



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

패류 내 축적 흰반점바이러스
(WSSV)의 새우에 대한 위험 분석



2017년 2월

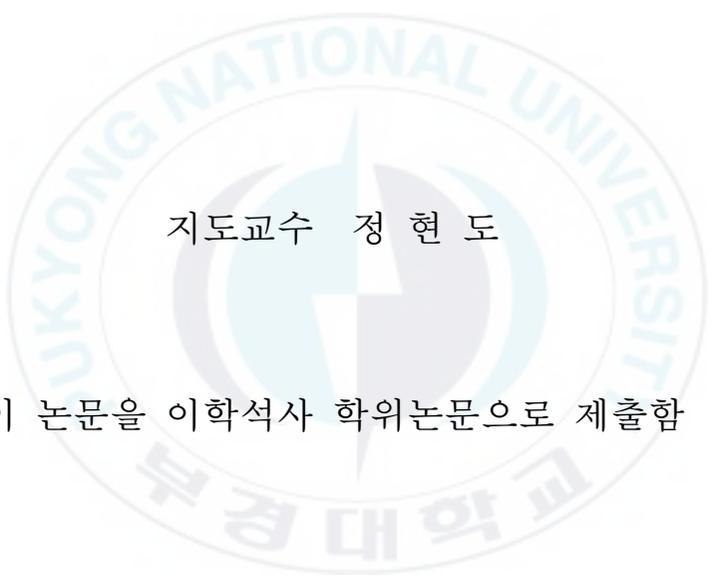
부경대학교대학원

수산생명의학과

민준규

이 학 석 사 학 위 논 문

패류 내 축적 흰반점바이러스
(WSSV)의 새우에 대한 위험 분석



지도교수 정 현 도

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2015년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

민 준 규

민준규의 이학석사 학위논문을 인준함.

2017년 2월 24일



위원장 이학박사 김도형 (인)

위원 농학박사 허민도 (인)

위원 이학박사 정현도 (인)

목 차

Abstract

I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 실험 개체 및 virus 분석	4
1.1. 새우	4
1.2. 패류	5
1.3. 새우 및 패류의 조직 분리	6
1.4. Virus	7
1.5. Virus의 핵산 분리	8
1.6. PCR (Polymerase chain reaction)	9
1.6.1. Primer	9
1.6.2. Primer의 PCR sensitivity 비교	12
1.6.3. Virus의 정량 비교	13
1.6.4 PCR을 이용한 WSSV의 검출을 위한 감염 새우의 target organ 선정	15
2. 패류 종별 accumulation 및 depuration 양상 확인	16
3. 패각 모양에 따른 WSSV 축적의 차이점	19
4. Vector로써 다른 어류 바이러스와의 패류 조직 내 축적 관계 확인	20
5. 침지법으로 축적한 패류 내 WSSV의 위험성 확인	21
III. 결 과	23
1. PCR	23
1.1. Primer의 PCR sensitivity 비교	23
1.2. PCR을 이용한 WSSV 감염 새우 조직 내 WSSV 검출 시의 target organ 선정	25
2. 패류 종별 accumulation 및 depuration 양상 확인	27

3. 패각 모양에 따른 WSSV 축적의 차이점	34
4. Vector로써 다른 수생 생물 바이러스와의 패류 조직 내 축적 관계 확인	37
5. 침지법으로 축적한 패류 내 WSSV의 새우에 대한 위험성 확인	39
IV. 고 찰	41
V. 요 약	48
VI. 감사의 글	50
VII. 참고문헌	52



Risk assessment to shrimp induced by the White Spot Syndrome Virus
accumulated in shellfish

Joon Gyu Min

*Department of Aquatic life medicine, Graduate School,
Pukyong National University*

Abstract

White spot syndrome virus (WSSV) is a major pathogen causing large economic losses in aquatic farms of shrimp of the world. Owing to the unavailability of immortal cell line for culturing of WSSV *in vitro*, transmission experiments with bivalve shellfish known as an important vector are hard to characterize.

In this study, we developed a PCR method which is more sensitive for detection of WSSV compared to that of the conventional PCR of OIE utilizing as a standard method, and applied to chase the potential risk of shellfish as a vector for transmission of WSSV in aquatic filed by accumulation of WSSV in tissues.

Primers designed from the nucleotide sequence of WSSV VP28 showed higher sensitivity for detection of WSSV(85%, 17/20) in 2-step amplification compared to the results performed with OIE reference primers (75%, 15/20). We have also demonstrated the lowest PCR detection limit of WSSV in the infected shrimp when the subcuticular connective tissue among various tissues used as target sample for WSSV detection by 2nd PCR.

For analysis of the risk in shellfish that might be induced by WSSV in shellfish, we compared the PCR detection rate of WSSV using gill, midgut and mantle tissues of 4 different shellfish species (oyster, mussel,

clam, and bloody clam) during accumulation and depuration process. Except gill, two other tissues showed the same frequency of positive PCR result of WSSV in 5 samples of each different shellfish species exposed to 5000X diluted WSSV infected tissue homogenate for 24 hrs in 20 ℓ tank (1/5000X, corresponding 1.00E + 10 copies / 20 ℓ seawater). Thus, through the analysis of shellfish gill tissue for accumulation of WSSV, we found mussels showed 100% (5/5) detection rate since 12hrs accumulation process, and the lowest results in clam(20%, 1/5). But we were not able to see a significant different frequency of WSSV detection in all three different tissues from 4 shellfish species used to assess the depuration rate.

Also we compared the level of accumulation between RSIV as an another aquatic fish pathogen and WSSV by comparison of the detection frequency of each pathogen in shellfish gill tissues. Shellfish were exposed to approximately 5.00E +04 copies per ml of each WSSV and RSIV in seawater by immersion method. After 60hrs at 23°C, frequency of positive sample in shellfish (21/48, 43.8%) exposed to WSSV was almost twice as high as that of RSIV (12/48, 25.0%).

To assess the risk of shellfish as a vector of WSSV, 20 individual of each oyster and mussel exposed to 5000X diluted WSSV-infected tissue homogenate for 24 hrs in 20 ℓ tank (1/5000X, corresponding 1.00E + 10 copies / 20 ℓ seawater). In each two 100 ℓ tank, those shellfish were moved and cohabitated with 20 shrimp (20g of body weight) at 23°C for 20 days and found the cumulative mortality of 44% (7/16) and 13 (2/16) with exposed oyster and mussel, respectively. Certainly, shellfish that can accumulate WSSV in tissue have the potential to act as a vector for transmission of WSSV.

I. 서 론

흰반점 바이러스(White Spot Syndrome Virus, WSSV)는 전 세계에서 대규모로 양식되는 새우에 감염하여 대량폐사를 일으키는 원인 바이러스이며 전염성이 매우 강한 특징을 보인다(Flegel, 1997). 흰반점 바이러스는 이중나선형 DNA 바이러스로서 길이는 약 275 nm, 넓이는 약 120 nm인 막대모양의 형태이며(Wongteerasupaya et al., 1995), 유전체의 크기는 약 290~305 kb에 이른다(Van Hulten et al., 2001; Yang et al., 2001). WSSV에 감염된 새우는 외골격에 흰색의 반점이 나타나는 특징을 나타내며, 감염 후 3~10일 안에 100%의 치사율을 보인다(Chou et al., 1995)

1991년 이후 동아시아에서 바이러스가 처음 발생한 이후, 바이러스는 아시아 전역과 미국으로 유입되어 양식 새우에 대량 폐사를 일으켜, 새우 양식 산업에 큰 피해를 야기 시켜왔다(Walker PJ and Mohan CV, 2009). 국내에서도 1993년 서해안 지역의 대하와 보리새우 양식장에서 처음 발견되었으며 매년 새우 양식에 많은 피해를 가져오고 있다(Kim et al., 1997, Jang, 2000; Kim et al., 2004; Jang et al., 2007). 이후 피해를 줄이기 위해 국내 주요 새우 양식을 우리나라 토착 새우종인 대하 *Fenneropenaeus chinensis*에서 흰반점 바이러스에 비교적 강한 흰다리새우 *Litopenaeus vannamei*로 바꿔 양식하기 시작하였으나, 이 또한 피해가 발생하고 있는 실정이다. 이와 같이 WSSV에 의한 새우 양식의 피해는 해마다 증가하고 보고되지만, 다른 국가에 비해 연구가 매우 부족한 실정이고 바이러스의 유입 및 전파 경로에 대한 연구는 부족한 상황

이다.

WSSV의 감염경로와 감염요인에 대한 연구로서, 수생동물 바이러스성 질병의 확산에 가장 큰 영향을 미치는 요인은 감수성 있는 숙주생물을 비롯하여 환경수와 바이러스 매개체 또는 함유생물이라는 큰 요소가 존재한다. Sobsey & Jaykus (1991)는 패류에서 여과섭식(filter-feeding)을 통한 먹이 섭취 시에 병원체를 비롯한 다양한 물질을 체내에 축적시킬 수 있으며, 소화과정 동안 불활성화 되지 않거나 중장선(digestive gland)에 특이적으로 부착하여 존재하는 바이러스 입자를 일정 조건에서 배출할 수도 있기 때문에 매개체 또는 함유생물로서의 역할을 할 수 있는 가능성이 있다고 한다. 또한 패류는 보통 한 곳에서 계속 머물러 있다는 특징 때문에 오랫동안 환경에서의 세균·바이러스·중금속 등 여러 오염 물질등을 체내에 축적 함으로써 환경 분석이나 오염 분석에서의 biomonitor의 대상 생물로 활용 되어 왔다(Claissse 1989, Kwan et al. 2003, Miller et al. 2005). 특히 우리나라 양식의 경우 어패류 및 새우 양식장이 밀집된 공간 내 인접하게 존재하고 있으므로, 패류와 해수에 존재하는 수생동물 바이러스성 질병의 monitoring과 감염 가능성에 대한 평가는 수생동물질병 전파 및 위험성을 최소화하기 위해 필수적이다. 또한 현재 대한민국과 유럽에서는 mollusc를 WSSV의 vector로서 검역을 실시하고 있으나 이에 대한 근거는 없는 실정이며, 전 세계적으로 패류를 포함한 연체동물에서의 WSSV에 관한 연구 또한 부족한 실정이다. C. Vazquez-Boucard (2010, 2012)의 연구를 통해, 굴이 대량의 물을 filtering 하는 도중 물속의 WSSV 입자를 포집하여 아가미와 소화관에 WSSV를 축적시키는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 굴과 같은 이매패류가 야생과 양식 환경에서 WSSV의 vector로서 역할을 하는지는 정확한 과학적인 연구가 없고 향후 실험적으로 분석 되어져야 할 부분이다.

따라서 본 연구에서는 PCR을 통한 WSSV의 검출법을 개선하고, 이를 사용하여 WSSV의 vector로서 이매패류의 역할을 분석하고자 하였다. 먼저 i) WSSV를 PCR에 의한 검출을 위한 OIE primer (146 F/R primer)와 본 실험실에서 다양한 WSSV의 strain의 viral capsid 유전자의 nucleotide sequence 비교에서 conserve한 부위를 대상으로하여 개발한 W VP28 primer와의 WSSV 검출을 위한 PCR-sensitivity를 비교하고자 하였고, ii) 감염 새우의 각 조직별 바이러스의 PCR 검출 한계를 비교하여 최적의 분석 대상조직을 선정하고자 하였다. 이후 iii) immersion 법에 의하여 WSSV에 노출된 다양한 패류 조직 내 바이러스의 축적 및 방출 양상을 비교 확인하고, iv) 다른 수생 바이러스인 RSIV와의 축적 양상과 비교 분석하였다. 또한 v) WSSV에 폐사한 새우 조직 homogenate를 immersion 법으로 직접 패류 조직 내 축적 후 새우와 cohabitation을 하여 패류 조직 내의 WSSV가 수중으로 방출된 이후 새우에서의 폐사율을 분석함으로써 vector 내 축적된 WSSV가 나타내는 새우 양식현장에서의 위험성을 직접 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 개체 및 virus 분석

1.1. 새우

실험에 사용한 새우는 국내의 해변시장의 새우 도매상에서 흰다리 새우 (*Litopenaeus vannamei*)를 구입하였다. 새우는 200 l의 수조에서 1일 1회 사료 투여 및 3일에 1번씩 환수를 하며 $23\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 에서 7일 동안 순치 시켜주었다. 실험새우는 무게 17-23g, 길이 16-18cm의 일정한 크기의 새우를 사용하였으며, 실험에 사용하기에 앞서 5마리의 새우를 무작위로 선별하여 pleopod, subcuticular connective tissue, abdominal muscle 조직을 분리 후 total DNA 분리를 실시하였다. 그 후, PCR을 이용한 WSSV 표준 검출 방법인 OIE의 protocol에 따라 146 F/R primer set를 이용하여 PCR을 실시하여 2-step PCR에서 음성 반응을 확인하여 WSSV에 감염되지 않았음을 확인하였다.

