

## 이매패류 소화 효소 및 환경수에서의 WSSV (white spot syndrome virus) 안정성

민준규 · 정현도 · 김광일<sup>†</sup>

부경대학교 수산생명의학과

### Stability of WSSV(white spot syndrome virus) in bivalve mollusk digestive enzymes and aquatic environments

Joon Gyu Min, Hyun Do Jeong and Kwang Il Kim<sup>†</sup>

Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan, 48513, Republic of Korea

White spot syndrome virus (WSSV) is a viral disease that causes significant economic losses in the global shrimp industry, primarily through horizontal transmission among aquatic animals. The virus can also be spread by shellfish, which can concentrate and release the virus through filter-feeding activity. The potential for virus transmission depends on whether the virus can survive in the environment for a while without being digested. From the artificial degradation analysis in the environmental water, the number of WSSV genome copies decreased more rapidly in seawater than in freshwater, and at 18°C compared to 23°C. Moreover, WSSV had a lower digestion rate with shellfish digestive enzyme compared to the reduction rate in seawater, indicating that WSSV may persist in the digestive tracts of shellfish for longer, increasing the chance of transmission. These findings conclude that shellfish play a significant role in the transmission of WSSV and further research is needed to determine their specific contribution to the virus spread in aquatic environments.

**Key words:** White spot syndrome virus, shellfish, stability, vector

## 서 론

흰반점바이러스(White spot syndrome virus, WSSV)는 *Nimaviridae* 과 *Whispovirus* 속에 속하는 외막을 가진 막대 모양의 이중나선형 DNA 바이러스이다 (Wang et al., 2019). WSSV는 흰반점병 (White spot diseases, WSD)의 원인 병원체로, 감염된 새우에서 외골격에 흰색의 반점이 나타나는 특징을 나타내

며 3-10일 안에 100%의 대량폐사를 일으켜 지난 25년간 새우 양식 산업에 심각한 손실을 유발한 바이러스성 질병이다(Chou et al., 1995; Nakano et al., 1994; Stentiford et al., 2012). WSSV는 광염성 바이러스로 해양 환경 뿐만 아니라 담수 환경에 서식하는 갑각류에도 흰반점병을 유발하는 것으로 알려져 있다(Pace et al., 2016).

수계 환경의 이매패류는 여과 섭식(filter-feeding) 과정을 통해 먹이 활동을 행하며 주변 환경수 및 오염된 플랑크톤, 생물 폐기물, 퇴적물 등으로부터 병원성 세균, 바이러스, 독소, 화학물질 등을

<sup>†</sup>Corresponding author: Kwang Il Kim  
Tel: +82-51-629-5946, Fax: +82-51-629-5938  
E-mail: kimki@pknu.ac.kr

조직 내 축적할 수 있다(Rodney *et al.*, 2007; Paul-Pont *et al.*, 2010; Martinez-Albores *et al.*, 2020). 이렇게 축적된 다양한 물질들이 특정한 환경 조건에서 수계 환경으로 방출(Molloy *et al.*, 2014, Mortensen. 1993; Pietrak *et al.*, 2012) 또는 특정 경로를 통해 사람을 포함한 동물에게 위험 요소로 작용할 수 있다(Ridler *et al.*, 2007; Razafimahefa *et al.*, 2020, Grodzki *et al.*, 2014, Kim *et al.*, 2017).

병원체 감염 경로에 대한 감염 역학 분석 및 위험성 평가를 위해서는, 여러 환경 요소에서의 병원체 유전자 안정성(stability) 및 상호작용을 이해하는 것이 필수적이다. 특히 질병 확산 측면에서 체내 병원체를 축적한 패류의 역할은 수계 환경으로 배출되는 병원체가 감염력을 유지하는지 또는 패류의 소화 과정에서 불활화되거나 축적된 병원체가 배출되지 않는지에 따라 달라질 수 있을 것이다. 전자의 경우 패류는 바이러스 전파 경로 중 하나인 매개체(vector) 혹은 보유자(reservoir)로서의 가능성을 나타내며(Hall *et al.*, 2012; Seitz *et al.*, 2011), 후자의 경우 패류가 주변 해양수에서의 바이러스 포집 및 불활화를 통해 오히려 바이러스 전파를 억제한다는 것을 의미한다(Molloy *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2017). 이러한 양상은 패류 및 병원체의 종류 뿐만 아니라 수질 조건, 수온 등과 같은 환경적인 요인에 따라서도 달라질 수 있으므로(de Abreu Corrêa *et al.*, 2012; Krog *et al.*, 2014; Polo *et al.*, 2015), 이에 대한 연구를 통해 이매패류 내의 병원체 안정성 분석은 전이 위험성을 평가하기 위해 중요하다. 특히 선행 연구에서 WSSV가 이매패류에서 검출된 사례가 있고(Vazquez-Boucard *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2013), WSSV의 매개체로서의 역할을 수행할 수 있기에(Praytino *et al.*, 2022), 이매패류에서의 WSSV 유전적 안정성 분석이 요구된다. 또한, 숙주 또는 매개체 생물로부터 수계 환경으로 배출된 수생 바이러스는 해수 및 담수 내에서 양적 감소 및 감염력이 소실되는 경향이 있으므로(Hawley and Garver, 2008; Toranzo and Metricic, 1982;), WSSV의 해수 및 담수에서의 안정성에 대한 연구 또한 필요하다. 따라서 본 연구에서는, 다양한 환경 요소에서의 WSSV genome 유전자 안정성을 평가하였다. 또한 어류 바이러스로 알려진 참

