

신경괴사증바이러스(Nervous Necrosis Virus, NNV) 모니터링을 통한 무감염 능성어(*Hyporthodus septemfasciatus*)친어의 선발

김시우^{1,3} · 김위식¹ · 서한길² · 김경민³ · 오명주^{1*}

¹전남대학교 수산생명의학과, ²국립수산물연구원 병리연구과, ³국립수산물연구원 남해연구소 양식산업과

Monitoring of Nervous Necrosis Virus (NNV) in the Broodstock of Seven Band Grouper *Hyporthodus septemfasciatus*

Si-Woo Kim^{1,3}, Wi-Sik Kim¹, Han-Gill Seo², Kyong Min Kim³ and Myung-Joo Oh^{1*}

¹Department of Aquaculture medicine, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea

²Pathology Research Division, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 46083, Korea

³South Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Yeosu 59780, Korea

We investigated the infection of nervous necrosis virus (NNV) in seven band grouper *Hyporthodus septemfasciatus* broodstocks, which have been reared in aquaculture farms in South Korea during 2012-2014. To investigate the prevalence of NNV within the broodstock, egg, sperm, and blood were sampled in the spawning season. The egg and sperm samples were subjected to a nested reverse transcription (RT) polymerase chain reaction (PCR) assay to detect NNV and were inoculated on SSN-1 cells to culture the virus. Blood samples were used to detect antibodies against NNV using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Positive values from ELISA were found in 39 of 162 samples (24%) in 2012, and 13 of 28 samples (46%) in 2014. Additionally, 4 of 34 broodstocks (11%) investigated in 2013-2014 were determined to be carriers from the nested RT-PCR and *in vitro* cultivation. The broodstocks in which antibodies against NNV were detected by ELISA, or in which NNV was detected by the nested RT-PCR assay, posed a risk of vertical transmission of NNV. Therefore, it is necessary to select virus-free broodstocks in seed production to reduce the possibility of the vertical transmission of NNV.

Key words: Sevenband grouper, BroodStock, Nervous necrosis virus, ELISA, Vertical transmission

서 론

능성어(*Hyporthodus septemfasciatus*)는 분류학적으로 농어목 바리과에 속하는 열대어종 해산어로, 국내에는 남해안 및 제주도 연안에서 서식한다. 능성어는 저지방, 고단백으로 맛이 좋아 횡감 등의 식용으로 인기가 높으며, 단가가 비싸 고급양식 품종으로 주목 받고 있다. 우리나라는 2003년에 능성어 인공 종묘 생산이 성공했지만 그 이후 산업화는 미흡한 실정이었으며, 국내 능성어 양식은 90년대 후반부터 실시되어 2010년 양식어장 15 개소에서 총 269톤을 생산하였으며, 2011년 150톤, 2013년 56톤을 생산하여 줄어드는 양상을 보이고 있다(statistics Korea, 2017). 능성어 양식이 활성화 되지 못한 이유는 체계적인 친어 관리 매뉴얼이 확립되어 있지 않은 관계로 안정적인 종묘

생산이 어려웠고, 아열대성 어종인 능성어를 양식하기에 적합한 지역이 확인되지 못하였던 점, 낮은 종묘생산 효율 그리고 질병에 의한 폐사 등 이 원인으로 작용하였다(Hong et al., 2015; Kim and Kim, 2015). 능성어의 양식과정 중에 발생하는 대표적인 바이러스성 질병으로는 바이러스성신경괴사증(viral nervous necrosis, VNN)이 보고되어 있다. VNN은 여름철 고수온기에 유행하는 질병으로 종묘생산단계의 자어부터 성어까지 광범위하게 발병하여 높은 누적 폐사율을 발생시킨다(Munday et al., 2002). VNN은 일본, 대만, 노르웨이, 프랑스, 인도네시아 등 전 세계적으로 광범위한 지역에서 발병하며 능성어, 흑점줄전갱이(*Pseudocaranx dentex*), 넙치(*Paralichthys olivaceus*), 유럽농어(*Dicentrarchus labrax*), 홍민어(*Sciaenops ocellatus*), 황점볼락(*Sebastes oblongus*) 등 5목 11과에 걸쳐 25종의 어

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2017.0527>



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) 527-533, October 2017

Received 25 September 2017; Revised 12 October 2017; Accepted 23 October 2017

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

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

중에서 발병한다(Munday et al., 2002). 국내에서는 1989년 여름, 남해안의 능성어 양식장에서의 발병이 최초 보고이며, 당시 80%의 누적 폐사율을 나타내었다(Sohn et al., 1991). 감염어의 특징적인 외부증상으로는 척추만곡, 선회유영, 체색흑화 등이 알려져 있고, 병리학적 증상으로 뇌와 안구 망막의 신경 조직에 공포화 및 괴사 병소가 나타난다(Nguyen et al., 1996; Nopadon et al., 2009).

