

Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV)에 대한 포르말린 불활화의 영향

박정수¹ · 김형준² · 주영현¹ · 권세련^{1,3*}

¹선문대학교 수산생명의학과, ²VHS OIE 표준실험실, 국립수산물품질관리원, ³유전체 기반 바이오IT 융합연구소

Effect of Formalin Inactivation on Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV)

Jeong Su Park¹, Hyoung Jun Kim², Young Hun Joo¹ and Se Ryun Kwon^{1,3*}

¹Department of Aquatic Life Medical Sciences, Sunmoon University, Asan 31460, Korea

²OIE Reference Laboratory for VHS, National Fishery Products Quality Management Services, Busan 49111, Korea

³Genome-based BioIT Convergence Insitute, Asan 31460, Korea

Killed vaccines, developed by inactivation with formalin, have been investigated for many fish viruses. In this study, the inactivation of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) by formalin was investigated based on the infectivity titer. When viral cell culture supernatants were used, the infectivity titer decreased 1,000-fold at 1 d after treatment with 0.1% (v/v) formalin, but was below the detection limit at 7 and 14 d. Moreover, neither the N nor G gene were detectable by RT-PCR immediately after formalin treatment. In western blot analysis, N protein was not detected by rabbit antiserum against VHSV KR-9225 from 2 d after formalin treatment. On the other hand, when we used a virus that was purified and concentrated ~100 times, the infectivity titer was maintained at $10^{6.05}$ TCID₅₀/mL, even at 14 d after formalin treatment, and no change in the viral structural proteins was observed. This study provides important data on the production and use of formalin-inactivated vaccines.

Key words: Viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV, Formalin, Vaccine, Inactivation

서 론

포르말린은 바이러스에 대한 불활화 백신을 제작하기 위해 많이 사용되고 있는 있다(Delrue et al., 2012). 어류에 발병하는 바이러스성 질병에 대한 포르말린 불활화 백신에 대한 연구도 많이 진행되었는데, infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV), red seabream iridovirus (RSIV), red spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) 및 infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV)에서 포르말린 불활화 백신이 효과가 있다고 알려져 있다(Nakajima et al., 1999; Pakingking et al., 2010; Dong et al., 2013a; Dong et al., 2013b; Nuñez-Ortiz et al., 2016; Tang et al., 2016). Vinay et al. (2013)은 squalene 이나 aluminum hydroxide와 같은 adjuvant가 없이도 포르말린 불활화 VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) 백신을

넙치에 주사한 경우 최대 47%의 상대생존율을 보이고, adjuvant를 사용한 경우에는 최대 83%의 상대생존율을 보인다고 하였다. 우리는 선행연구에서 0.1% (v/v) 포르말린을 이용하여 VHSV의 불활화 백신을 제조하여 넙치에서 그 효능을 실험하던 중에, 포르말린의 처리 시간에 따라 불활화 정도가 다르다는 것을 알아내었다. 즉 10^6 TCID₅₀ (tissue culture infectious dose 50)/mL의 VHSV를 1일간 포르말린 처리하여 백신으로 사용한 결과 VHSV 공격실험에 대해 50%의 방어율을 보였으나, 7일간 처리한 경우 포르말린 불활화 백신은 공격실험에 대해 방어하지 못했다. 결국 이러한 방어력의 차이는 1일간 처리한 것이 완전히 불활화되지 않아 낮은 바이러스 감염가를 가진 생백신으로 작용했기 때문이었다는 것을 알게 되었다(Kim et al., 2016). 따라서 본 연구에서는 바이러스의 감염가에 따라 포르말린에 의한 불활화 정도를 비교하고, 포르말린 처리에 의해

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

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



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.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2019.0644>

Korean J Fish Aquat Sci 52(6), 644-649, December 2019

Received 16 October 2019; Revised 13 November 2019; Accepted 11 December 2019

저자 직위: 박정수(연구원), 김형준(연구사), 주영현(대학원생), 권세련(교수)