돔이리도바이러스 (Red seabream iridovirus, RSIV)와의 유전자 안정성 비교 분석을 통해 이매패류가 WSSV 매개체로써 갖는 특이점을 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 바이러스

본 연구에서 분석에 사용한 WSSV는 2014년 8월 우리나라 인천 소재 양식장의 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)에서 검출된 현장 감염 시료를 사용하였다(Min., 2017). 실험에 사용하기에 앞서 바이러스의 접종액은 WSSV로 인해 폐사가 발생한 냉동 새우 복부 근육 조직을 PBS(Phosphate-buffered saline, 0.1M, pH 7.2)와 1:10(w/v)으로 혼합 후 마쇄하고 원심 분리 (8,000 rpm, 10분) 실시 한 후 상등액을 취해 0.45  $\mu$ m syringe-filter에 통과시킨 용액을 소분하여 실험에 사용하기 전까지 -50°C에 보관하였다.

Red sea bream iridovirus (RSIV)는 IVS-I strain (Jeong *et al.* 2003)을 사용하였으며, -80°C에 보관된 배양액을 PMF(*Pagrus major* fin) 세포에 재 접종하여 바이러스를 활성화 시켜주었고, 바이러스 접종 7일 후, 세포에서의 세포변성 효과(CPE)를 확인한 후 바이러스 상등액을 WSSV 용액 제조와 같은 방법으로 제작한 후 실험에 사용하기 전까지 소분하여 -50°C 보관하였다.

### 바이러스의 정량 확인

WSSV의 VP28 gene으로부터 qF/qR primer set (Table 1)를 이용하여 얻은 281bp의 증폭 산물을 pGEM-T easy vector system (Promega, USA)에 삽입하여 재조합 plasmid를 제작하였고, 이를 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 에 형질전환시켜 cloning 하여 대량 배양 및 plasmid 분리하여 사용하였다. 분리된 plasmid는 10배 단계 희석하여 standard curve 작성에 사용하였다( $1.0 \times 10^1$  -  $1.0 \times 10^7$  viral copies/ $\mu$ L) (Data not shown). 이후 Viral DNA의 정량을 위해 각 바이러스의 DNA를 주형으로 하는 absolute qPCR을 수행하였으며, Rotor Gene 6000 thermal cyclor (Qiagen, Germany)를 사용하여 제조사의 매

Table 1. Primers used in this study

Target	Primers	Sequence (5' - 3')	Amplicon Size (bp)	PCR condition	Reference
WSSV VP28	WSSV qF WSSV qR	TGT GAC CAA GAC CAT CGA A CCA CAC CTT GAA TGT TCC C	281	95°C for 15 min, (40 cycles; 95°C, 10 sec; 60°C, 15sec; 72°C, 20sec)	Reyes et al., 2007
RSIV MCP	MqF MqR	GGC GAC TAC CTC ATT AAT GT CCA CCA GGT CGT TAA ATG A	141	95°C for 10 min, (40 cycles; 95°C, 10 sec; 60°C, 15sec; 72°C, 20sec)	Jin et al., 2014

뉴얼에 따라 양을 측정하였다. Microtube에 TOPreal™ qPCR 2× Premix (Sybr Green with low ROX, Enzynomics) 10 µL, 0.5 pM의 각 primer, 그리고 1 µL의 template DNA를 첨가한 후, 최종 volume 이 20 µL이 되도록 nuclease-free water를 첨가하였다.

WSSV qPCR 분석 조건의 경우 95°C에서 15분간 반응한 후, 95°C 10초, 60°C 15초, 72°C 20초의 반응을 1 cycle로 하여 총 40 cycles를 반응시켰다. RSIV 경우 Jin et al. (2014)에서 제시한 MqF/MqR primer set를 이용하여 정량 분석을 실시하였으며, 해당 조건에 따라 95°C에서 10분간 반응한 후, 95°C 10초, 60°C 15초, 72°C 20초의 반응을 1 cycle로 하여 40 cycles를 반응시켰다(Table 1). 또한 WSSV와 RSIV 모두 마지막 cycle 이후 모든 반응물에 대하여 72°C부터 95°C까지의 영역에서 melting curve 분석을 실시하여 비특이적 증폭 여부 확인을 통해 오염 발생 유무를 확인하였다.