VNN의 원인 병원체는 *Nodaviridae*에 속하는 nervous necrosis virus (NNV)이며, 바이러스 외피가 없고, 핵산형은 positive sense의 single-stranded RNA로 구성되어있다. Virion의 크기는 26-34 nm로 소형이며, 정20면체의 구조를 하고 있다(Munday et al., 2002). NNV는 coat protein gene의 nucleotide sequence의 차이에 따라 striped jacked nervous necrosis virus (SJNNV), tiger puffer nervous necrosis virus (TPNNV), barfin flounder nervous necrosis virus (BFNNV), red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) 및 turbot nervous necrosis virus (TNV) 등 5 group의 genotype으로 나뉘어진다(Johansen et al., 2004; Nishizawa et al., 1997; Nishizawa et al., 1995). 이들 중에서 국내에서는 RGNNV와 SJNNV에 의한 발병이 보고되고 있다(Oh et al., 2005).

NNV는 산란용 친어의 난을 경유하여 생산된 종묘로 전파되는 수직감염이 흑점줄전갱이(*P. dentex*), 유럽농어(*D. labrax*), 노랑가자미(*V. moseri*) 및 바리과 어종인 감자바리(*E. tukula*) 등에서 보고된 바 있다(Nguyen et al., 1996; Peducasse et al., 1999; Breuil et al., 2000; Watanabe et al., 2000; Breuil et al., 2002; Kai et al., 2010). 또한 현재까지 NNV의 수직감염을 막기 위하여 친어 선별, 난 소독 및 사육수 소독을 통한 병원체의 유입 차단법이 현장에서 적용되고 있다(Mushiake et al., 1994; Arimoto et al., 1996; Grotmol and Totland, 2000; Watanabe et al., 2000). 본 연구에서는 수직 감염원 차단을 통한 안정적인 능성어 종묘생산을 위해, RGNNV 감염이력 확인을 통한 무감염 상태의 건전한 능성어 친어를 확보를 목적으로, 2012년부터 2014년에 걸쳐 남해안 일대의 능성어 친어를 대상으로, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)법 및 NNV검출 nested polymerase chain reaction (PCR)법 등을 적용하여 NNV 무감염 능성어 친어를 선별하고, NNV 무감염 능성어 치어생산을 시도하였다.

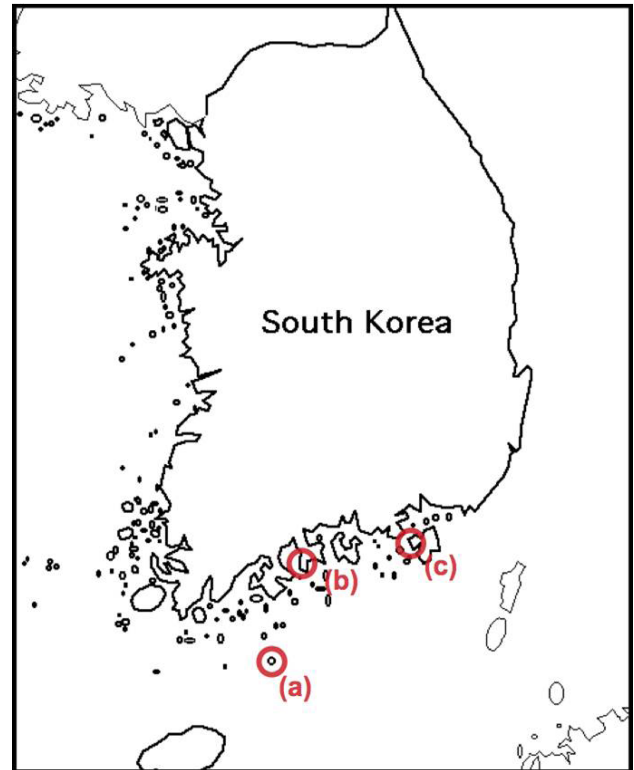


Fig 1. Broodstock sampling location in Korea (a)Geomun island, (b)Yeosu, (c) Tongyeong.

재료 및 방법

능성어 친어 샘플링

2012년-2014년 여름철 산란시기에 앞서 한국 남해안 연안의 거문도 해상가두리 양식장, 여수 육상수조식 양식장, 통영 육상수조식 양식장에서 사육중인 4-6년생(7.3 ± 1.45 kg / 73 ± 5.6 cm) 능성어 친어에서 난, 정자와 혈액을 샘플링 하였다(Fig. 1). 능성어 친어 샘플링은 2012년 168마리, 2013년 3마리, 2014년 31마리를 아래의 방법으로 실시하였다(Table 1).

