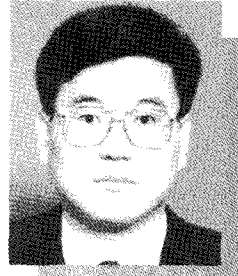


양식어류에 있어서 바이러스성 질병의 진단기법



허 강 준

충북대학교 수의과대학 어류질병학연구실 부교수

대한수의학

1. 사료의 취급방법

어류 바이러스가 모두 병원성을 갖는 것은 아니다. 그렇지만 일부 바이러스, 예를 들어 바이러스성 출혈성 패혈증을 일으키는 VHSV (Viral Hemorrhagic Septicemia Virus) 전염성 조혈기 괴사증을 일으키는 IHNV (Infectious Hematopoietic Necrosis Virus), 잉어의 봄바이러스 혈증을 일으키는 SVCV (Spring Viremia of Carp Virus), 연어과 어류의 상피 유두종 (上皮乳頭腫)을 일으키는 Herpes virus type 2 (NeVTA, OMV, YTV, CSTV), 메기과 어류의CCV (Channel Catfish Virus) 및 EHNV (Epizootic Hematopoietic Necrosis Virus) 등은 매우 강한 병원성을 가지고 있다. 그러므로 이와 같은 바이러스에 감염된 물고기, 혹은 바이러스성 질병으로 의심되는 병어가 발견되면 적어도 그 질병의 원인이 국내에 이미 존재하고 있는 바이러스 혹은 새로운 바이러스에 의한 질병이 아니라는 사실이 밝혀질 때까지 병어 및 시료 등은 엄중하게

격리, 소독하여야 한다. 왜냐하면 만일 원인 바이러스가 국내에 존재하지 않는, 즉 국외로부터 새로이 유입된 바이러스일 경우에는 관리부주의로 인해 순식간에 바이러스를 국내에 퍼뜨리는 결과를 낳을 수도 있기 때문이다. 병어를 운반하는 용기, 시료보존용기, 사용이 끝난 기구 등은 600ppm의 차아염소산소다액에 폐기처분 하거나 소각하도록 한다. 이는 바이러스의 수중침입을 막을 뿐 아니라 수평감염 경로를 차단한다는 점에 있어서도 매우 효과적이라 할 수 있다. 병어로부터 시료를 채취하는 과정은 다음과 같다.

- ① 환부를 신속하게 채취한다. 이것이 불가능한 경우에는 시료 내의 바이러스의 감염력을 유지하기 위해 신속하게 시료를 -20°C 혹은 그 이하의 온도에 신속하게 동결 보존한다. 시료 채취 중에는 항상 얼음으로 시료를 냉각시켜 둔다.
- ② 시료가 큰 경우에는 필요한 조직이나 환부만을

적당한 크기로 잘라내어 시료로 한다. 시료가 지나치게 작을 경우에는 병어 전체를 시료로 한다. 빈사어의 환부에는 보통 다량의 바이러스가 존재하므로 환부가 있는지의 여부를 반드시 확인한다.

- ③ 조직중의 바이러스를 방출시키기 위해서 시료를 마쇄한다. 멸균한 homogenizer에 시료를 약 2 g 정도 넣고 소량의 배지 (MEM) 과 함께 마쇄한다. 이 때에도 마찰에 의한 열의 발생을 줄이기 위해 가능한 한 얼음으로 냉각하면서 마쇄하는 것이 좋다.
- ④ 마쇄액을 시험관에 옮긴 후 4℃에서 3000 rpm, 15분간 원심분리한다.
- ⑤ 상청액만을 다른 시험관에 옮긴 후, 무균실로 옮긴다.
- ⑥ 상청액을 멸균한다. 멸균법에는 필터를 통한 여과 멸균법과 항생물질을 이용한 멸균법이 있다. 각각에 대한 설명은 다음과 같다.

1) 여과법에 의한 멸균

보통 0.22 μ m의 필터가 많이 쓰이며, 세균이나 진균은 통과하지 않지만 바이러스는 통과하므로 여과시킨 상청액은 바이러스 접종액으로 사용할 수 있다. 필터는 대개 개별포장되어 있으므로 clean bench 안에서 개봉하도록 하며, 일단 개봉한 후에는 시료와 직접 접촉하는 부분은 손이 닿지 않도록 주의한다. 시료량에 알맞는 syringe를 준비하여 시료액을 흡입한 후, 필터를 콧아 피스톤을 천천히 누르며 필터를 통과시킨다.

