

수입 냉동새우에서 검출된 YHV3와 IHNV의 계통학 및 병원성 분석

백은진 · 정예진 · 정민아 · 박지연 · 김광일[†]

부경대학교 수산생명의학과

Phylogenetic and pathogenic traits of YHV3 and IHNV detected from imported frozen shrimp

Eun Jin Baek, Ye Jin Joeng, Min A Jeong, Ji Yeon Park, Kwang Il Kim[†]

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

Yellow head virus (YHV), Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis (IHNV), Taura syndrome virus (TSV), and Infectious myositis virus (IMNV) cause serious mortality to *Penaeidae* shrimp in the aquaculture. In this study, YHV, IHNV, TSV, and IMNV were surveyed from imported frozen shrimps between 2019 and 2020 via molecular diagnostic assay. Among 10 shrimp groups, YHV ($n=1$) and IHNV ($n=4$) were detected by RT-PCR and PCR, respectively. From the phylogenetic analysis based on the partial ORF 1b region of YHV, YHV was classified into YHV genotype 3 (YHV3). And IHNVs ($n=2$) detected from *Litopenaeus vannamei* belong to infectious IHNV type 2. Although IHNVs ($n=2$) identified from *Penaeus monodon* showed PCR positive results (MG 831F/R primer set), the sequences of ORF 2 and 3 were not amplified, suggesting that those samples might possess type A IHNV related sequence of *P. monodon*. Furthermore, in the challenge test, even though PCR-detected isolates (YHV3/type A IHNV related sequence or infectious IHNV type 2) were not induced mortality to *L. vannamei*, viral genes were amplified suggesting that the viruses in the frozen shrimp could be non-pathogenic particles which are not enough to induce mortality.

Key words: Imported shrimp, Yellow head virus (YHV), Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis (IHNV), Genotype, Pathogenicity

서 론

전 세계 새우 양식 생산량은 총 생산량(2018년 기준 1억 7,850톤) 대비 5.2% 수준(939톤)으로 연간 지속적으로 증가하고 있다(FAO, 2020). 주요 새우 양식 국가로는 중국, 인도, 말레이시아, 태국,

인도네시아, 베트남, 페루 등 대다수 아시아 지역에 분포하고 있으며, 보리새우과(*Penaeidae*)에 속하는 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*; 84.07%)와 홍다리얼룩새우(*Penaeus monodon*; 11.95%)가 대부분 양식 되고 있다(FAO, 2020). 우리나라의 경우 베트남, 에콰도르, 태국 등에서 주로 새우를 수입하고 있으며, 해양수산부 수산물 수출입 통계에 따르면 연간 새우 수입량은 2017년 기준 62,544톤에서 2020년 65,221톤 수준으로 수입량이 증가하고

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

있는 실정이다. 또한, Free trade agreement (FTA) 체 계국 수산물 수입 동향에 따르면 국내로 유통되는 수입 새우의 형태 중 냉동 제품은 71.3%, 조미·가공 품은 26.8%, 건조품은 1.9%를 차지하고 있다(KMI, 2021).

국내에서는 어류를 비롯하여 패류, 해조류 및 갑각류 등 다양한 해양생물의 양식이 이루어지고 있다. 양식 생물은 국내 풍토병 또는 기존에 국내에 발생한 이력이 없는 질병의 유입으로 인해 대량 폐사가 일어날 수 있으며(조 등, 2019), 이는 양식 산업에 큰 경제적 피해를 일으킬 수 있다. 새우를 비롯한 갑각류는 국가 간 교역으로 인한 외래 병원체의 전파 및 피해 사례가 빈번하게 나타나고 있는데(Flegel., 1997; Lotz., 1997; Manimozhi, E., 2021; Park *et al.*, 2020), 우리나라는 여러 국가로부터 다양한 형태의 새우를 수입하기 때문에 외래 병원체의 유입 가능성이 높으며, 국외에서 유입된 병원체가 국내의 풍토병과 함께 질병을 야기할 잠재적 가능성이 존재한다. 따라서 국내에서는 수산생물 질병관리법에 의거하여 검역 대상 전염병을 지정하고 있으며, 현재 갑각류 질병은 총 10종으로 가재전염병(crayfish plague, CP), 전염성괴피및조혈기괴사증(infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, IHHN), 노란머리병(yellow head disease, YHD), 흰반점병(white spot disease, WSD), 타우라 증후군(taura syndrome, TS), 전염성근괴사증(infectious myonecrosis, IMN), 흰꼬리병(white tail disease, WTD), 십각류무지개바이러스병(infection with decapod iridescent virus 1), 괴사성간췌장염(necrotizing hepatopancreatitis, NHP) 및 급성간췌장괴사병(acute hepatopancreatic necrosis virus, AHPND)이 해당된다. 국내 양식 새우류에서 1993년 이후 흰반점병(Kim *et al.*, 1997)이 발생하였으며, 2004년에 타우라증후군(Do *et al.*, 2006), 2010년에 전염성괴피 및조혈기괴사증(Kim *et al.*, 2011), 2015년에 전염성근괴사증(권 등, 2019) 및 2016년에 급성간췌장 괴사증(Hwang *et al.*, 2020)이 발생한 사례가 있다. 현재 우리나라에서는 활 새우를 비롯한 열처리 및 절단 등의 가공되지 않은 상태로 수입되는 냉동·냉장 새우에 대한 검역이 이루어지고 있으나 국내에서 발생되지 않은 전염병의 국내 유입 및 정착 가

