



수온변화에 따른 해수내 VHSV(Viral Hemorrhagic Septicemia Virus)의 생존능 분석

정지민 · 지보영 · 권문경 · 서정수 · 황성돈 · 이지훈 · 황지연†
국립수산과학원(연구사)

Analysis of the Stability of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) Depending on Water Temperature

Ji Min JEONG · Bo-Young JEE · Mun-Gyeong KWON · Jung Soo SEO · Seong Don HWANG ·
Ji-Hoon LEE · Jee Youn HWANG†

National Institute of Fisheries Science(researcher)

Abstract

Viral hemorrhagic septicemia (VHS) is a serious viral disease that infects the olive flounder in South Korea. The Korean aquaculture industry experienced an economic loss caused by the high infectivity and mortality. Wastewater is a factor in transferring infections to wild and cultured fish in waters near infected aquaculture farms. In this study, we analyzed the stability of the VHS virus in sterilized seawater depending on the water temperature. The VHS virus maintained infectivity for 8 days and was detected using quantitative polymerase chain reaction after 10 days of inoculation to sterilized seawater at low temperatures. On the other hand, at high temperatures, the virus maintained infectivity for 4 days and was detected for 7 days. These results may contribute to basic data for epidemiological studies.

Key words : VHSV, stability, temperature, real-time PCR, plaque assay

I. 서론

VHSV는 RNA virus로서 family rhabdoviridae에 속하는 바이러스이며, 6개의 gene (3'-N-P-M-G-NV-L-5')으로 구성된 약 11.1 kb의 negative sense RNA를 가지고 있다(Tordo et al., 2005; Egusa et al., 2006). VHSV는 1980년대 중반 까지 서유럽의 담수어에서만 발견되었고(Wolf, 1988), 이후 Pacific salmon에서 보고되었으며(Winton et al., 1989; Batts et al., 1993), 현재 거의 전 세계에 걸쳐 약 60여종의 담수 및 해수어

류에 감염되는 것으로 알려져 있다 (OIE, 2019). 우리나라에서는 2001년 양식넙치에서 처음 검출되었고(Kim et al., 2003), 이후 저수온기에 발병하여 경제적 손실을 입히고 있다(Kim et al., 2003). 폐사율이 높고 전염성이 강하기 때문에 종자에서 발병되는 경우 방류를 금지하고 있으며 다른지역으로 이동을 제한해야하는 수산동

물질병관리법 제2종 법정전염병에 해당한다.

VHSV의 감염경로는 경구적 감염과 해수 내 바이러스 입자가 아가미를 통해 침입하여 전신혈류 시스템을 통해 신장과 비장과 같은 조혈기관

† Corresponding author : 051-720-3041, jinihwang@korea.kr

* 이 논문은 국립수산과학원 수산생물 방역프로그램 개발·운영 지원에 의해 수행되었음.

을 파괴한다는 것이 잘 알려져 있으며(Wolf, 1988), 어류의 노로 배설된 바이러스가 해수등을 통해 수평감염을 일으킨다는 것이 보고되었다(Small and Snow, 2011). 양식장의 배출수에 잔존하고있는 병원체가 주변수역의 자연산 어류나 양식장에 병원체를 감염시킬 수 있다는 보고가 있으며(Oidtmann et al., 2017), 또한 해수내 이러한 병원체의 생존율이 주변수역의 감염을 확대하는 중요한 인자가 되고 있다(Dale et al., 2009). 4℃ 담수에서 1년간 감염력을 유지하며, 15℃ 해수에서는 4일 후 비활성화된다고 보고되었다(Hawley and Garver, 2008). 이와 같이 질병발생 후 2차 피해를 예방하기 위한 역학조사에서 병원체의 생존기간에 대한 연구는 필수적이다.

본 연구에서는 한국 넙치양식장에서 분리되는 VHSV genotype IVa의 수온에 따른 멸균해수에서 생존능을 분석하여, 이후 역학조사에 필요한 기초자료로 이용하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 멸균해수 제작

Micro filter로 1차 여과 한 해수를 WHATMAN GLASS FILTER(pore size: 0.45 μm)를 이용하여 2차 여과 한 후, 고압멸균기를 이용하여 제작한 멸균해수를 실험에 이용하였다.

2. 바이러스 접종

본 실험에서는 ADC-VHS2014-5 (VHSV, KY979959) strain을 실험에 이용하였다. 고수온(21℃)과 저수온(13℃)에서 바이러스의 생존능을 알아보기 위하여, 멸균해수를 각각 21±0.5℃와 13±0.5℃의 배양기에 넣고 순치하였다. VHSV는 105 TCID₅₀/ml의 농도가 되도록 접종 후 1일후부터 10일까지 멸균 해수 중 VHSV의 생존능을 분석하였다.