2) 항생물질법에 의한 멸균

1.5 ml의 MEM (1ml의 MEM에 penicillin 800-1000 IU, streptomycin 800-1000 μ g, mycostatin 400 IU 함유)을 함유한 새로운 바이알 병에 0.2 ml의 시료를 넣는다. 이 단계에서 시료는 50배 희석된 셈이 된다.

이 혼합액을 4℃에서 하룻밤 방치함으로써 시료내의 일반 미생물은 사멸하므로 이 혼합액을 그대로 바이러스 분리를 위해 감수성 세포에 접종할 수 있다.

이 방법은 다수의 시료를 준비해야 되는 경우에 경제적이고 편리하다.

2 세포배양기술

1) 어류유래 배양세포의 특징

온혈동물의 세포의 배양기술과 비교하여 기본적으로 크게 다른 부분은 없다. 단, 어류는 변온동물이며 각 어종에 따라 서식하는 환경 온도가 다르므로, 세포를 배양할 때에도 그 어류에 가장 적합한 수온으로 배양기의 온도를 맞추어 주어야 하므로 대개 저온 인큐베이터를 필요로 하게 된다. 배지로서는 주로 L-15, MEM 등을 사용하며, 혈청은 FBS (fetal bovine serum)을 쓴다.

온혈동물의 세포와 비교하여 증식이 느리고, CPE(세포변성효과, Cytopathic Effect) 발현이 늦은 등의 단점이 있으나 그만큼 계대배양 간격이 길어지므로 관리에는 편하다는 장점이 있다.

2) 세포의 계대배양

주화세포로 확립이 된 배양세포는 접촉저지 현상을 일으킬 때까지 증식을 계속한다. 이후 세포의 대사활성은 현저히 저하되고 더이상 세포분열은 일어나지 않는다.

이 상태에서 세포는 비록 생존해 있지만, 단층의 막상태가 되어 배양기 벽으로부터 박리되거나 각각의 세포로 분리되어 사멸한다. 그러므로 이러한 상태의 세포를 적당 농도로 희석하여 새로운 배양액에 부유시키고 새로운 배양기에 부유상태의 세포를 옮겨 줄 필요가 있다. 이것을 계대배양(繼代培養)이라고 부르며 적극적으로 주화세포의 증식을 피하는 경우에 필수불가결한 기술이고 바이러스학, 세포 미생물학 등의 분야에서 주로 이용하는 보편적인 기술이기도 하다.

(1) 계대배양 순서

- ① 배양 flask의 스크류 캡을 열기 전에 캡과 배양 flask 입구 사이의 간극을 70% ethanol 을 분무하여 충분히 소독한다.
- ② 세포를 손상시키지 않도록 배양액을 배양 flask로부터 조심스럽게 피펫으로 빨아낸 후, PBS(-)로 단층배양면을 2-3회 세척하여 죽은 세포와 혈청성분 등을 씻어낸다.
- ③ 남은 PBS(-)액을 조심스럽게 버린 후, trypsin-EDTA액을 첨가하고 flask를 조심스럽게 기울여서 flask전면에 확산시킨다. 현미경으로 관찰하면서, 배양면의 백탁화가 진행되고 세포가 flask벽으로부터 유리하는 것을

확인한다. 세포가 잘 박리되지 않으면, flask의 측면을 살짝 두들겨 배양면에 진동을 주어 flask벽으로부터 세포의 박리를 유도한다.

- ④ 조심스럽게 pipetting해서 균일한 세포 현탁액을 만든다. 지나치게 오래 하거나 강하게 할 경우, 세포에 좋지 않은 영향이 있으므로 주의한다. 한편, 이 과정을 행하지 않으면, 계대 배양시 세포들이 균일하게 분산되지 않고 덩어리로 남아있게 된다.
- ⑤ 새 배지를 적당량 첨가하여 trypsin 효과를 저지시킨다. 이후, 가볍게 pipetting해서 균 일한 세포현탁액을 만든다.
- ⑥ 새 배양 flask에 새 배지를 첨가하고 ⑤의 세포부유액을 적당량 첨가한다.
- ⑦ 세포를 flask에 균일하게 분산시킨다.