**해수 및 담수에서의 WSSV 유전자 안정성 확인**

해수 및 담수에서 온도에 따른 WSSV 유전자의 안정성을 확인하고자, 해당 환경에서 WSSV 마쇄액의 viral genome copy 값 변화를 분석하였다. 담수의 경우 수돗물을 이용하여 잔류 염소 제거를 위해 하루동안 상온에서 에어레이션을 시켜주며 증발 반응을 유도한 후 사용하였으며, 해수의 경우 실제 환경에서의 적용을 위해 부산의 연안에서 10 km 떨어진 지역에서 채취한 해수(31.4 ± 0.7‰)를 사용하였다. 이후 해수와 담수 모두 사용 전 0.45 µm pore size의 filter를 통과시켜준 후 사용하였으며, -50°C에 보관된 WSSV 용액을 이용하여 실험

을 실시하였다. 해수와 담수에서 바이러스의 농도가 10<sup>6</sup> viral genome copies/mL 가 되도록 1L에 마쇄액을 넣어 주었고, 수온이 각각 18°C와 23°C가 되도록 유지하며 7일동안 에어레이션을 시켜주며 반응시켰다. 최초의 viral genome copy 값을 확인하고자 담수 및 해수에 각 바이러스를 희석 후 30분 뒤 채취하고 이후 1, 3 및 7일째 시료를 채취하여 주었고, 채취한 시료는 -20°C에 보관한 후 동시에 qPCR을 통해 viral genome copy 값을 분석하였다.

**패류 소화 효소**

패류 소화선 조직 내의 WSSV의 안정성 확인을 위해, Areekijserree *et al.* (2004)의 방법을 활용하여 각 패류로부터 추출한 소화선 마쇄액을 이용하여 소화율 확인을 위한 소화 효소로 활용하였다. 참굴 (*Crassostrea gigas*; 7.17 ± 1.4 cm mean shell length), 홍합 (*Mytilus coruscus*; 5.78 ± 0.7 cm mean shell length)과 바지락(*Venerupis philippinarum* 5.7 ± 1.2 cm mean shell length)을 부산 해변시장에서 구입하였고, 실험실로 수송 후 WSSV 및 RSIV의 존재 여부를 확인하여 바이러스가 존재하지 않는 것을 확인한 후 실험에 사용하였다. 이후 각 패류 5개체에서 분리한 소화선을 PBS와 10% (w/v)으로 혼합한 후 마쇄하였고, 8,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 위쪽의 지질층을 피펫을 이용해 제거한 다음 0.45 µm syringe-filter를 통과하였다. 만들어진 소화선 마쇄액의 상등액은 바이러스에 대한 소화율 분석을 위한 소화 효소액으로써 사용하였다.

**패류 소화 효소에서의 바이러스 소화율 분석**

Kim et al. (2017)의 방법을 활용하여 소화율 분

석을 실시하고자 하였다. 먼저 만들어진 소화 효소액을 WSSV 감염 새우 조직 마쇄액( $10^6$  copies/mL)과 1:1로 반응하여 주었으며, 소화율 비교는 23°C의 온도에서 1, 24 그리고 48 시간동안 진행하여 분석하였다. 또한 패류 소화선 조직의 성분에 의해 PCR inhibition 효과를 나타낼 수 있으므로 해당 온도에서 30분간 반응 후 qPCR을 수행하여 확인하였고, 대조구로 WSSV에 감염된 새우 근육 조직 마쇄액과 PBS를 반응시켜 주었다. 해당 시료의 qPCR 결과에 따라 소화율을 분석하고자 하였으며, 소화율은 다음과 같이 계산하였다.

소화 효소에 의한 inhibition rate (%) = [1 - (소화 효소에서의 최초 virus 농도/PBS에서의 최초 virus 농도)]

예상 Virus 농도 = PBS에서 감소한 바이러스의 양 × 소화 효소에 의한 inhibition rate

소화율 (%) = [1 - (소화효소에서의 최종 virus 농도/예상 virus 농도)]

추가적으로 수생 바이러스간의 소화율 분석을 위해 만들어진 소화 효소액을 WSSV 용액 및 RSIV 배양 상등액과 1:1로 반응하고, 23°C의 온도에서 1, 3, 및 7일간 반응하였고, 해당 실험의 경우 3반복으로 실험을 수행하여 비교 분석하였다.

