

Enzyme-linked immunosorbent assay를 이용한 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스 감염 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 특이 항체반응 검사

황지연* · 장진현 · 김동준 · 권문경 · 서정수 · 황성돈 · 손맹현

국립수산과학원 수산방역과

Detection of Specific Antibodies Against Viral Hemorrhagic Septicemia Virus in Infected Olive Flounder *Paralichthys olivaceus* Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Jee Youn Hwang*, Jin Hyeon Jang, Dong Jun Kim, Mun Gyeong Kwon, Jung Soo Seo, Seong Don Hwang and Maeng-Hyun Son

Aquatic Disease Control Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

The viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) has an extensive host range, and infects farmed and wild fish inhabiting both freshwater and marine ecosystems. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is highly useful in diagnosing viral hemorrhagic septicemia. However, ELISA shows high, non-specific background reaction with fish antibodies. In this study, we optimized the antigen and antibody concentrations used for detecting specific antibodies in VHSV-infected olive flounder to reduce non-specific binding, and improve the sensitivity of ELISA. The results suggested that OD (optical Density) values were valid when ELISA was performed with 0.1 µg/well of virus, involving blocking with blocking buffer (Roth, Roti-Block), 1:300-1:600 dilution with flounder antisera, and 1:1000 dilution with anti-flounder IgM and HRP-conjugated goat anti-mouse IgG for detecting the VHSV antibody in flounder sera. Furthermore, 11 different VHSV strains isolated in Korea from 2012 to 2016 were used to infect the fish. The results showed no correlation between viral pathogenicity and antibody production. This research is a basic study on the application of antibody detection in the diagnosis of viral hemorrhagic septicemia in the olive flounder.

Key words: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), virulence, Diagnosis, olive flounder

서 론

바이러스성 출혈성 패혈증(Viral hemorrhagic septicemia: VHS)은 세계동물보건기구 지정질병(OIE notifiable disease)일 뿐만 아니라 국내 수산생물질병관리법 제2조에서 규정하는 수산생물전염병으로 전염속도가 빠르고 대량폐사를 일으키는 어류바이러스성 질병이다(Skall et al., 2005; OIE, 2016). 이 질병을 일으키는 원인 Virus는 Rhabdoviridae family의 No-virhabdovirus, Viral hemorrhagic septicemia virus로 현재 담수 및 해수 어류 80종 이상에서 분리되고 있으며, 국내에서도 국내 해산어류 양식 생산량의 52% (2016년도 통계청 자료)를

차지하는 넙치에서 빈번하게 발생하여 대량폐사를 일으키고 있다(Kim et al., 2003; OIE, 2016).

VHSV는 일반적으로 수산생물병성감정지침서의 RT-PCR, real time PCR 등의 분자유전학적 방법으로 확정진단을 하고 있으나 항체검출 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)법 등의 면역 혈청학적 기법은 아직 확정진단에서는 제외되고 있다(Kim et al., 2012). 항체검출 ELISA법은 혈중에 존재하는 특이 항체를 검출하는 방법으로 감도가 높고 다수의 샘플을 신속하고 저렴하게 진단할 수 있는 진단법으로 포유류인 가축에서는 적은 양의 혈청으로 시료를 죽이지 않고 병원체 감염 이력 파악이 가능하여 모니터링에 널리 사용되고 있는 진단법

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2017.0547>



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) 547-552, October 2017

Received 21 September 2017; Revised 13 October 2017; Accepted 24 October 2017

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 720. 3044 Fax: +82. 51. 720. 3039

E-mail address: jinihwang@korea.kr

이기도 하다(De Marco et al., 2003; Shi et al., 2003).

어류에 있어서도 다양한 항원에 따른 항체 반응이 증명이 되어 어류 항체를 이용한 진단법 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나 어류의 항체는 대부분 친화력이 낮은 IgM으로 구성되어 어류 항체의 비특이적 반응에 의한 높은 background가 문제가 되고 있다(LaPatra et al., 1996; Kibenge et al., 2002; Kim et al., 2007; Kim et al., 2008). 본 연구에서는 넙치에 감염된 VHSV의 ELISA진단에 있어 항원과 항체농도의 최적화를 통해 비특이적인 반응을 줄여 ELISA 진단법의 반응성과 민감성을 향상시키고자 하였다.

