

국내 양식 금붕어(*Carassius auratus*)와 수입 진주린(*Carassius auratus*)에서 Cyprinid Herpesvirus 2 (CyHV-2)의 검출

송해덕 · 박정수 · 권세련

선문대학교 수산생명과학과

Molecular Evidence of Cyprinid Herpesvirus 2 (CyHV-2) in Domestic Goldfish *Carassius auratus* and Imported Pearlscale Goldfish *Carassius auratus*

Hae Deok Song, Jeong Su Park and Se Ryun Kwon*

Department of Aquatic life Medical Sciences, Sunmoon University, Asan 31460, Korea

Goldfish hematopoietic necrosis (GHN) affects hematopoietic organs and causes high mortality in goldfish. The causative agent of GHN is cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2). The purpose of this study was to detect CyHV-2 in ornamental cyprinid fish. CyHV-2 monitoring was conducted on a monthly basis for 1 year using goldfish *Carassius auratus* and pearlscale goldfish *Carassius auratus* that had been cultured at a domestic aquafarm and imported from Singapore, respectively. The results of polymerase chain reaction (PCR) assays using specific primers for the CyHV-2 helicase gene showed that 27.8% of goldfish and 33.3% of pearlscale goldfish were positive for CyHV-2. No cytopathic effects were detected in koi fin or common carp brain cells inoculated with tissue homogenates from either fish. Our data provides the useful data for establishing future quarantine and disinfection policies.

Key words: Goldfish, Pearlscale goldfish, Cyprinid herpesvirus 2, CyHV-2, Goldfish hematopoietic necrosis

서 론

세계적으로 관상어 산업은 1983년대부터 인정을 받으며 성장해 왔으며, 현재는 우리나라에서도 자리매김을 하며 지속적으로 성장하고 있다. 우리나라는 주 5일제 제도가 생기면서 국민들의 여가생활 및 취미가 다양해져 관상어에 대한 관심도 높아졌다. 또한 전국에 있는 대형마트에서 관상어를 판매하면서 구매가 용이해졌고, 인터넷 쇼핑의 발달로 관상어 시장이 더욱 성장하게 되었다(KMI, 2010). 이렇게 관상어에 대한 관심이 커지면서 정부의 지원으로 국내 관상어 시장이 확대되어 2012년에 관상어 수입 금액이 440만 달러에서 2016년에 640만 달러로 증가하였다(NFPQMS, 2016). 또한 국내에서는 관상어 산업의 성장을 위해 해양수산부와 한국 관상어 협회가 함께 매년 한국 관상어 산업 박람회 및 관상어 품평회를 개최하고 있다. 국내에서 관상어는 개, 고양이와 함께 3대 애완동물로써 자리를 잡았고 관련 용품과 서비스도 성장하고 있다(MOF, 2016). 관상어 중 가격이 저렴하고 키우기 쉬우며, 대중적으로 쉽게 접할

수 있는 것으로서 금붕어(goldfish *Carassius auratus*)와 진주린(pearlscale goldfish *Carassius auratus*)을 들 수 있다.

금붕어와 진주린에 감염될 수 있는 질병 중 붕어조혈기괴사증은 1992년 가을과 1993년 봄에 일본의 관상용 금붕어에서 처음 발병된 사례가 보고되었다(Jung and Miyazaki, 1995). 이는 GFHN (goldfish hematopoietic necrosis) 또는 HVHN (herpesviral hematopoietic necrosis) 라고도 하는데, 원인체는 *Herpesviridae*에 속하는 cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2)이다. 일본 이외에도 미국, 대만, 호주 및 영국에서 CyHV-2가 금붕어에서 검출된 바 있다(Groff et al., 1998; Chang et al., 1999; Stephens et al., 2004; Goodwin et al., 2006; Jeffrey et al., 2007). 최근에는 프랑스의 금붕어 양식장에서 검출이 된 바 있고, 싱가포르에서 네덜란드로 수입된 금붕어에서 검출된 바가 있다(Boitard et al., 2016; Ito et al., 2017). 붕어조혈기괴사증은 수온 15°C-25°C 사이에서 발생하여, 금붕어에서 50-100% 폐사를 유발한다고 보고되었다(Jung and Miyazaki, 1995; Jeffrey et al., 2007). 이 바이러스에 감염되는 금붕어는 무기력해

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2018.0383>



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 51(4) 383-388, August 2018

Received 29 May 2018; Revised 20 June 2018; Accepted 4 July 2018

*Corresponding author: Tel: +82. 41. 530. 2289 Fax: +82. 41. 530. 2917

E-mail address: srkwon@sunmoon.ac.kr

지며, 아가미 퇴색이 나타나고 병리조직학적으로 두신과 체신 사이의 세포와 상피의 괴사가 나타난다(Groff et al., 1998).

