

Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV)-검출 Reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) 법의 평가

김위식* · 전찬혁** · 김정호** · 오명주***†

*전남대학교 수산과학연구소, **강릉원주대학교 해양자원육성학과, ***전남대학교 수산생명의학과

Evaluation of reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for detection of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV)

Wi-Sik Kim*, Chan-Hyeok Jeon**, Jeong-Ho Kim**, Myung-Joo Oh***†

*The Fisheries Science Institute, Chonnam National University, Yeosu 556-901, Korea,

**Department of Marine Bioscience, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, 210-702, Korea,

***Department of Aqualife Medicine, College of Fisheries and Ocean Science, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea

A reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay was evaluated to monitor infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) from artificially infected rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. The cumulative mortalities of fish challenged with IHNV at $10^{6.5}$ TCID₅₀/fish, $10^{5.5}$ TCID₅₀/fish and $10^{4.5}$ TCID₅₀/fish were 40%, 0% and 0%, respectively. Dead fish and survivors at 16 and 28 d post-challenge in each group were employed for IHNV detection by RT-LAMP assay and virus isolation using BF-2 cells. IHNV from $10^{4.3}$ to $10^{6.8}$ TCID₅₀/ml was isolated from all the dead fish and also detected in all of the examined dead fish by RT-LAMP assay. In survivors at 16 d, 60% (3/5 fish, $10^{2.8}$ - $10^{5.05}$ TCID₅₀/ml), 20% (1/5 fish, $10^{1.05}$ TCID₅₀/ml) and 60% (3/5 fish, $10^{1.05}$ - $10^{4.8}$ TCID₅₀/ml) were found to be IHNV-positive by virus isolation in fish challenged with IHNV at $10^{6.5}$ TCID₅₀/fish, $10^{5.5}$ TCID₅₀/fish and $10^{4.5}$ TCID₅₀/fish, respectively, while 20% (1/5 fish), 0% (0/5 fish) and 20% (1/5 fish) were IHNV-positive by RT-LAMP assay. No IHNV was detected in the survivors at 28 d and control fish. These results indicate that the RT-LAMP assay is useful for detection of IHNV in diseased fish although it is not enough to monitor virus in IHNV-survivors.

Key words : IHNV, Rainbow trout, RT-LAMP

전염성조혈기괴사증 (infectious hematopoietic necrosis, IHN) 은 전세계적으로 연어과 어류에 대량폐사를 유발하는 바이러스성 질병으로 알려져 있다 (Wolf, 1988; Bootland and Leong, 1999). IHN의 원인 병원체

인 IHN virus (IHNV) 는 *Rhabdoviridae* 과 *Novirhabdovirus* 속에 속하며, 6개의 gene (3'-N-P-M-G-NV-L-5') 으로 구성된 약 1.1 kbp의 negative-sense RNA를 가진다 (Tordo *et al.*, 2005).

우리나라에서 IHN은 일본으로부터 IHNV에 오염된 난을 수입하면서 1990-1991년 강원도에서 양식중인 무지개송어 *Oncorhynchus mykiss* 및 산천어 *O.*

†Corresponding author : Myung-Joo Oh

Tel : +82-61-659-7173, Fax : +82-61-659-7173

E-mail : ohmj@chonnam.ac.kr

masou 치어에서 발생된 후, 다양한 지역에 위치한 무지개 송어 종묘장으로 확산되었다 (손 등, 1993; Park *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2007). 최근에는 무지개송어 치어뿐만 아니라 성어에서도 IHN에 의한 대량폐사가 발생하고 있다 (김 등, 2003). 이처럼 IHN은 1990년 이후로 국내 연어과 어류에서 난치성 전염병을 일으켜 양식 산업을 위협하고 있다.