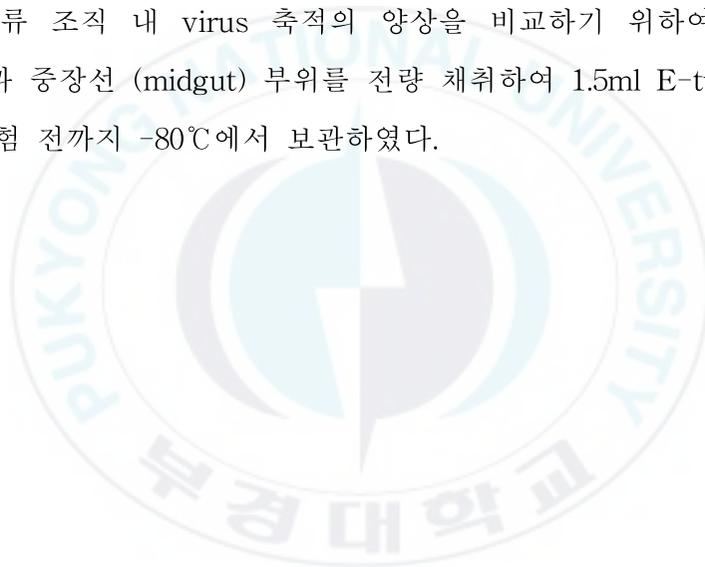
1.2. 패류

패류는 우리 나라 주요 양식 패류종인 참굴 (*Crassostrea gigas*), 홍합 (*Mytilus coruscus*), 바지락(*Venerupis philippinarum*)과 꼬막(*Anadara granosa*)을 남천의 해변시장에서 구입하였고, 200 ℓ 수조에서 3일에 1번씩 환수를 하며 23±0.5℃에서 7일 동안 순치시켜주었다. 먹이는 상업적으로 시판되는 Reed Mariculture® instant algae shellfish diet 1800(Reed Mariculture)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 먹이를 주었다. 실험에 사용하기에 앞서, 각 패류의 gill과 midgut 그리고 mantle 조직을 분리하여 total DNA 분리를 해주었고, PCR을 이용한 WSSV 표준 검출 방법인 OIE의 protocol에 따라 146 F/R primer set를 이용하여 PCR을 실시하여 2-step PCR에서 음성 반응을 확인하여 WSSV에 감염되지 않았음을 확인하였다.

1.3. 새우 및 패류의 조직 분리

본 연구에서 사용한 새우에서의 PCR을 통한 WSSV 검출 시, 새우의 분석에 사용할 조직 선정을 위해, 각 조직별로 1st PCR 시 검출 한계를 확인하여 조직별로 비교하고자 하였다. 감염새우의 조직의 pleopod · subcuticular connective tissue · abdominal muscle 조직을 분리하여 1.5ml E-tube로 전량 옮겨 담아 실험 전까지 -80℃에서 조직을 보관하였다.

패류는 패류 조직 내 virus 축적의 양상을 비교하기 위하여 아가미 (gill) 조직과 중장선 (midgut) 부위를 전량 채취하여 1.5ml E-tube로 옮겨 담아 실험 전까지 -80℃에서 보관하였다.



1.4. Virus

2014년 8월 국립수산과학원 서해수산연구소로부터, 자연적으로 WSSV에 감염된 WSD 현장 감염 새우를 이용하였다. 실험에 사용하기에 앞서 새우 중 10마리를 무작위로 선별하여 pleopod, subcuticular connective tissue, abdominal muscle 조직을 분리 한 다음 total DNA를 분리하였다. 그 후, PCR을 이용한 WSSV 표준 검출 방법인 OIE의 protocol에 따라 146 F/R primer set를 이용하여 PCR을 실시하여 1-step PCR product를 확인하여 WSSV에 감염되어 있는지 재확인 하였고, 실험 사용하기 전까지 -80°C deep-freezer에 보관하여 사용하였다.

RSIV는 2000년 9월 국내 남해안 양식장에서 돌돔으로 분리한 Megalocytivirus sachun-1 (IVS-1)을 PMF cell에 10배 희석하여 0.1ml 접종한 후 FBS가 5% 첨가된 L-15 배지에 25°C 에서 7일간 배양 후 cytopathic effects (CPE)가 나타나면 배지 상등액을 회수하여 0.2 μm syringe filter를 통과시킨 후 획득한 바이러스의 일부를 취하여 실험에 사용하기 전까지 -80°C deep-freezer에 보관하여 사용하였다(Jeong et al., 2003).

1.5. Virus의 핵산 분리

감염새우의 조직 10 mg 또는 패류의 조직 10mg으로부터 GeneAllR Exgene™ Tissue SB mini kit (GeneAll, Korea)를 사용하여 제조사의 protocol에 따르고, 최종 25 μ l의 elution buffer를 사용하여 total DNA을 분리하였다. 분리한 DNA는 실험 전까지 -20℃에서 보관하였다.



1.6. PCR (Polymerase chain reaction)

1.6.1 Primer

WSSV의 감염 확인을 위해 OIE에서 제시하는 WSSV 표준 검출 방법인 146F/R set(Lo et al., 1996a)을 이용하여 PCR을 실시하였다(Table 1). 또한 본 연구에서 새롭게 제작한 W VP28 primer set은 WSSV의 viral protein을 발현하는 VP28 gene을 이용하여 염기서열로부터 특이적으로 제작되어 사용하였다. 먼저 Genbank (NCBI)로부터, 여러 origin의 WSSV에 존재하는 VP28 gene의 염기 서열을 얻은 후, MACAW program (Version 2.0.5., National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, ND, USA)을 이용하여 비교하여 conserve한 부위를 target으로 하는 primer를 제작하였다(Figure 1.). 또한 2nd PCR을 위한 primer는 같은 VP28 gene을 target gene으로 제작된 WSSV VP 28F2 / R2 (Park et al., 2013)을 사용하였다. 새우 조직에서의 DNA 분리의 positive control으로는 decapod 18S rRNA를 검출하는 143F/145R primer를 사용하였다(Lo et al., 1996).

패류의 RSIV 축적의 확인은 major capsid protein (MCP) gene에 conserved 한 부위를 target으로 제작된 M1F/R primer set를 이용하여 PCR을 실시하여 감염을 확인하였다. (Jee et al., 2011).

Target	Primer	Primer sequence (5' to 3')	Amplicon Size (bp)
WSBV 1461-bp Sal I DNA fragment (OIE)	146F1 / R1 (1 st PCR)	ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG TAATGCGGGTGAATGTTCTTACGA	1447
	146F2 / R2 (2 nd PCR)	GTAAGTCCCCCTTCCATCTCCA TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT	941
VP 28 gene	W VP28 F1 / R1 (1 st PCR)	CTTCACTCTTTCGGTCGTGTC TCGGTCTCAGTGCCAGAGTA	601
	WSSV VP28 F2/R2 (2 nd PCR)	CACTCTTTCGGTCGTGTCG AAGGAGGAGGTGTGGAGCTA	408
	WSSV qPCR F / R	TGTGACCAAGACCATCGAA CCACACCTTGAATGTTCCC	281
Decapod 18s RNA	143F / 145R	TGCCTTATCAGCTNTCGATTGTAG TTCAGNTTGGCAACCATACTCCC	848
RSIV MCP gene	MIF / MIR	GCTGCCCATGCCAATCATCT ATGCGATGGAGACCCACTTG	401

Table 1. PCR primers used in this study

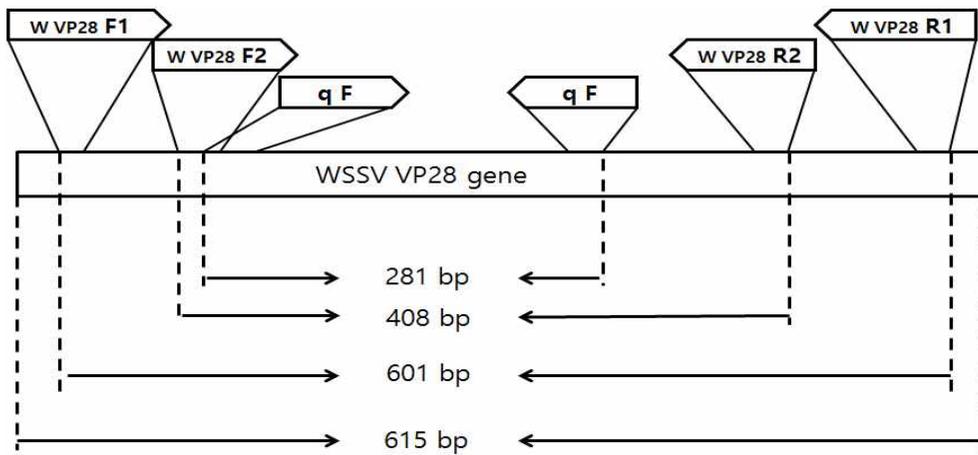
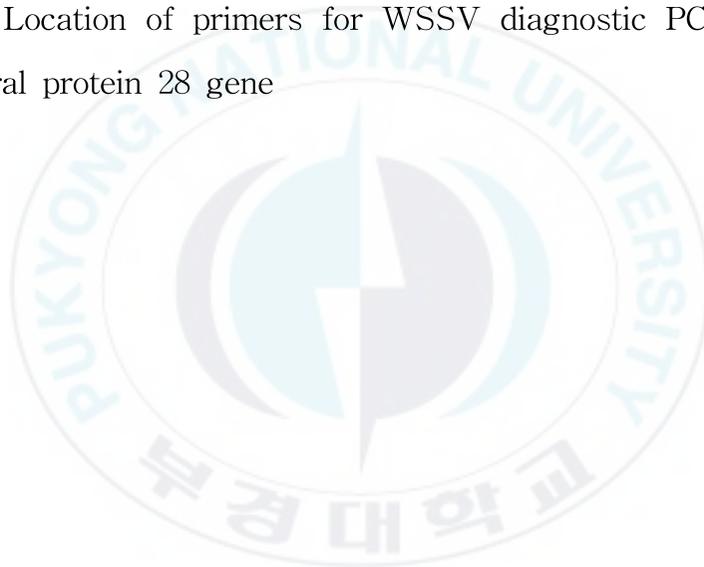


Figure 1. Location of primers for WSSV diagnostic PCR using WSSV viral protein 28 gene



1. 6. 2. Primer의 PCR sensitivity 비교

OIE primer set(146F/R)와 본 연구에서 새롭게 제작한 W VP 28 primer set를 사용하여, PCR을 이용한 WSSV 검출의 sensitivity를 비교하고자 하였다.

실험에 앞서 OIE primer set를 이용하여 2nd PCR에서만 양성을 보이는 약하게 감염된 새우를 확인하였다. 그 중 서로 origin이 다른 4마리의 새우를 이용하여, 각 새우마다 subcuticular connective tissue, hepatopancreas, pleopod, gill, muscle 조직 10mg 씩을 분리하여 실험에 사용하였다. 분리한 조직은 total DNA 분리 후, 두 종류의 primer set를 이용하여 2nd PCR을 실시하여 전기영동 결과 WSSV 검출율을 비교하였다.

1.6.3. Virus의 정량 비교

WSSV viral DNA의 absolute qPCR은 0.2 ml microtube에 TOPreal™ qPCR 2× PreMIX (SYBR Green with low ROX, Enzymomics) 10 µl, 0.5 pM의 각 primer, 그리고 1 µl의 template DNA를 첨가한 후, 최종 volume이 20 µl이 되도록 nuclease-free water를 첨가하였다. qPCR 조건은 95°C에서 15분간 반응한 후, 95°C 10초, 60°C 15초, 72°C 20초의 반응을 1 cycle로 하여 40 cycles를 반응시켰고 마지막 cycle 후에는 모든 반응물에 대하여 72°C부터 95°C까지의 영역에서 melting curve 분석을 실시하였다. Standard는 2014년 8월에 흰반점 질병을 보인 흰다리새우를 사용하여 WSSV 농도표준 제작을 위한 시료로 사용하였다. 새우의 pleopod와 subcuticular connective tissue로부터 핵산을 추출하였다. 추출된 핵산을 주형으로 하여 WSSV VP28 gene을 target으로 하는 primer set으로 qPCR F/qPCR R primer set를 사용하여 (Reyes at al., 2007) PCR을 수행한 다음, 1% agarose 겔을 이용하여 전기영동하였다. 증폭된 281 bp의 product를 agarose 겔에서 자른 다음, GeneAll Exgene™ Gel SV kit (GeneAll, Korea)를 이용하여 정제하였다. 정제된 281 bp의 산물을 Promega pGEM-T easy vector(Promega, USA)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 삽입한 후 *Escherichia coli* DH5a에 형질전환 시켜 WSSV-inserted plasmid를 제작하였다. WSSV의 증폭산물이 클로닝 된 클론을 확인 후 대량 배양하였고, 재조합된 plasmid 는 재분리 하여 10-fold로 단계 희석하여 standard curve ($1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^1$ copies/µl)를 작성하는데 사용하였다.