바이러스가 어떻게 변화하는지를 조사하고자 하였다. 이를 위하여 우리는 바이러스 세포배양 상층액과 초원심분리로 정제하여 100배 가량 농축되고 정제된 바이러스에 0.1% (v/v) 포르말린을 처리하고, 바이러스의 감염가, 핵산 및 단백질의 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

세포 및 바이러스

바이러스의 배양에는 epithelioma papulosum cyprinid (EPC) 세포가 사용되었다. 세포는 10% (v/v) FBS (fetal bovine serum)와 1% (v/v) antibiotic-antimycotic agent (Gibco, USA)가 첨가된 minimum essential medium (MEM, Gibco, USA) 배지로 계대 배양되었다. 바이러스는 부경대학교 김기홍 교수님에게 분양받은 VHSV KJ2008 분리주를 사용하여(Kim et al., 2015, 2016) EPC 세포에 감염시킨 후 15°C에서 배양하면서 cytopathic effect (CPE)를 관찰하였다. 세포가 거의 탈락했을 때 배양액을 모아서 3000 g에서 15분간 원심분리하고 수거한 상층액을 실험에 사용하였다.

바이러스 정제

바이러스의 정제는 Nishizawa et al. (1991)의 방법을 참고하여 진행하였다. 바이러스 세포배양 상층액에 7% (w/v) polyethylene glycol 6000 (PEG, Bioshop)과 2.3% (w/v) NaCl을 첨가한 후 4°C에서 하룻밤 동안 교반한 후 3000 g에서 30분간 다시 원심분리하였다. Pellet을 1/10 용량의 STE (Sodium Tris EDTA) buffer (0.02M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 1mM EDTA, pH 7.4)로 현탁한 후 4000 g에서 10분간 원심분리하여 PEG를 제거하였다. 상층액에 포함되어 있는 바이러스를 18,500 g에서 150분간 원심분리하여 농축한 후 STE buffer로 재현탁한 후 정제를 위해 50%, 35% 및 20% sucrose (w/v)로 밀도구배 원심분리(80,000 g, 90분)를 실시하여 바이러스 band를 수거하였다. Sucrose를 제거하기 위해 150,000 g에서 60분간 원심분리하고 pellet을 STE buffer에 현탁하였다. 농축 및 정제된 바이러스는

사용 전까지 -80°C에 보관하였다.

포르말린 처리 실험

바이러스의 포르말린 처리는 이전에 보고된 대로 실시하였다(Kim et al., 2016). 포르말린 처리에 의한 바이러스의 변화를 관찰하기 위해 VHSV 세포배양 상층액과 정제한 VHSV에 최종 농도가 0.1% (v/v)가 되도록 포르말린(Formaldehyde, Sigma)을 처리한 후 4°C에서 보관하면서 시간대 별로 채취하여 분석을 실시하였다. 감염가 측정은 포르말린 처리 1, 7 및 14일째에 50 µL씩 채취하여 10배 단계희석한 후 실시하였다. 핵산의 변화를 알아보는 실험을 하기 위해 세포 배양 상층액에 포르말린을 처리하고 0, 1, 3 및 5일째에 수거하여 total RNA (ribonucleic acid) 분리를 실시하였다. 핵산의 변화 분석에는 정제 바이러스가 사용되지 않았다. 바이러스 단백질의 변화 분석을 위해 세포 배양 상층액과 정제한 VHSV에 포르말린을 처리한 후 0, 0.5, 1, 2, 5 및 7일째에 50 µL씩 채취하여 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)와 western blot을 실시하였다. 포르말린 처리에 관한 모든 실험은 2반복으로 수행되었다.

감염가 측정

바이러스 감염가 측정을 위해 EPC 세포를 trypsin-EDTA (Gibco, USA)로 박리시키고 5% (v/v) FBS가 포함된 MEM에 현탁한 후 96-well plate에 접종한 후 15°C에서 하루 동안 배양하였다. VHSV 및 포르말린 처리된 VHSV를 MEM 배지로 10⁻¹-10⁻¹⁰까지 10단계 희석한 후 50 µL씩 접종하였다. 50% tissue culture infectious does (TCID₅₀)을 결정하기 위해 15°C에서 14일 동안 CPE를 관찰하였다. 각 바이러스의 감염가는 Karber (1931)의 방법에 의해 측정되었다.