### 통계 분석

WSSV 유전자 안정성에 대해 해수 및 담수 그리고 수온에 대한 영향을 확인하고자 다양한 환경에

서의 반응 시간에 따른 감소율을 측정하였으며, 패류 소화 효소에 의한 수생 바이러스의 영향을 확인하고자 반응 시간과 패류 종에 따른 소화율을 측정하였다. 측정된 값들은 모두 요인에 대한 차이를 이원분산분석으로 통계 처리하여 검정하였으며, 자료 분석은 Graph Pad Prism (La Jolla, CA, USA)의 ANOVA를 이용하여 분석하고 p 값이 0.05 이하인 경우 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

## 결 과

### 해수 및 담수에서의 WSSV 안정성 분석

해수 및 담수에 존재하는 WSSV의 수온별 안정성을 알아보기 위하여 WSSV 혼합액을 제조하였으며, 시간별로 viral genome copy 값 변화를 분석하여 수계 환경에서의 감소율을 확인하였다. WSSV 감염 조직 마쇄액을 해수와 담수에 혼합 후, 실온 30분 반응 후 수온 23°C와 18°C의 해수에서 각각  $5.71$ ,  $6.52 \times 10^5$  WSSV genome copies/mL, 담수에서 수온 23°C와 18°C에 대해 각각  $7.99$ ,  $6.78 \times 10^5$  WSSV genome copies/mL로 산출되었다(Table 2). 이후 바이러스 copy 값의 감소는 해수와 담수 모두 18°C에 비해 23°C에서 상대적으로 빠르게 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 반응 초기인 1일 차에 해수에서 18°C와 23°C의 감소율이 49.5%, 52.5%로 나타나, 담수에서의 감소율(각각 30.8%, 39.7%)과 차이를 확인할 수 있었다. 그러나 반응 7일차에서는 담수와 해수에 상관없이 대부분의

Table 2. Degradation of WSSV genome copy in freshwater and seawater at 18°C or 23°C

Group	Temperature (°C)	Incubation period (Day)			
		0	1	3	7
Seawater	23	$5.71 \times 10^5$	$2.71 \times 10^5$ (52.5)*	$9.97 \times 10^3$ (98.3)	$8.92 \times 10^2$ (99.8)
	18	$6.52 \times 10^5$	$3.29 \times 10^5$ (49.5)	$1.74 \times 10^4$ (97.3)	$2.31 \times 10^3$ (99.6)
Freshwater	23	$7.99 \times 10^5$	$4.82 \times 10^5$ (39.7)	$7.17 \times 10^4$ (91.0)	$6.43 \times 10^3$ (99.2)
	18	$6.78 \times 10^5$	$4.93 \times 10^5$ (30.8)	$1.02 \times 10^5$ (85.0)	$1.52 \times 10^4$ (97.8)

\* Degradation rate (%)

WSSV genome copy 값이  $10^4$  WSSV genome copies/mL 이하로 감소되었다(Table 2). 다만 모든 실험 그룹에서 통계적으로 유의미한 차이는 나타나지 않는 것으로 나타났다.

**패류 소화 효소에서의 바이러스 소화율 분석**

먼저 WSSV에 대해 PBS 그리고 굴, 홍합, 바지락 소화선 마쇄액의 mixture 에서는 실온 30분 반응 결과, 당시 viral genome copy 값이  $1.08 \times 10^6$ ,  $5.74 \times 10^5$ ,  $6.56 \times 10^5$ ,  $8.34 \times 10^5$  WSSV genome copies/mL로 나타났다(Fig. 1). 이에 따라 소화 효소에 의한 WSSV inhibition rate는 굴, 홍합, 바지락이 각각 46.9%, 39.3%, 및 22.8%으로 확인되었으며, 또한 대조구에서의 시간별(1, 24 및 48시간) 대조구의 WSSV copy 값은 각각  $1.12 \times 10^6$ ,  $1.01 \times 10^6$ ,  $9.85 \times 10^5$  WSSV genome copies/mL로 나타났다. 따라서 이를 활용하여 시간에 따른 예상 바이러스 농도를 추정하였고, 실제 측정된 WSSV genome copy 값에 따라 소화율을 측정하였다. 1시간, 24시간, 48시간 별로 각각 굴에서 2.4%, 8.8%, 16.3%, 홍합에서 5.6%, 8.5%, 15.3%, 그리고 바지락에서 8.5%, 10.3%, 20.6%의 비율로 소화되는 것으로 나타났다. WSSV의 소화선 마쇄액과의 반응 시간에 따른 통계적 분석 결과, 패류 품종과 상관없이 반응 24시간 및 48시간에 소화효소에 의해서 WSSV genome copy 값은 감소되는 것으로 확인되었다

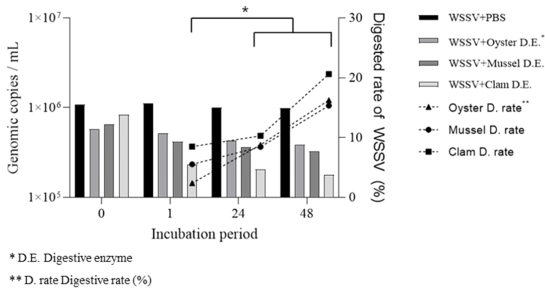


Fig. 1. Digestive rate of WSSV by shellfish digestive enzyme. The natural declined virus titer in PBS mixture due to viral stability is shown in the black bars. The viral titers in each of digestive enzyme group are shown in the grey bars. The digestive rate of WSSV by digestive enzyme of Oyster(▲), Mussel(●), and Clam(■) are shown in broken lines. (\*P<0.05)

(P<0.05).