붕어조혈기괴사증은 우리나라에서는 법정전염병에 속하지 않지만 발병 시 높은 폐사를 보이는 질병이며, 해외로부터 지속적으로 많은 수의 잉어과어류가 수입되고 있으므로 모니터링을 할 필요가 있다고 생각된다. 따라서 본 연구에서는 수입되는 관상용 진주린과 국내에서 양식되는 금붕어에서 CyHV-2를 모니터링하여 바이러스가 국외로부터 얼마만큼 유입되고 있는지 혹은 국내에 바이러스가 존재하는지를 파악하고자 하였다. 바이러스 검사는 관상어 도매업체로부터 구입한 시료로 1년간 매달 실시되었다. CyHV-2에 대한 특이적인 primer를 사용한 분자생물학적인 방법을 통하여 진행하고, 검출이 되었을 경우 염기서열 분석 및 세포배양을 실시하였다.

재료 및 방법

실험어

국내 관상어 도매업체로부터 2016년 12월부터 2017년 11월까지 매달 한 번씩 금붕어와 진주린을 구입하였다. 금붕어는 전라북도 소재의 양어장에서 양식된 것이고 진주린은 싱가포르에서 수입된 것이었다. 매 검사 시 12마리의 금붕어 (4.62 ± 0.60 cm, 8.47 ± 2.54 g)와 12마리의 진주린 (3.4 ± 0.14 cm, 5.98 ± 0.52 g)을 사용하였다. 육안적으로 병적 소견이 있는지 확인한 후 해부하여 특이 증상이 있는지를 관찰하였다. 어종 별로 아가미, 신장 및 비장을 분리한 후 4마리씩 pooling하여 총 3개 시료를 준비하였다. 분리한 장기들은 실험 전까지 -80°C 에서 보관하였다.

PCR 및 염기서열 분석

금붕어와 진주린의 아가미, 비장 및 신장으로부터 DNA를 분리하였다. DNA는 DNeasy blood and tissue kit (QIAGEN Inc, Germany)를 사용하여 추출하였고 농도 측정 후 실험 전까지 -80°C 에서 보관하였다. 본 연구에서 기생충 및 세균에 대한 검사는 실시하지 않았다.

CyHV-2 검출을 위해 PCR (polymerase chain reaction) 실험에 helicase gene에 특이적인 primer인 CyHV2HelF: 5'-GGACTTGCGAAGAGTTTGATTTCTAC-3'와 CyHV2HelR: 5'-CCATAGTCACCATCGTCTCATC-3'를 사용하였다(Waltzek et al., 2009). PCR은 Takara EX Taq™ (Takara Bio Inc., Japan)을 사용하여 95°C 에서 2분간의 반응을 수행한 후 60°C 에서 45초, 72°C 에서 45초, 95°C 에서 30초간의 반응을 35회 반복 수행한 후 마지막으로 72°C 에서 2분간 반응시키는 것으로 실시되었다. 증폭된 PCR product는 1.5% agarose gel에 전기영동을 하였고, ethidium bromide로 염색하고 gel doc UV illuminator (Bio-Rad)으로 산물을 확인하였다. PCR 산물은 Wizard® SV gel and PCR clean-UP system (Promega)을 사용하여 정제하

후 염기서열 분석을 실시하였다. 본 연구에서 검출된 CyHV-2 helicase gene과 Genebank에 등록되어 있는 13개의 분리주의 염기서열을 비교하였다. CyHV-2의 염기서열을 BioEdit를 사용하여 분석하였다. CyHV-2 DNA helicase gene의 염기서열은 BioEdit program (BioEdit sequence alignment editor version 7.2.5)를 사용하여 동일한 길이로 trimming하고 clustalW mutiple alignment하여 염기서열을 비교하였다.

