Check for updates

JFMSE, 34(1), pp. 126~132, 2022.
수산해양교육연구, 제34권 제1호, 통권115호, 2022.
www.ksfme.or.kr
https://doi.org/10.13000/JFMSE.2022.2.34.1.126

잉어봄바이러스(SVCV) 검출 민감도 및 세포 감염 한계 분석

정지민† · 최명광* · 김재옥** · 권문경***
†**국립수산물품질관리원(연구사) · *부경대학교(학생) · ***국립수산물품질관리원(연구관)

Research on Detection Sensitivity and Cell Infection Limit of Spring Viraemia of Carp

Ji-Min JEONG† · Myoung-Gwang CHOI* · Jae-Ok KIM** · Mun-Gyeong KWON**
†**National Fishery Products Quality Management Service(researcher) · *Pukyong National University(student) · ***National Fishery Products Quality Management Service(senior researcher)

Abstract

Spring viraemia of carp (SVC) is a highly infectious virus that infects fish and is associated with a high mortality rate. SVC is listed as a notifiable viral disease by the World Organization for Animal Health (OIE) and is a legal communicable disease (class-1) requiring stamping out in Korea. SVC-PCR positive of crucian carp was confirmed in a Chungcheongbuk-do aquaculture farm but CPE was not observed, and no mortality occurred. Further, we compared and analyzed the detection of qPCR and RT-PCR. SVC quantification was analyzed in the epidemiological investigation sample of the aquaculture farm. SVCV was detected above the concentration of infection limit of EPC cells. It is expected that SVCV was inactivated in crucian carp due to the increase in water temperature. These results may contribute to basic data for epidemiological studies.

Key words : SVC, qPCR, RT-PCR, Cell culture, PCR sensitivity

Ⅰ. 서 론

잉어봄바이러스(Spring viraemia of carp virus)는 Family Rhabdoviridae의 negative strand RNA virus 이며, 전장 약 11 kb의 3'-N-P-M-G-L-5' 5개 유전자로 구성된다(Ahne et al., 2002). SVCV는 OIE (World Organization for Animal Health)에서 지정한 신고대상 전염병이며, 우리나라에서는 제1종 수산생물전염병으로 살처분 대상전염병이나 현재까지 SVC 발생에 의한 살처분 사례는 보고되지 않았다. SVCV의 감염은 잉어(*Cyprinus carpio*), 금붕어(*Carassius auratus*), 비단잉어(*Cyprinus carpio*) 등 경제적으로 중요한 담수성 어류에 심각한 피해가 보고된바 있다(Ahne et al., 2002; Ghasemi et al., 2014). SVC의 발생은 주로 봄철 수온 10 ~ 17℃에서 발생하며, 1년생 미만의 어린 어류에서 최대 70%의 높은 폐사율이 보고되었다. 주요 임상증상은 체색흑화, 안구돌출, 체표 및 아가미 출혈, 항문 돌출, 복부팽만 등이 대표적이다(Teng et al., 2007; Walker and Winton, 2010). 그러나 현재

† Corresponding author : 051-720-3042, jvjvmv@korea.kr
※ 본 연구는 국립수산물품질관리원 (수산생물 방역기술 개발 및 프로그램 운영 R2021071)의 지원에 의해 수행되었습니다.

까지 SVC에 대한 효과적인 치료제나 예방을 위한 백신은 개발되지 않았으며, 진단에서 SVC 양성인 모든 어류를 살처분 하는 것만이 이 질병에 의한 피해와 확산 방지를 위한 가장 효과적인 방법이다. 그러므로 신속하고 믿을 수 있는 진단이 SVC를 예방하고 제어(control)하는데 가장 중요하다.

2020년 충북 진천과 단양의 종묘생산장 방류용 치어(붕어)에서 SVC의 PCR 양성 의심에 따라 우리원 수산방역과로 확정진단 의뢰되었으며, 동시에 이에 대한 역학조사가 실시되었다. 역학조사는 병원체의 유입경로와 확산에 의한 추가피해를 예방하기 위해 유입수와 배출수를 채취하고, 양식장 내 격리된 모든 사육수조의 사육수 및 생물에 대한 SVCV의 정밀분석을 실시하였다. 양성의 심시료 및 역학조사시료의 정밀분석결과 결과 PCR (nested) 양성이나, epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell에서 cytopathic effect (CPE)를 형성하지 않아 최종 음성으로 판정되었다.