* Trypsin-EDTA액 :

Trypsin	4 g
EDTA · 2Na	0.18 g
10배농도 PBS(-)	400 ml
정제수	3600 ml

이상을 비이커에서 잘 교반하면서 충분히 녹인 다음 (trypsin분말이 보이지 않을 때까지) 여과 멸균한다. 소량씩 분주하여 -20℃에 보존한다.

* 10배농도 PBS(-)

KCl	2 g
KH ₂ PO ₄	2 g
NaCl	80 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	28.85 g
정제수	1000 ml



적당량을 정제수에 넣어 녹인 후, 완전히 녹으면 나머지 정제수를 부어 1000 ml로 맞춘다.

사용시에는 정제수로 10배 희석한 후, 가압멸균한다. (-)란 칼슘염, 마그네슘염이 들어있지 않음을 의미한다.

*** 참고사항 :**

- ① 일반세포의 증식 사이클은 유도기(誘導期), 대수 증식기(對數增殖期), 정상기(定常期) 및 사멸기(死滅期)로 분류된다. 정상기에서의 세포 밀도는 세포 종류에 따라 다양하지만 RTG-2 세포의 세포밀도는 약 275,000 cells/ml가 된다.
- ② 계대할 때, 세포 희석율은 세포분산 후 부유상태에 있는 세포의 수를 혈구계산판을 이용하여 계산, 결정한다. 숙달이 되면, 도립현미경에서 분산 전의 세포증식상태를 관찰하지만 해도 대총 세포의 수를 짐작할 수 있다.
- ③ 계대배양 간격은 세포희석율, 배양온도, 배양액 등에 따라서 크게 다르다. RTG-2세포의 경우, 분산 시의 세포밀도를 26,000cells/ml, 15°C에서 2주 간격으로 계대하면 계대배양 이 안전하게 이루어진다.

2. 초대세포의 배양 (primary cell culture)

초대세포배양이란, 생체로부터 조직, 기관을 적출하여 trypsin 등을 이용하여 개개의 세포로 분산하거나 혹은 조직보다 작은 세포집단으로 소화시킨 후, 이를 배양 flask로 옮겨 세포 배양액 중에서 기르는 것을 말한다. 대부분의

경우 초대배양세포는 배양 flask 바닥에 부착, 정지배양(靜置培養)에 적당한 상태가 되어 계대배양이 가능하게 된다. 주화세포(株化細胞)란 초대 배양세포를 여러번 계대를 거듭한 결과, 세포의 형태, 핵형의 변화가 없는 일정한 성질을 갖는 세포군이 된 경우를 가리킨다. 다음부터 끝까지는 보통 사용되어지고 있는 초대세포배양기술을 작업의 흐름에 따라 대략 기술하였다.

- ① 공시어를 즉시시킨 후, 필요에 따라 방혈을 시킨다. 이후, 체표를 충분히 세척하고 수분간 600 ppm의 치아염소산소다액에 담그어 소독한다. 계속해서 공시어를 70% ethanol 에 적신 paper towel 위에 옮겨 70% ethanol로 표면을 깨끗이 닦는다.
- ② 무균적으로 개봉하여 복강을 노출시키고, 생식선, 간장, 비장, 부레, 신장, 심장 등의 내부 기관을 무균적으로 적출, 멸균된 PBS 혹은 세포배양액 이 담긴 petri dish로 옮긴다. 이 때, PBS 혹은 세포배양액은 항상 냉각시켜 둔다. 다량의 시료가 필요하다면, 여러마리로부터 기관을 채집하여 모아서 사용하여도 무방하다.
- ③ 멸균된 50ml 비이커에 적출한 시료를 옮겨, 차가운 PBS 혹은 세포배양액 1-2ml 을 넣고 2mm 이하의 조직소편이 될 때까지 충분히 잘게 자른다.
- ④ 조직소편을 PBS로 세척하고 침전시킨후 PBS를 제거한다. 이 단계를 수 회 반복한다.
- ⑤ trypsin 소화: 조직소편 2-6 ml에 trypsin액을 10배량 정도 넣고 5-6 °C 정도에서 하룻 밤 동안 천천히 교반시킨다.
- ⑥ 기계적분산 : 조직소편 1-3 ml에 대하여 3-4 배량의 차가운 PBS를 가한다. 이 후 0.1-0.2 ml / 25cm²의 비율로 조직소편을 배양 flask에 옮긴다. 조직소편의 정착밀도를 높이기 위하여 경사지게

만들어 1시간 정치시킨다. 그 후 배양면적 25 cm²당 5-7 ml의 배양액을 가하여 경사지지 않게 정치하고 적당한 온도에서 배양을 시작한다. 배양개시 후 수 일간 배양 flask를 움직이면 안된다.