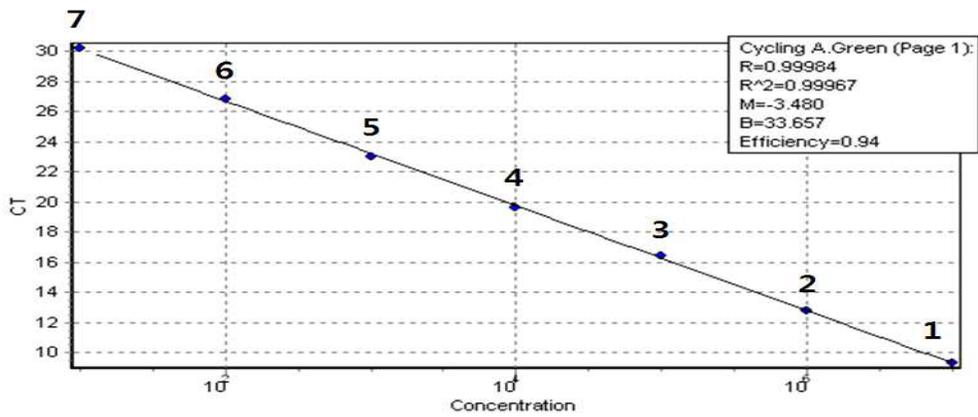
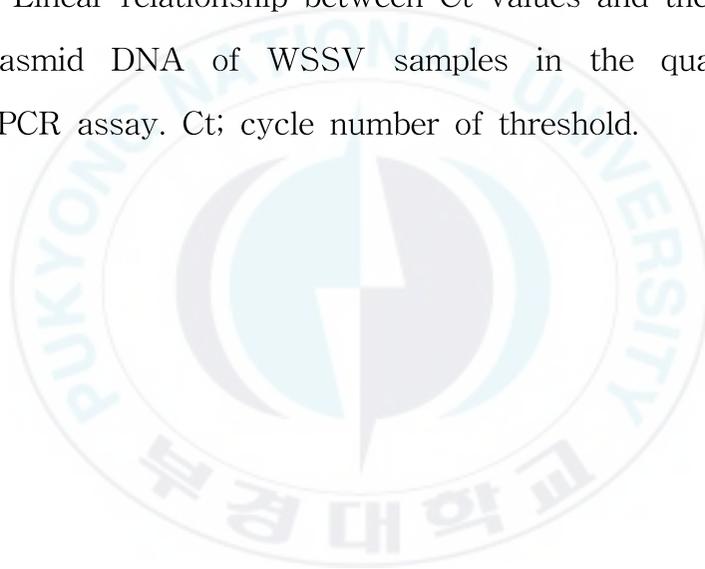


Figure 2. Linear relationship between Ct values and the dilution of the plasmid DNA of WSSV samples in the quantitative real-time PCR assay. Ct; cycle number of threshold.



1.6.4. PCR을 이용한 WSSV의 검출을 위한 감염 새우의 target organ 선정

새우에서의 PCR을 통한 WSSV 검출 시, 어떤 조직을 이용하여 검출할 것인지 결정하기 위해 1st PCR 시의 검출 한계를 확인하여 조직별로 비교하고자 하였다.

서해안 연구소에서 받은 현장 감염 새우 조직 1g을 채취한 후 PBS 9ml을 첨가하여 homogenize 하고 원심 분리 후 상등액만 취하였다. 그 후 상등액을 0.45 μ m syringe-filter에 통과 시켜준 후 건강 새우의 복부에 100 μ l에 접종하여 인위적으로 감염시켰다.

5일 후 moribund 상태의 새우를 취하여 pleopod · subcuticular connective tissue · abdominal muscle 조직을 각각 10mg씩 취하였다. 채취한 조직을 total DNA 분리 후 Free D.W로 10배씩 단계희석하여 W VP28 primer F1/R1 primer set를 이용하여 PCR을 실시하고, 검출 한계를 비교하였다. 이 때 decapod primer는 조직 내 WSSV의 DNA 분리 및 PCR inhibitor control로써 사용하였다.

2. 패류 종별 Accumulation 및 Depuration 양상 확인

패류 조직 내 virus 축적은 사육수의 pH, 염분, 온도 등 뿐 아니라, virus의 표면 특성과 패류 자체의 행동 패턴 및 조직의 종류에도 영향을 받는다. 이에 따라 국내에서 가장 많이 유통되는 굴(*Crassostrea gigas*), 홍합(*Mytilus edulis*), 바지락(*Venerupis philippinarum*)과 꼬막(*Scapharca subcrenata*)을 이용하여 WSSV의 패류 조직 간 축적 및 방출 양상을 확인하고자 하였다.

축적 실험은 각 패류 15개체를 종류별로 따로 각각 20L 수조에 넣어준 후 23℃로 수온을 유지시켜 주었다. 에어레이션을 통해 산소 공급과 해수 및 바이러스를 순환시켜 주었고, 패류가 filtration을 하도록 1시간 동안 안정시켜 주었다. 그 후 WSSV 감염으로 폐사한 새우 조직을 각각 4g씩을 해수를 이용하여 갈아준 후 20L 수조에 넣어, 최종 농도가 5000 배로 희석 되도록 하여 virus를 축적시켜 주었고, 바이러스 접종 후 12시간과 24시간에 한번에 5마리씩 sampling을 실시하였다.

방출 실험은 각 패류 30개체를 종류별로 따로 각각 20L 수조에 넣어주었고 이 위와 같은 방법으로 안정시켜 주었다. 이후 위의 방법과 같은 방식으로 12시간동안 WSSV 감염 조직 마쇄액을 이용하여 WSSV를 패류 조직 내에 축적시켜 주었고, 이후 패각에 묻어 있는 virus를 제거하기 위해 표면을 새로운 해수로 rinse해 주었다. 또한 해수 50L에서 30분간 두어 패류 자체가 지니고 있을 수 있는 WSSV-contaminated water를 방출하도록 하였다. 그런 다음 다시 새로운 20L 수조로 옮겨 패류 조직 내 virus를 방출하도록 유도하였고, 6, 12, 24, 48, 72시간에 한번에 5마리씩 sampling을 실시하였다. 또한 패류에서 방출된 virus가 다시 패류 조직으로 유입될 가능성이 있기에 방출 후 6시간과 24시간에 해수를

전량 환수하여 주었다.

패류는 sampling 실시 후 즉시 해부하여 패류의 아가미, 중장선 그리고 맨틀 조직을 분리한 후 실험에 사용하기 전까지 -80°C deep-freezer에 보관하였고, 결과는 W VP28 primer set를 이용하여 2-step PCR을 통해 분석하였다.

패류는 6시간마다 확인하였고 실험 중 폐사 개체는 즉시 제거하였으며, 실험 기간 동안에는 먹이를 주지 않았다.



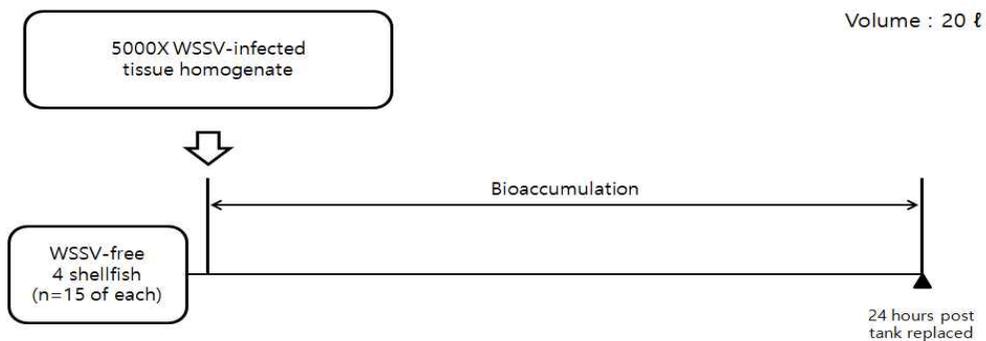


Figure 3. Schematic illustration of the bioaccumulation of shellfish with WSSV-infected shrimp homogenates

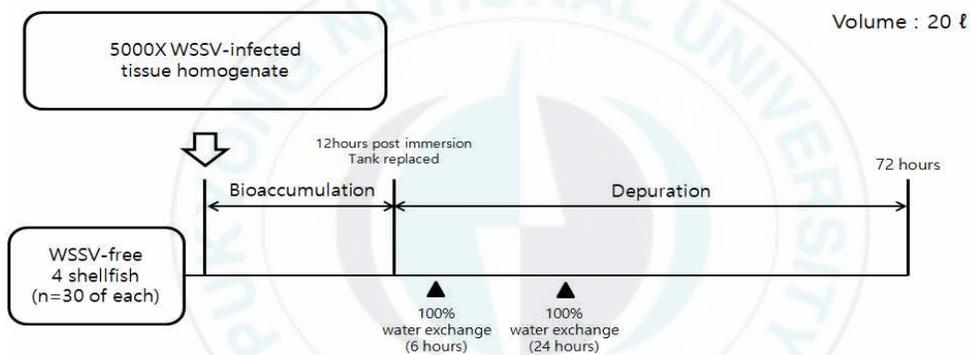


Figure 4. Schematic illustration of the bioaccumulation and depuration of shellfish with WSSV-infected shrimp homogenate

3. 패각 모양에 따른 WSSV 축적의 차이점

패각의 특성에 따른 virus의 흡착에 관해 알아보기 위해서, 패류 조직 없이 패각만을 이용하여 virus 축적의 차이를 보고자 하였다. 굴의 패각은 매끈한 홍합에 비해서 울퉁불퉁한 곳이 많을뿐더러 표면에 여러 해적생물이 붙어 있는데, 이를 조절하여 해수 내 virus의 농도 감소 정도를 상대적으로 비교하여 패각의 축적 차이를 보고자 하였다.

먼저 굴 표면에 존재하는 부착생물에 대한 영향을 알아보기 위해, 같은 개체의 굴 패각을 이용하여 표면의 부착생물의 생물학적 영향이 없도록 autoclave를 실시한 것과 미실시 한 것에서 비교를 하고자 하였다. 또한 개체별 패각 모양에 따른 차이를 확인하기 위해서, 굴과 홍합의 패각을 이용하여 서로 비교하였다. 다른 종에서의 패각 부착 실험에 앞서 패류 종별 패각의 크기가 달라 표면적의 차이가 있기에 실험에 앞서 무작위로 15개의 패각의 길이를 측정하여 표면적을 맞춰주고자 하였다. 홍합에 비해 굴의 가로는 1.53배, 세로는 1.40배, 높이는 1.34배 길어 총 표면적은 약 2.87배가 되어, 굴 25개체에 맞는 홍합의 패각 수는 72개체로 생각할 수 있다. 이에 따라 굴 25개체와 홍합 72개체를 각각 15L 수조에 넣어 온도를 23℃로 유지시켜 주었고, 유기물에 대한 영향을 적게 하기 위해 WSSV 감염 폐사 새우의 조직 1.5g을 마쇄하여 수조에 넣어주어 감염 마쇄액이 10000배 희석되도록 하여 virus를 접종하였다.

해수는 12시간, 24시간, 3일, 5일에 5ml을 채취한 후, 그 중 100ul를 취해 total DNA 분리를 실시하였고, 분리된 DNA를 이용하여 qPCR을 통해 해수 중 WSSV의 농도를 측정하였다.

4. Vector로써 다른 어류 바이러스와의 패류 조직 내 축적 관계 확인

패류 조직 내 virus 축적은 해수의 상태와 패류 종간의 차이 뿐 아니라, virus의 종류 및 표면의 특성과도 관련이 있다(Bedford et al., 1977). 그러므로 다른 수생 생물 바이러스인 RSIV를 이용하여 WSSV와 축적 특성 비교를 통하여 차이점이 있는지 확인하고자 하였다.

굴과 홍합을 이용하여 WSSV와 RSIV 두 종류의 virus의 패류 조직 내 축적을 비교하기 위해, 굴과 홍합 45마리를 한 수조당 15마리씩 20L 수조에 넣어준 후 에어레이션을 통해 산소 공급 및 해수 및 바이러스를 순환시켜 주었다. 그 후 한 그룹은 WSSV와 IVS를 같이 넣어주었고, 다른 그룹은 WSSV와 IVS를 각각을 넣어주었을 때 패류 축적을 확인하는 실험을 실시하였다. WSSV는 감염 새우 마쇄액을 사용하였고, 이 때, WSSV와 RSIV 모두 20L 해수에 약 $5.00E+4$ copies/ml의 농도가 되도록 하여 접종하여 주었다.