본 연구에서는 충북 진천과 단양의 SVC 양성 의심시료 내 SVCV 정량분석, 최소 검출 및 감염(EPC cell) 한계를 분석하였다. 이러한 결과는 바이러스 활성 및 전파가능성 분석으로 효율적인 방역조치에 기여 할 수 있을 것으로 예상된다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 표준 SVCV strain

본 연구에서 이용된 표준 SVCV (VR-1390 strain)은 American Type Culture Collection (ATCC)에서 분양 받아 EPC cell에 SVCV (ATCC, USA)를 MOI 1의 농도로 접종하였고, 3일째 CPE형성을 확인한 뒤 10일 후 상층액을 수거하여 1 ml씩 -80℃에서 보관하였다. 그 중 하나를 해동하여 바이러스 농도를 측정한 결과 3.75×10^8 $TCID_{50}$/ml로 확인되었으며, 이를 원액으로 하여 10^{-5}까지 단계 희석하여 검출한계 분석에 이용하였다.

2. SVCV 정량 분석을 위한 검량곡선

SVCV의 정량분석은 Shao et al.(2016)의 SYBR Green method에 따라 분석하였다. SVCV의 정량분석을 위한 검량곡선을 작성하기 위해 SVCV를 EPC cell에 접종 1주일 후 배양액 100 μl에서 Trizol을 이용하여 total RNA를 추출하였고, SuperScript IV Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA)를 이용하여 cDNA로 합성하였다. cDNA를 template로 이용하여 SVCV N gene에 특이적인 primer set <Table 1>를 이용하여 증폭하였고, 99 bp의 산물을 pGEM T-easy Vector System I (Promega, USA)와 *Escherichia coli* JM109를 이용하여 클로닝 하였다. Hybrid-Q Plasmid Rapidprep kit (GeneAll, South Korea)를 이용하여 plasmid를 추출하였으며, 추출된 plasmid는 NanoVue (GE Healthcare, USA)를 이용하여 농도를 측정한 뒤 아래의 식<Table 1>을 이용해 표준시료의 copy No.를 산출하였다.

표준시료의 검량곡선을 산출하기 위하여 10^{-6} 배까지 단계희석 한 plasmid DNA를 Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR)분석을 이용하여 Ct값을 측정 하였다. qPCR은 QuantiTect SYBR green PCR kit (QIAGEN, Germany)와 희석된 plasmid와 primer를 첨가한 후, PCR반응 조건은 50℃에서 2분, 95℃에서 15분 initial denaturation, 95℃에서 15초 denaturation, 55℃에서 30초 annealing, 72℃에서 30초간 extension의 반응을 40 cycles로 수행하였다. 최종적으로 측정된 Ct값으로 표준 검량곡선을 산출 하였다.

3. Real-time PCR과 Nested RT-PCR의 검출 비교

가. Quantitative real-time PCR

표준 SVCV strain을 10^{-5} 까지 단계희석한 후, 희석액 100 μl에 Trizol을 이용하여 total RNA를

추출하고 cDNA로 합성하였다. 정량분석은 QuantiTect SYBR Green PCR kit의 master mix와 함께 cDNA를 template로 하여 NF2 primer set <Table 1>을 이용하여 실시하였다.

나. RT-PCR

OIE aquatic manual의 진단법(Stone et al., 2003)에 따라 희석액의 cDNA를 template로 특이 primer <Table 1>를 이용하여 RT-PCR (F1R2 set) 및 semi-nested PCR (F1R4 set)을 수행하였다. PCR반응 조건은 95℃에서 1분, 55℃에서 1분 annealing, 72℃에서 30초간 extension의 반응을 35 cycles 반응시킨 후 72℃에서 10분간 final extension을 수행하였다.

4. SVCV의 세포 배양 한계 분석

단계희석 된 표준 SVCV를 EPC cell에 접종하고, 7일 후 현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하여 CPE의 형성을 확인 하였다. 그리고 상층액 100 μl를 취하여 배양액 내 SVCV 정량분석(qPCR) 및 RT-PCR 분석을 수행하였다.