핵산 분리 및 RT-PCR

바이러스 배양액 및 포르말린 처리된 바이러스 배양액을 시간대별로 500 µL씩 수거하여 TRI Reagent (molecular research center)를 이용하여 total RNA 분리를 실시하였다. RNA 분리

Table 1. Primers and PCR conditions used in this study

Target gene	Primer name	Primer sequence (5'→3')	PCR condition	Target size
G gene	VGsense	CCAGCTCAACTCAGGTGTCC	52°C for 30 min; 95 °C for 10 min 40 sec; 35 cycles of 95 °C for 40 sec, 64 °C for 40 sec, 72 °C for 40 sec; 72 °C for 7 min	587 bp
	VGantisense	GTCACYGTGCATGCCATTGT		
N gene	VN IVa F	ATGGAAGGGGAATCCGTGCAGCT	50°C for 30 min; 95°C 10 min 30 sec; 35 cycles of 94°C 30 sec, 55°C 30 sec, 68°C 1 min; 68°C 7 min	505 bp
	VN IVa R	GCGGTGAAGTGCTGCAGTTCTC		

PCR, polymerase chain reaction.

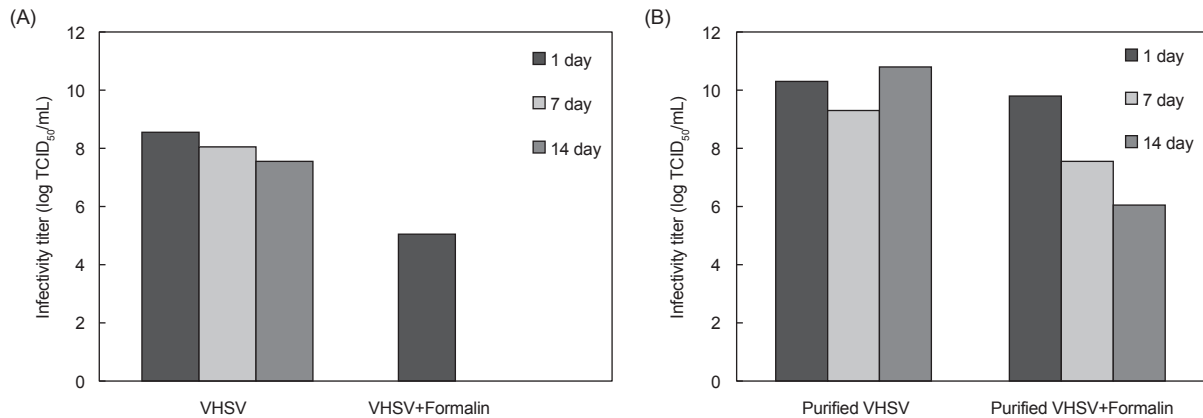


Fig. 1. Infectivity titers of VHSV culture fluid (A) and purified VHSV (B) after 0.1% (v/v) formalin treatment. VHSV, viral hemorrhagic septicemia virus.

는 제품에 제공되어 있는 매뉴얼을 따라 진행하였다.

분리된 RNA를 동일한 양으로 희석하고 TOPscript™ One-step RT-PCR DyeMIX (enzymatics)을 사용하여 RT-PCR을 실시하였다. RT-PCR 반응액을 만들기 위해 DyeMIX 5 μ L와 분리한 RNA 1 μ L와 primer를 각각 1 μ L씩 첨가하고 총 20 μ L의 용액을 제조하였다. Primer는 VHSV G gene을 증폭하는 VGsense/ VGantisense (Nishizawa et al., 2002; 2006)과 VHSV genotype IVa 검출에 적합한 VN IVa F/R (Kim, 2015)을 사용하였다. 위의 2가지 유전자를 증폭하기 위한 PCR 조건은 Table 1에 제시한 바와 같다. PCR 산물은 1.5% agarose gel에 전기영동 후 EtBr로 염색하여 Gel Doc UV transilluminator (Bio-Rad)로 확인하였다.