패류는 축적 후 12시간과 60시간 후에 각각 6마리씩을 sampling 하였고 아가미 조직을 분리하여 확인하였다. 또한 해수의 경우 해수 100ul를 이용하여 total DNA 분리 후 PCR을 실시하여 해수 내 virus의 감소를 분석하였다.

5. 침지법으로 축적한 패류 내 WSSV의 위험성 확인

패류 조직 내 축적된 WSSV가 다시 해수로 방출되어 새우로 전이가 되고, 그 결과 새우에게 영향을 미치는 지 확인하기 위한 실험을 실시하였다. 실험에 앞서 패류 조직 내 2nd PCR을 통해 WSSV가 없다고 확인된 패류에 인위적으로 WSSV를 축적시키고자 하였다.

굴과 홍합 각각 16개체를 50L 수조에 두어 패류가 filter-feeding을 할 수 있도록 1시간 동안 안정되도록 하였다. 그 후 WSSV에 감염되어 폐사한 개체의 조직 10g을 해수 90ml를 첨가하여 homogenize 하고 이후 50L 해수에 풀어주어, 결과적으로 농도가 5000배 희석되도록 하여 바이러스를 침지하여 주었다. 충분한 accumulation을 위해 overnight을 통해 12시간동안 패류 조직 내 virus를 축적시켜 준 후, 이후 패각에 묻어 있는 virus를 제거하기 위해 표면을 새로운 해수로 rinse해 주었다. 그 후 다른 WSSV가 없는 해수 50L에서 30분간 두어 패류 자체가 지니고 있을 수 있는 WSSV-contaminated water를 방출하도록 하였다. 이후 다시 각각 100L 수조로 옮긴 후 WSSV에 감염되지 않은 건강새우를 각 수조에 16마리씩 넣어 준 후 새우의 폐사를 확인하였다. 또한 새우의 자연적인 폐사 관찰을 위해 negative control로써 새우 16마리를 100L 해수에서 사육시켜주었다.

실험동안 해수는 3일마다 80% 환수하였고, moribund 및 폐사 개체는 즉시 제거하여 주었다. 그 후 새우가 WSSV로 인해 폐사하였는지 확인하기 위해 subcuticular connective tissue 중 10mg을 분리하여 1st PCR을 통해 확인하였다.

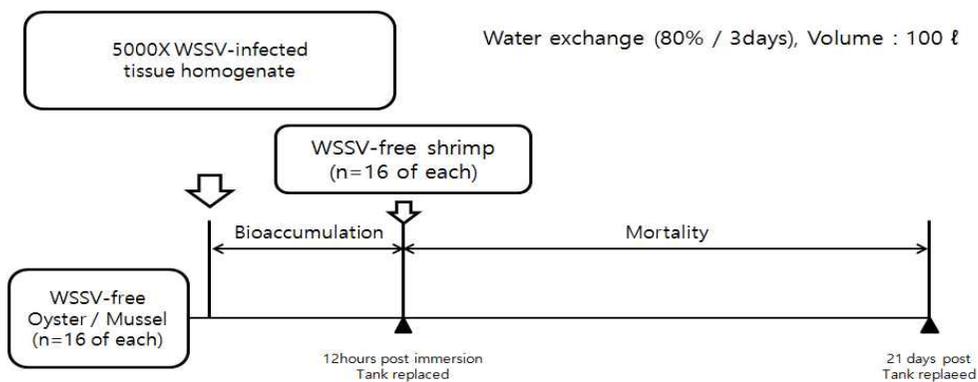
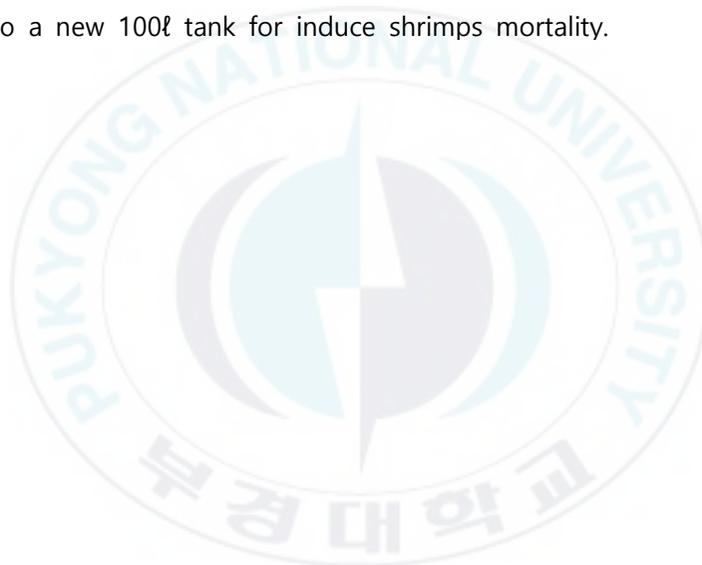


Figure 5. Schematic illustration of the cohabitation of contaminated shellfishes with WSSV-free shrimps. WSSV accumulated Shellfishes were transferred to a new 100l tank for induce shrimps mortality.



Ⅲ. 결 과

1. PCR

1.1 Primer의 PCR sensitivity 비교

Primer에 따른 WSSV의 PCR sensitivity를 비교하기 위해 같은 template를 이용하여 2-step PCR 시 검출율 비교를 통해 PCR sensitivity를 비교하고자 실험을 진행하였다.

Origin이 다른 4마리의 새우의 조직을 이용하여 2nd PCR을 실시한 결과, WSSV 검출율은 OIE 146 F1/R1 primer 에서는 총 20개 시료 중 15개(75%)에서 양성 결과를 확인할 수 있었고, W VP28 primer를 이용한 2nd PCR 결과는 20개 시료 중 17개(85%)에서 양성 결과를 확인할 수 있었다. 결과적으로 W VP 28 primer set가 OIE primer (146 F/R) 보다 WSSV 검출율이 높아 WSSV에 대한 PCR sensitivity가 뛰어난 것을 확인할 수 있었다.

(A) OIE primer (146 F2/R2, 39cycle) - 941bp



(B) VP28 primer(W VP28 F2 / R2, 39cycle) - 408bp



Figure 6. Detection of WSSV in various tissues of shrimp by 2-step PCR with OIE primer set(A) and newly designated primers(B) in this study ; S : subcuticular connective tissue ; H : hepatopancreas ; P : pleopod ; G : gill ; M : muscle

1.2 PCR을 이용한 WSSV 감염 새우 조직 내 WSSV 검출 시의 target organ 선정

WSSV에 감염된 새우에서 PCR을 이용한 WSSV 검출 시 사용할 target organ 선정을 위해 실험을 실시하였다. 각 조직별로 DNA를 추출 후 10배씩 단계희석한 후 1-step PCR을 실시하였다. 전기영동 결과, 십각류의 house-keeping gene인 decapod 18s RNA 부위를 target으로 하는 decapod primer로 PCR을 실시하여 검출 한계를 확인했을 때, abdominal muscle 조직의 검출 한계가 가장 낮았다(Fig. 7). 그러나 WSSV를 확인하는 W VP28 primer를 사용한 PCR에서는 subcuticular connective tissue에서 검출 한계가 더 낮은 결과를 확인할 수 있었다.

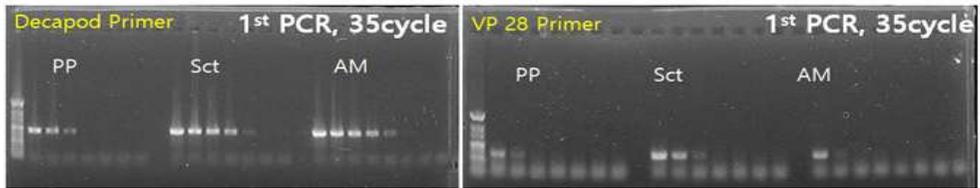


Figure 7. Comparative analysis of PCR detection limit of the WSSV in various shrimp tissues with decapod and VP28 primer sets.



2. 패류 종별 Accumulation 및 depuration 양상 확인

국내에서 흔하게 볼 수 있는 굴, 홍합, 바지락, 꼬막을 이용하여 WSSV detection rate 비교를 통한 패류 조직 내 WSSV 축적 및 방출의 종별·조직별·시간별 차이를 확인하고자 실험을 실시하였다.

축적 실험의 결과 해수에 WSSV 마쇄액을 접종한 후 12시간부터 모든 조직 및 종에서 virus가 검출됨을 확인할 수 있었다(Fig. 8). 축적 후 12시간과 24시간에서는 큰 차이가 없었고, 조직별로는 세 가지 조직 중 아가미 조직만이 종별 차이를 보였다. 아가미 조직을 기준으로 봤을 때, 축적 속도는 홍합이 12시간부터 5개체 중 5개체 모두 검출이 되어 제일 빠른 것으로 보였고 바지락은 5개체 중 1개체만 되어 제일 느린 것으로 보인다. 또한 사육 해수 내의 virus 감소양을 비교해본 결과 패류 종별로는 큰 차이를 보이지는 않았지만, 패류 조직 내 축적된 WSSV와 해수에서의 WSSV 감소가 서로 상관관계가 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 9).

방출 실험에서는 축적실험과 마찬가지로 세가지 조직 중 아가미 조직이 유의성을 띄는 차이를 확인할 수 있었다(Fig. 10). 또한 조직별 방출은 맨틀 조직에서 빠르게 없어지는 것을 확인할 수 있었다. 다른 조직에 대해서는 패류 종별 큰 차이를 확인하기 힘들었으며, 패류 조직 내 축적된 WSSV가 사육수로의 방출한 virus 농도를 확인했을 때 또한 큰 차이를 보이지는 않았다. 그 중 굴 그룹에서 방출 1시간 이후 해수 내 virus 농도가 $9.89E + 04$ copies/ml로 가장 높았다(Table 3).

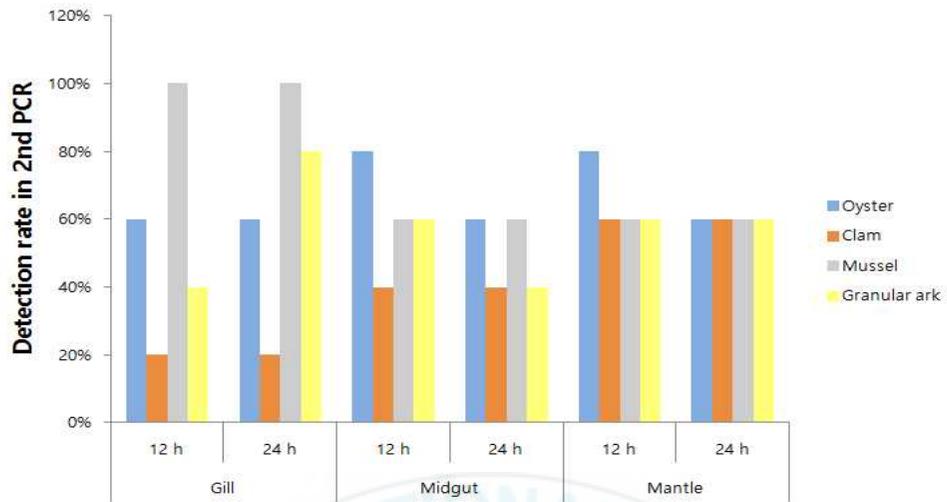


Figure 8. 2-step PCR Detection rate of WSSV in various tissues of 4 shellfish species from bioaccumulation experiment using WSSV-infected shrimp homogenate during 24 hrs

Species		Concentration of viral particles (copies/20L)		
		0h	12h	24h
Oyster	Virus copy*	8.95E+09	3.45E+09	7.90E+08
	decreasing rate**		61.5%	91.2%
Clam	Virus copy	7.60E+09	4.45E+09	1.88E+09
	decreasing rate		41.5%	75.3%
Mussel	Virus copy	6.35E+09	1.80E+09	5.85E+08
	Decreasing rate		71.7%	90.8%
Granular ark	Virus copy	5.45E+09	2.59E+09	1.38E+09
	Decreasing rate		52.6%	74.8%

Table 2. Total viral concentration of WSSV in 20L seawater from bioaccumulation experiments using WSSV-infected shrimp homogenate during 24hrs