5. 충북 진천 및 단양 붕어시료 조직 내 SVCV 정량 분석

잉어봄바이러스병 발생에 따른 역학조사에서 충북 진천에서 대농갱이(*Pelteobagrus ussuriensis*) 및 붕어(*Carassius auratus*), 단양에서 붕어치어1과 2(격리된 수조)를 채취하였고(<Table 2>), 조직(신장, 비장)을 적출하여 pooling하여 −80℃에 보관하였다. SVCV 정량분석을 위해 30 mg을 이용하여 qPCR을 수행하였다.

<Table 1> primer used in this study

Method	name	Sequence	Size
First	F1	5'-TCTTGGAGCCAAATAGCTCARRTC-3'	714 bp
	R1	5'-AGATGGTATGGACCCCAATACATHACNCAY-3'	
Nested	F1	5'-TCTTGGAGCCAAATAGCTCARRTC-3'	606 bp
	R4	5'-CTGGGGTTTCCNCCTCAAAGYTGY-3'	
qPCR	NF2	5'-CATGGTATTCTGACGTRGACAA-3'	99 bp
	NR2	5'-CCATAGGTRTGTTTTATCCATTTGC-3'	

<Table 2> Epidemiological investigation sample information used in this study

Sampling area	Jincheon			Danyang			
Species	No. of sample	Length (cm)	Weight (g)	Species	No. of sample	Length (cm)	Weight (g)
Bullhead (*Pelteobagrus ussuriensis*)	10	12.2±2	39.5±12	Juvenile Crucian carp 1 (*Carassius auratus*)	10	5.4±1	3.6±1
Crucian carp (*Carassius auratus*)	10	5.9±1	3.9±1	Juvenile Crucian carp 2 (*Carassius auratus*)	10	5.4±1	2.9±1

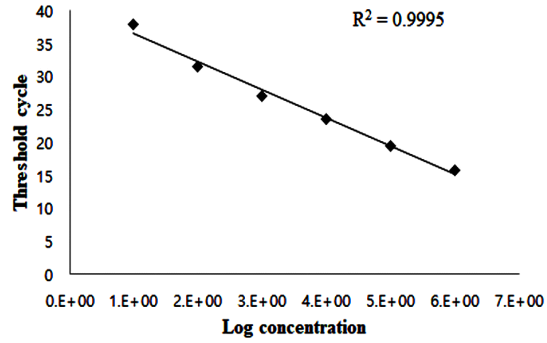
Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 표준 SVCV strain의 검출 비교(qPCR 및 RT-PCR) 및 세포 감염 한계

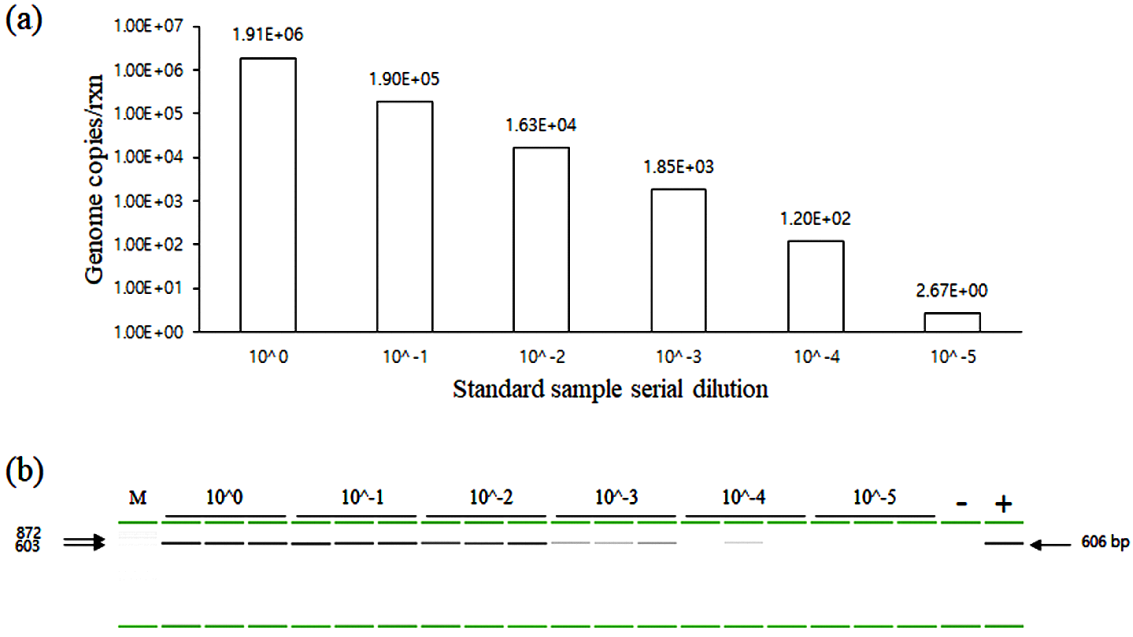
Plasmid DNA copy 값(x)에 대한 Ct 값(y)의 표준 회귀식은 y = -3.779 × x + 39.456을 이용 하였다([Fig 1]).