세포배양

PCR에서 양성결과를 보인 시료의 비장 조직을 사용하여 세포배양을 실시하였다. 비장 조직의 9배양의 HBSS (Gibco)를 첨가하여 조직을 마쇄한 후 4°C 에서 4000 rpm으로 15분간 원심분리를 2회 실시하고 수거한 상층액을 접종에 사용하였다. 조직 마쇄액을 준비하기 이를 전에 세포를 준비하였다. KF-1 (koi fin) 세포와 CCB (common carp brain) 세포를 10% fetal bovine serum과 x1 antibiotic-antimycotic (Gibco)이 첨가된 minimum essential medium (MEM, Gibco)에서 배양하다가 trypsin-EDTA (Gibco)로 세포를 떨어뜨린 후 MEM 배지에 현탁하고 24-well plate에 1 mL씩 접종한 후 20°C 에서 이틀간 배양하였다. 시료 접종 시 세포로부터 배지를 제거한 후 준비한 마쇄액 100 μL 를 세포에 접종한 후 30분 동안 실온에서 방치하여 바이러스의 흡착을 유도하였다. 그 후 배지를 1 mL씩 첨가한 후 20°C 에서 2주간 배양하면서 현미경으로 cytopathic effect (CPE)를 관찰하였다.

결과 및 고찰

검사어를 육안적으로 관찰했을 때 총 144마리의 진주린 중 15개체에서 특이 증상이 관찰되었다. 주요 증상으로 아가미와 체표의 출혈 및 비장의 거대화가 관찰되었다(Fig. 1). 이러한 증상이 나타난 개체는 1월에 샘플링 한 3번 시료, 2월에 샘플링 한 2번 시료, 3월에 샘플링 한 2번 시료, 4월에 샘플링 한 1번 및 3번 시료, 5월에 샘플링 한 1번 및 3번 시료, 6월에 샘플링 한 2번 시료, 7월에 샘플링 한 1, 2, 3번 시료, 8월에 샘플링 한 2번 시료였으며, PCR 결과에서 2월의 2번 시료, 6월의 2번 시료, 7월의 1, 2, 3번 시료를 제외한 모든 증상 개체를 포함한 시료에서 양성으로 나타나 증상과 CyHV-2의 유전자 검출 결과가 거의 일치하는 것으로 나타났다. 그러나 증상을 보이지 않는 진주린의 시료에서도 PCR 양성 결과가 나타났고 증상어와 비증상어 사이에서 PCR band의 density 차이는 보이지 않았다. 반면에 144마리의 금붕어에서는 어떠한 증상도 관찰되지 않았다. Goodwin et al. (2009)의 연구에서 CyHV-2는 외부증상 없이 발병하는 경우가 많다고 알려져 있기 때문에 본 연구의 PCR 결과에서 양성으로 나타난 대부분의 개체에서도 증상이 나타나지 않았다고 생각된다. 그러나 기생충과 세균 검사는 실시하지 않았기 때문에 세균 감염에 의해 외부소견이 나타났을 가능성을 배제할 수 없다. 한편 Wang et al. (2012)의 연구에서는 CyHV-2가 검

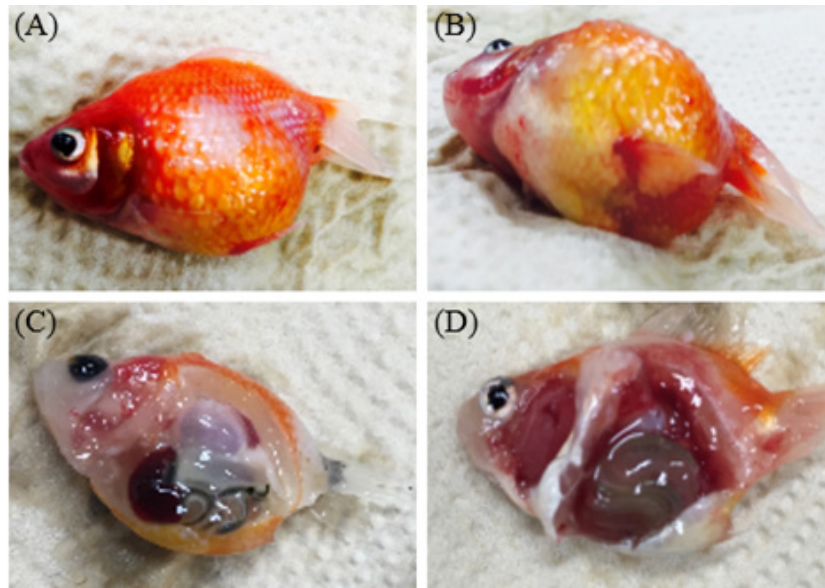


Fig. 1. Gross findings observed in pearlscale goldfish *Carassius auratus*. A, Bleeding in the gill and operculum; B, abnormal bleeding; C, splenomegaly; D, normal fish.