3. 정량분석

1) Quantitative real-time PCR

해수중 바이러스의 정량 분석을 위해 해수 500 μl에서 바이러스의 RNA를 분리 하였다. RNA는 RNAiso Plus(Takara)를 이용하여 분리하였고, PrimeScript™ cDNA Synthesis Kit를 이용하여 cDNA로 합성하였다. cDNA는 정량분석에 이용하기까지 -20℃에 보관하였다.

VHSV copy No.는 Pierce et al.(2013)의 방법을 응용하여 분석하였다. 합성된 VHSV의 cDNA를 template로 이용하여 VHSV N gene에 특이적인 primer set(Table 1)를 이용하여 증폭하였고, 74 bp의 산물을 pGEM T-easy Vector System I (Promega, USA)와 *Escherichia coli* JM109를 이용하여 클로닝하였다. Hybrid-Q Plasmid Rapidprep kit를 이용하여 plasmid를 추출하였으며, 추출된 plasmid는 NanoVue (GE Healthcare, USA)를 이용하여 농도를 측정한 뒤 아래의 식을 이용해 표준 시료의 copy No.를 산출하였다.

$$\text{Number of copies} = (\text{amount of ssRNA in nanograms} \times 6.022 \times 10^{23}) / (\text{length of ssRNA in basepairs} \times 1 \times 10^9 \times 330)$$

표준 시료의 검량곡선을 산출하기 위하여 108배까지 단계희석 한 plasmid DNA를 제작한 특이-probe와 함께 real-time PCR을 이용하여 Ct값을 측정하였다. qPCR의 수행은 Probe qPCR Mix (TaKaRa, Japan)와 희석된 plasmid, primer를 첨가한 후, PCR반응 조건은 95℃에서 5분간 initial denaturation하여 95℃에서 30초간 denaturation, 60℃에서 1분간 annealing, 72℃에서 20초간 extension의 반응을 40 cycles로 수행하였다. 최종적으로 측정된 Ct값은 표준 검량곡선을 작성하여 VHSV의 copy수를 측정하는데 사용하였다. 시료 cDNA의 VHSV copy No.를 분석하기 위하여 특이-probe를 이용하여 qPCR로 정량분석을 수행하였다(<Table 1>).

<Table 1> primer and probe used in this study

	Sequence
VHSV N-F	GCC GGA ATC CTT ATG CCG ATG
VHSV N-R	CCC TTG ACG ATG TCC ATG AGG TT
Probe	ACT GGC CCA GAC TGT CAA

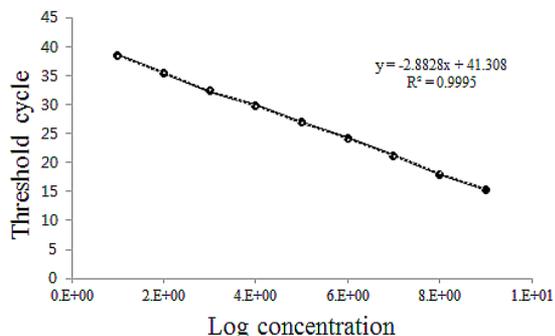
2) Plaque assay

EPC cell line은 24 well-plate에 MEM(5% FBS)을 이용하여 단층 배양한 후 PEG solution (Polythylen glycol with MEM)을 첨가하고 30분 동안 반응시킨 다음 샘플링된 시료 100 μ l를 접종하여 바이러스를 흡착시켰다. Methylcellulos overlay media를 첨가한 뒤 15 $^{\circ}$ C 배양기에서 7일간 배양 후 crystal violet/formaldehyde solution을 이용하여 1시간 동안 염색 후 형성된 plaque를 계수하였다.

III. 결과 및 고찰

1. Quantitative real-time PCR

바이러스 정량을 위한 standard curve는 10배 단계희석한 plasmid DNA를 특이-probe와 함께 qPCR을 분석을 수행하여 산출하였고, plasmid DNA copy 값(x)에 대한 Ct 값(y) 간의 표준 회귀식은 $y = -2.8828x + 41.308$ 를 이용하였다([Fig 1]). Pierce(2013)의 연구결과에서 검출한계는 VHSV 5 molecule이었으며, syber green을 이용한 Garver(2011)의 연구에서는 Ct 값 38을 검출한계로 설정하였다. 본 연구에서 plasmid DNA 10 copies에 대한 Ct값이 38.53으로 나타났으며, 안정성과 신뢰성을 고려하여 검출한계를 38로 설정하였다.



[Fig. 1] The standard curve was obtained by regression analysis of cycle threshold values versus initial plasmid copy numbers.

