

해수 사육 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)의 Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) 모니터링

김위식 · 공경희 · 전영호¹ · 오명주*

전남대학교 수산생명의학과, ¹전라남도 해양수산과학원

Monitoring of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus in Seawater-Reared Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*

Wi-Sik Kim, Kyoung-hui Kong, Young-Ho Jeon¹ and Myung-Joo Oh*

Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 59626, Korea

¹Jeollanam-do Ocean Fishery Science Institute, Goheung 59560, Korea

Mariculture of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* has been initiated in or around olive flounder *Paralichthys olivaceus* farms, where viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) is often detected in some fish. In the present study, we investigated VHSV infection in seawater-reared rainbow trout because VHSV has never been detected in salmonids in Korea. A total of 104 adult fish were tested for the presence of VHSV by reverse transcription-polymerase chain reaction, followed by virus isolation with the fathead minnow caudal trunk cell line. Cytopathic effects were observed in two samples but the virus was identified as infectious hematopoietic necrosis virus. Thus, VHSV was not isolated from seawater-reared rainbow trout.

Key words: Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Olive flounder, VHSV, Seawater, Monitoring

서 론

바이러스성출혈성패혈증(viral hemorrhagic septicemia, VHS)은 유럽에서 양식되고 있는 담수산 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)와 동북아시아에서 양식되고 있는 해산 넙치(*Paralichthys olivaceus*)에 대량 폐사를 유발하는 바이러스성 질병으로 알려져 있다(Wolf, 1988; Skall et al., 2005; Egusa et al., 2006). 우리나라에서는 2001년 양식산 넙치에서 VHS virus (VHSV, VHS의 원인 병원체)가 처음으로 검출되었고(Kim et al., 2003), 그 이후 다양한 지역에 위치한 넙치 양식장에서 VHS가 발생하였다(Kim et al., 2009; Kim et al., 2012). 국내 VHSV 분리주는 유럽 분리주들과는 달리 계통발생학적으로 genotype IVa에 속하며(Kim et al., 2011a; Ahn et al., 2013), 무지개송어(치어)에 대해 낮은 독력을 나타낸다(Kim et al., 2011b). 최근 우리나라에서는 동절기 남해안의 유힬 해상가두리 양식장의 활성화, 넙치 위주의 획일화된 양식산업 구조의 다양화, 송어 정소로부터 의약품의 원료가 되는 polydeoxyribonucleotide (PDRN) 추출 등을 위해 해수를 이용한 무지개송어(해수 송어) 양식이

시도되고 있다. 하지만 해수 송어 양식은 주로 넙치 양식장 또는 넙치 양식장 주변에서 실시되고 있어, 해수 송어는 넙치 유래 VHSV에 감염될 가능성이 있다. 본 연구에서는 해수에 사육 중인 무지개송어를 대상으로 VHSV의 감염 유무를 조사하였다.

재료 및 방법

2016년 1월부터 2017년 5월까지 전라남도 고흥과 제주도에 위치한 2곳의 양식장 및 전라남도 해양수산과학원 남해특산 시험장으로부터 총 106마리의 해수 송어(성어)를 채집하여 VHSV 검사를 실시하였다(Table 1). 채집된 시료는 외부와 내부 증상을 육안으로 관찰한 후 해부하여 신장, 비장 및 생식소를 취해 Hanks' balanced salt solution (HBSS; Gibco, USA)으로 1:9 (0.1 g/0.9 mL)가 되게 처리하여 마쇄하고, 그 마쇄액을 0.45 µm syringe filter로 여과하여 바이러스 분리용 시료로 사용하였다. 해당 시료는 fathead minnow caudal trunk cell line (FHM)에 접종하여 15°C에 배양하면서 세포변성효과(Cytopathic effect, CPE)를 관찰하였다. 분리된 바이러스

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2017.0621>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Korean J Fish Aquat Sci 50(5) 621-623, October 2017

Received 18 July 2017; Revised 18 August 2017; Accepted 13 October 2017

*Corresponding author: Tel: +82. 61. 659. 7173 Fax: +82. 61. 659. 6947

E-mail address: ohmj@jnu.ac.kr

Table 1. Detection of VHSV from seawater reared rainbow trout *Onchorhynchus mykiss*