바이러스

NNV 특이 항체 검출을 위한 항원 및 바이러스 검출을 위한 표

Table 1. List of experiment done in 2012-2014, and result

Year	Sampling location	Number of tested broodstock	PCR	ELISA	<i>in vitro</i> cultivation
2012	Geomun island	168	N.T	45/166 (27 %)	1/2
2013	Yeosu	3	2/3 (66%) ¹	N.T	0/1
2014	Tongyeong	31	2/31 (6.5%) ¹	14/31 (45%)	0/19

¹Positive sample/Total sample (positive percentage). N.T, not tested.

준 바이러스는 2008년 여수에 위치한 양식장에서 분리한 NNV Yeosu08 isolate (RGNNV)를 사용하였다(Kim et al., 2012). 바이러스 배양을 위한 어류 주화세포는 NNV에 감수성을 나타내는 Striped Snakehead (SSN-1) 주화세포를 사용하였다. 세포 배양액은 10% (V/V) fetal bovine serum (FBS), 100 IU/ml penicillin G, 100 ug/ml streptomycin을 첨가한 Leibovitz's L-15 medium을 사용하였고 배양된 세포는 25℃ 배양기에서 배양하였다. 25 cm² 세포배양 플라스크(Corning, USA)에 배양된 SSN-1 cell에 NNV Yeosu08을 접종한 후, 25℃에 배양하면서 세포변성 효과(cytopathic effect, CPE)를 관찰하였다. 바이러스는 7일간 배양한 후, 8,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 세포 잔유물을 제거하고 1.5 mL tube에 200 uL 씩 분주하여 실험에 사용하기 전까지 -80℃에 보관하였다.

NNV 검출을 위한 RT-PCR 및 nested RT-PCR

난과 정자로부터 Total RNA를 추출하기 위해서 miRNeasy MiNi Kit (Qiagen, USA)를 사용하였고, 제조사의 매뉴얼에 따라 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 즉시 사용하거나, -80℃에 보관하였다. 추출한 total RNA를 이용하여 cDNA를 합성하기 위하여 M-MLV reverse transcriptase (Bioneer, Korea)를 사용하였다. 추출한 RNA 5 uL와 R3 (5'-CGA GTC AAC ACG GGT GAA GA-3') reverse primer (10 pmol) 2 uL, RNase-free water 4 uL를 먼저 섞고 65℃에서 10분간 반응시켜 RNA와 primer를 denaturation 시켜주고 반응이 끝난 후 곧바로 얼음에 보관하였다. RNA와 primer를 65℃에서 10분간 반응시키는 동안 5×reaction buffer 4 uL, 10 mM mixed dNTP 2 uL, 100 mM DTT 2 uL, RNase inhibitor (40 U/uL) 0.5 uL, M-MLV reverse transcriptase (200 U/uL) 0.5 uL를 섞어 준비하고 10분 반응이 끝난 후 같이 섞어 주었다. 전체 20 uL volume의 reaction mixture는 MyGenie 32 Thermal Block (Bioneer, Korea)을 이용하여 37℃에서 1시간, 94℃에서 5분, 4℃ 3분 동안 반응시켰다. RT-PCR에 사용한 primer는 RGNNV RNA2의 T4 부위 증폭을 위해서 forward primer로 F2 (5'-CGT GTC AGT CAT GTG TCG CT-3')와 reverse primer로 R3 (5'-CGA GTCAAC ACG GGT GAA GA-3')를 이용하였다(Nishizawa et al., 1994). PCR조건은 pre-incubation 72℃ 10분, pre-denaturation 95℃ 2분, denaturation 95℃ 40초, annealing 50℃ 40초, extension 72℃ 40초 반응을 30 cycle을 기준으로 실시하고 post-extension 72℃ 10분으로 PCR을 종료하였다. Nested RT-PCR에 사용한 primer는 forward primer로 NF2 (5'-GTT CCC TGT ACA ACG ATT CC-3')와 reverse primer로 NR3 (5'-GGA TTT GAC GGG GCT GCT CA-3')를 이용하였다(Thiery et al., 1999). PCR 조건은 pre-denaturation 94℃ 2분, denaturation 94℃ 40초, annealing 50℃ 40초, extension 72℃ 40초 반응을 25 cycle 실시하고 post-extension 72℃ 10분으로 과정을 종료하였다. PCR 산물 5 uL를 1% agarose gel, 100

Volt 조건에서 25분간 전기영동하여 UV transilluminator (Bio-Rad, USA)상에서 밴드를 확인하였다.

