. Virus taxonomy: Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier/Academic Press, London, United Kingdom. pp. 869-872, 2005.
- Sohn, S.G., Park, M.A., Oh, M.J. and Chun, S.K.: A fish nodavirus isolated from cultured sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. J. Fish Pathol., 11: 97-104, 1998.
- Sommerset, I., Skern, R., Biering, E., Bleie, H., Fiksdal, I.U., Grove, S. and Nerland, A.H.: Protection against Atlantic halibut nodavirus in turbot is induced by recombinant capsid protein vaccination but not following DNA vaccination. Fish Shellfish Immunol., 18: 13-29, 2005.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S.: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol., 4: 1596-1599, 2007.
- Thiéry, R., Cozien, J., Cabon, J., Lamour, F., Baud, M. and Schneemann, A.: Induction of a protective immune response against viral nervous necrosis in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* by using betanodavirus virus-like particles. J. Virol., 80: 10201-10207, 2006.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G.: The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res., 25: 4876-4882, 1997.
- Yamashita, H., Fujita, Y., Kawakami, H. and Nakai, T.: The efficacy of inactivated virus vaccine against viral nervous necrosis (VNN). Fish Pathol., 40: 15-21, 2005.
- Yuasa, K., Koesharyani, I., Roza, D., Mori, K., Katata, M. and Nakai, T.: Immune response of humpback grouper, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes) injected with the recombinant coat protein of betanodavirus. J. Fish Dis., 25: 53-56, 2002.
- 김진도, 김영진, 정성주, 키타무라신이치, 박성우, 오봉세, 변순규, 오명주: 바이러스성 신경괴사증 미감염 홍민어, *Sciaenops ocellatus*의 종묘생산. 한국어병학회지, 19: 65-72, 2006.
- 손상규, 박명애, 이생동, 전세규: 양식 능성어, *Epinephelus septemfasciatus*의 대량폐사에 관한 연구. 한국어병학회지, 4: 87-94, 1991.
- 손상규, 전세규: 능성어, *Epinephelus septemfasciatus*의 바이러스성 신경괴사증 바이러스의 병원성 연구. 한국어병학회지, 12: 107-113, 1999.

---

Manuscript Received : May 10, 2012

Revised : July 20, 2012

Accepted : July 23, 2012