SVCV 표준 strain의 단계희석 샘플을 qPCR로 분석한 결과, 원액(농도)의 10^{-4} 희석배율에서 1.2 × 10^2 copies/rxn, 10^{-5} 희석배율에서 2.6 copies/rxn (Ct value: 34.56)까지 검출되었다([Fig 2a]). RT-PCR은 first PCR에서 10^{-1} 희석배율 까지 검출되었고, nested PCR은 10^{-4} 희석배율(1.2 × 10^2 copies/rxn)에서 3반복 중 1개 실험구에서 특이 band를 확인 할 수 있었다([Fig 2b]).

OIE aquatic manual의 SVC 분자생물학적 진단에서 F1R2 set (first) 및 F1R4 set (nested) primer를 권고하고 있으나, 이는 진단과 유전형 분석을 위한 degenerate primer로 real-time PCR과 비교하여 검출감도(sensitivity)가 상대적으로 낮게 나타난 것으로 예상된다.



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



[Fig 2] DNA of serial diluted standard SVCV strain were analyzed the minimum detection limit by (a) quantitative real-time PCR and (b) RT-PCR(nested).

Shao et al.(2016)의 정량분석법에서 특이 probe를 이용한 이론적인 검출한계는 2 ~ 7 genomic copy이며, 본 연구에서 SYBR Green을 이용한 실험에서는 10^{-5} 희석배율에서 2.6 copies로 유사하게 나타났다.

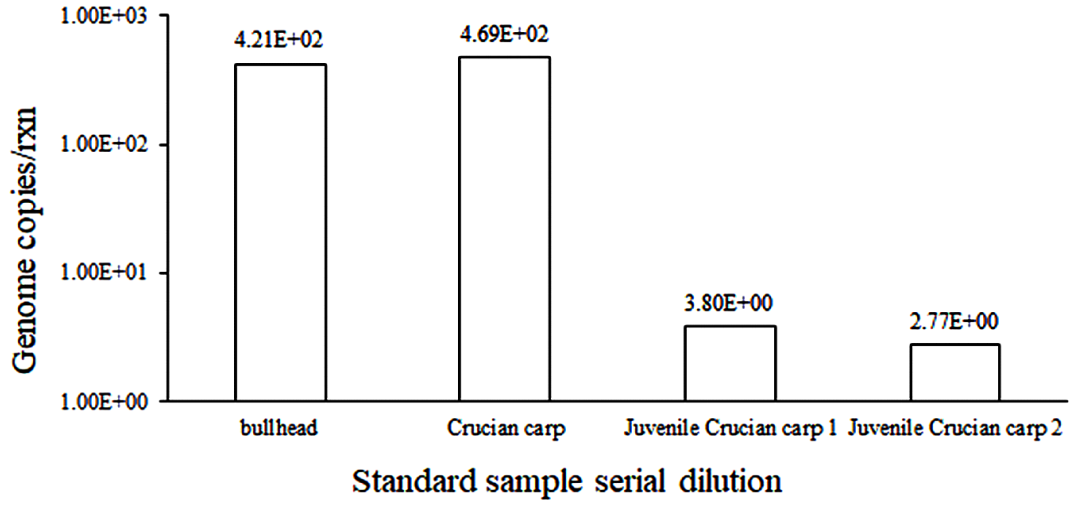
단계 희석한 SVCV 표준 strain 배양액을 EPC cell에 접종 7일 후 CPE형성을 확인 한 결과, 10^{-4} 희석배율까지 CPE가 확인되었다. 배양액에서 SVCV의 RT-PCR 결과 first 및 nested PCR에서 10^{-4} 희석배율까지 특이 band가 나타났고, qPCR 결과 원액부터 10^{-4} 희석배율까지 10^5 copies/rxn로 일정한 수준으로 확인되었다. 10^{-5} 희석액은 약 10^2 $TCID_{50}$/well의 농도로 접종되었으며 7일 후 CPE가 확인되지 않았다. 10^{-5} 배양액의 qPCR 분석결과 3반복에서 검출 한계 미만(1.6 copies/rxn) 또는 불검출로 나타났다(data not shown).