배양세포주를 이용한 NNV 바이러스 분리배양

능성어 친어에서 채집한 난을 hanks' balanced salt solution (HBSS, Gibco, USA)으로 1:9로 희석하여 마쇄하고, 그 마쇄액을 0.45 µm syringe filter (Pall corporation, USA)로 여과하여 시료를 제작하였으며, 해당시료는 SSN-1 주화세포에 접종하여 25℃에 배양하면서 CPE를 관찰하였다.

혈액 중 NNV 특이항체 검출 ELISA

능성어 친어의 미부정맥에서 채혈하여 원심분리(6,000 rpm, 4℃, 20 min)를 통해 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 실험에 사용하기까지 -20℃에 보관하였다. 항체검출 ELSIA 실험방법은 Kim et al. (2007)의 실험방법을 참고하여 다음과 같이 실시하였다. 10^{8.05} TCID₅₀/mL의 Yeosu08 isolate (RGNNV)를 멸균된 증류수로 320배 희석한 후 ELISA plate에 각 50 uL씩 분주한 후, 37℃에서 overnight하여 항원을 코팅하였다. Tween-20이 0.05% 포함된 PBS (T-PBS)로 3번 세척하였고 5% skim milk를 380 µL씩 넣어 20℃에서 1시간 동안 배양하였다. 1차 항체는 능성어 혈청을 5% skim milk로 희석(40배)하여 1시간 반응시킨 후, 시료당 2배수의 well에 50 µL씩 분주하였고, 2차 항체는 5% skim milk로 500배 희석된 토끼 항 능성어 IgM 혈청을 50 µL씩 분주하였으며, 3차 항체는 5% skim milk로 1000배 희석된 peroxidase conjugated goat anti rabbit immunoglobulin antibody (DakoCytomation, Denmark)을 50 µL씩 분주하였다. 각각의 항체 반응은 25℃에서 1시간 동안 반응하였다. T-PBS로 5번 수세하였고 ELISA 발색액(100 mM Na₂HPO₄, 50 mM citric acid, 1 mg/ 1 mL o-phenylenediamine, 0.03% H₂O₂)을 각 well에 50 µL씩 분주한 후 25℃에서 30분 동안 발색하였다. 각 well에 2N H₂SO₄를 50 µL씩 넣은 후 ELISA plate reader (Spectra max 340, USA)로 492 nm에서 O.D (optical density)값을 측정하였다.

결 과

NNV 바이러스 분리배양

능성어 친어 어체내의 NNV 보균유무를 확인하기 위해, 산란기에 앞서 능성어 친어의 난을 채집하여 시료를 제작하였으며, 해당시료는 SSN-1 주화세포에 접종하여 25℃에 배양하면서 세포변성 효과(CPE)를 관찰하여 바이러스 분리를 시도하였다. 2012년 2마리의 친어에서 취한 난을 이용한 세포접종을 통한 바이러스 분리실험을 실시한 결과 1마리의 난시료에서 NNV의 특징적인 공포를 형성하는 세포변성 효과를 확인하였고(Fig. 3), CPE가 나타난 세포배양액을 시료로 NNV 검출 RT-PCR을 실시한 결과 양성밴드가 나타나 NNV가 분리 배양됨을

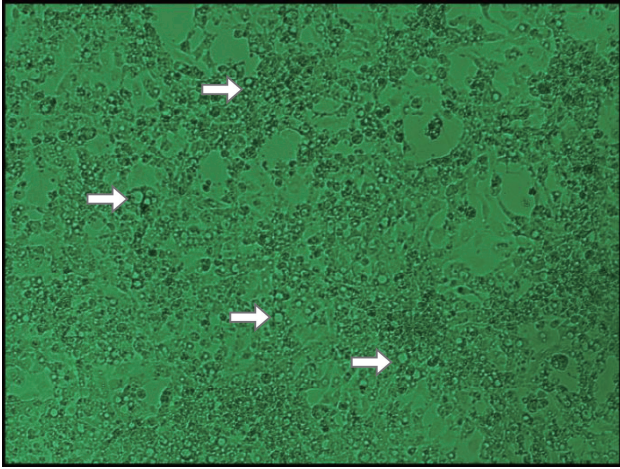


Fig. 3. SSN-1 cell, inoculated with homogenized egg supernatant, showed typical NNV CPE. NNV, nervous necrosis virus; CPE, cytopathic effect.