IHNV 검출 방법으로는 어류주화세포를 사용한 분리배양법, 항 IHNV 항체를 사용한 형광항체법 (fluorescent antibody test) 과 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), IHNV의 유전자를 검출하는 polymerase chain reaction (PCR) 법과 real-time PCR법, 어체내에 IHNV에 대한 특이항체를 검출하는 ELISA 등이 보고되어 있다 (Yoshinaka *et al.*, 1998; Overturf *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2008; OIE, 2009). 이 중 PCR법은 빠른 시간내에 병원체의 검출이 가능하고 검출감도가 높아 어류병원바이러스를 검출하는데 널리 사용되고 있다. 그러나 PCR법은 결과 확인을 위해 전기영동이 라는 별도의 실험이 요구되어 다소 번거로우면서도 단계적 온도조절장치 (thermal cycler) 를 보유한 곳에서만 가능하다는 단점을 가지고 있다. 최근 Notomi *et al.* (2000) 은 PCR법의 단점을 보완한 진단법인 loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 법을 개발하였다. 본 방법은 3쌍의 primer (1쌍의 inner primer, 1쌍의 outer primer, 1쌍의 loop primer) 를 사용하여 6개의 독립된 장소를 인식하여 증폭시키는 방법으로서 PCR법과는 달리 일정한 온도 (등온) 에서 annealing 및 extension이 가능하여 온도조절장치가 필요하지 않으며, 또한 신속성, 특이성 및 검출감도가 높아 1시간 이내에 10^9 copy의 유전자를 증폭시킬 수 있다. 더욱이 결과 확인에 있어서는 전기영동법을 이용한 방법 외에도 생성물에 SybrGreen을 첨가하여 형광 유무를 관찰하거나 magnesium pyrophosphate 첨

가하여 침전물을 확인하는 방식으로도 가능하다. Suebsing *et al.* (2011) 은 IHNV 검출법으로서 RT-LAMP법을 검토한 결과 nested PCR보다 검출감도가 높아 IHNV 감염을 초기에 확인하는데 유용하다고 보고하였다.

본 연구에서는 어체내 IHNV 모니터링에 RT-LAMP법의 사용이 가능 하는지를 검토하기 위해 IHNV를 무지개송어에 인위적으로 감염시킨 후 시간 경과에 따라 RT-LAMP법과 어류세포를 사용한 분리배양법을 이용하여 IHNV 검사를 실시하였다.

재료 및 방법

IHNV는 강원도 양양군에 위치한 양양연어사업소에서 2008년 인공수정을 통해 부화한 방류 직전의 연어 *O. keta* 치어로부터 분리한 Chyy08.1 분리주 (Genbank accessin no. HQ638077) 를 bluegill fry-2 cell line (BF-2) 에 배양하여 사용하였다. 감염실험은 경남 상주에 위치한 무지개송어 양식장으로부터 분양 받은 무지개송어 치어 (체중 1-2g) 를 수온 $9\pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지된 10 L 수조 4개에 각각 20마리씩 수용한 후, IHNV를 $10^{6.5}$ TCID₅₀/fish, $10^{5.5}$ TCID₅₀/fish 및 $10^{4.5}$ TCID₅₀/fish로 50μl씩 복강주사 하였다. 대조구는 Hanks'balanced salt solution (HBSS, Gibco) 를 사용하여 50μl씩 복강에 주사하였다. 28일간 폐사율을 관찰 하였으며, 폐사어 및 생존어 (접종 16일과 28일째 각 그룹의 5마리) 를 대상으로 IHNV 검사를 실시하였다.