RSIV와의 비교를 위해 각 바이러스를 패류 소화선 마쇄액과 반응(1, 3, 및 7일)한 실험에서는 1일 간 반응한 RSIV의 경우 굴의 소화 효소에 의해서 13.1%, 홍합의 경우 24.1%, 바지락의 경우 8.3%의 소화율로 나타났다. 반응 후 3일차, 굴의 경우 48.6%, 홍합의 경우 67.3%, 바지락의 경우 55.0% 였으며, 7일 차 굴의 경우 91.5%, 홍합의 경우 97.0%, 바지락의 경우 95.8%의 소화율이 확인되었다(Fig. 2B). 이에 반해 WSSV의 경우 1일차 굴, 홍합, 바지락에서의 소화율은 각각 2.4%, 14.7%, 7.5%로 나타났으며 3일차에는 21.3%, 38.5%, 29.9% 및 7일차에는 85.2%, 92.0%, 96.5%로 나타났다(Fig. 2A). 모든 그룹에서 패류 품종과 바이러스 종류에 따른 통계적으로 유의미한 차이는 나타나지 않았으나, 반응 1일차에 비해 3일차부터 모든 그룹에서 viral genome copy 값의 유의미한 감소가 나타났다(P<0.0001).

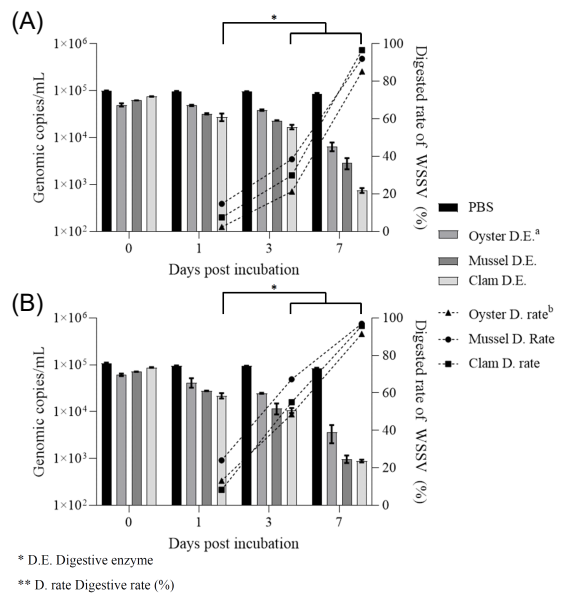


Fig. 2. Digestive rate of (A) WSSV and (B) RSIV by shellfish digestive enzyme. The natural declined virus titer in PBS mixture due to viral stability is shown in the black bars. The viral titers in each of digestive enzyme group are shown in the grey bars. The digestive rate of WSSV by digestive enzyme of Oyster(▲), Mussel(●), and Clam(■) are shown in broken lines. (\*P<0.05)

## 고 찰

본 연구에서는 수계 환경에서의 WSSV 유전자 안정성과 패류 소화효소에서 WSSV 및 RSIV의 유전자 안정성을 조사하였다. 수계 환경 조건인 해수 및 담수에서 1일간의 반응기간 동안 수중의 WSSV genome copy 값이 담수에 비해 해수에서 더 많이 감소되는 것으로 나타났는데(Table 2), 이는 해수 중 존재하는 2가 양이온이 viral capsid에 손상을 일으켜 안정성이 떨어지게 되면 숙주에서의 증식 능력과 더불어 핵산을 보호할 수 없게 되어(Roberto et al., 2009), 담수 환경에 비해 상대적으로 viral genome copy 값이 감소되는 것으로 사료된다. Hawley and Garver (2008)의 연구에서 담수 및 해수 중 VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus)가 99.9% 불활화되는 시점의 비교 시 모든 온도 구간에 상관없이 해수에서 불활화가 더 빠르게 이루어지는 결과를 보였으며, Jeong et al. (2008)에서도 담수 관상어인 펠구라미(*Trichogaster lalius*)에서 분리한 PGIV (Pearl gurami iridovirus)와 해수 양식어인 돌돔(*Oplegnathus fasciatus*)에서 분리한 RSIV (Red seabream iridovirus)에 대해서도 담수에 비해 해수에서 viral genome copy 값이 더 감소하여 본 연구에서의 결과와 비슷하게 나타났다. 이와 더불어 같은 염도 조건에서는 18°C에 비해 23°C에서 감소하는 것으로 나타났는데(Table 1), 수중의 viral genome copy 값에 대해서는 수온 또한 큰 영향을 끼치는 것으로 알려져 있으며(Hawley and Garver, 2008), 25°C에 보관한 WSSV가 50일차에 감염력을 상실하는 것에 비교하여 15°C는 보관 120일까지도 감염력을 유지한 선행연구와 유사한 결과를 보였다(Momoyama et al., 1998). 비록 본 연구에서 사용한 qPCR의 특성에 따라 생물학적 분자만을 검출할 수 있기에 한계가 있으나, 낮은 수온에서의 감염력 유지에 따른 WSSV 전이 가능성을 간접적으로 확인할 수 있었다.