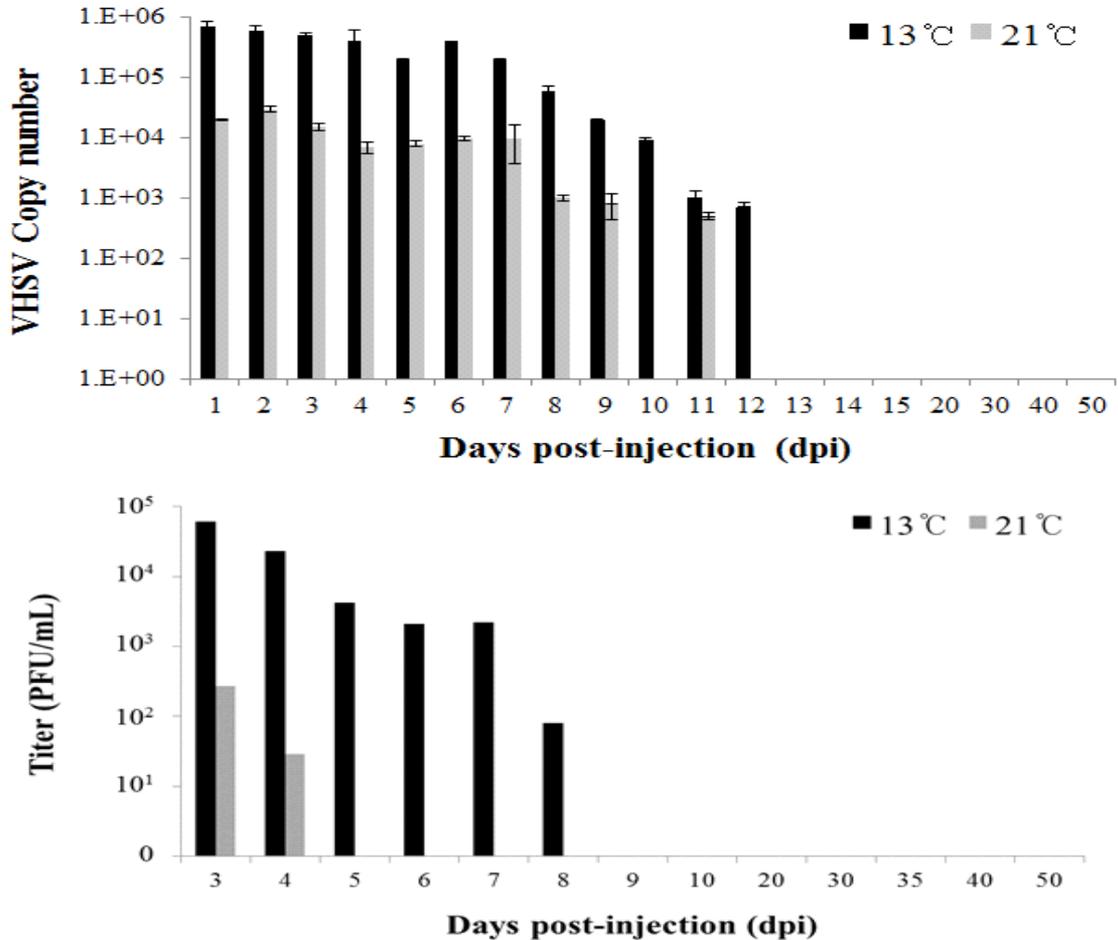
저수온과 고수온에서 바이러스의 생존능을 qPCR을 이용하여 분석한 결과, 13 $^{\circ}$ C의 멸균해수에서 VHSV는 10일(Ct값 36.9) 후까지 검출되었으며, 희석배수를 곱하여 산출한 copy 값은 4×10^3 copies/ml로 나타났다. 21 $^{\circ}$ C의 멸균해수에서는 VHSV는 7일(Ct값 37.38) 후까지 검출되었고, 원액에서 농도는 2×10^3 copies/ml로 나타났다. 저수온(13 $^{\circ}$ C)에서는 VHSV copy 값이 8일 후부터 급격하게 감소하였으며, 고수온(21 $^{\circ}$ C)에서는 접종 1일 후 103배 감소한 것으로 나타났다([Fig. 2], top).

2. Plaque assay

13 $^{\circ}$ C 멸균해수에 VHSV 접종 후 titer는 서서히 감소하여 8일(0.8×10^2 PFU/ml) 까지 plaque를 형성하여 감염력을 유지하는 것으로 나타났으며, 접종 9일 후 감염력을 잃은 것으로 나타났다.

20 $^{\circ}$ C 멸균해수에서는 VHSV 접종 3일(2.7×10^2 PFU/ml) 후부터 뚜렷하게 titer의 감소가 나타났으며, 5일 후부터 plaque가 형성되지 않은 것으로 미루어 4일 까지 감염력을 유지할 수 있는 것으로 나타났다([Fig. 2], bottom).