SDS-PAGE 및 western blot

포르말린을 처리하거나 처리하지 않은 바이러스 세포배양 상층액 및 정제한 바이러스 15 μ L를 sample buffer와 혼합한 후 100°C에서 5분간 열을 가한 후 각각을 10%와 14% acrylamide gel에 전기영동하고 Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad)과 Silver Stain kit (Bio-Rad)로 염색하였다.

세포배양 상층액을 전기영동한 gel은 nitrocellulose (NC) membrane (Bio-Rad)으로 옮긴 다음 blocking buffer에서 30분간 배양하였다. 1차 항체는 전남대학교 니시자와 교수님으로부터 VHSV KRRV-9822 분리주에 대한 토끼 항혈청을 제공받아 사용하였다. 세포배양 상층액 내에 포함되어 있는 FBS에 대한 반응을 최소화하기 위해 항체를 FBS와 1:1로 혼합한 후 23°C에서 하루 밤 동안 배양한 후 1:500으로 희석하여 사용하였고, 2차 항체는 alkaline phosphatase가 결합되어 있는 goat anti rabbit IgG (SantaCruz)을 1:1000으로 희석하여 사용하였다. NC membrane을 세정한 다음 BCIP-NBT로 발색을 유도한 후 band를 관찰하였다.

결과 및 고찰

세포배양 상층액 바이러스의 감염가는 4°C에서 1, 7, 14일간 배양하면서 각각 $10^{8.55}$, $10^{8.05}$, $10^{7.55}$ TCID₅₀/mL로서 거의 변화가 없었던 것에 반하여, 포르말린을 처리한 경우 1일째의 감염가가 $10^{5.05}$ TCID₅₀/mL로 1000배 이상 감소하였다가 7일과 14일째에는 10^{-1} 희석액을 접종한 well에서도 CPE가 아예 관찰되지 않았다(Fig. 1A). Kim et al. (2016)은 $10^{7.05}$ TCID₅₀/mL의 VHSV를 0.1% (v/v) 포르말린을 처리한 후 시간대별로 감염가의 변화를 관찰하였는데, 처리 48시간 이후로 감염가가 detection limit 이하로 떨어져 본 연구 결과와 일치하는 것을 확인할 수 있었다. 한편 정제한 바이러스는 4°C에서 1, 7, 14일간의 배양 기간 동안 각각 $10^{10.3}$, $10^{9.3}$, $10^{10.8}$ TCID₅₀/mL의 감염가를 보여, 정제 전의 바이러스 배양액에서 약 100배 가량으로 바이러스가 농축된 것을 확인할 수 있었고 2주간 4°C 배양에 의해서는 감염가의 변화가 발생하지 않음을 확인할 수 있었다(Fig. 1B). Jorgensen (1973) 역시 VHSV를 4°C에서 2주간 배양하더라도 감염가의 소실이 없다고 보고한 바 있으며, Garver and Hawley (2008)는 4°C에서 보존할 경우 1년간 감염력을 유지한다고 하였다. 정제한 바이러스에 동량의 포르말린을 처리한 경우 1일째는 $10^{9.8}$ TCID₅₀/mL로서 거의 변화가 없다가 7일과 14일째에는 각각 $10^{7.55}$ 와 $10^{6.05}$ TCID₅₀/mL로서 10,000배 가량 감염가가 감소한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1B). 즉 세포배양 상층액 바이러스가 0.1% (v/v) 포르말린 처리에 의해 완전히 불활화되었던 것에 반해 높은 감염가의 바이러스는 동량의 포르말린 처리에 의해서는 완전히 불활화 되지 않는다는 사실을 알 수 있다. 따라서 감염가가 높은 바이러스의 경우에는 0.1% (v/v) 이상 농도의 포르말린을 사용하거나 더 오랜 기간 동안 처리할 필요가 있다고 사료된다. 향후 높은 농도와 장기간의 포르말린 처리에 의해 정제 바이러스의 역가가 어떻게 변화하는지 확인해 볼 필요가 있겠다.