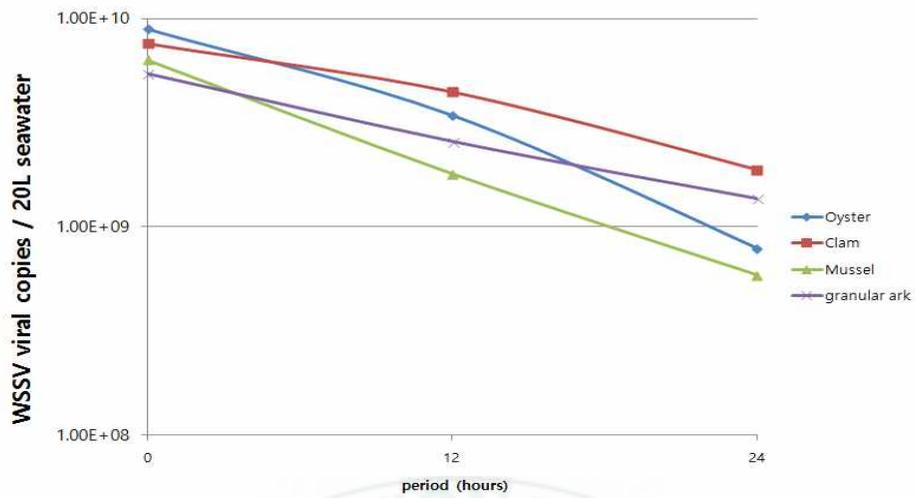
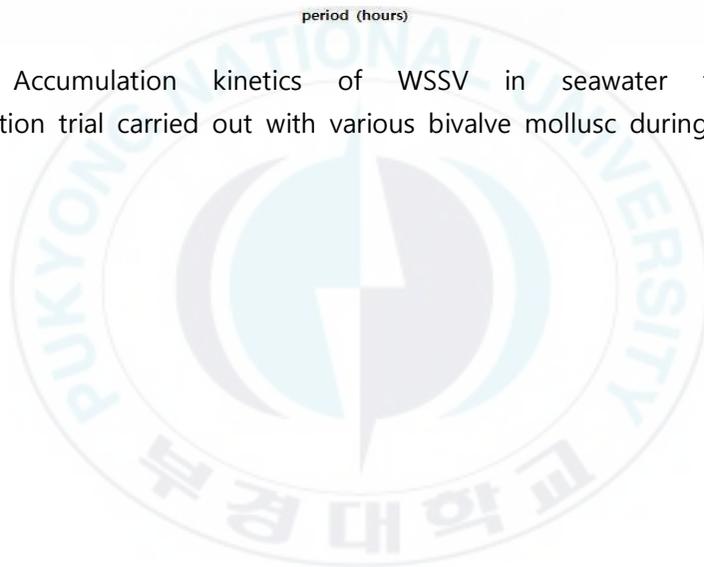


Figure 9. Accumulation kinetics of WSSV in seawater for each bioaccumulation trial carried out with various bivalve mollusc during 24 hrs.



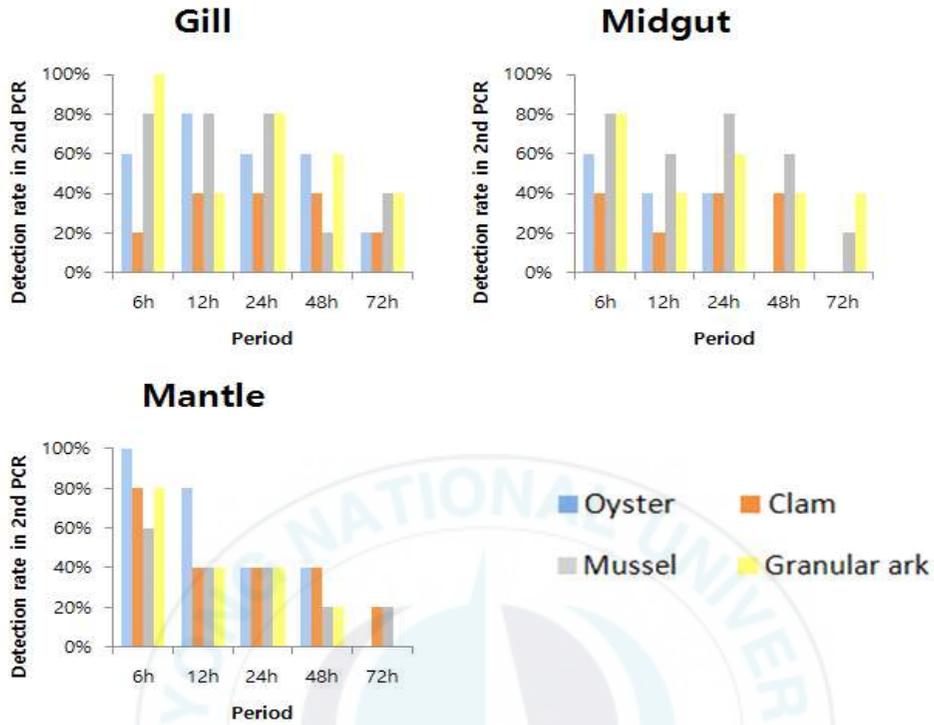


Figure 10. 2-step PCR detection rate of WSSV in various tissues of 4 shellfish species from depuration experiment during 72 hrs

Species	Concentration of viral particles (copies/ml)					
	1 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
Oyster	9.89E+04	1.64E+05	3.65E+04	5.85E+04	1.72E+04	2.47E+04
Clam	3.58E+04	7.18E+04	4.28E+04	5.15E+04	3.89E+04	4.79E+04
Mussel	7.48E+04	1.16E+05	4.48E+04	6.15E+04	2.50E+04	3.15E+04
Granular ark	5.33E+04	1.04E+05	5.03E+04	5.63E+04	3.10E+04	5.48E+04

Table 3. Viral concentration of WSSV in seawater along depuration period. Results are expressed as no. of WSSV viral copies/ml of seawater.



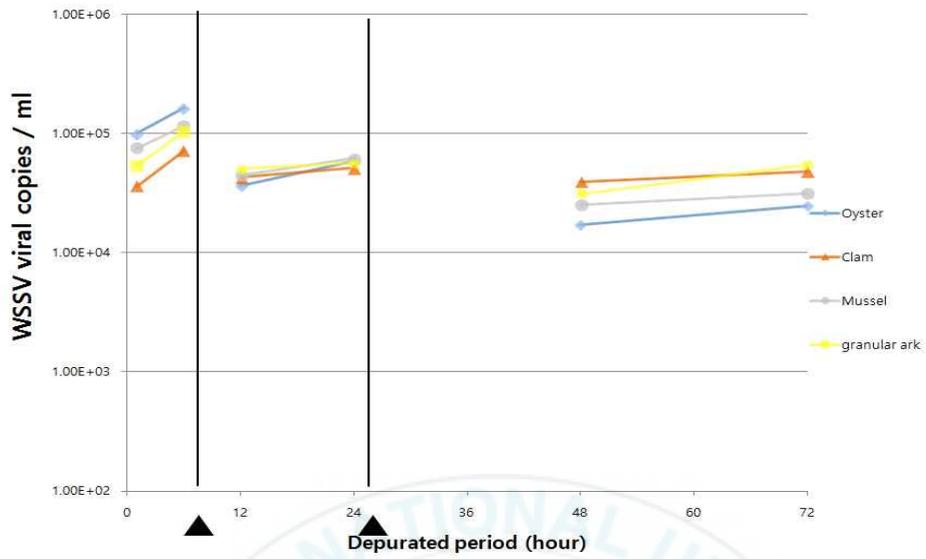


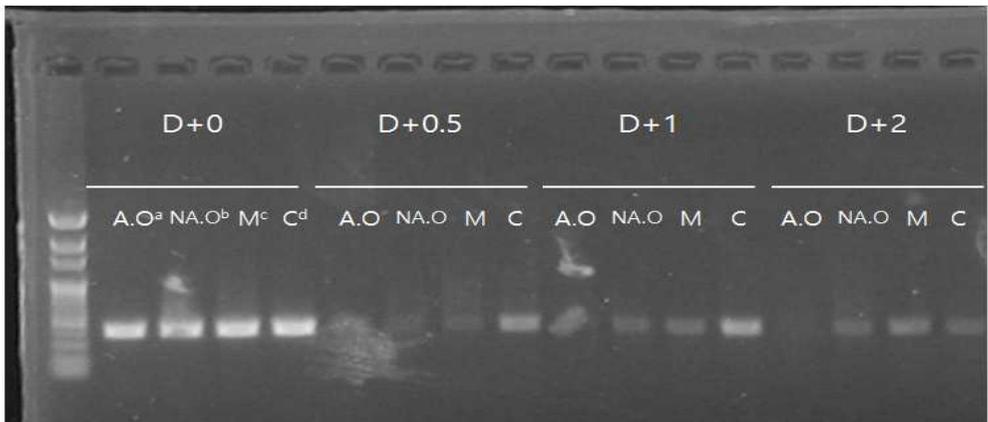
Figure 11. Depuration kinetics of WSSV in seawater for each depuration trial carried out with various bivalve mollusc. Black triangle, the time of 100% water exchange.

3. 패각 모양에 따른 WSSV 축적의 차이점

패각의 특성에 따른 virus의 흡착의 특성을 확인하기 위해, 패류 조직이 없도록 패각만을 이용하여 virus 축적의 차이에 대한 실험을 실시하였다. 그러나 직접적으로 패각에 부착된 virus의 양을 정량할 수가 없어, 간접적으로 해수 내 virus의 농도 감소양을 비교하여 비교하고자 하였다.

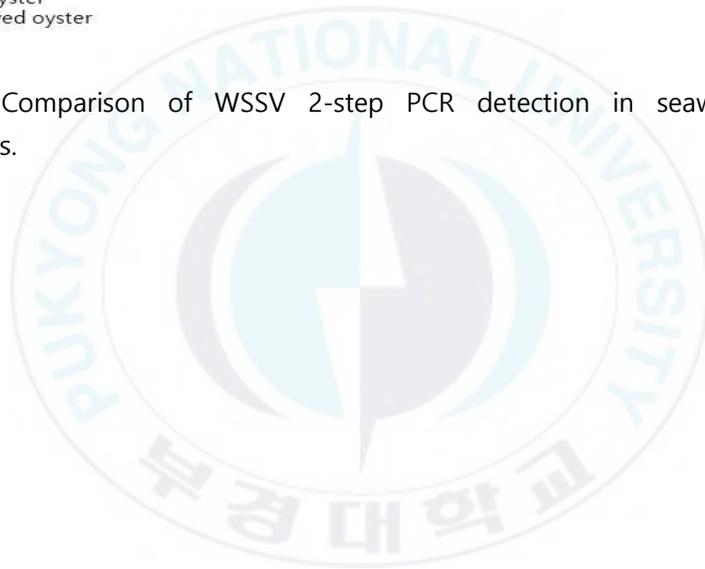
먼저 해수에서 분리한 DNA를 이용하여 1-step PCR 실시 시에는 어떠한 band도 보이지 않았다(data not shown). 그 이후 2nd PCR의 cycle 수를 15로 낮추어 비교해본 결과 패각을 넣어주지 않은 control 그룹에 비해 12시간이 지난 후 band의 density 차이를 확인할 수 있었으며, 2일째가 되자 autoclave 실시한 굴 패각에서는 바이러스 band가 보이지 않았다(Fig 12). 이를 qPCR을 이용하여 해수 내 WSSV 농도 차이를 분석해본 결과, 초기 12시간에서는 autoclave를 하지 않은 굴과 혼합 그룹에서 해수 내 virus 감소 차이를 확인할 수 있었으나, 시간이 지나고 나서는 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 13). 이를 통해 패각 표면의 물리적 차이는, 표면적만 동일하게 하면 패각 표면의 virus 축적에 큰 영향을 끼치지 않는 것으로 추측할 수 있다.

그러나 autoclave를 실시한 굴 패각에서는 autoclave를 실시하지 않은 굴과 비교했을 때, 유의성 있는 해수 내 WSSV 농도 감소를 확인하였다.



- ^a autoclaved oyster
- ^b non-autoclaved oyster
- ^c mussel
- ^d control

Figure 12. Comparison of WSSV 2-step PCR detection in seawater with various shells.



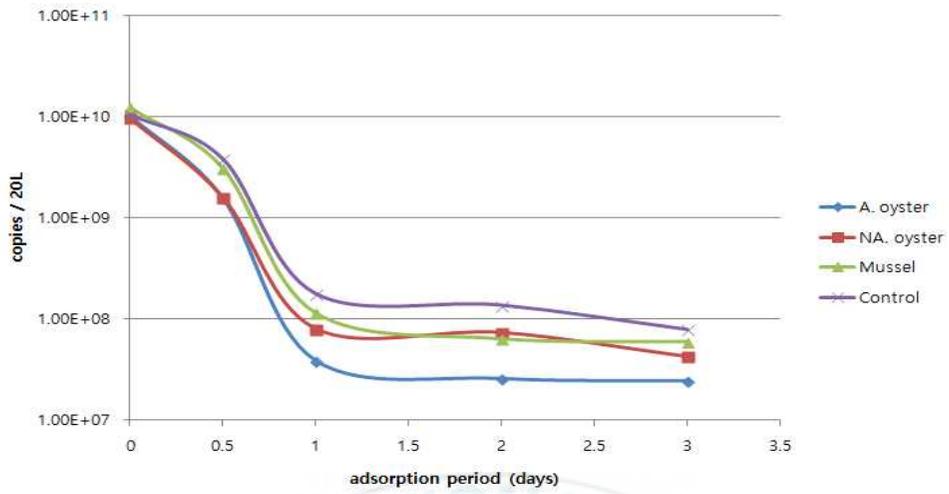


Figure 13. Total decreasing concentration of WSSV copies in 20L seawater from adsorption experiment with various state of shells.