또한 본 연구에서 확립한 ELISA법으로 VHSV 감염 넙치의 항체값을 확인하고 바이러스의 병원성과 항체값을 상관관계도 비교 분석하였다.

재료 및 방법

바이러스 배양 및 분리

실험에 사용한 어류주화세포는 Epithelioma papulosum cyprini(EPC) cell line (ATCC No. CRL-2872)이며 1% antibiotic-antimycotic (Gibco BRL, USA), 10% fetal bovine serum (FBS)를 첨가한 Earle's salt-based minimal essential medium (EMEM; Invitrogen, CA)을 사용하여 20°C에서 배양하였다. 본 실험에서는 2012년에서 2016년까지 국내 넙치에서 분리한 11종의 VHSV를 사용하였다. 각각의 TCID₅₀는 Reed and Muench (1938)법에 따라 결정하였다(Table 1). 96 well plate에 EPC세포를 1 × 10⁴ cells/well 분주하고 24시간 후 바이러스 배양액 100 µL씩 10 fold로 단계희석하여 접종하였다. 바이러스 접종 후에는 2%의 FBS를 첨가한 EMEM배지를 사용하여 15°C에서 7일간 세포변성효과(cytopathic effects, CPE)를 관찰하였다.

병원성 실험 및 VHS 감염어의 항혈청 분리

인위 감염실험에 사용한 시험어는 포항소재 넙치양식장에서 구입하였고, VHS 감염이력없는 건강한 넙치(평균 13.8 cm, 29.61 g)를 선별하여 이용하였다. 넙치를 1 ton 용량의 유수식 사육조에 2주간 순치시킨 후, 실험용 수조인 300 L 수조에 10마리씩 옮겨 실험을 수행하였고, 수온은 13.0°C를 유지하였다. 11종 VHSV의 병원성 실험은 각 10⁴ TCID₅₀/fish/0.1 mL로 각각 복강 주사하였다. 대조구는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, USA) 0.1 mL를 복강 주사하여 바이러스별 누적폐사율을 조사하였다. 또한, 감염실험 3주 후 살아남은 개체의 혈액을 300 µL 추출하고 혈청을 분리 (6000 rpm, 4°C, 20 min)하여 ELISA 분석 전까지 -20°C에서 보관하였다.

바이러스 정제 및 ELISA의 최적화 실험

바이러스의 정제는 Nishizawa et al. (1991)의 방법에 준하였다. 병원성이 높은 ADC-2014VHS-5에서 분리한 VHSV isolates를 150 cm² T/C flask에 접종하여 대량 배양 후 -75°C의 초저온으로 세포를 용해시켜 4,000 g, 30 min 동안 원심 분리하여 상정액만을 취하고 여기에 7% polyethylene glycol (PEG-6,000), 2.3% NaCl을 첨가하여 4°C에서 교반하면서 overnight 하였다. 이를 20,000 g, 40 min 동안 원심 분리하여 얻은 pellet을 소량의 TNE buffer (0.01 M Tris HCl, 0.1 M NaCl, 0.001 M EDTA)에 재현탁한 다음 15% sucrose cushion 위에 중층하고 4°C, 115,000 g에서 1시간 동안 초고속 원심 분리(scificentific WX µLtra 100, Thermo, USA)하여 바이러스 pellet을 얻었다. 최종 바이러스는 12% SDS-PAGE로 확인하였고 농도는 흡광도 280 nm (NanoVue Plus, Ge, USA)에서 측정하였다.

항체 검출 ELISA법은 Adelman et al. (2008)의 방법을 변형하여 실시하였다. 넙치 VHSV ELISA 최적화를 위해 정제된 바이러스를 각각 다른 농도(0.1 µg/well/100 µL, 0.5 µg/well/100

Table 1. Pathogenicity of different VHSV isolates against the olive flounder *Paralichthys olivaceus*