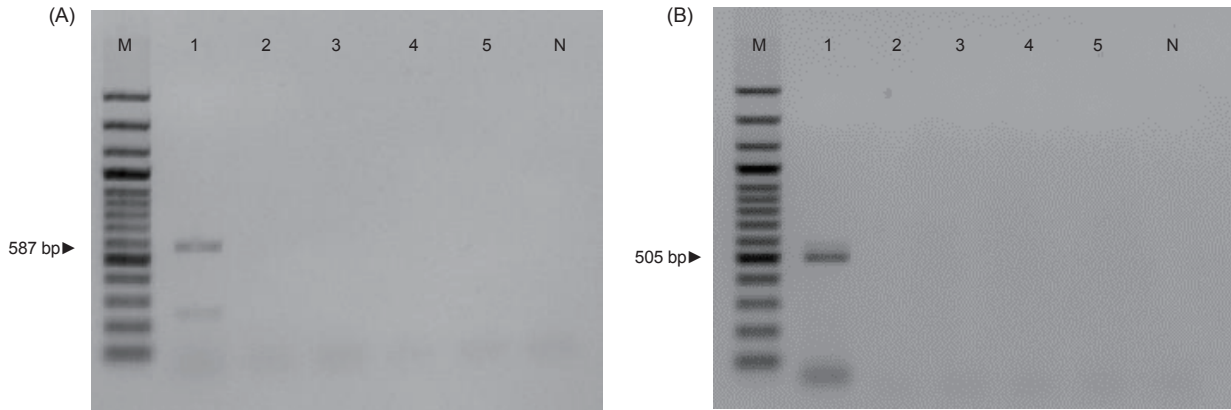


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products targeting VHSV G gene (A) and N gene (B). Lane 1, untreated VHSV culture fluid; lane 2, VHSV culture fluid treated with 0.1% (v/v) formalin for 0 h; lane 3, VHSV culture fluid treated with 0.1% (v/v) formalin for 1 d; lane 4, VHSV culture fluid treated with 0.1% (v/v) formalin for 3 d; lane 5, VHSV culture fluid treated with 0.1% (v/v) formalin for 5 d; N, negative control without template. RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; VHSV, viral hemorrhagic septicemia virus.

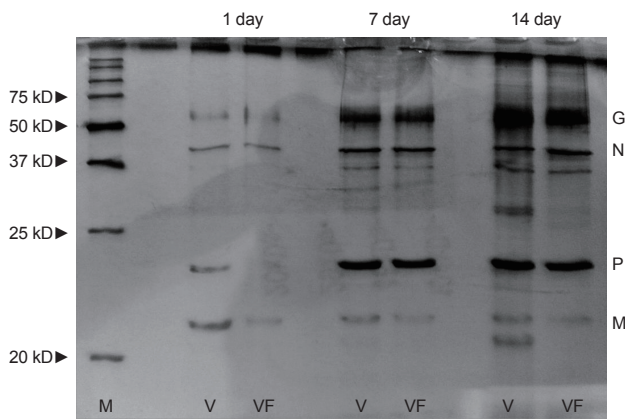


Fig. 3. SDS-PAGE of purified VHSV. V, untreated VHSV; VF, VHSV treated with 0.1% (v/v) formalin for 1, 7 and 14 days. 14% polyacrylamide gel was stained with silver nitrate solution. G, glycoprotein; N, nucleoprotein; P, phosphoprotein; M, matrix protein. SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; VHSV, viral hemorrhagic septicemia virus.