패류의 경우 다른 수생 바이러스의 매개체 역할을 하는 것으로 알려져 있으며(Campos and lees, 2014; Kim et al., 2017), 선행 연구에서 패류 조직내 WSSV 검출 또한 보고된 바 있다(Park et al., 2013; Vazquez-Boucard et al., 2010). 따라서 패류 조직 내

축적된 WSSV의 간접적 전이 가능성을 확인하기 위해 분리된 소화선 조직 마쇄액에 의한 WSSV genome copy 값 변화 및 다른 수생 바이러스인 RSIV와의 비교를 통해 유전자 안정성을 비교 분석하고자 하였다. 패류 종류별 소화선의 마쇄액에 의한 WSSV qPCR inhibition rate는 굴, 홍합, 바지락 각각의 평균이 48.8, 39.7, 및 23.8%로 차이를 확인하였다(Fig. 1). 이후 반응 시간에 따른 WSSV 소화율을 분석한 결과, 48시간 이후 패류 종류별 소화율은 굴 16.3%, 홍합 15.3%, 바지락 20.6% 수준으로 확인되었다. 이러한 결과는 패류의 filter-feeding 과정에서 감염성을 가진 바이러스 입자의 불활화는 단 시간에 이루어지지 않음을 의미한다. 오히려 같은 기간 동안 23°C 해수에서의 감소율에 비해 다양한 패류 소화 효소에 의한 소화율이 낮은 것으로 나타나 소화효소 자체 또는 소화 효소 내에 존재하는 특정 물질에 의해서 바이러스의 안정성이 유지될 수 있음을 시사하며(Table 2, Fig. 1), 이러한 결과는 25°C의 해수에서 보다 소화선에서의 바이러스 감소량이 적게 나타났던 Jin et al. (2014)의 연구 결과와 유사하게 나타났다. 위와 같이 패류 소화 효소에 의한 PCR inhibition rate가 존재할 뿐만 아니라 해수에 비해 안정성이 더 높은 결과는, 패류 내 존재하는 바이러스가 수계 환경에서의 바이러스에 비해 상대적으로 재감염 위험성이 높을 가능성이 있을 것으로 생각된다. 하지만 본 연구에서 수행한 qPCR으로는 조직 내 존재하는 바이러스의 병원성 유지 여부는 판단할 수 없기에, 패류 조직 내 존재하는 바이러스의 정량 수준과 SID50 (shrimp infectious dose 50%)에 대한 상관관계 연구 등을 통해, 패류 조직 내 존재하는 바이러스의 병원성에 대한 구명이 필요할 것으로 사료된다.

비록 통계학적으로 유의미한 차이는 확인되지 않았지만, 다른 수생 바이러스인 RSIV와의 바이러스 감소량에 따른 소화율 비교 시 3일간의 반응기간 동안 WSSV의 소화율은 패류 3종의 평균이 29.9%인 반면 RSIV의 소화율은 57.0%로 RSIV가 WSSV에 비해 동일한 반응 조건에서 약 2배 정도 많이 분해되는 것으로 확인되었다(Fig. 2). 즉, WSSV가 RSIV에 비해 상대적으로 패류 소화 효소 내에서 안정하여 패류가 WSSV의 매개체로 가지는 특

이점을 제공할 수 있음을 시사한다. 또한, 흥미로운 점은 WSSV와 RSIV의 패류 종에 따른 소화효율의 차이는 패류 종과 바이러스 종류에 따른 패류 조직 내 축적된 바이러스의 안정성이 다르게 나타날 수 있음을 의미하며, 향후 패류의 매개체 역할의 작용 기전에 대한 접근을 위해서 이에 관한 연구가 더욱 더 필요할 것으로 사료된다.