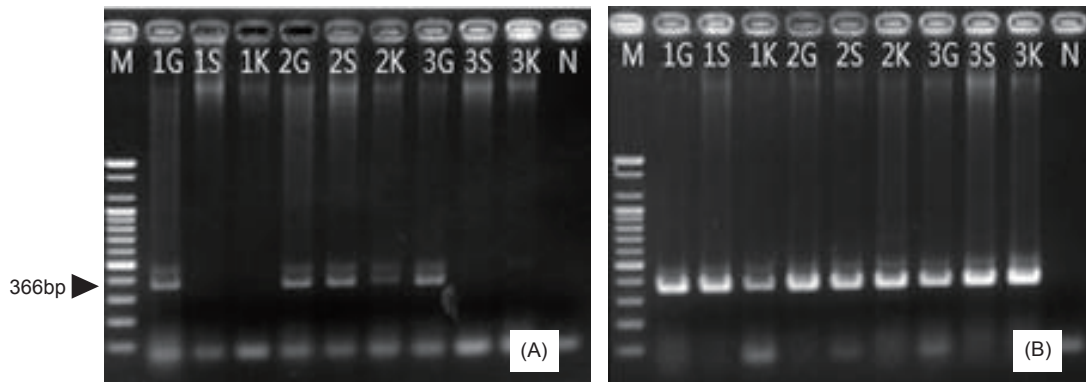


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR products generated from tissue samples of goldfish (A) and pearlscale goldfish *Carassius auratus* (B) using primer targeting helicase gene of cyprinid herpesvirus 2. Fish were sampled in January 2017. Number means each pooled sample consisting of 4 fish. M, marker; G, gill; S, spleen; K, kidney; N, negative control.

출된 개체에서 세균이 검출되지 않았음에도 불구하고 아래턱과 복부 부위에 충혈과 아가미 출혈이 관찰되었다고 보고하였다.

진주린과 금붕어의 아가미, 비장 및 신장에서 추출한 DNA를 사용하여 PCR을 실시한 결과 366 bp 크기의 밴드가 확인되었다(Fig. 2). PCR 산물을 정제하여 염기서열 분석을 실시한 결과 CyHV-2의 helicase gene으로 확인되었다. 1년간의 CyHV-2 검출결과는 Table 1에 제시하였다. 진주린의 경우에는 1월, 3월, 4월, 5월, 8월 및 9월 시료에서 양성결과가 나왔다. 장기별 검출결과는 아가미에서 36개의 시료 중 11개, 비장에서 11개 그리고 신장에서 14개의 시료가 양성 결과를 보여 주었다. 금붕어의 경우 1월, 3월, 4월, 5월, 6월 및 12월 시료에서 양성결과가 나왔

다. 장기별 검출 결과는 아가미에서 36개의 시료 중 11개, 비장에서 8개 그리고 신장에서 11개 시료가 양성을 보였다. 진주린과 금붕어에서의 양성 검출율은 각각 33.3%와 27.8%로서, 진주린이 금붕어에 비해 높았으며 3개 시료 모두에서 양성결과가 나온 횟수가 많았다.

PCR 양성 시료의 염기서열을 모두 분석해 본 결과 2017년 4월에 샘플링한 금붕어로부터 검출된 시료를 제외한 나머지 금붕어 시료의 염기서열이 일치하는 것을 확인하였다. 염기서열이 다른 금붕어의 2017년 4월 샘플링 시료명을 GF 1704라고 명명하였다. 진주린 또한 2017년 5월에 샘플링한 것을 제외한 나머지 진주린 시료의 염기서열이 일치하였다. 진주린의 2017