Virus isolates	isolates year	isolates place	Dosage (TCID ₅₀ /mL)	Mortality (%)	No. of fish survived
ADC-2012VHS-6	2012	Jeju, Korea	1.20E+07	80	2
ADC-2012VHS-7	2012	Jeju, Korea	2.10E+07	90	1
ADC-2012VHS-9	2012	Jeju, Korea	3.40E+07	70	2
ADC-2012VHS-11	2012	Jeju, Korea	2.10E+07	50	5
ADC-2013VHS-1	2013	Pohang, Korea	7.34E+06	70	3
ADC-2013VHS-2	2013	Jeju, Korea	1.50E+07	70	3
ADC-2013VHS-9	2013	Jeju, Korea	7.30E+07	60	4
ADC-2014VHS-5	2014	Jeju, Korea	1.20E+08	90	1
ADC-2015VHS-2	2015	Jeju, Korea	3.40E+07	40	5
ADC-2015VHS-5	2015	Pohang, Korea	3.40E+07	30	7
ADC-2016VHS-2	2016	Jeju, Korea	7.34E+07	70	3
Control	-	-	-	0	7

μL)로 coating buffer에 희석하여 4℃에서 overnight 동안 반응시켰다. 그리고, 넙치 혈청 시료를 희석하여 반응 시킨 후, 1: 1000으로 희석된 Anti-flounder IgM monoclonal antibody (Aquatic Diagnostic, UK) 및 goat anti-mouse IgG-Horseradish Peroxidase (HRP) conjugated (Santa Cruz Biotechnology, USA)로 반응시켰다. 또한 넙치 혈청농도(1:150, 1:300, 1:600, 1:1200, 1:2400, 1:4800, 1:9600, 1:19200)에 따른 값을 비교하여 최적의 넙치 혈청농도를 찾고자 하였고, Anti-flounder IgM monoclonal antibody (Aquatic Diagnostic, UK) 및 goat anti-mouse IgG-HRP conjugated (Santa Cruz Biotechnology, USA)의 적정 농도를 알아보고자 여러 희석배수로 반응시켜 그 값을 비교하여 보았다.

VHSV에 대한 ELISA법

ELISA plate (poly sorp, Nunc, Denmark)에 정제한 VHSV 를 Coating buffer (Bi-carbonate buffer pH 8.6)로 0.1 μg/100 μL로 희석하여 각 well에 분주 한 후 4℃에서 overnight하여 항원코팅을 하였다. Washing buffer (PBS with Tween 20)로 3번 세척 후, Blocking buffer (Roth, Roti-Block Art-Nr.A1511)의 10배 희석액을 각 well 당 300 μL 첨가하여 1시간 동안 반응하였다. Washing buffer (PBS with Tween 20)로 3번 세척 후 1차 항체는 VHSV 감염이력이 있는 넙치 혹은 대조구의 넙치혈청 (1:150, 1:300, 1:600)을 각 3개의 well에 100 μL씩 분주하여 1 시간동안 반응시켰다. Washing buffer (PBS with Tween 20)로 3번 세척 후 2차 항체로는 1:1000로 희석한 Anti-flounder IgM (aquatics Diagnostics Ltd., UK)을 well 당 50 μL씩 넣고 1 시간동안 반응시켰다. Washing buffer로 3회 washing 후 Goat anti-Mouse IgG conjugated HRP (Santa Crus Biotechnology, USA)를 100 μL 첨가 후, 1시간 반응시켰다. Washing buffer로 3회 washing 후 TMB peroxidase substrate solution (agdia, USA)를 well 당 100 μL 첨가하였다. 이 후 5분 상온에서 반응 시킨 후 TMB stop buffer (GenDEPOT, USA)를 첨가하여 반응종료 후 ELISA plate reader (GloMax Explorer, Promega, USA)로 450 nm에서 OD (Optical density)값을 측정하였다.

결과 및 고찰

OIE aquatic manual (<http://www.oie.int>)에 따르면 VHSV의 진단방법에는 세포배양법, 항혈청을 이용한 면역혈청학적 방법, 유전자를 이용한 분자생물학적 방법 등이 있다. 이 중 면역혈청학적 진단은 소량의 혈청으로 진단이 가능하여 병원체의 감염 이력 파악 등의 질병 예찰 및 모니터링에 이용될 수 있다. 그러나 어류의 경우 넙치 혈청의 비특이적 반응으로 인한 Background가 높아 본 논문에서는 국내 주요 품종인 넙치에 감염된 VHSV 진단을 위해 ELISA법을 정립하였을 뿐 아니라, 11종의 VHSV strain으로 인위 감염한 넙치의 혈청을 추출하여 항체값을 비교 분석하였다.