2. 역학조사 시료 조직 내 SVCV 정량분석

충북 진천 역학조사 PCR 양성시료의 qPCR 분석결과 대농갱이에서 4.2×10^2 copies/rxn, 붕어시료에서 4.6×10^2 copies/rxn로 확인되었고, 충북 단양군 붕어시료 정량분석 결과 붕어치어1에서는 3.8 copies/rxn, 붕어치어2에서는 검출한계가 2.7 copies/rxn 부근으로 나타났다([Fig 3]).

충북 단양 붕어치어 시료의 경우 SVCV 정량분석결과 검출한계 부근으로 세포배양법에서 CPE 미형성에 대한 데이터의 일관성이 있었다. 그러나 진천의 대농갱이와 붕어 시료조직 내 SVCV 정량분석 결과 세포배양 한계농도 이상으로 검출되었으나 CPE 미형성으로 확인되었다. SVCV는 bullhead catfish에서 검출이 보고되었으나(Siwicki et al., 2003, Giulia et al., 2017), 감염에 따른 임상증상 및 병원성 등에 대해서는 잘 알려져 있지 않다.

SVC의 병원성은 1년생 미만의 개체에서 높게 나타나는 등 숙주의 연령에 따라 다르게 나타나지만(Shchelkunov and Shchelkunova, 1989), 수온은 SVC 감염의 경과와 결과를 결정하는 주요한 요인으로 알려져 있다(Fijan et al., 1971; Fijan, 1976; Baudouy, 1979a, b, c; Ahne, 1980). 50 g의 잉어에 SVC를 10^3 $TCID_{50}$/fish의 농도로 인위감염시킨 결과 10℃에서 4주간 90%의 폐사율을 확인



[Fig 3] The epidemiological investigation sample of aquaculture farm of Chungcheongbuk-do were analyzed by qPCR for SVCV quantitation.

하였고, 20℃에서는 폐사가 없었으며, 4주 후에 중화항체가 형성되었다. 750 g의 잉어에 10^5 $TCID_{50}$/fish로 인위감염 시킨 뒤 10℃에서 1주간 순치 후 20℃까지 수온을 상승시킨 결과 4주 후 가장 높은 중화항체 값을 나타냈고, 이후 10℃로 수온을 하강시켜 10^6 $TCID_{50}$/fish로 재감염 시켰을 경우 폐사가 나타나지 않았다. 또한 인위감염 후 20℃, 15℃, 10℃의 수온을 유지하였을 경우 각각 8주(20℃), 9주(15℃), 10주(10℃) 후에 가장 높은 중화항체 값이 나타났다(Ahne, 1986). 또한 SVCV는 수온이 바이러스의 복제(replication)와 증식(proliferation)에 직접적으로 관여하고, zebrafish의 경우 22℃에서 가장 높은 증식 및 폐사(60%)를 나타냈으며, 28℃에서 가장 낮은 폐사(20%)가 보고되었다(Zhou et al., 2020).

본 연구에서 충북 진천(26℃) 및 단양(28℃) 역학조사시료는 일차 세포배양 7일 후 CPE가 확인되지 않았으며, 2차 배양 7일 후에도 CPE 미확인으로 나타났다. 이러한 결과는 바이러스 입자를 보균하고 있었으나 수온 상승으로 어체 내에서 불활화 되어 PCR양성이나 세포배양에서 CPE를 형성하지 않은 것으로 예상된다.

결론적으로 충북 진천 및 단양 역학조사시료는 qPCR, RT-PCR에서 세포배양한계 이상으로 검출되었으나, EPC에서 CPE를 형성하지 않아 최종음성으로 확인되었다. 이러한 결과는 SVC의 확산 방지를 위한 방역조치 및 역학 연구에 중요한 자료로 이용될 것이다.