Place	Year	Farm	Sampling date	Water temp. (°C)	Salinity (‰)	Rainbow trout		Virus isolation in FHM		RT-PCR
						Sampling No.	Weight (g)	Kd. and Sp.	Gonad	VHSV
Jeju	2016	A	Jan 28	14.7	NT	9	2,192±737	0% (0/9)	0% (0/9)	
			Mar 10	14.5	34	8	2,081±676	0% (0/8)	0% (0/8)	
			May 20	18	32	10	2,381±623	0% (0/10)	0% (0/9)	
Goheung	2017		Jan 20	11	25	16	3,827±1,617	0% (0/16)	0% (0/8)	
			Feb 8	10	25	3	2,336±1,447	0% (0/3)	0% (0/1)	
			Mar 14	NT	NT	10	2,567±1,000	0% (0/10)	0% (0/2)	
		C ¹	May 19	13.5	25	10	2,795±865	0% (0/10)		
			May 29	14	25	3	1,146±242	0% (0/3)		
			Jan 4	10	27	1	1,620	0% (0/1)	0% (0/1)	
			Jan 24	6.5	27.7	14	2,794±1,548	7% (1/14)	0% (0/13)	Negative
	Feb 15	7.4	28.1	10	2,134±804	0% (0/10)	11% (1/9)	Negative		
	Apr 25	14	31.1	10	1,664±583	0% (0/10)	0% (0/6)			
Total						104		1% (1/104)	1% (1/66)	

¹Jeollanam-do oceans fisheries science institute, Goheung branch. NT, not tested; temp., temperature; Kd., Kidney; Sp., Spleen.

를 동정하기 위해 CPE가 확인된 well의 배양 상층액을 사용하여 RNA를 분리한 후 VHSV 검출 primer를 사용하여 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)을 실시하였다. RNA는 200 µL의 바이러스 배양액으로부터 TRIZOL 시약(Gibco, USA)을 사용하여 매뉴얼에 따라 분리하였고, OIE (2017) 방법에 따라 VHSV의 viral nucleoprotein (VN) gene 으로부터 디자인된 VN forward (5'-ATG-GAA-GGA-GGA-ATT-CGT-GAA-GCG-3')와 VN reverse (5'-GCG-GTG-AAG-TGC-TGC-AGT-TCC-C-3') primer를 사용하여 RT-PCR을 실시하였다(PCR 산물: 505 bp). 또한 Kim (2015)이 제작한 VN IVa F (5'-ATG-GAA-GGG-GGA-ATC-CGT-GCA-GCT-3')와 VN IVa R (5'-GCG-GTG-AAG-TGC-TGC-AGT-TCT-C-3') primer를 사용하여 RT-PCR을 병행하였다(PCR 산물: 505 bp) (Kim, 2015).

결과 및 고찰

우리나라에서는 2001년부터 넙치에서 VHSV가 검출되고 있으나 현재까지 무지개송어에서 VHSV가 검출된다는 보고는 없다. 본 연구에서는 넙치 양식장(제주 A와 고흥 B 양식장)과 남해특산 시험장에서 해수로 사육하고 있는 무지개송어를 사용하여 VHSV의 감염 여부를 조사하였다(Table 1). 무지개송어는 채집 기간 동안 수온 6.5-18°C, 염분 농도 25-34‰에서 사육되었다. 총 104마리(A 양식장, 27마리; B 양식장, 42마리; 남해특산 시험장, 35마리)를 채집하여 임상검사를 한 결과, 모든 시료에서 특이적인 병변은 관찰되지 않았다. 신장과 비장 조직 마쇄액(104개 시료)과 생식소 마쇄액(66개 시료)을 제작한 후 FHM 세포에 접종한 결과, 남해특산 시험장에서 채집한 2개의

시료에서만 바이러스가 분리되었다(Table 1). 분리된 바이러스로부터 핵산을 분리한 후 2종류의 VHSV primer를 사용하여 RT-PCR을 한 결과, 2개의 바이러스 모두 VHSV 음성으로 확인되었다(Table 1). Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV)와 infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) 검출용 primer를 사용한 RT-PCR에서는 2개의 바이러스 모두 IHNV에 양성을 보였다(data not shown).