확인할 수 있었다. 2013년 1마리, 2014년 19마리의 친어에서 취한 난을 이용하여 NNV의 분리배양을 실시한 결과 전 시료에서 CPE가 나타나지 않아 음성임을 확인하였다.

NNV 바이러스 특정유전자의 검출

능성어 친어 어체내의 NNV 보균유무를 확인하기 위해, 산란기에 앞서 능성어 친어의 난과 정자시료를 채집하여, nested RT-PCR법 적용한 NNV 검출을 실시하였다(Table 1). 2013년 3마리의 친어에서 채집한 난과, 14년 31마리(암컷 22마리, 수컷 9마리)의 친어에서 채집한 난과 정자를 대상으로 실시한 RT-PCR 결과, 2013년 2개의 난 시료와 2014년 2개의 정자 시료에서 양성 결과 확인할 수 있었다.

혈액 중 NNV 특이항체 검출 ELISA 결과

능성어 친어의 NNV 감염이력과 Anti-NNV 특이항체 보유유무를 확인하기 위해, 2012-2014년 동안 산란기에 앞서 능성어 친어의 혈액을 이용하여 ELISA실험을 실시하였다(Table 1). 2012년 총 166마리의 능성어 친어를 대상으로 ELISA를 실시한 결과 흡광도(optical density, O.D) 값 0.1 이상을 나타내는 45마리에서 NNV 특이항체가 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 2014년 능성어 친어 ELISA의 결과는 31마리의 능성어 친어 중 14마리에서 O.D 값 0.1 이상을 확인하여, 검사 친어 중 14마리에서 NNV 특이항체가 존재함을 확인하였다(Fig. 2).

종묘생산

2014년 경남 통영의 양식장에서 ELISA와 RT-PCR의 결과 모두에서 음성이 확인된 암·수 능성어 친어를 선별하여 종묘생산에 사용하였다. 수컷 2마리와 암컷 6마리에서 총 4,500 mL의 수정란을 취하였고, 침전란을 제거한 2,700 mL의 부상란 중 1,000 mL에서 약 1,000,000마리의 치어를 부화시켰다. 종묘생산에 앞서 종묘생산장의 사육수조와 기구의 소독이 이루어졌으며, 오염된 사육수를 통한 NNV감염을 차단하기 위하여 UV멸균 해수를 사용하였다. 아울러 초기 먹이생물로 공급되는 로티퍼와 알테미아 유생의 NNV 오염유무를 먹이공급에 앞서 RT-PCR을 실시하여 검사하였고, 음성의 결과를 확인 후 공급하였다. 이후 정기적인 샘플링을 실시하여 건강한 능성어 치어, 폐사어, 바닥의 침전물(배설물, 먹이잔여물)에 대해서 NNV 검출 RT-PCR을 하였으며, 종묘생산 기간 중 전 시료에서 NNV는 검출되지 않았다. 14년 10월경 종묘로 판매가능한 8-10 cm (14.7 ± 1.4 g) 크기로 성장한 능성어 치어 약 3만마리를 생산하였다. 친어선별을 통한 NNV 수직감염 예방과 종묘생산기간 중 외부로부터의 NNV 수평감염 차단의 결과, 능성어 자치어 시기의 NNV로 인한 대량폐사 없이 건강한 능성어 치어를 생산할 수 있었다.