결론적으로 WSSV는 수계 환경 및 패류 소화 효소에서 자연적으로 감소하는 것으로 나타났으나 상대적으로 패류 소화 효소에서 더욱 안정한 것으로 나타났으며, 다른 수생 바이러스인 RSIV와의 비교 결과 WSSV가 상대적으로 안정한 것으로 나타났다. 이는 패류 조직 내 WSSV의 간접적 전이 가능성을 확인하고, 이매패류의 매개체로서 WSSV가 갖는 특이점을 확인하는 결과이다.

### Acknowledgment

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (2022R1I1A2064371).

### References

Areekijseer, M., Engkagul, A., Kovitvadh, U., Thongpan, A., Mingmuang, M., Pakkong, P., & Rungruangsak-Torrissen, K. (2004). Temperature and pH characteristics of amylase and proteinase of adult freshwater pearl mussel, *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus* Simpson 1900. *Aquaculture*, 234(1-4), 575-587.

Campos, C. J., & Lees, D. N. (2014). Environmental transmission of human noroviruses in shellfish waters. *Applied and environmental microbiology*, 80(12), 3552-3561.

Chou, H., Huang, C. Y., Wang, C. H., Chiang, H. C., & Lo, C. F. (1995). Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Diseases of aquatic organisms*, 23(3), 165-173.

de Abreu Corrêa, A., Souza, D. S. M., Moresco, V., Kleemann, C. R., Garcia, L. A. T., & Barardi, C. R. M. (2012). Stability of human enteric viruses in seawater samples from mollusc depuration tanks coupled with ultraviolet irradiation. *Journal of applied microbiology*, 113(6), 1554-1563.

Grodzki, M., Schaeffer, J., Piquet, J. C., Le Saux, J. C., Chev e, J., Ollivier, J., Pendu, J. & Le Guyader, F. S. (2014). Bioaccumulation efficiency, tissue distribution, and environmental occurrence of hepatitis E virus in bivalve shellfish from France. *Applied and environmental microbiology*, 80(14), 4269-4276.

Hall, A. J., Eisenbart, V. G., Eting e, A. L., Gould, L. H., Lopman, B. A., & Parashar, U. D. (2012). Epidemiology of foodborne norovirus outbreaks, United States, 2001–2008. *Emerging infectious diseases*, 18(10), 1566.

Hawley, L. M., & Garver, K. A. (2008). Stability of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in freshwater and seawater at various temperatures. *Diseases of aquatic organisms*, 82(3), 171-178.

Jeong, J. B., Jun, L. J., Yoo, M. H., Kim, M. S., Komisar, J. L., & Do Jeong, H. (2003). Characterization of the DNA nucleotide sequences in the genome of red sea bream iridoviruses isolated in Korea. *Aquaculture*, 220(1-4), 119-133.

Jeong, J. B., Cho, H. J., Jun, L. J., Hong, S. H., Chung, J. K., & Do Jeong, H. (2008). Transmission of iridovirus from freshwater ornamental fish (pearl gourami) to marine fish (rock bream). *Diseases of aquatic organisms*, 82(1), 27-36.

Jin, J. W., Kim, K. I., Kim, J. K., Park, N. G., & Do Jeong, H. (2014). Dynamics of megalocytivirus transmission between bivalve molluscs and rock bream *Oplegnathus fasciatus*. *Aquaculture*, 428, 29-34.

Kim, K. I., Kim, Y. C., Kwon, W. J., & Do Jeong, H. (2017). Evaluation of blue mussel *Mytilus edulis* as vector for viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Diseases of Aquatic Organisms*, 126(3), 239-246.

Krog, J. S., Larsen, L. E., & Schultz, A. C. (2014). Enteric porcine viruses in farmed shellfish in Denmark. *International Journal of Food Microbiology*, 186, 105-109.

Martinez-Albores, A., Lopez-Santamarina, A., Rodriguez, J. A., Ibarra, I. S., Mondrag n, A. D. C., Miranda, J. M., Lamas, A., & Cepeda, A. (2020). Complementary methods to improve the depuration of bivalves: A review. *Foods*, 9(2), 129.

Min, (2017), "Risk assessment to shrimp induced by the White spot syndrome virus accumulated in shellfish", Master thesis, Pukyong National University, Korea

Molloy, S. D., Pietrak, M. R., Bouchard, D. A., & Bricknell, I. (2014). The interaction of infectious salmon anaemia virus (ISAV) with the blue mussel, *Mytilus*