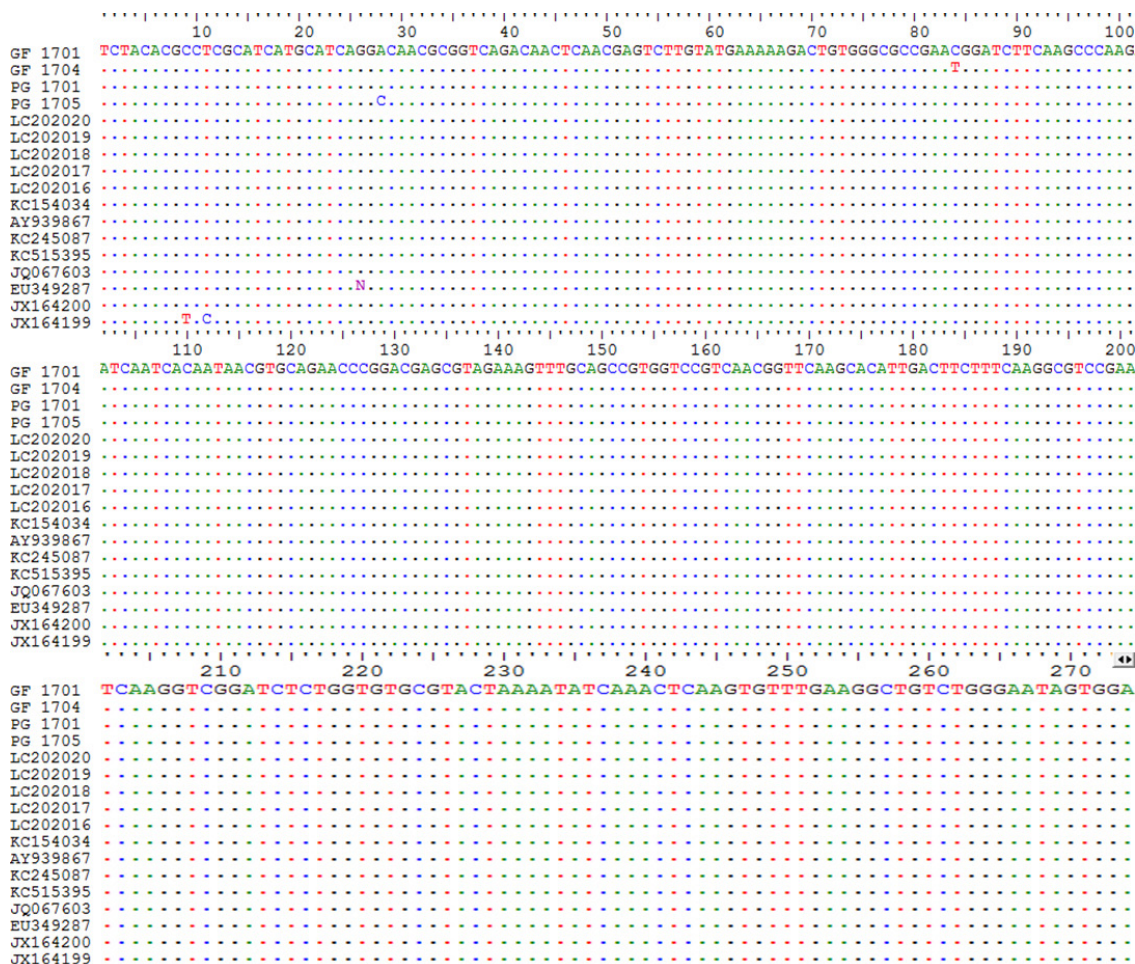


Fig. 3. Comparison of nucleotide sequences of helicase gene from 17 CyHV-2 isolates. GF, goldfish *Carassius auratus*; PG, pearl scale goldfish *Carassius auratus*.

Table 1. Detection of cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) by PCR assay

Month	Pearl scale goldfish <i>Carassius auratus</i>			Goldfish <i>Carassius auratus</i>		
	Gill	Spleen	Kidney	Gill	Spleen	Kidney
January	+++	+++	+++	+++	-+-	-+-
February	---	---	---	---	---	---
March	---	---	-+-	---	---	--+
April	+++	+++	+++	+++	+++	+++
May	-++	+ - +	+++	+ - -	---	-++
June	---	---	---	+++	+++	+++
July	---	---	---	---	---	---
August	+++	+++	+++	---	---	---
September	--+	---	--+	---	---	---
October	---	---	---	---	---	---
November	---	---	---	---	---	---
December	---	---	---	-+-	-+-	+ - -

+, PCR positive; -, PCR negative.