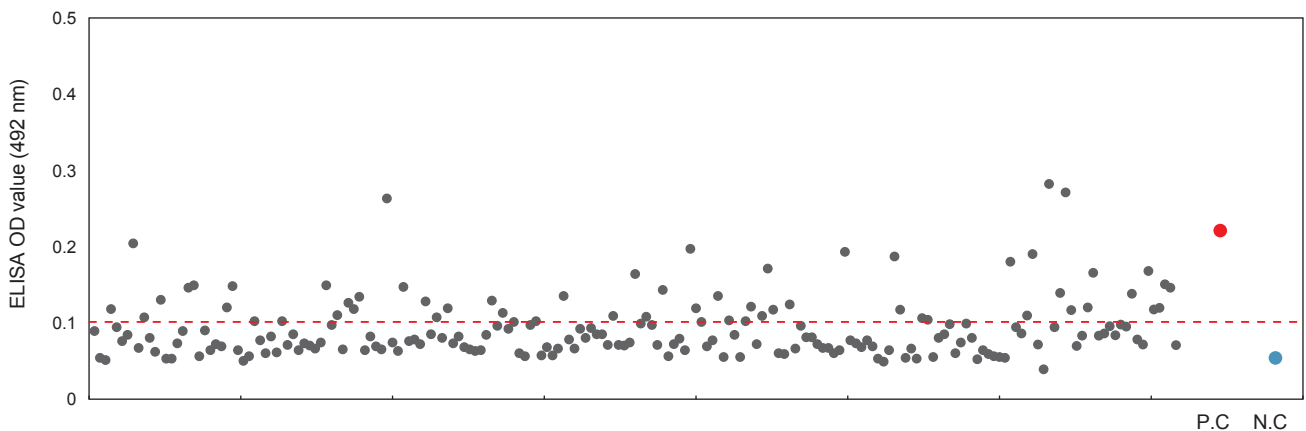


Fig. 2. Year of 2012 & 2014, bloodstock antibody detection ELISA result. Each dot indicate individual broodstocks. 59 samples out of 197 samples (30%) showing positive values ($OD \geq 0.1$). P.C, positive control; N.C, negative control.

고 찰

NNV의 경우 친어에서 난으로 전파되는 수직감염이 다양한 어종에서 확인되었고(Peducasse et al., 1999; Breuil et al., 2000; Watanabe et al., 2000; Breuil et al., 2002; Kai et al., 2010), 현재까지 NNV의 수직감염을 막는 방법으로 난소독 및 오염된 사육수 소독을 통한 병원체의 유입을 차단하는 간접적인 수단만이 이루어 지고 있다(Mushiake et al., 1994; Arimoto et al., 1996; Grotmol and Totland, 2000; Watanabe et al., 2000). 하지만 NNV의 수직감염을 효과적이고 적극적으로 차단하기 위해서는 ELISA와 RT-PCR을 통한 NNV보균 친어와 감염된 난을 배제하는 것이 권장된다(Kim and Kim., 2015).

NNV의 진단에는 뇌, 망막 조직에서의 VNN의 특징적인 공포변성을 광학현미경으로 확인하거나, 전자현미경, 혈청학, 분자생물학적 방법을 통한 바이러스 혹은 바이러스 핵산물질의 검출, 혈청과 체액에서 NNV 특이 항체의 검출, 어류주화세포를 사용한 바이러스 분리배양법 등이 있다(Munday et al., 2002). 어류주화세포를 사용한 분리배양법의 경우 시료접종 후 7일-15일간 관찰하여 세포변성효과가 나타나는 것을 관찰하여야 하기에 시간이 오래 걸리고, 검출 바이러스에 감수성이 있는 주화세포가 필요하기에 사용 가능한 주화세포가 없는 경우 적용이 불가능 하다. 이에 반해 NNV의 유전자를 검출하는 RT-PCR법은 빠른 시간내에 병원체의 검출이 가능하고 검출감도가 높아 어류병원 바이러스를 검출하는데 널리 사용되고 있다.

능성어 친어에서 취한 난과 정자를 이용하여 NNV의 검출을 시도한 결과, nested RT-PCR실험에서 총 34개의 난과 정자시료 중 4개(난 2, 정자 2)의 양성결과를 확인할 수 있었고 바이러스 분리배양을 위한 세포접종실험에서 총 22개의 난을 이용하여 NNV배양을 시도한 결과 1개의 난에서 NNV의 배양을 확인하였다. 이상의 결과 능성어 친어에서 난과 정자 모두 NNV가 검출되었기에, 능성어 친어의 선별시 암컷과 수컷 모두 선별해야 함을 확인할 수 있었다(Nishizawa et al., 1997; Watanabe et al., 2000; Janina and Kim, 2016).

질병에 감염 후 회복하였지만 체내에 질병을 보유하고 있거나(잠복감염, carrier stage), 보균 친어에서 생산된 정자 난자의 경우 질병감염 후 증상을 나타내거나 폐사한 개체와 달리 소량의 바이러스가 존재한다(Agius et al., 1982; Munro et al., 2004). 따라서 기존의 증상, 폐사 개체에서의 병원체 검출 방법과는 달리 친어, 난과 자치어의 선별시에는 고감도의 병원체 검출 방법이 필요할 것으로 사료된다.

본 실험에서는 능성어 친어를 대상으로 과거의 NNV감염이력과 현재의 NNV 보균유무를 확인하기 위하여 ELISA를 실시하였고, 이를 통해 NNV에 대한 특이적인 항체 값을 측정하였다. 본 실험의 결과 2012년 166마리 중 45마리, 2014년 31마리 중 14마리의 능성어 친어에서 NNV항체가 기준치 이상으로 검출되었다. 이는 총 검사 능성어 친어 197마리 중 59마리(30%)

는 과거에 NNV에 노출되어 감염 후 회복하였거나, 현재 NNV 보균상태임을 의미한다. 따라서 본 연구결과의 분석을 통하여 능성어 친어의 NNV에 대한 노출경험 혹은 보균유무를 확인할 수 있었다. 따라서 능성어 친어의 결정에 있어서는 ELISA 나 nested RT-PCR결과를 종합하여 과거의 NNV 노출이력이 없으며, 현재도 감염되지 않은 개체를 선정하는 것이 SPF 종묘 생산에 효과적이라고 생각된다. 아울러 양성 및 음성 기준 값의 보다 세밀한 기준설정을 위하여 추가적인 연구가 필요하다고 여겨진다.