- ⑦ ⑤의 flask 내용물을 꺼뜨로 간단히 여과시킨 후, 500×g 정도에서 5분간 원심을 행하여 세포를 침전시킨다.
- ⑧ 조직침전물을 남기고 상청액을 따라 버린다.
- ⑨ 조직침전물을 100배량의 배양액으로 다시 부유시키고, 배양 flask당 5 ml를 분주하고 10-15℃에서 배양을 시작한다.

3. 바이러스 분리기술

본 항목에서는 각종 세포의 바이러스 감수성, 세포배양 크기와 사료접종량, 계대법 및 세포의 동결보존법을 계속하여 기술한다.

1) 각종 어류 주회세포의 바이러스 감수성

바이러스는 살아있는 세포 내에서만 자기복제를 행하며 세균처럼 인공배지에서는 증식하지 않는다. 이것은 바이러스의 유전정보가 적고 바이러스입자 내에 에너지 합성계 및 단백질 합성계가 없으므로 숙주세포의 에너지 및 단백질 합성계를 이용하면서 자기복제를 하기 때문이다. 그러므로 바이러스 검사를 위해서는 해당 바이러스에 감수성이 있는 배양세포가 필수적이다.

Table 2-1에 어류 바이러스에 대한 각종 어류 유래 배양세포의 감수성에 대하여 기술하였다. 이는 어디까지나 개략적인 것이며 상황에

따라 신축적으로 참고하는 것이 좋다. 또 RTG-2세포는 특정 바이러스에 대하여 감수성이 약간 떨어지는 경우가 있지만 각종 바이러스에 대해 각각 특징적인 CPE를 보이는 경우가 많으므로 진단에 많은 도움이 될 수 있다.

Table 2-1. 각종 어류 바이러스에 대한 각종 어류 유래 배양세포의 감수성

바이러스종	배양적온	감수성이 높은세포 () ^{*4}
IPNV	15-20℃	CHSE-214, BF-2, CHH-1, (RTG-2, BB, EK-1)
EVE, YAV	15-20℃	IPNV
IHNV	15-18℃	EPC, FHM, (RTG-2, CHSE-214)
HRV	15-20℃	EPC, FHM, RTG-2
VHSV	10-15℃	EPC, FHM, RTG-2
SVCV	15-20℃	EPC, FHM, BF-2, (RTG-2, BB)
EVA	15-20℃	EPC, FHM, (RTG-2)
NeVTA (OMV)등 ^{*1}	10-15℃	CHSE-214, (RTG-2)
CCV	20-25℃	CCO, BB
CHV	15-20℃	EPC, FHM
H.salmonis	10-15℃	RTG-2, CHSE-214
EHNV ^{*2}	15-20℃	RTG-2, FHM
CSV등 ^{*3}	20-25℃	EPC, FHM, EK-1, CHSE-214, SSE-5, RTG-2

*1 연어과 어류의 Herpesvirus

*2 Epizootic Hematopoietic Necrosis Virus : Iridovirus

*3 Reovirus속의, GSV (Golden Shiner Virus), CSV (Chum Salmon Virus), JCV (Japanese Carp Virus), CRV(Channel Catfish Reovirus)등이 포함되어있다.

*4 감수성이 약간 약한 세포

대부분의 어류 바이러스는 CHSE-214, EPC 및 RTG-2 세포를 사용하면 비교적 손쉽게 바이러스를 분리할 수 있다. 그리고, 검사재료 접종 후 세포배양은 발병시의 수온과 비슷한 온도에서 행하는 것이 바람직하다.