능성은 존재하고 있어 국내외 발생 이력이 있는 질병에 대한 감시는 필수적이다.

본 연구에서는 2019년도부터 2020년도까지 국내로 수입되어 들어오는 냉동 흰다리새우 및 홍다리얼룩새우를 대상으로 yellow head virus (YHV), infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV), taura syndrome virus (TSV), infectious myonecrosis virus (IMNV)의 유전자 검출 여부를 조사하였으며 검출된 바이러스에 대해 계통학적 분석을 통해 유전학적 근연 관계를 알아보고 흰 다리새우를 대상으로 인위 감염을 통해 병원성을 확인하였다.

재료 및 방법

시료

본 연구에 사용된 새우는 주요 새우 양식 국가(5개 국가; 말레이시아, 베트남, 에콰도르, 페루, 중국)에서 2019년부터 2020년도까지 국내로 수입 및 유통되고 있는 냉동 새우(흰다리새우 및 홍다리얼룩새우)를 마트 및 인터넷 쇼핑몰을 통해 구입하였다(Table 1). 구입된 새우는 생산 시기 및 국가별로 구분하였고(10 그룹), 각 그룹 내 시료(25-30마리)에서 gill, hepatopancreas, abdominal muscle, pleopod 조직을 적출하여 5마리씩 pooling 하였으며(pooling 시료 총 59개), 분석 전 까지 -80°C에 보관하였다.

DNA 및 RNA 추출

각 pooling 조직 50mg에 lysis buffer 400 μ L와 proteinase K 20 μ L (20mg/mL; GeNet Bio, Korea)를 첨가하여 55°C에서 overnight 반응 후, Patho Gene-spin™ DNA/RNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology, Korea)를 이용하여 제조사의 protocol에 따라 total DNA와 RNA를 분리하였다. RNA 바이러스 분석을 위해 UltraScript 2.0 cDNA Synthesis Kit (PCR Biosystems, UK)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 분리한 DNA와 cDNA는 실험 전까지 -80°C에 보관하였다.