2014년 위의 방법으로 친어를 선별하고, NNV음성 친어에서 난과 정자를 취하여 능성어 종묘생산을 실시한 결과 능성어 자치어에서 NNV가 검출되지 않았고 초기 대량폐사는 나타나지 않았다. 이상의 결과를 근거로 nested RT-PCR실험과 바이러스 분리배양실험을 통한 NNV항원의 검출, ELISA실험을 통한 NNV 특이항체의 검출의 두 방법은 상호 보완적으로 작용하여 건강한 친어의 선별에 효과적으로 사용이 가능함을 확인할 수 있었다.

능성어 치어의 VNN 수직감염예방과 안정적인 종묘생산을 위해 산란시기에 앞서 당해년도 채란이 예상되는 수컷과 암컷 친어의 감염유무를 검사하여 보균 친어와 건강한 친어를 구분하여 선별하는 것이 필수적인 절차라 여겨진다. 아울러 수직감염의 예방을 위한 건강한 친어의 선별뿐 아니라 병원체의 외부 유입을 통한 감염을 차단하기 위해 사육시설과 사육해수의 철저한 소독과 멸균을 실시하고, 자치어의 먹이생물로 공급되는 로티퍼, 알테미아 역시 감염의 경로로 작용할 수 있기에(Cano et al., 2012; Zhang et al., 2006) 철저한 관리와 사전 검사가 필요할 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 2017년도 국립수산물과학원 수산시험연구사업 “해상가두리 양식자동화 모델 개발 (R2017020)”의 지원으로 수행된 연구입니다.

References

- Agius C, Mangunwiryo H, Johnson H and Smail DA. 1982. A more sensitive technique for isolating infectious pancreatic necrosis virus from asymptomatic carrier rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J Fish Dis 5, 285-292. 10.1111/j.1365-2761.1982.tb00484.x.
- Arimoto M, Sato J, Maruyama K, Mimura G and Furusawa I. 1996. Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). Aquaculture 143, 15-22. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(96\)01261-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(96)01261-6).
- Breuil G, Pepin J, Boscher S and Thiery R. 2002. Experimental vertical transmission of nodavirus from brood fish to