4. Vector로써 다른 수생 생물 바이러스와의 패류 조직 내 축적 관계 확인

다른 수생 생물 바이러스인 RSIV를 이용하여 같은 양의 virus를 해수에 넣어주어 축적시켜 준 후, 이후 PCR을 통해 조직 내 virus 검출을 통해 축적 특성을 비교하여 차이점을 확인하고자 실험을 실시하였다.

해수 내 virus의 경우 12시간이 지난 이후 1-step PCR에서 RSIV가 WSSV에 비해 band가 열어져 빠르게 감소한 것을 볼 수 있고(Fig. 14), 60시간까지는 2-step PCR을 실시했을 때 모두 검출됨을 확인할 수 있었다(data not shown). 또한 패류 조직 내 virus는 모두 1-step PCR에서 band가 확인되지 않았고(data not shown), 35 cycle로 2-step PCR을 실시하여 전기영동 band를 확인할 수 있었다(Fig. 12).

WSSV와 RSIV를 함께 넣어준 WRV 그룹과 한 종류만을 넣어준 WSSV, RSIV 각각의 차이를 비교했을 때 유의적인 차이는 없었다. 그러나 서로 다른 virus인 WSSV와 RSIV의 패류 조직 내 바이러스의 PCR 검출율을 비교했을 때, WSSV (21/48, 43.8%)가 RSIV(12/48, 25.0%)에 비해 두배 정도 PCR 검출율이 높아 축적이 더 잘 되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 15).

Figure 14. Virus detection in seawater inoculated with different viruses. (A) WSSV and (B) RSIV by 1st PCR

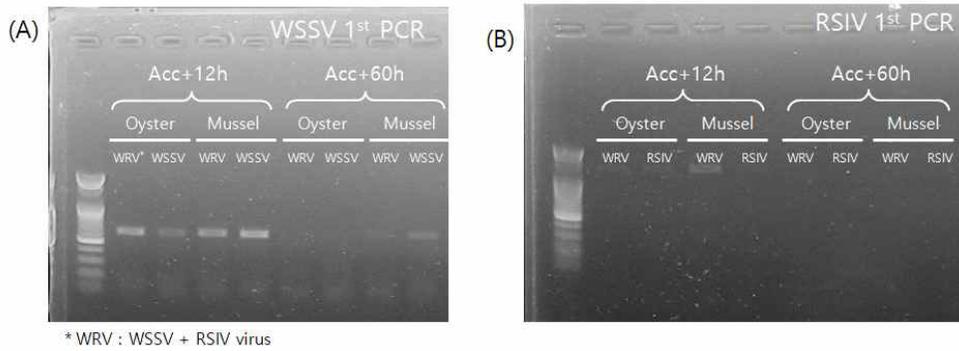


Figure 14. Virus detection in seawater inoculated with different viruses. (A) WSSV and (B) RSIV by 1st PCR

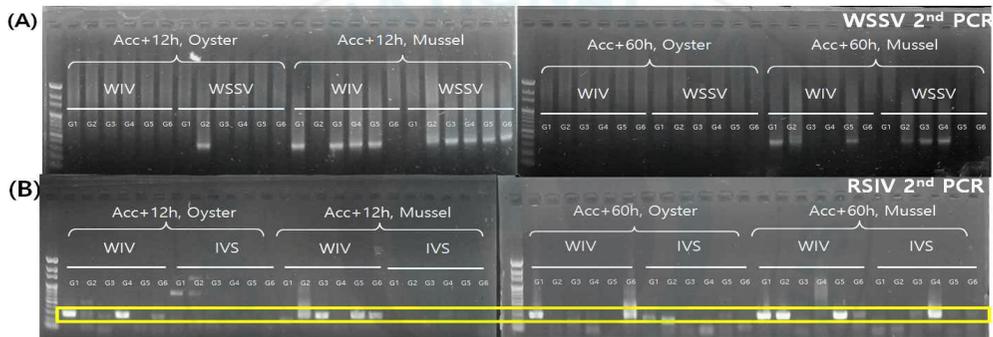


Figure 15. Detection of virus in shellfish gill tissue exposed to different viruses during 60 hrs. (A) WSSV and (B) RSIV by 2nd PCR

5. 침지법으로 축적한 패류 내 WSSV의 새우에 대한 위험성 확인

침지법으로 조직 내 WSSV 축적한 패류와 건강 새우와의 cohabitation 을 통해, 축적한 virus가 해수 중으로 방출되어 새우로의 전이가 되어 위험성을 갖는지 확인하기 위해 실험을 실시하였다. 홍합의 경우 16마리 중 2마리가 폐사하여 아무것도 넣어주지 않은 negative control과 큰 차이는 없었다. 그러나 굴의 경우 지속적으로 폐사가 발생하여 최종적으로 16마리 중 7마리(44.0%)가 폐사한 것을 확인할 수 있었다. 죽은 개체를 대상으로 PCR을 실시한 결과 모두 1st PCR 양성의 결과를 확인할 수 있었고 (data not shown) negative control은 음성으로 확인되었다.



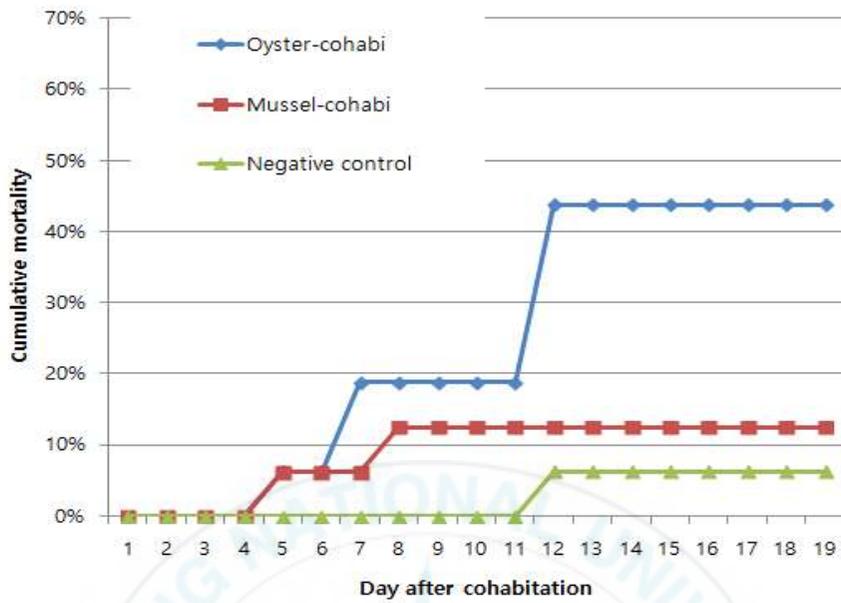


Figure 16. Cumulative mortality of shrimps cohabitated with WSSV accumulated shellfish

IV. 고 찰

흰반점 바이러스는 국내에서 1993년 보리새우 양식장에서 처음 발생했고 그 이후로도 매년 큰 피해를 입혀왔다. 이에 대한 대방책으로 주요 새우 양식 종을 대하 (*Fenneropenaeus chinensis*)에서 WSSV에 조금 더 내성을 지닌다고 하는 흰다리새우 (*Litopenaeus vannamei*)로 품종을 바꿔 양식하여, 현재 대부분의 새우 양식 어가는 이식 승인 및 국경 검역을 거쳐 국내에 반입된 미국산 모하로부터 생산된 흰다리새우 종묘를 입식하고 양식하고 있다. (Jang et al., 2007).

하지만 우리나라 양식 산업에 매년 경제적으로 큰 피해를 끼치고 있는 흰반점 바이러스에 대해서 바이러스의 유입 및 전파 경로에 대한 연구는 부족한 실정이다.

WSSV의 감염경로와 감염요인에 대한 연구로서, 수생동물 바이러스성 질병의 확산에 가장 큰 영향을 미치는 요인은 감수성 있는 숙주생물을 비롯하여 환경수와 바이러스 매개체 또는 함유생물이라는 큰 요소가 존재하며, WSSV는 18종의 새우 뿐 아니라 7종의 랍스터, 7종의 가재, 38종의 게, 모약동물류와 로티퍼 그리고 다모류 등 넓은 범위의 host를 가지고 있다(Chakraborty and Ghosh, 2014). 특히 패류는 여과섭식 (filter-feeding)을 통한 먹이 섭취 시에 병원체를 비롯한 다양한 물질을 체내에 축적 시킬 수 있으며, 소화과정 동안 불활성화 되지 않거나 중장선(digestive gland)에 특이적으로 부착하여 존재하는 바이러스 입자를 일정 조건에서 배출할 수도 있기 때문에 매개체 또는 함유생물로서의 역할을 할 수 있는 가능성이 있다고 한다(Sobey & Jaykus, 1991). 게다가

현재 유럽과 대한민국에서 패류를 WSSV의 vector로써 활패류 수입 시 검역을 하도록 되어 있으나 이에 대한 확실한 근거는 없는 실정이다. 또한 전 세계적으로 패류를 포함한 연체동물에서의 virus 축적 연구는 enteric viral pathogens (M. Grodzki et al., 2014; Nappier et al., 2008, Polo et al., 2010)과 bacteriophages (Burkhardt and Calci, 2000; A. Olalemi et al., 2016) 위주로 되어 있고 WSSV에 대한 보고는 매우 부족한 실정이다. 그러나 C. Vazquez-Boucard(2010, 2012)의 연구 결과에 따르면 참굴 (*Crassostrea gigas*)에 WSSV가 축적 되어 발병 직후 4일까지도 검출되는 것을 확인할 수 있었고, Yun-Shiang Chang (2011)은 WSSV를 축적한 패류의 아가미 조직을 이용하여 새우에게 먹이로 준 결과 패류 조직 내 축적한 WSSV의 전이 위험성을 확인하였다. 그러나 실질적으로 이대패류가 야생과 양식 환경에서 WSSV의 vector로서 역할을 하는 지에 대한 정확한 과학적인 연구가 없어 이에 대한 연구를 하고자 하였다.

OIE에서 지정한 PCR을 통한 WSSV 분석 방법으로는 약 20년 전 개발된 Lo et al.(1996)의 143 F/R primer를 이용하고 있다. 그러나 143 F/R primer set의 경우 WSSV가 없음에도 band를 확인한 결과가 있고, 146 F1 primer가 비특이적으로 sequence에 붙어 예상치 못한 band가 확인되기도 하는 false-positive의 결과가 있다(Claydon et al., 2004). 또한 OIE reference primer의 amplicon size는 1st PCR 기준 1447bp로 비교적 길어 PCR 중 elongation이 시간이 길어 그대로의 protocol을 사용했을 때 1-step PCR에 3시간 30분이 걸린다는 단점도 존재한다. 이러한 문제점을 극복하고자 WSSV에서 가장 많이 발현되는 부위 중 하나인 viral protein 28 gene 부위를 이용하여 primer를 design 하고자 하였고(Xie et al., 2006), 그 후 target organ의 detection limit를 비교하여 WSSV 검출

방법을 확립시키고자 하였다. 본 연구에서 새로이 제작한 W VP28 primer set을 이용하여 PCR 수행 후 OIE primer를 이용한 PCR과의 검출율을 비교해본 결과 같은 20개의 sample을 사용하였을 때 검출율이 높아 PCR sensitivity가 더 뛰어난 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6). 이에 따라, OIE primer의 단점을 개선하고 PCR sensitivity 또한 더 좋은 W VP28 primer를 사용하여 WSSV의 검출에 사용하고자 하였다.

감염 새우 조직에서의 PCR 방법을 통한 WSSV 검출을 위해 분석할 target organ을 설정하고자 한 실험에서, 실험에 앞서 새우에서의 DNA 추출 및 PCR inhibitor를 확인하는 decapod primer를 사용하여 DNA 분리 및 PCR 효율을 조직별로 비교하였다. 같은 양의 조직을 사용하여 DNA 추출 후 decapod primer를 사용하여 PCR detection limit를 분석 시, abdominal muscle이 10^{-6} 까지 희석했을 때에도 band를 확인할 수 있었다. 즉 같은 조직 양을 사용할 때, abdominal muscle이 DNA가 가장 많이 추출되었거나 PCR inhibitor가 가장 적게 된 것을 확인할 수 있었다. 그러나 WSSV를 검출하는 VP28 primer의 경우 abdominal muscle보다 subcuticular connective tissue가 가장 detection limit가 낮게 나온 것을 확인할 수 있었다(Fig. 7). Guang-Hsiung Kou et al.(1998)는 약하게 감염된 대하에서 2nd PCR을 이용한 WSSV 검출을 비교 시, 아가미와 복부 근육 조직이 가장 검출이 잘 되는 것을 확인하였다. 그러나 본 연구에서 abdominal muscle 보다 subcuticular connective tissue가 PCR detection limit가 낮아 PCR을 이용한 새우에서의 WSSV 검출에 더 적합한 target organ으로 생각된다.