VHSV진단을 위한 ELISA법의 최적화 및 표준화

0.5 μg/well/100 μL 혹은 0.1 μg/well/100 μL의 바이러스를 항원으로 사용했을 때 0.5 μg/well/100 μL 경우 양성시료의 흡광도 값이 1.315 ± 0.693 (1:150), 0.416 ± 0.021 (1:300), 0.269 ± 0.021 (1:600), 음성시료의 흡광도 값은 0.184 ± 0.004 (1:150), 0.116 ± 0.004 (1:300), 0.111 ± 0.012 (1:600)로 확인되었다. 0.1 μg/well/100 μL 경우 양성시료의 흡광도 값은 0.693 ± 0.031 (1:150), 0.295 ± 0.015 (1:300), 0.217 ± 0.008 (1:600), 음성시료에서는 0.106 ± 0.004 (1:150), 0.091 ± 0.000 (1:300), 0.084 ± 0.006 (1:600)로 확인하였다(Fig. 1A). 0.5 μg/well/100 μL와

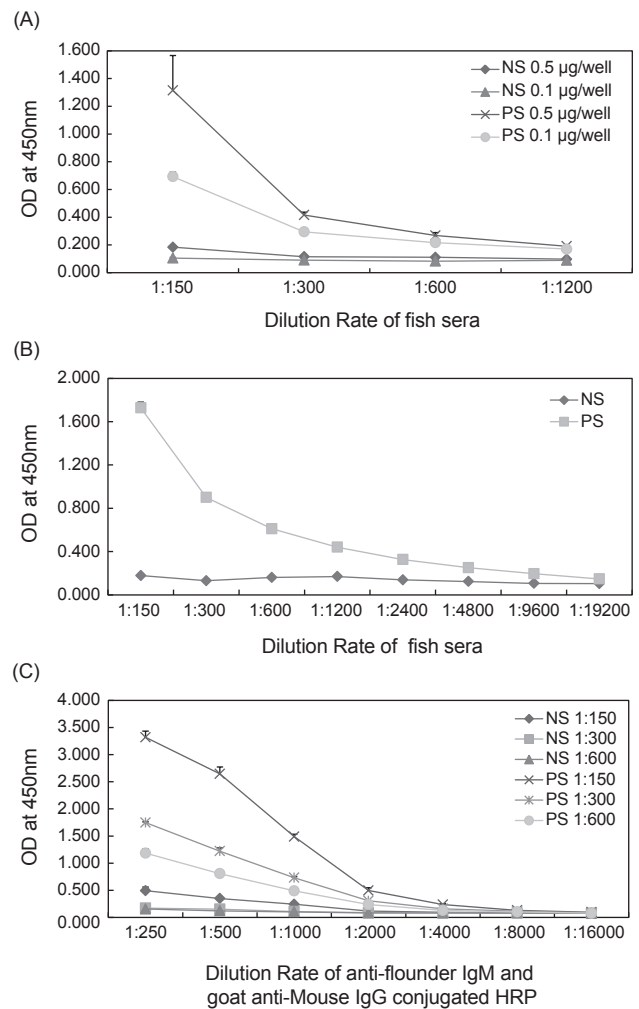


Figure 1. Comparison of ELISA absorbance values (OD₄₅₀) for anti-VHSV flounder serum [the negative serum (NS) and positive serum (PS)] under different conditions A. antigen (VHSV) concentration B, dilution rate of fish sera C, dilution rate of anti-flounder IgM and goat anti-Mouse IgG conjugated HRP. OD, optical density; HRP, goat anti-mouse IgG-Horseradish Peroxidase.

Table 2. Comparison of ELISA absorbance values (OD_{450}) for VHS-survived and -negative olive flounder *Paralichthys olivaceus* sera