VHSV는 저수온에서 보다 오랜기간 감염력을 유지하는 것으로 나타났으며, qPCR과 plaque assay분석에서 유사한 패턴을 나타냈다.



[Fig. 2] For stability analysis of the VHS virus dependent on temperature, the virus was inoculated to 13°C and 21°C sterilized seawater. Seawater was sampled at the indicated time points, and virus titers were determined using real-time polymerase chain reaction (a) and a plaque assay (b). The viral titers are averages of the triplicate groups.

qPCR은 생물학적 분자 즉, 게놈만을 검출할 수 있지만 생물학적 특징인 감염성을 검출 할 수는 없기 때문에 감염력이 없는 바이러스 입자까지 검출되어 qPCR과 plaque assay의 결과가 상이하게 나타난 것으로 예상된다. 이러한 결과는 yellow fever virus의 정량분석에서 qPCR과 plaque assay를 비교한 이전연구 결과와 유사하다(Bae et al., 2003).

국내에서 분리되는 VHSV는 일본 분리주들과

같은 genotype IVa형에 속하며, 미국 및 유럽 분리주들과 유전적으로 다른 것으로 알려져 있으며 (Kim et al, 2011), 국내에서 분리된 VHSV (ADC-VHS2014-5)의 수온에 따른 안전성과 감염력에 대한 연구로 국내 넙치 양식장에서 발생하는 VHS의 확산방지와 질병 발생 후 역학조사에 필요한 기초자료로 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

References

- Bae HG, Nitsche A, Teichmann A, Biel SS and Niedrig M(2003). Detection of yellow fever virus: a comparison of quantitative real-time PCR and plaque assay. *J virol met.* 110, 185~191.
- Batts WN, Arakawa CK, Bernard J and Winton JR(1993). Isolates of viral hemorrhagic septicemia from North America and Europe can be detected and distinguished by DNA probe. *Dis Aquat Org* 17, 67~71.
- Dale OB, Ørpetveit I, Lyngstad TM, Kahns S, Skall HF, Olesen NJ and Dannevig BH(2009). Outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in seawater-farmed rainbow trout in Norway caused by VHS virus Genotype III. *Dis Aquat Org* 85, 93~103.
- Egusa S, Wakabayashi H and Muroga K(2006). Infectious and parasitic diseases of fish and shellfish. Life Science Publishing Co. Seoul. 54~58.
- Hawley LM and Garver KA(2008). Stability of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in freshwater and seawater at various temperatures. *Dis Aquat Org.* 82, 171~178.
- Kim SM, Le 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), 1~12.
- Kim WS, Jung SJ, Kim JO, Kim DW, Kim JH and Oh MJ(2011). Geneic positioning of Korean viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from cultured and wild marine fishes. *J Fish Pathol* 24, 1~9.
- Oidtmann B, Dixon P, Way K, Joiner C and Bayley AE(2018). Risk of waterborne virus spread-review of survival of relevant fish and crustacean viruses in the aquatic environment and implications for control measures. *Rev aquat.* 10, 641~669.
- OIE(2019). Manual of Diagnostic tests for Aquatic Animals. Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV); Office International des Epizooties: Paris, France, 3~7.
- Pierce LR, Willey JC, Palsule VV, Yeo J, Shepherd BS, Crawford EL and Stepien CA(2013). Accurate detection and quantification of the fish viral hemorrhagic septicemia virus(VHSV) with a two-color fluorometric real-time PCR assay. *PLoS one*, 8, p.71851.
- SMAIL DA and SNOW M(2011). Viral Haemorrhagic Septicaemia. In: Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, Second Edition. Woo PTK and Bruno DW eds. CABI Wallingford. 110~142.
- Tordo N, Benmansour A, Calisher C, Dietgen R, Fang RX, Jackson AO, Kurath G, Nadin-Davis S, Tesh RB and Walker PJ(2005). Family Rhabdoviridae. In Fauquet, CM, Mayo MA, Manilof J, Deselberger, U and Bal L A, editors. Virus taxonomy: Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier/Academic Press, London, United Kingdom. 623~644.
- Winton J, Batts WN and Nishizawa T(1989). Characterization of the first North American isolates of viral hemorrhagic septicaemia virus. *Am Fish Soc Fish Health Section Newsl.* 17, 2~3.
- Wolf K(1998). Viral hemorrhagic septicemia. In Wolf, K., editor. Fish viruses and fish viral diseases. Cornell University Pres, Ithaca, New York, USA. 217~249.
-
- Received : 09 September, 2019
 - Revised : 02 October, 2019
 - Accepted : 10 October, 2019