IHNV 검사 시료는 폐사어 및 생존어의 신장과 비장조직을 적출하여 pooling한 후 HBSS로 1:100 (0.01g/ml) 이 되게 처리하여 마쇄한 후 3,500×g로 30 분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 분리배양법에 의한 검사는 BF-2 세포를 사용하여 Reed and Muench (1938) 의 방법에 의해 바이러스 감염가를

TCID₅₀법으로 측정하였다. RT-LAMP법은 300 µl의 조직마쇄액으로부터 TRI Reagent® (Molecular Research Center) 를 사용하여 RNA를 분리하였고, Suebsing *et al.* (2011) 의 방법에 따라 RT-LAMP법을 실시하였다. 10x thermopol- supplied reaction buffer, 0.6 M betaine, 6 mM의 magnesium sulfate, 1 mM deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) mix, 8 U *Bst* DNA polymerase, 0.25 U AMV reverse transcriptase를 첨가한 mixture에 6개의 specific primers (F3: 5'-CAGCCAAACCGTCCA ACC-3', B3: 5'-TCGTTTCCGACCGACAGG-3', FIP: 5'-CAGAGTGCATCCCTCGGGGTAG/TTTT/CGA CACCGCAAGCGAATC-3', BIP: 5'-ATGCCTCTCAAC TGAGATGCCC/TTTT/ATGTGGGATAGGCAATCAGC -3', LF: 5'-TG AAGAGCGGGTTTGACCAG-3', LB: 5'-AGGATCTTCGATGATGAGAATAGGG-3') 를 분 주한 후 63°C에서 30분간 반응시켰으며, 2% agarose gel에서 전기영동을 수행하여 LAMP assay 특유의 다양한 크기의 band가 검출되는지의 여부를 관찰하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 IHNV를 무지개송어에 인위적으로 감염시킨 후 시간 경과에 따른 어체내 IHNV의 감염유무를 RT-LAMP법과 어류세포를 사용한 분리배양법을 이용하여 조사하였다. IHNV를 무지개송어 치어에 복강 주사한 결과, 10^{6.5} TCID₅₀/fish의 IHNV를 접종한 실험구에서는 7일째부터 폐사어가 나타나기 시작하였고 40%의 누적폐사율이 관찰되었다 (Fig. 1). 10^{5.5} TCID₅₀/fish와 10^{4.5} TCID₅₀/fish의 IHNV를 접종한 실험구 및 대조구에서는 폐사어가 관찰되지 않았다.

폐사어 및 IHNV 접종 후 16일과 28일째에 각 실험구에서 채집한 생존어 5마리를 대상으로 한 IHNV

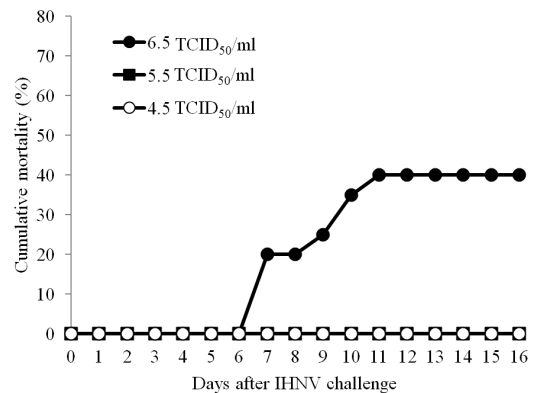


Fig. 1. Cumulative mortality of rainbow trout experimentally infected by intraperitoneal infection with IHNV. ● 10^{6.5} TCID₅₀/fish; ■, 10^{5.5} TCID₅₀/fish; ○, 10^{4.5} TCID₅₀/fish

검출 결과는 Table 1에 나타내었다. 폐사어 (10^{6.5} TCID₅₀/fish의 IHNV로 접종한 실험구)에서는 100% (8/8 마리) IHNV가 분리되었고, 어체내 바이러스 감염가는 10^{4.3}-10^{6.8} TCID₅₀/ml를 나타내었다. RT-LAMP법에서도 모든 개체에서 IHNV가 검출되었다 (검출율: 100%, 8/8 마리). 16일째 생존한 개체를 대상으로 한 IHNV 검사 결과에서는 10^{6.5} TCID₅₀/fish, 10^{5.5} TCID₅₀/fish, 10^{4.5} TCID₅₀/fish의 IHNV로 접종한 실험구에서 각각 60% (3/5 마리, 감염가: 10^{2.8}-10^{5.05} TCID₅₀/ml), 20% (1/5 마리, 10^{1.05} TCID₅₀/ml), 60% (3/5 마리, 10^{1.05}-10^{4.8} TCID₅₀/ml)의 검출율을 나타내었다. 이에 반해 RT-LAMP법에서는 위의 실험구에서 각각 20% (1/5 마리), 0% (0/5 마리), 20% (1/5 마리)의 검출율을 나타내었다. 28일째 생존한 개체 및 대조구의 어류에서는 IHNV가 분리·검출되지 않았다.