VHSV isolate	OD values 1:150 dilution (sera)	OD values 1:300 dilution (sera)	OD values 1:600 dilution (sera)
ADC-2012VHS-6	1.889±0.161	0.286±0.021	0.194±0.007
	0.429±0.035	0.189±0.012	0.175±0.016
ADC-2012VHS-7	1.387±0.161	0.240±0.013	0.187±0.008
ADC-2012VHS-9	1.112±0.092	0.347±0.058	0.235±0.020
	1.101±0.072	0.156±0.021	0.138±0.002
ADC-2012VHS-11	2.096±0.087	0.603±0.013	0.372±0.022
	1.659±0.076	0.383±0.016	0.283±0.015
	2.578±0.177	1.027±0.155	0.745±0.029
	1.470±0.031	0.366±0.007	0.274±0.005
ADC-2013VHS-1	1.503±0.026	0.346±0.017	0.304±0.043
	1.918±0.156	0.389±0.035	0.281±0.010
	1.044±0.013	0.221±0.009	0.170±0.005
	0.724±0.050	0.215±0.014	0.180±0.024
ADC-2013VHS-2	1.154±0.096	0.182±0.014	0.140±0.007
	0.760±0.062	0.134±0.003	0.131±0.002
ADC-2013VHS-9	1.166±0.087	0.237±0.041	0.166±0.018
	0.353±0.017	0.102±0.004	0.102±0.007
	0.922±0.052	0.224±0.007	0.184±0.003
	0.995±0.060	0.217±0.005	0.160±0.002
ADC-2014VHS-5	1.571±0.032	0.479±0.022	0.359±0.005
	0.378±0.044	0.119±0.018	0.111±0.012
ADC-2015VHS-2	0.370±0.028	0.226±0.015	0.199±0.026
	0.246±0.017	0.119±0.011	0.121±0.002
	0.833±0.090	0.256±0.023	0.177±0.022
	0.713±0.003	0.237±0.036	0.224±0.004
	0.374±0.006	0.152±0.009	0.147±0.009
ADC-2015VHS-5	0.849±0.038	0.168±0.005	0.153±0.007
	0.559±0.053	0.186±0.032	0.157±0.014
	0.458±0.035	0.156±0.014	0.145±0.014
	0.481±0.042	0.186±0.008	0.156±0.007
	0.558±0.060	0.145±0.006	0.127±0.015
	0.450±0.030	0.143±0.004	0.128±0.005
ADC-2016VHS-2	0.706±0.031	0.280±0.019	0.288±0.052
	1.288±0.093	0.445±0.047	0.295±0.005
	0.684±0.083	0.392±0.053	0.355±0.039
	0.375±0.023	0.335±0.011	0.304±0.033
Control	0.369±0.056	0.186±0.056	0.133±0.015
	0.134±0.015	0.094±0.004	0.096±0.004
	0.158±0.006	0.102±0.002	0.107±0.008
	0.141±0.045	0.137±0.048	0.122±0.028
	0.120±0.009	0.097±0.008	0.088±0.006
	0.137±0.011	0.114±0.012	0.113±0.004
	0.217±0.040	0.181±0.059	0.150±0.021

OD, Optical Density.

0.1 µg/well/100 µL 모두 양성시료의 흡광도 값은 0.2 이상, 음성시료에서는 0.2 이하로 모두 유효한 값으로 나타났다.

넙치에서 추출한 항혈청을 1:150, 1:300, 1:600, 1:1200, 1:2400, 1:4800, 1:9600, 1:19200 비율로 희석하여 흡광도 값을 비교하였다. 양성시료는 1:150희석에서는 1.21 ± 0.56 , 1:300희석에서는 0.649 ± 0.276 , 1:600희석에서는 0.442 ± 0.185 , 1:1200희석에서는 0.324 ± 0.127 였으며 음성시료는 0.186 ± 0.56 (1:150), 0.126 ± 0.008 (1:300), 0.142 ± 0.021 (1:600), 0.139 ± 0.127 (1:1200)로 확인되었다(Fig. 1B).

2차 및 3차 항체의 농도를 결정하기 위해 1:250, 1: 500, 1:1000, 1:2000, 1:4000으로 희석된 Anti-flounder IgM 및 Anti-Mouse conjugated IgG를 처리하였다. 넙치의 항혈청을 1:300으로 희석시 Anti-flounder IgM 및 Anti-Mouse conjugated IgG 모두 1:500희석하여 처리한 시료의 경우 양성시료의 흡광도 값은 1.222 ± 0.059 이, 음성시료는 0.153 ± 0.009 이였으며 2, 3차 항체를 모두 1:1000희석하여 처리한 시료의 경우, 양성시료의 흡광도 값이 0.731 ± 0.017 , 음성시료는 0.109 ± 0.003 였다(Fig 1C). 모든 실험에서 negative control로 blank뿐 아니라 각 단계별 시료나 시약을 처리하지 않고 OD 값을 확인한 결과, bank에서는 평균 0.094, VHSV의 항원코팅과 TMB buffer만을 처리했을 경우 0.078, VHSV의 항원코팅 없이 모든 시료와 시약을 처리할 경우에는 0.085의 흡광도를 나타냈다. 즉 0.1 정도의 background는 발색제에 의한 기본적인 흡광도 값으로 보여진다. 본 연구결과를 기초로 넙치의 항혈청을 1:150으로 희석시 Anti-flounder IgM 및 Anti-Mouse conjugated IgG 농도는 1:2000, 넙치의 항혈청을 1:300으로 희석 시에는 Anti-flounder IgM 및 Anti-Mouse conjugated IgG 농도는 1:500-1:1000이 가장 적절한 것으로 사료된다.