핵산의 변화를 관찰한 결과, 포르말린을 처리한 직후인 0 h 부터 G gene 뿐만 아니라 N gene도 검출되지 않았다(Fig. 2). Winton et al. (2014)도 Poliovirus를 1:4,000 비율로 formaldehyde를 처리한 결과 RT-PCR에 의한 핵산 검출이 되지 않았다고 보고한 바 있다. 몇몇 연구자들은 포르말린이 capsid 단백질과 RNA의 crosslinking을 유도하여 genome reading을 방해한다고 보고한 바 있다(Ma and Harris, 1988; Kuykendall and Bogdanffy, 1992; Permana and Snapka, 1994).

단백질의 변화를 알아보기 위해서 정제한 바이러스와 바이러스 배양 상층액을 대상으로 SDS-PAGE와 western blot을 실시

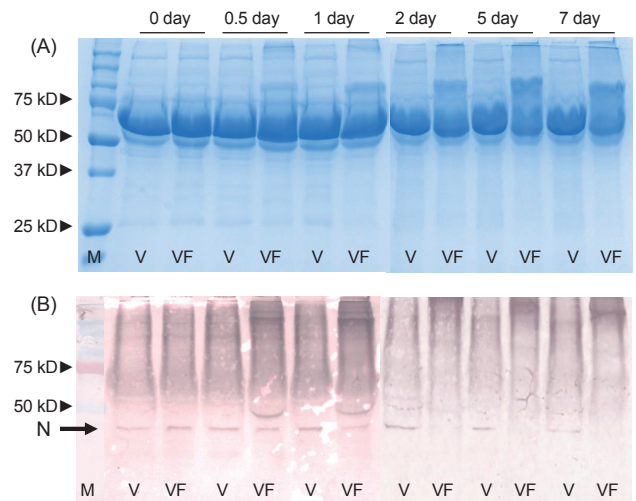


Fig. 4. SDS-PAGE (A) and western blot analysis (B) of VHSV culture fluid. V, untreated VHSV; VF, VHSV treated with 0.1% (v/v) formalin for 0, 0.5, 1, 2, 5 and 7 days. 10% polyacrylamide gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. Proteins were blotted to nitrocellulose membranes and incubated with rabbit antiserum against VHSV KRRV-9822. N, nucleoprotein. SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; VHSV, viral hemorrhagic septicemia virus.

하였다. 정제한 바이러스를 전기영동하여 silver stain으로 염색한 결과 G, N, P 및 M protein을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 포르말린 처리 후 1, 7, 14일 후에 전기영동을 하여도 처리하지 않은 정제 바이러스와 동일한 구조 단백질을 보여 포르말린 처리에 의해 단백질의 소실이 일어나지 않았음을 알 수 있었다(Fig. 3). 바이러스 세포배양 상층액을 항원으로 하여 SDS-PAGE를 한

경우 세포 배양액 중의 FBS band만 주로 관찰되었기 때문에, VHSV KR-9225 분리주에 대한 토끼 항혈청으로 western blot 을 실시하였다. 실험에 사용된 항혈청에 대해서는 N protein이 검출되었고 나머지 구조 단백질은 검출되지 않았다. 실험에 사용된 토끼 항혈청은 FBS로 전처리 했음에도 불구하고 본 연구 결과에서 FBS 단백질과 반응성이 높아 smear band가 나타나게 되었는데, 이것에 의해 69 kD의 G protein에 대한 반응이 보이지 않게 된 것으로 판단된다. 포르말린 처리 2일째부터 N protein이 검출되지 않는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이는 Kim et al. (2016)의 연구에서 감염가가 detection limit 이하도 떨어진 시기와 일치하였다. Western blot 실험에서 N protein이 관찰되지 않은 것은 포르말린 처리에 의해 N protein의 epitope이 변화된 것이라고 판단된다. 포르말린의 영향을 가장 많이 받게 될 단백질은 바이러스의 가장 바깥쪽에 존재하는 G protein이나, 본 연구에 사용된 항체로는 N protein에 대한 영향만 관찰할 수 있었다. 따라서 다른 구조 단백질 특히 외막에 있는 G protein에 대한 영향을 알아보기 위해서는 각 구조 단백질에 대한 monoclonal antibody (MAb)를 사용하여 차후의 연구를 진행할 필요가 있겠다. Fan et al. (2015)은 다양한 MAb를 사용하여 실험한 결과, 시판되는 포르말린 불활화백신과 실험실에서 제작한 포르말린 불활화 일본 뇌염 바이러스 백신에 대해서 MAb 일부가 binding 하지 못하거나 중화항체가 대조구에 비해 현저하게 낮은 것을 확인함으로써 포르말린이 항원 epitope를 변형시킨다는 것을 증명하였다. 그 외에 포르말린은 단백질의 N 말단에 결합하여 methylol adducts를 만들게 되어 이것이 다양한 아미노산의 R 기와 crosslinking을 하게 된다는 것을 증명한 연구도 있다(Delrue et al., 2012; Metz et al., 2004).