무지개송어 양식장에서 바이러스성 질병(IHN)이 발생하게 되면 질병이 발생한 시기에서는 바이러스가 분리되나 약 50일이 지난 이후의 생존어에서는 성 성숙이 이루어지기 전까지 바이러스가 분리되지 않는다(Bootland and Leong 1999). 그러나 성 성숙이 이루어졌을 경우 바이러스가 분리되게 된다(Bootland and Leong 1999). 본 연구에서는 최소 1년생 이상의 성어(평균 체중, 1,146 g 이상)를 사용하여 생식소와 함께 신장 및 비장 조직을 사용하여 VHSV 검사를 하였으나 모든 시료에서 VHSV는 분리되지 않았다. Kong (2017)은 2014-2016년 동안 해수에 사육 중인 연어과 어류 약 200마리(무지개송어, 88마리)를 사용하여 병원체 검사를 한 결과 모든 시료에서 VHSV가 검출되지 않았다. 국내에서 해수 송어 양식은 넙치 양식장 또는 넙치 양식장 주변에서 약 3년간 시도되고 있으나 현재까지 VHSV에 의한 피해가 발생한 적이 없으며, 또한 사육 중인 해수 송어에서 VHSV가 검출된 바 없다(본 연구 결과; Kong, 2017). 더욱이 국내 넙치 유래 VHSV는 무지개송어 치어(약 1.1 g)에는 병원성을 지니지만 해수 송어(성어)에는 병원성이 없거나 아주 낮은 것으로 감염실험을 통해 확인되었다(Kim et al., 2011b; Kim et al., 2016). 따라서 기존에 보고된 넙치 유래 VHSV가 변이되지 않는다면 무지개송어(성어)를 해수에 사육하여도 넙치 유래

VHSV (genotype IVa)에 의한 피해는 없을 것으로 추정된다.

사 사

이 논문은 2016년 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원을 받아 수행되었습니다(무지개송어의 해면양식에 서 감염성 질병의 발생현황 및 저감 방안 연구).

References

- Ahn SJ, Cho MY, Jee BY and Park MA. 2013. Phylogenetic analysis of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) isolates from Asia. *J Fish Pathol* 26, 149-161.
- Bootland LM and Leong JC. 1999. Infectious haematopoietic necrosis virus. In: Woo PTK and Bruno DW (eds) *Fish Diseases and Disorder, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections*. Cab international, New York, U.S.A. 57-121.
- Egusa S, Wakabayashi H and Muroga K. 2006. *Infectious and parasitic diseases of fish and shellfish*. Life Science Publishing Co., Seoul, Korea. 54-58.
- Kim HJ. 2015. Validation of the sensitivities of one-step and two-step reverse-transcription PCR methods for detection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) IVa isolates from cultured olive flounder in Korea. *Aquaculture* 448, 359-364.
- Kim IW, Cho MY, Lee HN, Han HJ, Oh YK, Lee SJ, Jee BY, Myeong JI and Won KM. 2012. Diagnosis case of viral hemorrhagic septicemia (VHS) in adult olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Korean J Fish Aquat Sci* 45, 666-674.
- Kim SM, Lee JI, Hong MJ, Park HS and Park SI. 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.
- Kim WS, Jeong HN, Kong KH, Kim AR, Jeon YH and Oh MJ. 2016. Experimental infection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV, genotype IVa) from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Korean J Ichthyol* 28, 141-146.
- Kim WS, Jung SJ, Kim JO, Kim DW, Kim JH and Oh MJ. 2011a. 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 hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea. *Aquaculture* 296, 165-168.
- Kim WS, Nishizawa T, Kim JH, Suebsing R, Jung SJ and Oh MJ. 2011b. Korean and Japanese isolates of viral hemorrhagic septicemia virus from olive flounder are pathogenic to rainbow trout fry. *Fish Pathol* 46, 112-115.
- Kong KH. 2017. Disease monitoring of maricultured salmonid fish. Master thesis. Chonnam National University, Yeosu, Korea.
- OIE (Office International des Epizooties). 2017. Manual of diagnostic tests for aquatic animals. Viral haemorrhagic septicaemia. Retrieved from http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_vhs.pdf on Jun 18, 2017.
- Skall HF, Olesen NJ and Møllergaard S. 2005. Viral haemorrhagic septicemia virus in marine fish and its implications for fish farming-a review. *J Fish Dis* 28, 509-529.
- Wolf K. 1988. Viral hemorrhagic septicemia virus. In: Wolf K (ed) *Fish viruses and fish viral diseases*. Cornell University Press, Ithaca, U.S.A., 217-249.