PCR 및 염기서열 분석

세계동물보건기구(OIE) 수산동물 진단 매뉴얼

Table 1. PCR primers used in this study

Disease	Primer	Sequence (5'-3')	Condition	Amplicon size	Reference
YHD	10F	CCG CTA ATT TCA AAA ACT ACG	50°C 30min, 94°C 2min	135	Mohr <i>et al.</i> (2015)
	144R	AAG GTG TTA TGT CGA GGA AGT	(94°C 30s, 58°C 45s, 68°C 45s) x40 68°C 7 min		
	GY1	GAC ATC ACT CCA GAC AAC ATC TG	50°C 30min, 94°C 2min	794	
	GY4	GTG AAG TCC ATG TGT GTG AGA CG	(95°C 30s, 66°C 30s, 68°C 45s) x35 68°C 7 min		
	GY2	CAT CTG TCC AGA AGG CGT CTA TGA	95°C 15 min	406	
	G6	GTA GTA GAG ACG AGT GAC ACC TAT	(95°C 30s, 66°C 30s, 72°C 45s) x35 72°C 7 min		
	GY2	CAT CTG TCC AGA AGG CGT CTA TGA	95°C 15 min	277	
	Y3	ACG CTC TGT GAC AAG CAT GAA GTT	(95°C 30s, 66°C 30s, 72°C 45s) x35 72°C 7 min		
	YC-F1a	ATC GTC GTC AGC TAC CGC AAT ACT GC	50°C 55min, 94°C 2min	359	
	YC-F1b	ATC GTC GTC AGY TAY CGT AAC ACC GC	(94°C 45s, 60°C 45s, 68°C 45s) x35		
YC-R1a	TCT TCR CGT GTG AAC ACY TTC TTR GC	68°C 7 min			
YC-R1b	TCT GCG TGG GTG AAC ACC TTC TTG GC				
YC-F2a	CGC TTC CAA TGT ATC TGY ATG CAC CA	95°C 15min	147		
YC-F2b	CGC TTY CAR TGT ATC TGC ATG CAC CA	(94°C 30s, 66°C 30s, 72°C 45s) x35			
YC-R2a	RTC DGT GTA CAT GTT TGA GAG TTT GTT	72°C 7 min			
YC-R2b	GTC AGT GTA CAT ATT GGA GAG TTT RTT				
YH30-F1m	TAC CAY TCA AAC ATC ATY AAY AAY CAY CA	50°C 30min, 94°C 2min	1001	Modified from Wijegoonawardane <i>et al.</i> (2008)	
YH30-R1m	GAG ATG ATY TGR TKC TTR AAY TTC TGR AA	(94°C 45s, 55°C 45s, 68°C 60s) x35 68°C 7 min			
YH31-F2m	CTC ARA TCC ATG CMA TYT GGG ART CHT C	94°C 15min	721		
YH31-R2m	AGT TTG GCR CGR ATR TTR GTR AGR AT	(94°C 45s, 55°C 45s, 72°C 60s) x35 72°C 7 min			
TS	9992 F	AAG TAG ACA GCC GCG CTT	94°C 5 min	231	Nunan <i>et al.</i> (1998)
	9195 R	TCA ATG AGA GCT TGG TCC	(94°C 45s, 60°C 45s, 72°C 45s) x40 60°C 7 min		

Table 1. Continued

Disease	Primer	Sequence (5'-3')	Condition	Amplicon size	Reference
	7171 F	CGA CAG TTG GAC ATC TAG TG	60°C 30min, 95°C 2min	341	Navarro <i>et al.</i> (2009)
	7511 R	GAG CTT CAG ACT GCA AGT TC	(95°C 45s, 62°C 45s), x39 62°C 7min		
IMN	4587F	CGA CGC TGC TAA CCA TAC AA	95°C 2 min	328	Poulos and Lightner (2006)
	4914R	ACT CGG CTG TTC GAT CAA GT	(95°C 45s, 60°C 45s, 72°C 45s) x39 72°C 7 min		
	4725NF	GGC ACA TGC TCA GAG ACA	95°C 2 min	139	
	4863NR	AGC GCT GAG TCC AGT CTT G	(95°C 30s, 65° 30s, 72°C 30s) x39 72°C 2 min		
IHHN	389F	CGG AAC ACA ACC CGA CTT TA	95°C 5 min	389	Tang <i>et al.</i> (2007)
	389R	GGC CAA GAC CAA AAT ACG AA	(95°C 30s, 55°C 30s, 72°C 60s) x35 72°C 7 min		
	77012F	ATC GGT GCA CTA CTC GGA	95°C 5 min	356	Nunan <i>et al.</i> (2000)
	77353R	TCC TAC TGG CTG TTC ATC	(95°C 30s, 55°C 30s, 72°C 60s) x35 72°C 7 min		
	392F	GGG CGA ACC AGA ATC ACT TA	95°C 5 min	392	Tang <i>et al.</i> (2007)
	392R	ATC CGG AGG AAT CTG ATG TG	(95°C 30s, 55°C 30s, 72°C 60s) x35 72°C 7 min		
	309F	TCC AAC ACT TAG TCA AAA CCA A	95°C 5 min	309	
	309R	TGT CTG CTA CGA TGA TTA TCC A	(95°C 30s, 55°C 30s, 72°C 60s) x35 72°C 7 min		
	MG831F	TTG GGG ATG CAG CAA TAT CT	95°C 5 min	831	
	MG831R	GTC CAT CCA CTG ATC GGA CT	(95°C 30s, 55°C 30s, 72°C 60s) x35 72°C 7 min		
IHNV760F	IHNV760F	ATG TCA ACG GAC AGT GTC TAC	95°C 5 min	1500	Rai, Praveen, <i>et al.</i> (2009)
	IHNV309R	TGT CTG CTA CGA TGA TTA TCC A	(95°C 30s, 55°C 60s, 72°C 60s) x35 72°C 7 min		
CP1F	CP1F	GAT CAC CAG CAC GAC TTC CT	95°C 2 min	1048	Robles-Sikisaka <i>et al.</i> (2010)
	CP2R	CGG GTA TAT ATT GCA CAT CGA A	(94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 60s) x35 72°C 7 min		