새롭게 제작한 primer를 이용하여 패류 조직 내 virus를 축적 및 방출시키는 실험을 통해 패류 종간·조직간·시간별 차이를 보고자 하였다. 시간에 따른 축적 실험의 경우 12시간과 24시간은 큰 차이를 보이지 않는

것으로 생각된다(Fig. 8). 또한 조직에 따른 패류에서의 PCR을 통한 WSSV 검출을 비교했을 때, 중장선과 맨틀 조직에서는 종별 차이를 보기는 힘들었으나 아가미 조직에서 큰 차이를 보였다. 종별 차이가 있는 아가미 조직을 기준으로 볼 때, 홍합의 축적 속도가 가장 빠르고 가장 느린 것은 바지락이었고, 굴과 꼬막은 중간이었다. 이는 패류 조직 내 bacteriophage 축적 시 홍합이 굴보다 빠르다는 연구 결과와 상응했지만 (A. Olalemi et al., 2016), Hepatitis E virus를 축적한 결과와는 반대의 결과를 보여(M. Grodzki et al., 2014) virus 마다 축적의 차이가 있는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 본 연구에서의 bioaccumulation 시 바지락의 경우 저질에 과묵혀서 살아있기에 일반적인 상태를 만들지 못한 한계도 존재한다. 또한 WSSV 접종액은 감염 새우 조직을 이용하여, 원심분리를 실시하여도 접종액에 유기물이 많이 포함되어 있고, 보통의 바지락에서는 유기물이 너무 많을 때 filtration을 감소시켜 대사 에너지를 아끼는 mechanism이 존재하기 때문에(Newell and Bayne, 1980), 이에 따라 바지락 내에 축적이 늦게 된 결과일 가능성을 배제할 수는 없다. 패류 내 virus 축적에 따른 해수 내 virus 양 감소의 결과를 보면 비교적 축적이 느린 바지락의 해수 내 virus 양이 높고, 굴과 홍합에서 낮아 축적 속도와 상관관계가 있는 것으로 보인다(Table 2.).

방출 실험의 경우에서도 또한 아가미에서 조직이 종별로 유의성을 띠는 차이가 나는 것을 확인할 수 있다(Fig. 8). 전체적으로 조직별 비교를 해봤을 때 맨틀 조직이 시간에 따른 방출이 가장 빠르게 일어났으며, 모든 조직에서 해수로의 WSSV 방출을 유도한지 72시간까지도 조직 내에서 검출이 되는 것으로 확인할 수 있다. Polo et al., (2015)의 패류 조직 내 enteric virus를 축적 및 방출한 실험 결과에 따르면, virus는 시간에 따라 점점 양이 작아지는 바이러스와 지속적으로 남아 방출 되지 않는 중

류가 존재하므로, WSSV 또한 모든 양이 방출되지 않고 조직 내에 남아 있을 것이라는 가능성을 가지는 것을 추정할 수 있다.

하지만 본 실험에서 패류 조직의 filter-feeding activity 속도 혹은 조직의 절대량 및 표면적에 대해 통일하지 않았기에 한계가 있어 패류 종에 따른 위험성 분석에는 한계가 존재한다. 그러나 본 연구는 WSSV 축적 및 방출 양상을 시간별, 종별, 조직별로 분석하여 이후 패류에서의 WSSV 위험 분석에 유용할 것이라 생각된다.

앞선 축적 실험의 결과에서 굴과 홍합의 해수 내 virus 양 감소는 비슷했으나, 굴에 비해 홍합에서 조직에서의 WSSV 검출율이 높았고 이 결과가 패류의 크기 자체에 의한 것인지 혹은 패각의 물리적 차이에 따른 축적 차이를 보고자 패각의 종류에 따른 virus 축적의 차이점을 비교해 보았다. 실험 초기에는 굴의 축적이 더 빠르게 일어났으나 시간이 지난 후 홍합과 큰 차이를 보이지 않은 결과를 확인할 수 있었다(Figure 13.). 그러나 패각을 넣어준 그룹의 경우 넣지 않은 그룹에 비해 확실히 해수 내 virus 양의 감소를 확인할 수 있었다. 이에 따라 표면적을 동일 시 해주었을 때, 굴과 홍합의 패각에 붙은 WSSV 양이 비슷할 것이라고 추정되어, 패각 표면에 붙는 virus는 패각 표면의 물리적으로 다른 점에 대한 결과보다는 단순 표면적 차이라고 생각된다. 또한 autoclave를 실시하면 굴 패각에 붙어있는 부착생물 뿐 아니라, 패각 표면의 단백질 및 유기물의 변성으로 인해 virus가 더 부착하여 해수 내 virus 감소 양이 차이가 나는 것을 확인할 수 있었다. 다른 연구에서 *Crassostrea glomerata*를 살아있는 상태와 액체질소에 담귀 죽어있는 상태 두 그룹을 비교했을 시, 죽어있는 상태에서도 해수 내 virus 감소가 나타났고, 이는 패류의 filter-feeding activity 외에 패류 조직 및 패각에 물리적으로 부착한 결과에 따라 (Bedford et al., 1978) 표면적이 비교적 큰 굴 패

각에 virus가 묻어 패류 조직 내 검출량이 적은 것으로 생각된다.

이후 패류 조직 내 축적된 바이러스를 다른 수생 바이러스인 RSIV와 축적 비교 실험을 통해 이때패류가 수생 바이러스의 vector로써 특이점을 확인하고자 실험을 진행하였다. 먼저 실험에 앞서 WSSV primer와 RSIV primer의 1st PCR sensitivity를 비교한 결과 모두 10^5 copies/ml의 농도가 detection limit로 같은 것을 확인하였다(Data not shown). 다른 어류 바이러스인 RSIV와의 축적을 비교했을 시, 해수 내 RSIV의 경우 12시간이 지난 이후 band density가 떨어진 것을 보아 해수 내 stability가 낮다고 생각된다. Nakano et al. (1998)의 연구에 따르면 WSSV는 30°C의 해수에서 host 없이 30일간 생존 가능하다고 얘기한 반면, RSIV는 15°C에서 7일간 생존성은 확인하였고(Ito et al., 2013) inactivation 시 50°C 부근에서의 필요 시간을 비교한 결과 RSIV의 해수 내 stability가 낮은 것을 확인할 수 있었다. 또한 패류 조직 내 축적 비교 시, WSSV가 더 많이 검출되는 것을 미뤄보았을 때 RSIV 또한 패류 조직 내 축적이 가능하나 stability 및 조직 내 축적율에 따라 WSSV가 vector로서의 위험성을 더 가지는 것을 확인할 수 있다. 그러나 각 virus의 host로의 전이 및 감염에 필요한 virus의 농도 혹은 바이러스 간 방출 속도의 차이에 대한 연구는 필요할 것이라고 생각된다.

패류 내 침지법으로 축적된 WSSV의 위험성 분석에는 국내에서 가장 많이 생산 및 유통되는 굴과 홍합을 사용하였다. 실험 결과 WSSV를 축적한 패류의 경우 4일째부터 죽기 시작하면서 굴은 44%, 홍합은 13%의 폐사를 나타낸 것을 확인할 수 있는데 이 이전의 실험에서 같은 virus를 5000배 희석 시 6일 내로 100% 폐사가 발생한 점을 고려하면(data not shown) 패류로부터 나온 virus 양이 감염 새우 마쇄액을 5000배 희석했을 시 농도인 10^6 copies/ml 보다는 낮은 것으로 예상된다. 또한 굴과 홍

합의 폐사율 비교 시 굴이 홍합보다 더 높은 폐사율을 확인할 수 있었다. 수중의 WSSV가 수중의 WSSV가 ml당 $1.00E + 04$ copy에서는 감염이 되지 않고 $1.00E + 05$ copy에서는 감염 되는 결과와(Durand and Lightner, 2002) 패류 조직 내 WSSV 축적 후 방출하는 실험 결과 해수 내 WSSV의 농도가 굴 그룹이 홍합 그룹보다 높았기에, 그에 따른 결과라 생각된다. 패류에 축적된 WSSV의 위험성을 확인한 실험은 WSSV를 축적한 패류를 새우에게 먹이로 주어 1-step PCR에서 양성을 확인한 결과가 있었으나(Yun-Shiang Chang et al., 2011), 패류에 축적된 WSSV가 해수로 방출된 이후 새우에 전이되는 실험은 실질적으로 양식 현장에서의 전이 위험성을 파악하였다.

종합해보면, 본 연구에서 WSSV 검출에 사용할 primer로 기존의 OIE primer의 단점을 개선한 새로운 primer를 design 하였으며, W VP28 primer를 이용한 새우에서의 WSSV 검출 시 subcuticular connective tissue가 가장 감수성이 높은 것을 확인할 수 있었다. 또한 패류 내 virus 축적의 경우 홍합이 빠르고 바지락은 느린 것을 확인할 수 있었지만, 패류 조직 내의 WSSV 방출에 대해서는 유의성을 띄는 차이는 확인할 수 없었다. 다른 수생 생물 바이러스인 RSIV와 WSSV의 축적 실험 시, WSSV가 RSIV에 비해 해수 내의 stability와 패류 조직 내 축적이 잘 되어 vector로서의 위험성이 큰 것을 확인할 수 있었다. 또한 패류 조직 내 축적된 WSSV가 해수로 방출된 이후 새우로 전이되어 감염을 확인하여, 실질적 양식 현장에서의 WSSV 전파 위험성을 확인하였다. 허나 패류 종별 축적과 방출에 대해 정확한 비교를 위해 패류의 filtration activity 비교 및 조직의 양 등을 고려하여 비교하는 실험이 더 필요할 것이라고 생각된다.

V. 요약

새우 양식에서 질병을 유발하는 white spot syndrome virus는 우리나라를 비롯한 세계 각지의 양식 산업에서 매우 큰 경제적 손실을 일으키고 있다. 특히 우리나라에서는 WSSV의 피해를 줄이기 위해 주요 새우 양식 어종을 바꾸어 양식하고 있으나 매년 WSSV로 인한 피해는 발생하고 있다. 그러나 우리나라에서의 WSSV에 대한 연구는 다른 국가에 비해 연구가 매우 부족한 실정이고, 바이러스의 유입 및 전파 경로에 대한 연구 또한 없는 상황이다. 따라서 본 연구는 감염경로와 감염요인에 대한 연구로서 OIE에서 지정한 WSSV 표준 검출 방법의 단점을 개선한 PCR primer 개발하고, 이매패류의 여과섭식을 통해 패류 조직 내 축적된 WSSV가 수생 환경에서의 WSD 전파 위험성을 갖는지 분석하는 것에 중점을 두고 연구를 수행하였다.

우선 PCR을 이용한 WSSV의 검출법을 개선하고자 다양한 국가에서 발견된 WSSV strain의 viral capsid 유전자의 nucleotide sequence 비교하여 W VP28 primer를 제작하였다. 이를 기존의 OIE에서 지정한 WSSV 표준 검출 방법의 PCR primer (146 F/R)와의 PCR 검출율 차이를 비교하여 WSSV에 대한 PCR sensitivity를 비교한 결과, W VP28 primer의 PCR 민감도가 더 높은 것을 확인하였다. 그리고 WSSV 감염 새우 조직의 DNA를 Free D.W.로 희석하여 detection limit를 비교했을 때, subcuticular connective tissue에서 detection limit가 가장 낮아 WSSV를 검출할 PCR 시 사용할 target organ으로 선정하였다.

이후 이매패류에 축적된 WSSV의 위험성 확인을 위해, 이매패류를 약 $1.00E + 10$ copies / 20 ℓ seawater 농도의 WSSV에 축적하여 아가미,

중장선, 맨틀 조직에서의 PCR detection rate를 비교하여, 이매패류 중에서는 홍합이 12시간부터 5개체 중 5개체가 다 검출이 되어 축적 속도가 가장 빠르고 바지락이 5개체 중 1개체만 검출이 되어 축적 속도가 가장 느린 것을 확인하였다. 위의 방법으로 패류 조직 내 WSSV를 축적시킨 후 다시 방출하는 실험에서는 유의성을 띄는 차이를 볼 수는 없었다. WSSV를 다른 수생 바이러스인 RSIV와 함께 immersion 법으로 이매패류에 축적시켜 PCR을 통해 검출율을 비교한 결과, WSSV (21/48, 43.8%)가 RSIV (12/48, 25.0%)보다 약 2배 정도 높아, WSSV가 RSIV에 비해 패류 조직 내 축적이 잘 되어 더 높은 전이 위험성을 갖는 것을 확인하였다. 또한 감염 새우 마쇄액을 immersion 법으로 패류에게 축적한 후 새우와 cohabitation을 통해 패류 조직 내 축적된 WSSV가 다시 수중으로 방출되어 새우로의 전이 위험성을 확인했다. 그 결과 굴과 홍합에서 각각 누적 폐사율이 44% (7/16), 13% (2/16)을 확인하여, 이매패류가 WSSV vector로써 조직 내 축적된 WSSV의 위험성을 확인하였다.