바이러스의 병원성

넙치에 대한 분리 바이러스별 병원성 시험 결과는 Table 1과 같다. ADC-2012VHS-7 및 ADC-2014VHS-5 바이러스의 각 시험구에서는 가장 높은 병원성을 나타내어 17일 동안에 90% 폐사하였고, ADC-2012VHS-6는 80%, ADC-2012VHS-9, DC-2013VHS-1, ADC-2013VHS-2, ADC-2016VHS-2 시험구는 70%, ADC-2013VHS-9는 60 %, ADC-2012VHS-11는 50%, ADC-2015VHS-2시험구는 40%, ADC-2015VHS-5는 30%의 누적 폐사율을 나타내어 분리 바이러스별 다양한 병원성을 확인하였다. 한국에서 분리된 11종의 바이러스의 유전자와 전 세계적으로 동정된 VHSV의 G 유전자의 염기서열을 비교해본 결과, 분석 결과 모두 VHSV genotype IVa로 확인되었다(data not shown).

VHSV strain 별 ELISA값 비교

11개의 양식장에서 분리된 VHSV별 넙치 감염실험 후 생존넙치의 혈청을 1:150, 1:300, 1:600으로 희석하여 특이 항체를 ELISA법을 이용하여 측정하였다(Table 2). 혈청을 150배로 희

석한 자료를 보면 감염이력이 있는 넙치의 경우 ELISA OD 값은 0.162 ± 0.017 - 1.450 ± 0.177 로 36개의 시료 모두 0.2 이상이었고, 감염이력이 없는 넙치의 ELISA OD 값은 0.1084 ± 0.015 - 0.230 ± 0.056 로 7시료 중 6개가 모두 0.2 미만의 값을 나타내었다. 그리고 혈청을 300배로 희석한 경우, 감염이력이 있는 넙치의 경우 ELISA OD 값은 0.119 ± 0.011 - 1.027 ± 0.155 로 36개의 시료 중 22개의 흡광도 값이 0.2 이상이었고, 감염이력이 없는 넙치의 ELISA OD 값은 0.094 ± 0.004 - 0.186 ± 0.056 로 7개의 시료 모두 0.2 미만의 값을 나타내었다.

비록, 감염된 이력이 있는 넙치 혈청을 150배로 희석한 시료의 ELISA OD 결과값이 300배로 희석한 시료의 ELISA OD 값보다 높게 나왔지만, 감염이력이 없는 넙치의 150배, 300배 희석한 시료의 ELISA OD 값을 분석하였을 때, 모든 시료가 0.2 미만의 값을 가진 300배 희석 값이 가장 유효한 값으로 보여, 본 실험에서는 혈청 300배 희석 값으로 분석하였다.

고병원성 바이러스인 ADC-2012VHS-7와 ADC-2014VHS-5 경우에는 0.240 ± 0.013 (1:300), 0.119 ± 0.018 (1:300)의 흡광도 값을 나타내었고 저병원성 바이러스인 ADC-2015VHS-2와 ADC-2015VHS-5의 경우에는 0.119 ± 0.011 - 0.256 ± 0.023 (1:300), 0.143 ± 0.004 - 0.280 ± 0.019 (1:300)의 값을 확인할 수 있었다. 또한 ADC-2012VHS-11의 경우 같은 양의 바이러스에 노출되었으나 흡광도는 0.346 ± 0.017 (1:300)- 1.027 ± 0.155 (1:300) 로 확인되었다. 그리고 병원성과 ELISA OD 값과의 연관성은 없는 것으로 보인다. 2012년부터 국내에서 분리한 VHSV의 인위감염 3주 후, 생존넙치의 항체가 분석한 결과, 감염이력이 있더라도 모든 개체가 항체를 형성하지는 않으며, 항체가 또한 바이러스의 병원성과도 상관성이 없는 것으로 확인되었다. 또한 같은 양의 항원에 노출되었다 하더라도 개체간의 차이가 커 흡광도의 값도 크게 다른 것이 확인되었다.