어류 바이러스성 질병을 대처하기 위한 백신 중 가장 쉽게 제작할 수 있는 것이 불활화 백신이다. 이러한 점에서 불활화백신은 다음과 같은 요건을 갖추고 있어야 한다. 첫째 바이러스는 완전히 불활화되어야 한다. 둘째 불활화 백신은 방어 면역을 잘 유도하여야 하며, 이를 위해 불활화 물질에 의해 바이러스의 epitope의 변형이 생겨서는 안 된다. 본 연구에서는 바이러스의 농도 즉 감염가에 따라 포르말린에 의한 불활화 정도가 달라지는 것이 확인되었으며, 포르말린 처리에 의해 바이러스의 핵산과 N protein의 epitope이 변화된 것을 제시하였다. 본 연구의 결과는 향후 포르말린 불활화 백신의 제조와 사용에 대해 중요한 자료가 될 것으로 사료된다.

사 사

이 연구는 2018년도 선문대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 이루어졌음.

References

Delrue I, Verzele D, Madder A and Nauwynck HJ. 2012. Inac-

tivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: merits, risks and challenges. *Expert Rev Vaccines* 11, 695-719. <https://doi.org/10.1586/erv.12.38>.

Dong C, Xiong X, Luo Y, Weng S, Wang Q and He J. 2013a. Efficacy of a formalin-killed cell vaccine against infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) and immunoproteomic analysis of its major immunogenic proteins. *Vet Microbiol* 162, 419-428. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.10.026>.

Dong Y, Weng S, He J and Dong C. 2013b. Field trial tests of FKC vaccines against RSIV genotype Megalocytivirus in cage-cultured mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) in an inland reservoir. *Fish Shellfish Immunol* 35, 1598-1603. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.09.005>.

Fan YC, Chiu HC, Chen LK, Chang GJ and Chiou SS. 2015. Antigenicity and Immunogenicity of a Neutralization Epitope in Envelope Protein Domain III. *PLOS Negl Trop Dis* 23, e0004167. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004167>.

Kuykendall JR and Bogdanffy MS. 1992. Efficiency of DNA-histone crosslinking induced by saturated and unsaturated aldehydes *in vitro*. *Mutat Res* 283, 131-136. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(92\)90145-8](https://doi.org/10.1016/0165-7992(92)90145-8).

Garver KA and Hawley LM. 2008. Stability of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in freshwater and seawater at various temperatures. *Dis Aquat Org* 82, 171-178. <https://doi.org/10.3354/dao01998>.

Jørgensen PEV. 1973. Inactivation of IPN and Egtved virus. *Riv Ital Piscicol Ittiopatol* 8, 107-108.

Karber G. 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch Exp Pathol Pharmacol* 162, 480-483.

Kim HJ. 2015. Validation of the sensitivities of one-step and two-step reverse-transcription PCR methods for detection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) IVa isolates from cultured olive flounder in Korea. *Aquaculture* 448, 359-364. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.034>.

Kim HJ, Park JS, Choi MC and Kwon SR. 2016. Comparison of the efficacy of Poly(I:C) immunization with live vaccine and formalin-killed vaccine against viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol* 48, 206-211. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.11.035>.