년 5월 샘플링 시료명은 PG 1705라고 명명하였다. 위의 돌을 제외한 금붕어와 진주린에서 바이러스가 검출되었던 나머지 시료들의 염기서열은 모두 동일하였기 때문에 각 어종의 1월 샘플링 시료를 대표로 하여 GF 1701과 PG 1701로 명명하였다. 따라서 본 연구에서 분석된 총 4개의 염기서열(GF 1701, GF 1704, PG 1701 및 PG 1705)과 기존에 알려진 13개의 분리주와 유전자 서열을 비교하였다. GF 1701과 PG 1701의 helicase gene은 기존에 보고된 11개의 분리주의 염기서열과 100% 일치하였고, GF 1704, PG 1705, EU349287 및 JX164199의 경우에는 나머지 분리주에 비해 nucleotide 1-2개씩 차이를 보였다(Fig. 3). 이러한 염기서열 차이에 의해 helicase의 아미노산 서열은 GF 1704의 경우 tryptophane에서 arginine으로, PG 1705의 경우 alanine이 aspartic acid로 치환되게 되었다. 본 연구에서는 바이러스가 검출된 시료의 비장을 마쇄하고 정균한 후 KF-1와 CCB 세포에 접종하였지만 어떠한 세포변성도 관찰할 수 없었다(data not shown). Groff et al. (1998)은 폐사가 나타난 금붕어의 조직 마쇄액을 chinook salmon embryo (CHSE-214) 세포, fathead minnow (FHM) 세포 및 epithelioma papulosum cyprinid (EPC) 세포에 접종해 보았으나 CPE가 나타나지 않았다고 하였다. 한편 CyHV-2의 배양이 가능한 것은 GF-1 (goldfish fin) 세포라고 하나(Jung and Miyazaki, 1995), KF-1 세포에서도 배양이 되었다는 보고가 있으며(Wang et al., 2012). CyHV-2에 감염된 어체의 아가미 조직 마쇄액을 접종한 KF-1 세포에서는 세포질의 핵포화, 과립화 및 구형화를 특징으로 하는 CPE가 관찰된다고 보고된 바 있다(Jeffery et al., 2007). 본 연구에서 KF-1과 CCB 세포에서 배양되지 않았던 이유는 CyHV-2에 대한 세포주의 감수성이 낮거나 조직 내의 바이러스 양이 적었기 때문일 가능성이 있다. 또는 Jeffery et al. (2007)은 아가미 조직을 사용한 것에 반하여 본 연구에서는 비장 조직을 접종에 사용했기 때문이었을 가능성도 있다.

본 연구에서는 관상용 잉어과어류를 대상으로 1년에 걸쳐 CyHV-2에 대한 모니터링을 실시한 결과 세포배양을 통해 바이러스가 분리되지 않았지만 분자생물학적으로 바이러스의 존재를 확인하였다. 본 연구에서 CyHV-2가 검출된 진주린은 싱가포르에서 수입된 것이었는데 Ito et al. (2017) 역시 싱가포르에서 네덜란드로 수입된 금붕어에서 CyHV-2를 검출한 바 있어, CyHV-2는 싱가포르의 양식 어류나 수계에 존재하고 있는 것으로 사료된다. 더욱이 국외로부터 수입되는 진주린 뿐 만 아니라 전라북도의 양어장에서 양식되고 있는 금붕어에서도 바이러스가 검출되어 우리나라도 바이러스를 보유하고 있다는 것을 제시하고 있다. 국내에서는 Ryu (2015)에 의해 2014년 4월에 국내의 소형 수족관에서 사육하던 금붕어와 6월에 온라인에서 구매한 금붕어가 섭이불량, 무기력 및 수조 가장자리로 유평하는 등의 이상 증상을 보여 조사한 결과 CyHV-2가 검출되었다고 처음 보고되었다. 붕어조혈기괴사증은 우리나라에서 법정전염병으로 분류되지 않은 질병이기 때문에 정기적인 조사가 이루어지지 않으며 이에 대한 연구도 부진하다. 따라서 본 연구에서 처럼 수입 관상어 및 국내 양식 관상어에 대한 CyHV-2 검출에 대한 연구 결과는 향후 CyHV-2에 대한 검역 및 방역 정책수립을 위한 기초자료로 활용될 수 있을 것이다.