2) 세포의 배양온도 및 증식속도

배양세포에 따라 적정 배양온도 및 증식속도는 다르다. 다음 표는 배양적온 및 계대시의 희석 배율에 관하여 기술한 것이다. 단 배양액에 5%이상의 혈청이 포함된 경우에서의 결과임을 유의하기 바란다.

Table 2-2 각종 어류세포의 적정 배양온도, 증식속도, 배지 및 바이러스 감수성

세포의 종류	적정 배양온도	계대시 희석율	배양액	적용 바이러스
RTG-2	10-22℃	1/4-1/6	MEM	IPNV, IHNV, VHSV, NeVTA, EHNV외
CHSE-214	10-22℃	1/6-1/10	MEM	IPNV, IHNV, NeVTA, Iridovirus
CHH-1	10-22℃	1/6-1/10	MEM	IPNV
FHM	18-30℃	1/6-1/8	MEM	IHNV, CHV, HRV, SVCV, VHSV, EVA
EPC	18-30℃	1/6-1/10	MEM	IHNV, CHV, HRV, SVCV, VHSV, EVA
BB	20-30℃	1/4-1/6	MEM	CCV
BF-2	10-30℃	1/4-1/8	MEM	IPNV, EVA, EVEX
EK-1	25-35℃	1/6-1/10	L-15	대부분의 뱀장어 바이러스, IPNV
EO-2	20-30℃	1/6-1/8	L-15	위와 같음

3) 시료의 접종량

병어조직에서 유래하는 독성물질에 의해 세포가 좋지 않은 영향을 받을 수 있으므로 조직마쇄액은 적당한 범위로 희석하여 세포에 접종하여야 한다. 다음은 배양용기의 종류에 따른 세포배양액량과 시료 접종량을 나타내었다.

Table 2-3 각종배양 크기와 시료접종 용량

배양용기의 종류	용기당 배양액량	접종량(조직 1/100희석액)
165mm culture Tube	1.0-1.5 ml	0.1-0.2 ml
96well plate	0.1 ml	0.05 ml
24well plate	1.0 ml	0.1-0.2 ml
12well plate	1.5-2.0 ml	0.2-0.4 ml
25cm ² flask	5.0 ml	0.5-1.0 ml

세포에 따라서는 조직유래의 독성물질에 감수성이 높은 것도 있으므로 접종량을 적당히 가감한다. RTG-2와 BB cell 등은 독성물질에 감수성이 높으므로 1000 배 희석한 시료를 접종하는 것도 괜찮다. 난황은 특히 독성물질을 많이 포함하고 있으므로 연어과 어류의 난을 접종재료로 하는 경우에는 난황을 제거한 후에 마쇄액을 희석하도록 한다. 또 조직마쇄액은 일반적으로 비중, 점도가 높으며 배양 용기의 바닥에 정제하는 경향이 있으므로 접종 후 배양액과 잘 혼합하여야 한다. 한편 친어 배란액의 경우에는 독성이 낮고 바이러스양도 적은 경우가 대부분이므로 1/2-1/5로 희석하여 접종한다. 그러나 이와 같이 주의하여 접종하더라도 때로는 독성에 의해 세포 형태가 변화하거나

최악의 경우 세포가 사멸하는 경우도 있다.

바이러스 농도가 충분히 높다고 생각되는 경우에는 시료를 보다 높은 배율로 희석하여 접종하여도 무방하다.

4) 세포의 동결보존법

대부분의 어류 주화세포는 배양온도를 내리면 상당기간동안 계대를 하지 않아도 장기보존이 가능하지만, 동결보존을 하는 것이 장기간의 보존을 위해 적합한 방법이다. 얼음 결정의 성장을 저해하는 것은 세포의 손상을 경감하는 방법이 된다. 동결 보호제 (얼음 결정의 성장을 저해하여 세포손상을 경감시킨다) 로서는 glycerin 또는 DMSO가 사용된다. 동결보존한 세포의 생존률은 세포의 종류, 동결보호제의 종류와 첨가비율, 동결시의 온도 저하 속도, 보존온도, 기간, 해동시의 온도 상승속도 등에 따라서 결정된다.