- edulis. *Aquaculture research*, 45(3), 509-518
- Momoyama, K., Hiraoka, M., Nakano, H., & Sameshima, M. (1998). Cryopreservation of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) and its survival in sea water at different temperatures. *Fish Pathology*, 33(2), 95-96.
- Mortensen, S. H. (1993). Passage of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) through invertebrates in an aquatic food chain.
- Nakano, H., Koube, H., Umezawa, S., Momoyama, K., Hiraoka, M., Inouye, K., & Oseko, N. (1994). Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: epizootiological survey and infection trials. *Fish Pathology*, 29(2), 135-139.
- Pace, B. T., Hawke, J. P., Subramanian, R., & Green, C. C. (2016). Experimental inoculation of Louisiana red swamp crayfish *Procambarus clarkii* with white spot syndrome virus (WSSV). *Diseases of aquatic organisms*, 120(2), 143-150.
- Park, J. Y., Kim, K. I., Joh, S. J., Kang, J. Y., Kwon, J. H., Lee, H. S., & Kwon, Y. K. (2013). 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, 225-229.
- Paul-Pont, I., Gonzalez, P., Baudrimont, M., Jude, F., Raymond, N., Bourrasseau, L., Goïc, N., Haynes, F., Legeay, A., Paillard, C., & de Montaudouin, X. (2010). Interactive effects of metal contamination and pathogenic organisms on the marine bivalve *Cerastoderma edule*. *Marine Pollution Bulletin*, 60(4), 515-525.
- Pietrak, M. R., Molloy, S. D., Bouchard, D. A., Singer, J. T., & Bricknell, I. (2012). Potential role of *Mytilus edulis* in modulating the infectious pressure of *Vibrio anguillarum* 02β on an integrated multi-trophic aquaculture farm. *Aquaculture*, 326, 36-39.
- Prayitno, S. B., Verdegem, M. C., Verreth, J. A., & Vlaskin, J. M. (2022). White spot syndrome virus host range and impact on transmission. *Reviews in Aquaculture*, 14(4), 1843-1860.
- Polo, D., Feal, X., & Romalde, J. L. (2015). Mathematical model for viral depuration kinetics in shellfish: An useful tool to estimate the risk for the consumers. *Food Microbiology*, 49, 220-225.
- Razafimahefa, R. M., Ludwig-Begall, L. F., & Thiry, E. (2020). Cockles and mussels, alive, alive, oh – the role of bivalve molluscs as transmission vehicles for human norovirus infections. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67, 9-25.
- Reyes, A., Salazar, M., & Granja, C. (2007). Temperature modifies gene expression in subcuticular epithelial cells of white spot syndrome virus-infected *Litopenaeus vannamei*. *Developmental & Comparative Immunology*, 31(1), 23-29.
- Ridler, N., Wowchuk, M., Robinson, B., Barrington, K., Chopin, T., Robinson, S., Page, F., Reid, G., Szeemerda, M., Sewuster, J., & Boyne-Travis, S. (2007). Integrated multi-trophic aquaculture (IMTA): a potential strategic choice for farmers. *Aquaculture Economics & Management*, 11(1), 99-110.
- Rodney, E., Herrera, P., Luxama, J., Boykin, M., Crawford, A., Carroll, M. A., & Catapane, E. J. (2007). Bioaccumulation and tissue distribution of arsenic, cadmium, copper and zinc in *Crassostrea virginica* grown at two different depths in Jamaica Bay, New York. *In vivo*, 29(1), 16.
- Seitz, S. R., Leon, J. S., Schwab, K. J., Lyon, G. M., Dowd, M., McDaniels, M., Abdulhafid, G., Fernandez, M. L., Lindesmith, L. C., Baric, R. S., & Moe, C. L. (2011). Norovirus infectivity in humans and persistence in water. *Applied and environmental microbiology*, 77(19), 6884-6888.
- Stentiford, G. D., Neil, D. M., Peeler, E. J., Shields, J. D., Small, H. J., Flegel, T. W., Vlaskin, J. M., Jones, B., Morado, F., Moss, S., Lotz, J., Bartholomay, L., Behringer, D. C., Jauton, C., & Lightner, D. V. (2012). Disease will limit future food supply from the global crustacean fishery and aquaculture sectors. *Journal of invertebrate pathology*, 110(2), 141-157.
- Toranzo, A.E. & Metrickic, F. M. (1982). Comparative stability of two salmonid viruses and poliovirus in fresh, estuarine and marine waters. *Journal of Fish Diseases*, 5(3), 223-231.
- Vazquez-Boucard, C., Alvarez-Ruiz, P., Escobedo-Fregoso, C., Anguiano-Vega, G., de Jesus Duran-Avelar, M., Pinto, V. S., & Escobedo-Bonilla, C. M. (2010). Detection of white spot syndrome virus (WSSV) in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of invertebrate pathology*, 104(3), 245-247.
- Wang, H. C., Hirono, I., Maningas, M. B. B., Somboonwiwat, K., Stentiford, G., & ICTV Report Consortium. (2019). ICTV virus taxonomy profile: Nimaviridae. *Journal of General Virology*, 100(7), 1053-1054.

---

Manuscript Received : May 09, 2023

Revised : May 25, 2023

Accepted : May 30, 2023