References

Ahne W(1980). Rhabdovirus carpio-Infektion beim Karpfen (*Cyprinus carpio*): Untersuchungen über Reaktionen des Wirtsorganismus. Fortschr Vet. 30, 180~183.

Ahne W(1986). The influence of environmental temperature and infection route on the immune response of carp (*Cyprinus carpio*) to spring viremia of carp virus (SVCV). Vet Immunol Immunopathol. 12(1-4), 383~386. http://dx.doi.org/10.1016/0165-2427(86)90144-3.

Ahne W, Bjorklund HV, Essbauer S, Fijan N, Kurath G and Winton JR(2002). Spring viremia of Carp (SVC). Dis Aquat Organ. 52(3), 261~272. http://dx.doi.org/10.3354/dao052261

Baudouy AM, Danton M and Merle G(1980). Experimental infection of susceptible carp fingerlings with spring viremia of carp virus, under wintering environmental conditions. Fish Dis. 23~27. https://doi.org/10.1007/978-3-642-67854-7_4.

Baudouy AM, Danton M and Merle G(1980). SVCV infection of Carp (author's transl). Annales de recherches veterinaires. 11(3), 245~249.

Baudouy AM, Danton M and Merle G(1980). Virémie printanière de la carpe: étude expérimentale de l'infection évoluant à différentes températures. Annales de l'Institut Pasteur/Virologie. 131(4), 479~488. https://doi.org/10.1016/0769-2617(80)90045-3

Bedendo G, Panzarin V, Fortin A, Zamperin G, Pretto T, Buratin A, Quartesan R, Sabbion M, Salogni C, Pascoli F, Toffan A(2018). Detection and characterization of a rhabdovirus causing mortality in black bullhead catfish, Ameiurus melas. J Fish Dis. 41(7), 1063~1075. https://doi.org/10.1111/jfd.12797.

FIJAN N(1976). Diseases of Cyprinids in Europe. Fish Pathol. 10(2), 129~134. https://doi.org/10.3147/jsfp.10.129

Ghasemi M, Zamani H, Hosseini S M, Karsidani SH and Bergmann SM(2014). Caspian White Fish (*Rutilus frisii kutum*) as a host for spring viraemia of carp virus. Vet Microbiol. 170(3-4), 408~413. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.032.

Shao L, Zhao J and Zhang H(2016). An N-targeting real-time PCR strategy for the accurate detection of spring viremia of carp virus. J virol Methods. 229, 27~34. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.12.008

Shchelkunov IS and Shchelkunova TI(1989). Rhabdovirus Carpio in Herpivorous Fishes: Isolation, Pathology and Comparative Susceptibility of Fishes. Viruses of lower vertebrates. 333~348. https://doi.org/10.1007/978-3-642-83727-2_31.

Siwicki AK, Pozet F, Morand M, Kazuń B, Trapkowska S, Małaczewska J(2003). Influence of methisoprinol on the replication of rhabdoviruses isolated from Carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (Ictalurus melas): in vitro study. Pol J Vet Sci. 6(1):47-50. PMID: 12675468.

Stone DM, Ahne W, Denham KL, Dixon PF, Liu CY, Sheppard AM and Way K(2003). Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp virus and pike fry rhabdovirus isolates reveals four genogroups. Dis Aquat Organ. 53(3), 203~210. https://doi.org/10.3354/dao053203.

Teng Y, Liu H, Lv JQ, Fan WH, Zhang QY and Qin QW(2007). Characterization of complete genome sequence of the spring viremia of carp virus isolated from common carp (*Cyprinus carpio*) in China. Arch Virol. 152(8), 1457~1465. https://doi.org/10.1007/s00705-007-0971-8.

Walker PJ and Winton JR(2010). Emerging viral diseases of fish and shrimp. Vet Res. 41(6), 51. https://doi.org/10.1051/vetres/2010022.

Zhou XY, Lu LF, Li ZC, Zhang C, Chen DD and Li S(2020). Temperature effects on SVCV propagation and the related IFN response in zebrafish. Aquac, 533, 736084. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736084.

• Received : 11 October, 2021
• Revised : 18 November, 2021
• Accepted : 24 November, 2021