Kim HJ, Park JS and Kwon SR. 2015. Development of a stringent ELISA protocol to evaluate anti-viral hemorrhagic septicemia virus-specific antibodies in olive flounder *Paralichthys olivaceus* with improved specificity. *J Microbiol* 53, 481-485. <https://doi.org/10.1007/s12275-015-5101-9>.

Ma TH and Harris MM. Review of the genotoxicity of formaldehyde. 1988. *Mutat Res* 196, 37-59. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(88\)90027-9](https://doi.org/10.1016/0165-1110(88)90027-9).

Metz B, Kersten GF, Hoogerhout P, Brugghe HF, Timmermans HAM, Jong A, Meiring H, Hove J, Hennink WE, Crom-

- melin DJA and Jiskoot W. 2004. Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with model peptides. *J Biol Chem* 279, 6235-6243. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310752200>.
- Nakajima K, Maeno Y, Honda A, Yokoyama K, Tooiyama T and Manabe S. 1999. Effectiveness of a vaccine against red sea bream iridoviral disease in a field trial test. *Dis Aquat Org* 36, 73-75. <https://doi.org/10.3354/dao036073>.
- Nishizawa T, Iida H, Takano R, Isshiki T, Nakajima K and Muroga K. 2002. Genetic relatedness among Japanese, American and European isolates of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) based on partial G and P genes. *Dis Aquat Org* 48, 143-148. <https://doi.org/10.3354/dao048143>.
- Nishizawa T, Savas H, Isidan H, Ustündağ C, Iwamoto H and Yoshimizu M. 2006. Genotyping and pathogenicity of viral hemorrhagic septicemia virus from free-living Turbot (*Psetta maxima*) in a Turkish Coastal Area of the Black Sea. *Appl Environ Microbiol* 72, 2373-2378. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2373-2378.2006>.
- Nishizawa T, Yoshimizu M, Winton J, Ahne W and Kimura T. 1991. Characterization of structural proteins of hirame rhabdovirus, HRV. *Dis Aquat Org* 10, 167-172. <https://doi.org/10.3354/dao010167>.
- Núñez-Ortiz N, Pascoli F, Picchietti S, Buonocore F, Bernini C, Toson M, Scapigliati G and Toffan A. 2016. A formalin-inactivated immunogen against viral encephalopathy and retinopathy (VER) disease in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): immunological and protection effects. *Vet Res* 47, 89. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0376-3>.
- Pakingking RJ, Bautista NB, de Jesus-Ayson EG, Reyes O. 2010. Protective immunity against viral nervous necrosis (VNN) in brown-marbled grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) following vaccination with inactivated betanodavirus. *Fish Shellfish Immunol* 28, 525-533. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.12.004>.
- Permana PA and Snapka RM. 1994. Aldehydeinduced protein-DNA crosslinks disrupt specific stages of SV40 DNA replication. *Carcinogenesis* 15, 1031-1036. <https://doi.org/10.1093/carcin/15.5.1031>.
- Tang L, Kang H, Duan K, Guo M, Lian G, Wu Y, Li Y, Gao S, Jiang Y, Yin J and Liu M. 2016. Effects of three types of inactivation agents on the antibody response and immune protection of inactivated IHNV vaccine in rainbow trout. *Viral Immunol* 29, 430-435. <https://doi.org/10.1089/vim.2016.0035>.
- Vinay TN, Kim YJ, Jung MH, Kim WS, Kim DH and Jung SJ. 2013. Inactivated vaccine against viral hemorrhagic septicemia (VHS) emulsified with squalene and aluminum hydroxide adjuvant provides long term protection in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Vaccine* 31, 4603-4610. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.07.036>.
- Wilton T, Dunn G, Eastwood D, Minor PD and Martina J. 2014. Effect of formaldehyde inactivation on poliovirus. *J Virol* 88, 11955-11964. <https://doi.org/10.1128/JVI.01809-14>.