(1) 준비

- ① 배양세포 : 계대 후 약 2주 이내의 충분히 희게 번식한 세포.
- ② 동결보존용 배양액 : glycerin 또는 DMSO(시약특급), 혈청, 배양액을 1:4:5의 비율로 혼합한다. glycerin은 점성이 높으므로 계량시 주의한다.
- ③ PBS, trypsin액, 멸균 피펫
- ④ cryotube : 1.5-2.0 ml용. screw cap이 부착된 것.
- ⑤ tube rack, 냉동 컨테이너
- ⑥ 타올, 비닐봉지

(2) 방법

- ① 세포의 상태를 관찰한다. 미생물 오염이 없는 것을 확인하는 것이 좋다.
- ② 배양세포를 trypsin을 사용하여 분산시킨 후, 원심분리 (1000 rpm, 5분)한다. 이후 상층액을 제거하고 동결보존용 배양액을 넣어 잘 혼합한다.
- ③ cryotube에 1 ml씩 분주한다.
- ④ tube rack에 cryotube를 넣고, 타올로 4겹 정도로 잘 싸 후, 비닐봉투에 넣어 -80 °C에 넣어둔다.
- ⑤ 다음날 액체질소탱크에 옮긴다.
- ⑥ 약 1주일 후에 1개를 해동하여 25 cm²의 flask에 배양하여 본다. 동결보호제는 세포 독성을 나타내므로, 원심(1000 rpm, 5분)을 하여 세포만 회수, 새로운 배양액을 첨가하여 배양한다.

이상의 방법으로 통상 70 %이상의 생존율로 수년간 보존이 가능하다. 동결보존시 현탁액의 농도는 세포에 따라 다르므로 각각 조사를 해야 한다.

4. 바이러스의 정량기술

바이러스의 존재는 광학현미경으로는 직접 확인할 수 없지만, 바이러스에 감염된 세포의 형태 변화 혹은 사멸에 의해 간접적으로 확인할 수 있다. 이처럼 바이러스의 감염에 의해 세포의 형태가 변화하는 현상을 세포변성효과 (CPE)라고 하며, 이를 바이러스의 정량에 응용

할 수 있다. 즉, 바이러스 접종액을 단계별로 희석하고 이를 적당한 배양세포에 접종하면 CPE를 나타낼 것이다. 여기서 CPE를 나타내는 최고 희석배율을 구하여 이것의 역수를 구한 것이 바이러스의 감염가 (TCID)가 된다. 또한, 정상세포는 단층으로 발육하므로 단층세포에 바이러스를 접종한 후, methycellulose 등 적당한 증층배지를 사용하면 증식한 바이러스의 확산을 억제하여 최초로 감염된 세포의 주위에만 바이러스가 감염하여 plaque를 형성하게 된다. 이러한 현상을 이용한 plaque법도 바이러스 정량에 널리 쓰이고 있다.

1) TCID₅₀ method

(1) 준비

- 세포가 배양된 96 well microplate
- 바이러스 희석액 (2% 혈청, HEPES 등으로 pH를 조정한 배양액)
- 바이러스 희석용기 (screw vial 등)

(2) 조작

- 10단계 희석계열, 즉 0.9 ml(희석용 용액) + 0.1 ml(바이러스 액), 혹은 0.45 ml + 0.05 ml의 희석계열을 만든다.
- 각각의 농도별 시료를 차례로 세포에 접종한다 (0.05 또는 0.1 ml/ well).
- CPE 발현의 유무를 관찰한다.
- 아래의 식에 각 수치를 대입하여 산정한다. (Behrens-Karber법)

$$TCID_{50} = D + (h_1 + h_2 + \dots) d + 0.5 \times d$$

D = 전 well이 CPE양성인 희석배율의 상용 log
 $h_1, h_2, \dots =$ 이 이후의 각 희석배율에 있어 CPE 양성을 = (CPE 양성 well 수/ 접종 well 수)
 d = 시료 희석배율의 상용 log(10배이면 1)

이 수치는 1 well에 접종한 접종액 중의 바이러스 감염가 (TCID₅₀)를 나타낸 것이다. 그러므로 1 ml로 환산하면, 1 well당 접종량이 0.05 ml인 경우 20배 (log값에서는 약 1.3을 더함) 이고, 0.1 ml의 경우는 10배 (log값에서는 약 1.0을 가산)를 한다. 이 밖에 Reed-Muench법이 있지만 실질적으로는 거의 차이가 생기지 않는다.