본 실험은 VHSV의 적정감염 온도인 13℃에서 수행되어 감염 3주째 혈청을 채취한 결과로, Kim et al. (2011)에 따르면 수온 13℃에서는 28일째부터 항체를 확인할 수 있다고 보고하고 있어 본 실험의 항체가 각 개체에 있어 최고의 값은 아니라고 생각된다. 따라서 넙치의 사육 수온 및 병원성에 따른 항체 형성 시기에 대한 연구도 지속적으로 진행되어야 할 것으로 사료되었다. 본 연구는 넙치에 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스(VHSV) 진단에 항체 검출 ELISA를 적용하기 위한 기초연구로서 넙치의 특이 항체 반응에 대한 정보를 구축하여 VHSV SPF (specific pathogen free) 넙치생산을 위한 기반연구 등에 이용 가능할 것이다.

사사

이 논문은 국립수산물과학원(2017년도 수산방역 프로그램 개발 운영, R2017067)의 지원에 의해 운영되었습니다.

References

- Adelmann M, Köllner B, Bergmann SM, Fischer U, Lange B, Weitschies W, Enzmann PJ and Fichtne D. 2008. Development of an oral vaccine for immunisation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against viral haemorrhagic septicaemia. *Vaccine* 26, 837-844.
- De Marco MA, Foni E, Campitelli L, Raffini E, Delogu M and Donatelli I. 2003. Long-term monitoring for avian influenza viruses in wild bird species in Italy. *Vet Res Commun* 27, 107-114.
- Kibenge MT, Opazo B, Rojas AH and Kibenge FSB. 2002. Serological evidence of infectious salmon anaemia virus (ISAV) infection in farmed fishes, using an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Dis Aquat Org* 51, 1-11.
- Kim JW, Cho MY, Lee HN, Han HJ, Oh YK, Lee SJ, Jee BY, Myeong JI and Won KM. 2012. Diagnosis case of Viral hemorrhagic septicemia (VHS) in adult Olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Korean J Fish Aquat Sci* 45, 666-674.
- Kim SM, Lee 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, 1-12.
- Kim WS, Nishizawa T and Yoshimiz M. 2007. Non-specific adsorption of fish immunoglobulin M (IgM) to blocking reagents on ELISA plate wells. *Dis Aquat Org* 78, 55-59.
- Kim WS, Mochizuki M, Nishizawa T and Yoshimizu M. 2008. Detection of Specific Antibodies against Infectious Hematopoietic Necrosis Virus from Rainbow Trout Sera by ELISA using Two Novirhabdoviruses. *Fish Pathology* 43, 112-116.
- Kim WS, Jang MS, Jung SJ, Kim SR, Park MA, Lee JH, Myeong JI and Oh MJ. 2011. Specific antibody response of olive flounder *Paralichthys olivaceus* by water temperature. *J. Fish Pathol* 24, 39-45.
- LaPatra SE. 1996. The use of serological techniques for virus surveillance and certification of finfish. *Ann. Rev Fish Dis* 6, 15-28.
- Nishizawa T, Yoshimizu M, Winton JR, and Kimura T. 1991. Comparison of genome size and synthesis of structural of hiramersh abdovirus, infectious hematopoietic necrosis virus and viral hemorrhagic septicemia virus. *Fish Pathol* 26, 77-81.
- OIE (Office International des Épizooties). 2016. Viral haemorrhagic septicaemia. In: *Manual of diagnostic tests for aquatic animals*, World Organization for Animal Health, Paris, France.
- Reed LJ and Muench H. 1938. A simple method of estimating fiftypercent endpoints. *American J Hygiene* 27, 493-497.
- Shi Y, Yi Y, Li P, Kuang T, Li L, Dong M, Ma Q and Cao C. 2003. dagnosis of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid antibodies in an antigen-capturing enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 41, 5781-5782.
- Skall HF, Olesen NJ and Møllergaard S. 2005. Viral haemorrhagic septicaemia virus in marine fish and its implications for fish farming: a review. *J Fish Dis* 28, 509-529.