- eggs and larvae of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). J Fish Dis 25, 697-702. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2002.00406.x>.
- Breuil G, Pepin J, Castric J, Fauvel C and Thiery R. 2000. Detection of serum antibodies against nodavirus in wild and farmed adult sea bass: application to the screening of brood stock in sea bass hatcheries. B Eur Assoc Fish 20, 95-100.
- Cano I, Valverde EJ, Garcia-Rosado E, Alonso MC, Lopez-Jimena B, Ortiz-Delgado JB, Borrego JJ, Sarasquete C and Castro D. 2012. Transmission of lymphocystis disease virus to cultured gilthead seabream, *Sparus aurata* L., larvae. J Fish Dis 20, 569-576. <https://doi.org/10.1111/jfd.12011>.
- Grotmol S and Totland G. 2000. Surface disinfection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* eggs with ozonated sea-water inactivates nodavirus and increases survival of the larvae. Dis Aquat Organ 39, 89-96. <https://doi.org/10.3354/dao039089>.
- Hong CG, Cho JK, Park JY, Son MH, Park JM, Han KH and Kang HW. 2015. Ovulation Induction Effect of Seven-band Grouper, *Epinephelus septemfasciatus* by Treating Hormones. J Fish Mar Sci Educa 27, 981-989. <https://doi.org/10.13000/jfmse.2015.27.4.981>.
- Huang B, Tan C, Chang SF, Munday B, Mathew JA, Ngoh GH and Kwang J. 2001. Detection of nodavirus in barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), using recombinant coat protein-based ELISA and RT-PCR. J Fish Dis 24, 135-142. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2001.00270.x>.
- Janina ZC and Kim DT. 2016. Understanding the interaction between Betanodavirus and its host for the development of prophylactic measures for viral encephalopathy and retinopathy. Fish Shellfish Immunol 53, 35-49. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.033>.
- Johansen R, Sommerset I, Tørud B, Korsnes K, Hjortaa MJ, Nilsen F, Nerland AH and Dannevig BH. 2004. Characterization of nodavirus and viral encephalopathy and retinopathy in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). J Fish Dis 27, 591-601. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00581.x>.
- Kai YH, Su HM, Tai KT and Chi SC. 2010. Vaccination of grouper broodfish (*Epinephelus tukula*) reduces the risk of vertical transmission by nervous necrosis virus. Vaccine 28, 996-1001. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.10.132>.
- Kim CS, Kim WS, Nishizawa T and Oh MJ. 2012. Prevalence of viral nervous necrosis (VNN) in sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus* farms. J Fish Pathol 25, 111-116. <https://doi.org/10.7847/jfp.2012.25.2.111>.
- Kim WS and Kim JO. 2015. Prevention Strategies for Viral Nervous Necrosis (VNN) in Sevenband Grouper *Epinephelus septemfasciatus* Aquaculture Farms. Korean J Fish Aquat Sci 48, 403-410. <https://doi.org/10.5657/kfas.2015.0403>.
- Kim WS, Nishizawa T and Yoshimizu M. 2007. Non-specific adsorption of sheep immunoglobulin M (IgM) to blocking reagents on ELISA plate wells. Dis Aquat Org 78, 55-59. <http://dx.doi.org/10.3354/dao01843>.
- Munday BL and Nakai T. 1997. Nodaviruses as pathogens in larval and juvenile marine finfish. World J Microbiol Biotechnol 13, 375-381.
- Munro ES, Gahlawat SK and Ellis AE. 2004. A sensitive non-destructive method for detecting IPNV carrier Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by culture of virus from plastic adherent blood leucocytes. J Fish Dis 27, 129-134. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00520.x>.
- Mushiaki K, Nishizawa T, Nakai T, Furusawa I and Muroga K. 1994. Control of VNN in striped jack-selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain-reaction (PCR). Fish Pathol 29, 177-182. <https://doi.org/10.3147/jsfp.29.177>.
- Nguyen HD, Nakai T and Muroga K. 1996. Progression of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) infection in naturally and experimentally infected striped jack *Pseudocaranx dentex* larvae. Dis Aquat Organ 24, 99-105. <https://doi.org/10.3354/dao024099>.
- Nishizawa T, Furuhashi M, Nagai T, Nakai T and Muroga K. 1997. Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. Appl Environ Microbiol 64, 1633-1636.
- Nishizawa T, Mori KI, Furuhashi M, Nakai T, Furusawa I and Muroga K. 1995. 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. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-7-1563>.
- Nishizawa T, Mori KI, Nakai T, Furusawa I and Muroga K. 1994. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis (SJNNV). Dis Aquat Organ 18, 103-107. <https://doi.org/10.3354/dao018103>.
- Nopadon P, Aranya P, Tipaporn T, Toshihiro N, Takayuki K, Masashi M and Makoto E. 2009. Nodavirus associated with pathological changes in adult spotted coralgroupers (*Plectropomus maculatus*) in Thailand with viral nervous necrosis. Res Vet Sci 87, 97-101. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.01.004>.
- Oh MJ, Jung SJ and Kitamura SI. 2005. Comparison of the coat protein gene of nervous necrosis virus (NNV) detected from marine fishes in Korea. J World Aquac Soc 36, 223-227. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2005.tb00389.x>.
- Peducasse S, Castric J, Thiery R, Jeffroy J, Le Ven A and Baudin Laurencin F. 1999. Comparative study of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax* infected in different ways. Dis Aquat Organ 36, 11-20. <https://doi.org/10.3354/dao036011>.
- Sohn SG, Park MA, Lee SD and Chun SK. 1991. Studies on the mass mortality of the cultured grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. J Fish Pathol 4, 87-94.
- Statistics Korea. 2017. Fish farm trends survey. Retrieved from

<http://kostat.go.kr/wnsearch/search.jsp> on Feb 11, 2017.

- Thiery R, Raymond JC and Castric J. 1999. Natural outbreak of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*: study by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Virus Res* 63, 11-17. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(99\)00053-2](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(99)00053-2).
- Watanabe KI, Nishizawa T and Yoshimizu M. 2000. Selection of brood stock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. *Dis Aquat Organ* 41, 219-223. <https://doi.org/10.3354/dao041219>.
- Zhang JS, Dong SL, Tian XL, Dong YW, Liu XY and Yan DC. 2006. Studies on the rotifer (*Brachionus urceus* Linnaeus, 1758) as a vector in white spot syndrome virus (WSSV) transmission. *Aquaculture* 261, 1181-1185. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.09.002>.