2) Plaque 법

Plaque법은 세포와 바이러스에 따라 최적조건이 다르다. 여기서는 IHNV, IPNV, NeVTA에 관하여 기술한다.

(1) 준비

- 바이러스 희석액 (HEPES 등으로 pH를 조절한 배양액, 2%의 혈청을 포함)
- 증층배지 : 0.5-0.75%의 methylcellulose (4000 cps)와 세포배양용 배지 (2% 혈청 포함, pH 7.4- 7.6). 2배 농도의 배양액과 2배 농도의 methylcellulose 용액을 만들어 이를 혼합 하여 원하는 농도로 조정한다.
- 24 well 혹은 12 well microplate에 단층배양된 세포
- *methylcellulose 용액 :
 methylcellulose는 저온에서 잘 용해하므로 소정량의

methylcellulose를 증류수에 현탁시켜 4 ℃에서 하룻밤 정도 교반하여 용해를 시킨 후, 가압 멸균을 한다. 점도가 매우 높으므로 주의한다.

(2) 조 작

바이러스액을 10단계별로 희석한다.

세포가 배양된 microplate로부터 배양액을 제거한다. 단, 세포표면이 건조되지 않게 주의 한다.

각 희석단계의 바이러스액을 24 well의 경우에는 0.1 ml, 12 well의 경우는 0.2 ml씩 접종 한다.

적당한 온도(15-20 ℃)에서 10-15분 간격으로 흔들며 주면서 바이러스가 세포에 잘 흡착 되도록 한다.

접종한 바이러스액을 흡인제거하고 24 well의 경우에는 1 ml, 12 well의 경우에는 1.5-2 ml의 중층배지를 첨가하여 소정의 온도에서 plaque가 형성될 때까지 배양한다.


현미경으로 관찰하여 plaque가 충분히 형성되었다고 판단되면, 1% crystal violet을 포함한 30% 포르말린 용액에 수 시간 동안 고정과 염색을 같이 행한다. 수도수로 세척 후 plaque 수를 센다.

접종한 바이러스 액으로부터 1 ml 당 바이러스량을 환산하여, pfu/ml로 표기를 한다.

Table 2-4 바이러스, 공시세포와 MC농도 등의 관계

바이러스	공시세포	MC농도	배양온도	배양기간
IPNV	CHSE-214	0.75 %	15~20 ℃	4~6일
IHNV	FHM, EPC	0.65 %	15~18 ℃	5~7일
NeVTA	CHSE-214	0.50 %	15 ℃	7~9일

5. 바이러스성 질병의 진단

어류의 바이러스성 질병을 진단하는 가장 기본적인 방법은 병어로부터 바이러스를 분리한 후, 바이러스의 성상검사 및 중화시험 등을 행하는 것이다. 그러나 이러한 고전적인 방법은 결과가 나오기까지 상당한 시간이 걸리는 단점이 있으며 또한 바이러스의 종류에 따라서는 아직까지 원인 바이러스의 분리, 배양이 불가능한 경우들이 있다. 그러므로 최근에는 면역학적 기법을 도입하여 바이러스 항원을 검출해내거나 바이러스의 유전자를 검출해내는 방법을 병용하여 진단하는 경우가 대부분이다. 즉, 질병의 감염여부를 진단하기 위해서는 세포배양 및 면역학적 기법을 동시에 사용하며, 잠복감염어의 검출을 위해서는 세포배양과 유전자검출법을 사용한다. 분리가 불가능한 바이러스의 경우에는 면역학적 기법, PCR, DNA probe법이 유효하다. 

부스틴-에스와 바디컨디션(BCS)과의 관계를 알고 싶습니다.

바디컨디션이란 체중의 증감이 아닌 체지방의 축적정도를 표시하는 것입니다. 젖소는 체지방을 이용하여 우유를 생산하는데 바디컨디션이 3.0 이상이 되면 젖소에 무리없이 큰 효과를 기대할 수 있지만 2.5 이하가 되면 큰 효과를 볼 수 없으며 다음 비유기에 정상적인 상태로 도달되기 어렵고 대사성 질병에 걸릴 확률이 높습니다. 결론적으로 부스틴-에스를 투여할 경우 체내의 체지방 분해가 많아지므로 적정 사양관리가 이루어지지 않을 경우 바디컨디션이 떨어질 수 있습니다.