본 연구에서는 IHNV를 인위적으로 감염시킨 후 시간 경과에 따른 어체내 IHNV를 모니터링하는데 RT-LAMP법의 사용이 가능 하는지를 검토하고자 하였다. 폐사어 (바이러스 접종 후 7-11일에 폐사된 개체)에서는 RT-LAMP법에 의해 IHNV가 100% 검출되었으나 바이러스 접종후 16일째 생존한 어류에서

Table1. Detection of IHN in rainbow trout inoculated with IHN by virus isolation using BF-2 cells and RT-LAMP

Dose of IHN injection (logTCID ₅₀ /fish)	Fish condition	Fish No.	Virus titer (TCID ₅₀ /ml)	RT- LAMP
6.5	Dead	1	5.8	+
		2	6.3	+
		3	5.8	+
		4	6.8	+
		5	4.55	+
		6	6.3	+
		7	4.3	+
		8	5.8	+
	Survivor at 16 days	1	<0.8	-
		2	2.8	-
		3	5.05	+
		4	3.3	-
		5	<0.8	-
	Survivor at 28 days	1	<0.8	-
		2	<0.8	-
		3	<0.8	-
		4	<0.8	-
		5	<0.8	-
5.5	Survivor at 16 days	1	<0.8	-
		2	<0.8	-
		3	1.05	-
		4	<0.8	-
		5	<0.8	-
	Survivor at 28 days	1	<0.8	-
		2	<0.8	-
		3	<0.8	-
		4	<0.8	-
		5	<0.8	-
4.5	Survivor at 16 days	1	3.8	-
		2	4.8	+
		3	<0.8	-
		4	<0.8	-
		5	1.05	-
	Survivor at 28 days	1	<0.8	-
		2	<0.8	-
		3	<0.8	-
		4	<0.8	-
		5	NT	NT

<0.8: detection limit, NT: not test

는 13.3% (2/15 마리) 의 검출율을 보였고, 28일째 생존한 어류에서는 IHN이 검출되지 않았다 (0/14 마리). 이상의 결과, RT-LAMP법에 의해 폐사어 및 16일째 일부 생존어로부터 IHN을 검출할 수 있었으나 28일째 생존한 어류에서는 IHN을 검출할 수 없었다. 일반적으로 IHN 발생기간에는 병어 및 빈사어에서 IHN이 분리되나 질병 발생 후 약 50일 후의 생존어에서는 바이러스가 분리되지 않는다고 보고되어 있다 (Bootland and Leong, 1999). Kim *et al.*, (1999) 의 연구에서는 IHN 생존어에서 감염성 바이러스가 분리되지 않으나 truncated 바이러스 입자가 검출 (nested PCR 양성) 된다고 보고하였다. 본 연구에서는 nested PCR보다 검출감도가 높은 RT-LAMP법을 적용하였으나 (Suebsing *et al.*, 2011) 28일째 생존한 개체에서는 IHN이 검출되지 않았다. 이러한 이유는 target 유전자의 차이 (본 연구에서 사용한 RT-LAMP의 타겟 gene: G gene) 일 것으로 추정되나 정확한 원인을 규명하기 위해서는 향후 다양한 연구들이 수행되어야 할 것이다; Kim *et al.*, (1999) 의 연구에서 L gene의 경우 88.9% (16/18 IHN 생존어) 의 검출율을 보였으나 N gene에서는 50% (9/18) 의 검출율이 확인되었다.