VII. 감사의 글

2009년부터 부경대학교 수산생명의학과에 입학하여 학교 생활을 시작한 지 8년이 지났고, 진단방 실험실 생활을 시작한지는 벌써 4년째가 되어 갑니다. 여태까지 아쉬운 점도, 그리고 부족한 점도 많은 저이지만 이렇게 석사 생활을 마무리 한다고 하니 감회가 새롭습니다.

본 논문이 완성되기에는 정말 많은 사람의 도움이 있었습니다. 제게 때로는 엄하게, 때로는 푸근하게 ‘진검승부’를 가르쳐주신 정현도 지도교수님께 깊은 감사의 마음을 드립니다. 아직도 부족하고 배울 점이 많은 저에게 아낌없이 조언해주셔서 정말 감사합니다. 그리고 바쁘신 중에도 저의 논문이 발전할 수 있도록 조언을 아끼지 않으신 김도형 교수님과 허민도 교수님께 깊이 감사드리며, 학부부터 석사과정까지 끊임없는 관심과 훌륭한 수업으로 지도 편달해 주신 박수일 교수님, 정준기 교수님, 강주찬 교수님, 김기홍 교수님께도 감사드립니다.

그리고 어떤 길을 가도 절 믿어주시고 격려해주시는 부모님께 정말 감사하다는 말 드리고 싶습니다. 집에서는 과묵한 아들이라 말로 표현 잘 못하지만, 항상 중요한 결정에 많은 도움 주시는 아버지와 제 결정에 반대는 많이 하시지만 따뜻한 말 해주시는 어머니 그리고 물질적으로 지원 많이 해주는 누나도 정말 고맙고 사랑합니다.

여태까지 한 대학생들의 절반을 지내던 진단방에서 뵈게 된 선배님들과 후배님들께도 감사의 마음 전합니다. 저를 진단방으로 들여서 이런 좋은 선�후배를 만나게 해준 우주 형, 그리고 이제는 나의 개그 코드까지 파악하는 영철이 형, 다른 방이지만 고민될 땐 언제든 찾아갈 수 있는 보성이 형, 지금은 떨어져 있어서 잘 못 보지만 정말 잘 노는 재찬이 형까지 정말 사랑하고 조만간에 술 한 잔 하고 싶습니다. :D 그리고 저희 방 회식 때마다 자리를 빛내주시는 모든 선배님들께 감사하다는 말을 전하고 싶습니다. 실험실 생활은 오래 동안 같이 하지 못했지만 처음 들어왔을 때 밤에 조용히 실험실에서 조언해주던 지용이 형, 그리고 멀리서 실험실 후배들 밥 사주겠다고 오셔서 많은 조언 해주시는 광일 형이랑 기택 형께 정말 많이 배우고 있고 존경하고 있습니다. 그리고 지금은 실험실에 없지만 실험실 초기 생활에 많은 도움을 준 이슬이 서경이 지희 민지에게도 감사하다는 말 전하고 싶습니다. 또, 패류만 보면 질린다는 형욱이, 보경이, 딸이랑 석사 열심히 하고 있는 민경이도 진짜 고맙다. 그리고 해성아 이번에 떨어지면 가만 안 둔다. 자기 일 잘 찾아가서 생활 잘 하고 있는 망둥어 같

은 정현이, 그리고 실험실에서 많은 도움을 준 종서와 무홍아 그때 새벽까지 일 시켜서 미안하다. 그리고 이제 막 들어와서 열의있게 잘 배우고 있는 건태와 상동이 다혜 모두 열심히 하길 바랄게.

그리고 내가 요즘 연락 잘 못하는 계자식들, 맨날 바쁘다고 투덜대는 사직고 도라이들, 그리고 아직까지 모임 갖고 있는 09학번까지 힘들 때마다 웃을 일 만들어 줘서 너무 고맙다. 그리고 국토 대장정 같이 했던 YGK 국토 희망 3조 대원들 다시 또 볼 수 있는 날까지 각자 자리에서 열심히 잘 하고 있으리라 믿습니다. 또 봉사활동에서 만난 여운 팀, 맨날 연락 안한다고 뭐라하지마... 잘 할게 이제부터... 조만간 약속 잡혀있으니 그때 미안한 맘 다 풀어줄게. 그리고 내가 겁부할 때 받았던 13학번들아 우리 집에서 한번 봐야지. 정말 다들 고마워.

마지막으로 저는 이 논문이 여기서 끝난다고 생각하지 않습니다. 앞으로 부족한 점을 잘 채우고 교수님과 부모님 그리고 선후배님들 친구들께 받은 가르침을 잊지 않고 더욱 더 정진하도록 하겠습니다. 정말 감사합니다.



VI. 참고문헌

- Flegel, T.W. 1997. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 13, 433-442.
- Wongteerasupaya, C., J.E. Vickers, S. Sriurairatana, G.L. Nash, A.Akarajamorn, V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul, and T.W. Flegel. 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 21, 69-77
- Van Hulten, M.C.W., J. Witteveldt, S. Peters, N. Kloosterboer, R. Tarchini, M. Fiers, H. Sandbrink, R.K. Lankhorst, and J.M. Vlak. 2001. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology* 286, 7-22.
- Yang, F., J. He, X.H. Lin, Q. Li, D. Pan, X.B. Zhang, and X. Xu. 2001. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. *J. Virol.* 75, 11811-11820.
- Chou, H.Y., C.Y. Huang, C.H. Wang, H.C. Chiang, and C.F. Lo. 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot

syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.* 23, 165-173

- Walker PJ, Mohan CV (2009) Viral disease emergence in shrimp aquaculture: origins, impacts and the effectiveness of health management strategies. *Rev Aquac* 1:125-154.
- Kim, C. K., S.G. Sohn, M. S. Heo, T. H. Lee, H. K. Jun and K. L. Jang, 1997. Partial genomic sequence of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) isolated from penaeid shrimp *P. chinensis*. *J. Fish Pathol.*, 10(2), 87-95. (in Korean)
- Jang, I. K., 2000. Shrimp culture and disease control. Technical Publication No. 7, Ministry of Maritime Affairs and Fisheries, 127 pp. (in Korean)
- Kim, Y.J. and M.J. OH. 2004. Characteristics of white spot syndrome virus (WSSV) infected shrimp (*Penaeus chinensis*). *Bull. Fish. Sci. Inst., Yosu Nat'l Univ.* 13, 16-22.
- Jang, In-Kwon, et al. "Polyculture of fleshy shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and white shrimp *Litopenaeus vannamei* with river puffer *Takifugu obscurus* in shrimp ponds." *Journal of Aquaculture* 20.4 (2007): 278-288.

Sobsey, Mark D., and Lee-Ann Jaykus. "Human enteric viruses and depuration of bivalve mollusks." *Molluscan shellfish depuration* (1991): 71-114.

Claisse, Didier. "Chemical contamination of French coasts: the results of a ten years mussel watch." *Marine Pollution Bulletin* 20.10 (1989): 523-528.

Kwan, KH Michael, Hing Man Chan, and Yves De Lafontaine. "Metal contamination in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) along the St. Lawrence River." *Environmental monitoring and assessment* 88.1-3 (2003): 193-219.

Miller, Christopher J., Stephen K. Swallow, and Jon G. Sutinen. "Preferences for Wastewater Management Programs in Rhode Island: Accounting for Shellfish, Drinking Water, and Strategic Behavior." 2005 Annual meeting, July 24-27, Providence, RI. No. 19376. American Agricultural Economics Association (New Name 2008: Agricultural and Applied Economics Association), 2005.

Vazquez-Boucard, Celia, et al. "Detection of white spot syndrome virus (WSSV) in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*." *Journal of invertebrate pathology* 104.3 (2010): 245-247.

Vazquez-Boucard, C., et al. "Crassostrea gigas oysters as a shrimp farm bioindicator of white spot syndrome virus." *Diseases of aquatic organisms* 98.3 (2012): 201-207.

Jeong, Joon Bum, et al. "Characterization of the DNA nucleotide sequences in the genome of red sea bream iridoviruses isolated in Korea." *Aquaculture* 220.1 (2003): 119-133.

Park, Ji Young, et al. "Development of a highly sensitive single-tube nested PCR protocol directed toward the sequence of virion envelope proteins for detection of white spot syndrome virus infection: Improvement of PCR methods for detection of WSSV." *Aquaculture* 410 (2013): 225-229.

Lo, Chu Fang, et al. "Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction." *Diseases of aquatic organisms* 25.1-2 (1996): 133-141.

Jee, Bo Young, et al. "Detection of Fish Pathogenic Viruses in Seawater Using Negatively Charged Membranes." *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 46.1 (2013): 46-52.

Reyes, Alejandro, Marcela Salazar, and Clarissa Granja. "Temperature modifies gene expression in subcuticular epithelial cells of

white spot syndrome virus-infected *Litopenaeus vannamei*." *Developmental & Comparative Immunology* 31.1 (2007): 23-29.

Bedford, ANNE J., G. I. L. L. I. A. N. Williams, and A. R. Bellamy. "Virus accumulation by the rock oyster *Crassostrea glomerata*." *Applied and environmental microbiology* 35.6 (1978): 1012-1018.

Chakraborty, S., and U. Ghosh. "White Spot Syndrome Virus (WSSV) in Crustaceans: An Overview of Host-Pathogen Interaction." *J Mar Biol Oceanogr* 3 1 (2014): 2.

Grodzki, Marco, et al. "Bioaccumulation efficiency, tissue distribution, and environmental occurrence of hepatitis E virus in bivalve shellfish from France." *Applied and environmental microbiology* 80.14 (2014): 4269-4276.

Nappier, Sharon P., Thaddeus K. Graczyk, and Kellogg J. Schwab. "Bioaccumulation, retention, and depuration of enteric viruses by *Crassostrea virginica* and *Crassostrea ariakensis* oysters." *Applied and environmental microbiology* 74.22 (2008): 6825-6831.

Polo, David. "Imported Mollusks and Dissemination of Human Enteric Viruses—Volume 16, Number 6—June 2010—Emerging Infectious

Disease journal–CDC." (2010).

Burkhardt, William, and Kevin R. Calci. "Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness." *Applied and Environmental Microbiology* 66.4 (2000): 1375–1378.

Olalemi, A., et al. "Bioaccumulation and persistence of faecal bacterial and viral indicators in *Mytilus edulis* and *Crassostrea gigas*." *International Journal of Hygiene and Environmental Health* (2016).

Chang, Yun-Shiang, et al. "Assessment of the roles of copepod *Apocyclops royi* and bivalve mollusk *Meretrix lusoria* in white spot syndrome virus transmission." *Marine biotechnology* 13.5 (2011): 909–917.

Claydon, Kerry, Bradford Cullen, and Leigh Owens. "OIE white spot syndrome virus PCR gives false-positive results in *Cherax quadricarinatus*." *Diseases of aquatic organisms* 62 (2004): 265–268.

Xie, Xixian, Limei Xu, and Feng Yang. "Proteomic analysis of the major envelope and nucleocapsid proteins of white spot syndrome virus." *Journal of virology* 80.21 (2006): 10615–10623.

- Kou, Guang-Hsiung, et al. "Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp and crabs." *Advances in shrimp biotechnology* (1998): 267-271.
- Newell, R.C., Bayne, B. L. (1980). Seasonal changes in the physiology, reproductive condition and carbohydrate content of the cockle *Cardium (=Cerasterma) edule* (Bivalvia: Cardiidae). *Marine Biology* 56: 11 - 19.
- Polo, David, Xabier Feal, and Jesús L. Romalde. "Mathematical model for viral depuration kinetics in shellfish: An useful tool to estimate the risk for the consumers." *Food microbiology* 49 (2015): 220-225.
- Nakano, H., et al. "Inactivation of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), the causative agent of penaid acute viremia (PAV), by some chemical and physical treatments." *Fish Pathology* (Japan) (1998).
- Ito, T., et al. "Dynamics of virus titer and quantity of red sea bream iridovirus DNA using natural and autoclaved artificial sea water under different water temperatures." *BULLETIN OF THE EUROPEAN ASSOCIATION OF FISH PATHOLOGISTS* 33.4 (2013): 118-125.

Durand, S. V., and D. V. Lightner. "Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp." *Journal of Fish Diseases* 25.7 (2002): 381-389.