사 사

이 논문은 2017년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(NRF-2017R1D1A1A09000992).

References

- Boitard PM, Baud M, Labrut S, De boissesson C, Jamin M and Bigarre L. 2016. First detection of Cyprinid Herpesvirus 2 (CyHV-2) in goldfish (*Carassius auratus*) in France. J Fish Dis 39, 673-680. <http://dx.doi.org/10.1111/jfd.12400>.
- Chang PH, Lee SH, Chiang HC and Jong MH. 1999. Epizootic of herpes-like virus infection in goldfish, *Carassius auratus* in Taiwan. Fish Pathol 34, 209-210. <http://dx.doi.org/10.3147/jsfp.34.209>.
- Goodwin AE, Khoo L, LaPatra SE, Bonar A, Key DW, Garner M, Lee MV and Hanson L. 2006. Goldfish haematopoietic necrosis herpesvirus (Cyprinid Herpesvirus 2) in the USA: molecular confirmation of isolates from diseased fish. J Aquat Anim Health 18, 11-18. <http://dx.doi.org/10.1577/H05-007.1>.
- Goodwin AE, Sadler J, Merry GE and Marecaux EN. 2009. Herpesviral haematopoietic necrosis virus (CyHV-2) infection: case studies from commercial goldfish farms. J Fish Dis 32, 271-278. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2761.2008.0098.x>.
- Groff JM, LaPatra SE, Munn RJ and Zinkl JG. 1998. A viral epizootic in cultured populations of juvenile goldfish due to a putative herpesvirus etiology. J Vet Diagn Invest 10, 375-378. <http://dx.doi.org/10.1177/104063879801000415>.
- Ito T, Kurita J and Haenen OLM. 2017. Importation of CyHV-2-infected goldfish into the Netherlands. Dis Aquat Org 126, 51-62. <http://dx.doi.org/10.3354/dao03157>.
- Jeffrey KR, Bateman K, Bayley A, Feist SW, Hulland J, Longshaw C, Stone D, Woolford G and Way K. 2007. Isolation of a cyprinid herpesvirus 2 from goldfish, *Carassius auratus* (L.), in the UK. J Fish Dis 30, 649-656. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00847.x>.
- Jung SJ and Miyazaki T. 1995. Herpesviral haematopoietic necrosis of goldfish, *Carassius auratus* (L.). J Fish Dis 18, 211-220. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2761.1995.tb00296.x>.
- KMI (Korea Maritime Institute). 2010. Report of policy direction for a high value-added ornamental fish industry. KMI, Busan, Korea, 1-160.
- MOF (Ministry of Oceans and Fisheries). 2016. Rapid growth of ornamental fish market [Internet]. Retrieved from <http://www.mof.go.kr/article/view.do?menuKey=376&boardKey>

- =10&articleKey=11102 on Feb 24, 2018.
- NFPQMS (National Fishery Products Quality Management Service). 2016. Statistic database for fisheries import quarantine [Internet]. Retrieved from <http://www.nfqs.go.kr/2013/contents.asp?m=5&s=8&s2=3> on Feb 24, 2018.
- Ryu JW. 2015. First detection of Herpesviral haematopoietic necrosis virus [cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2)] from goldfish *Carassius auratus* in Korea. MS Dissertation, Chonnam National University, Chonnam, Korea.
- Stephens FJ, Raidal SR and Jones B. 2004. Haematopoietic necrosis in a goldfish (*Carassius auratus*) associated with an agent morphologically similar to herpesvirus. *Aust Vet J* 82, 167-169. <http://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2004.tb12650.x>.
- Waltzek TB, Kurobe T, Goodwin AE and Hedrick RP. 2009. Development of a Polymerase Chain Reaction Assay to Detect Cyprinid Herpesvirus 2 in Goldfish. *J Aquat Anim Health* 21, 60-67. <http://dx.doi.org/10.1577/H08-045.1>.
- Wang L, He J, Liang L, Zheng X, Jia P, Shi X, Lan W, Xie J, Liu H and Xu P. 2012. Mass mortality caused by Cyprinid Herpesvirus 2 (CyHV-2) in Prussian carp (*Carassius gibelio*) in China. *B Eur Assoc Fish Pat* 32, 164-173. https://eafp.org/download/2012-volume32/issue_5/164-Wang.pdf.