16일째 생존어를 대상으로 한 IHN 검출 결과, 분리배양법과 RT-LAMP법에서 각각 46.7% (7/15마리), 13.3% (2/15마리) 의 검출율을 보여 검출감도는 분리배양법이 높게 나타났다. 분리배양법의 경우, 200 μ l의 조직마쇄액 전부를 사용하여 바이러스를 분리한 반면, LAMP의 경우 300 μ l의 조직마쇄액으로부터 분리한 RNA를 약 100 μ l의 diethylpyrocarbonate (DEPC, Bioneer) 용액에 부유시킨 후 (RNA 최종농도 : 100 ng/ μ l) 2 μ l를 사용하여 검사를 실시하였기 때문에 검출감도를 비교하는데 한계가 있다. 하지만 실질적으로 분리된 RNA 전부를 LAMP법으로 분석 하는

데는 한계가 있으므로 어류세포를 이용한 분리배양법은 IHNV를 검출하는데 있어 LAMP법보다 검출감도가 높을 것으로 사료된다.

진단법으로서 어류주화세포를 이용한 바이러스 분리 배양법은 이론적으로 감염성 바이러스 입자 1개만 있어도 검출이 가능하나 시설뿐만 아니라 진단 시 많은 시간과 비용이 소요된다는 단점을 가지고 있다. 이에 반해 LAMP법은 분리배양법보다 검출감도는 낮으나 저렴한 비용으로 빠른 시간내에 진단이 가능하며 고가의 시험장비가 필요없기 때문에 현장에서 사용하기가 용이하다는 장점을 가지고 있다. 이에 본 연구의 결과를 종합해 보면 RT-LAMP법은 IHNV-생존어에서 바이러스를 모니터링 하는데 한계가 있으나 병어로부터 IHNV를 검출하는데 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다. 특히 신속한 결과를 요구하는 시료에 있어 분리배양법과 병행하여 선행될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 어체내 IHNV 모니터링에 LAMP법의 사용이 가능 하는지를 검토하기 위해 IHNV를 무지개송어에 인위적으로 감염시킨 후 시간 경과에 따라 LAMP법과 어류세포를 사용한 분리배양법을 이용하여 IHNV 검사를 실시하였다. IHNV를 $10^{6.5}$ TCID₅₀/fish, $10^{5.5}$ TCID₅₀/fish, $10^{4.5}$ TCID₅₀/fish로 복강 주사한 결과, 40%, 0%, 0%의 누적폐사율이 관찰되었다. 폐사어 및 IHNV 접종 후 16일과 28일째에 각 실험구에서 채집한 생존어 5마리를 대상으로 한 IHNV 검사 결과, 폐사어에서 IHNV가 100% (8/8 마리) 분리되었고 (감염가: $10^{4.3}$ - $10^{6.8}$ TCID₅₀/ml), RT-LAMP법에서도 100% 검출되었다. 16일째 생존한 개체를 대상으로 한 IHNV 검사 결과에서는 $10^{6.5}$

TCID₅₀/fish, $10^{5.5}$ TCID₅₀/fish, $10^{4.5}$ TCID₅₀/fish의 IHNV로 접종한 실험구에서 각각 60% (3/5 마리, 감염가: $10^{2.8}$ - $10^{5.05}$ TCID₅₀/ml), 20% (1/5 마리, $10^{1.05}$ TCID₅₀/ml), 60% (3/5 마리, $10^{1.05}$ - $10^{4.8}$ TCID₅₀/ml) 의 검출율을 보였으나 LAMP법에서는 20% (1/5 마리), 0% (0/5 마리), 20% (1/5 마리) 의 검출율을 나타내었다. 28일째 생존한 개체 및 대조구의 어류에서는 IHNV가 분리·검출되지 않았다. 이상의 연구결과로 LAMP법은 IHNV-생존어에서 바이러스를 모니터링 하는데 한계가 있으나 병어로부터 IHNV를 검출하는데 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료되었다.

감사의 글

본 연구는 2011년도 정부 (교육과학기술부) 의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행 되었습니다 (No. 2009-0087136).

참고문헌

- Bootland, L.M. and Leong, J.C.: Infectious haematopoietic necrosis virus. In: Woo, P.T.K. and Bruno, D.W. (eds). Fish diseases and disorders, Vol 3. Viral, bacterial and fungal infections. CABI Publishing, New York, pp 57-121, 1999.
- Kim, C.H., Dummer, D.M., Chiou, P.P. and Leong J.A.: Truncated particles produced in fish surviving infectious hematopoietic necrosis virus infection: Mediators of persistence?. J. Virol., 73:843-849, 1999.
- Kim, W.S., Mochizuki, M., Nishizawa, T. and Yoshimizu, M.: Detection of specific antibodies against infectious hematopoietic necrosis virus from

- rainbow trout sera by ELISA using two
- Kim, W.S., Oh, M.J., Nishizawa, T., Park, J.W., Kurath, G. and Yoshimizu, M.: Genotyping of Korean isolates of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) based on the glycoprotein gene. 152: 2119-2124, 2007.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T.: Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*, 28:e63, 2000.
- OIE: Manual of diagnostic tests for aquatic animals. Infectious haematopoietic necrosis. Office International des Epizooties, Paris. 2009.
- Overturf, K., LaPatra, S. and Powell, M.: Real-time PCR for the detection and quantitative analysis of IHNV in salmonids. *J. Fish Dis.*, 24:325-333, 2001.
- Park, M.A., Sohn, S.G., Lee, S.D., Chun, S.K., Park, J.W., Fryer, J.L. and Hah, Y.C.: Infectious haematopoietic necrosis virus from salmonids cultured in Korea. *J. Fish Dis.*, 16:471-478, 1993.
- Reed, L.J. and Muench, H.: A simple method of estimating fifty percent endpoint. *Am. J. Hyg.*, 27:493-497, 1938.
- Suebsing, R., Jeon, C.H., Oh, M.J. and Kim, J.H.: Reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification assay for infectious hematopoietic necrosis virus in *Oncorhynchus keta*. *Dis. Aquat. Org.*, 94:1-8, 2011.
- Novirhabdoviruses. *Fish Pathol.*, 43:112-116, 2008.
- Tordo, N., Benmansour, A., Calisher, C., Dietzgen, R.G., Fang, R.X., Jackson, A.O., Kurath, G., Nadin-Davis, S., Tesh, R.B. and Walker, P.J.: Family *Rhabdoviridae*. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. and Ball, L.A. (eds). *Virus taxonomy*, VIIIth report of the ICTV, Elsevier, Academic Press, pp 623-644, 2005.
- Wolf, K.: Infectious hematopoietic necrosis. In: Wolf (ed) *Fish viruses and fish viral diseases*. Cornell University Press, Ithaca, New York, pp 83-114, 1988.
- Yoshinaka, T., Hori, Y., Motonishi, A., Kasai, K., Yamamoto, A., Suzuki, K., Ugazin, M. Nomura, T. and Yoshimizu, M.: Detection of infectious hematopoietic necrosis virus using RT-PCR combined with tissue culture. *Bull. Nat. Salmon Res. Cent.*, 1:29-34, 1998.
- 김가홍, 김영진, 정성주, 정태성, 오명주. 무지개송어 성어에 대량 폐사를 유발하는 IHNV의 분리와 특성. *한국어병학회지*, 16:81-90, 2003.
- 손상규, 박명애, 박정우. 산천어의 바이러스성 질병에 관한 연구 II-산천어 치어에서 IHNV 분라. *한국어병학회지*, 6:87-92, 1993.

Manuscript Received : October 17, 2012

Revised : November 8, 2012

Accepted : November 13, 2012