에서 권고하는 PCR primers를 사용하여 YHV, TSV, IMNV는 cDNA를 주형으로, IHNV는 DNA를 주형으로 하여 PCR을 수행하였다(Table 2). PCR은 2X Exprime Taq Premix (GenetBio, Korea) 10 μ L, forward primer와 reverse primer를 각각 1 μ M, DEPC treated water 7 μ L, template 1 μ L를 혼합하여 수행하였다. PCR 증폭 산물은 1.5% agarose gel 상에서 전기영동하였으며, 양성 amplicon의 경우 yesCTM Gel purification mini kit (GenesGen, Korea)를 이용하여 정제 후 ABI 9790 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 염기서열 분석 및 NCBI BLAST search를 통해 최종 양성으로 판정하였다.

계통학적 분석

PCR 분석에서 양성으로 확인된 시료를 대상으로 유전학적 근연 관계를 확인하기 위해 YHV의 경우 ORF 1b region, IHNV의 경우 ORF 2와 3 region을 대상으로 Table S1의 PCR primer set를 이용하여 해당 유전자를 증폭 후 염기서열을 분석하였다. YHV와 IHNV에 대한 phylogenetic tree 제작을 위해서 NCBI Genbank에 등록된 여러 국가에서 보고된 strain들의 유전자 염기 서열을 수집하였다. YHV의 경우 ORF 1b region의 32개 strain, IHNV의 경우 ORF 2, ORF 3 20개의 strain과 함께 BioEdit (ver. 7.2.5)를 이용하여 Clustal W Multiple alignment 방법으로 염기서열들을 정렬하였다. 이 후 MEGA (ver. 11.0.10) program을 이용하여 maximum likelihood method로 계통수를 작성하였으며, 계통수의 branch는 1,000 bootstrap resampling을 통해 결정되었다.

흰다리새우 인위 감염 실험

상기 4종 바이러스 PCR 시 amplicon을 생성한 시료 3개 [20-MY-04 (YHV3/type A IHNV related sequence)과 20-EC-1, 20-PE-1 (IHNV, Type 2)의 아가미 조직을 이용하여 흰다리새우에 인위 감염을 통해 병원성을 분석하였다. 새우는 경남 거제에서 바이오플라크로 양식 중인 흰다리새우(7.88 \pm 1.32 g)를 구입하여 25°C에서 14일간 순치 후 실험에 사용하였으며, 실험 전 Table 2에 언급된 primer를 이용한 PCR검사를 통해 YHV와 IHNV에 감염되

Table 2 The results of monitoring from imported frozen shrimp between 2019 and 2020

No.	Species	Origin	Sampling date	Pooling group No. ^a	Weight (g)	YHV		IHNV			IMNV	TSV
						1st	2nd	392F/R	309F/R	MG831F/R		
19-MY-1	<i>L. vanamei</i>	Malaysia	Aug, 2019	5	14.00 \pm 2.46	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
20-CH-1	<i>L. vanamei</i>	China	Oct, 2020	6	1.16 \pm 0.3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
20-EC-1	<i>L. vanamei</i>	Ecuador	May, 2020	6	20.98 \pm 1.33	N.D.	N.D.	6/6	6/6	N.D.	N.D.	N.D.
20-MY-1	<i>L. vanamei</i>	Malaysia	Apr, 2020	6	17.36 \pm 1.94	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
20-MY-2	<i>L. vanamei</i>	Malaysia	Aug, 2020	6	13.52 \pm 2.41	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
20-MY-3	<i>P. monodon</i>	Malaysia	Nov, 2020	7	8.20 \pm 4.54	N.D.	N.D.	7/7	N.D.	7/7	N.D.	N.D.
20-MY-4	<i>P. monodon</i>	Malaysia	Dec, 2020	6	20.35 \pm 3.39	1/6	5/6	4/6	N.D.	6/6	N.D.	N.D.
20-PE-1	<i>L. vanamei</i>	Peru	Jun, 2020	6	21.94 \pm 5.1	N.D.	N.D.	6/6	6/6	N.D.	N.D.	N.D.
20-VN-1	<i>L. vanamei</i>	Vietnam	Oct, 2020	5	15.57 \pm 3.48	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
20-VN-2	<i>L. vanamei</i>	Vietnam	Jul, 2019	6	12.27 \pm 3.18	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

^aFive to seven individual shrimps were pooled

지 않았음을 확인하였다. 인위 감염을 위한 접종액의 경우 양성 조직(50 mg)을 마쇄한 후 1% antibiotic-antimycotic solution (GenDEPOT, USA)가 첨가된 PBS (Gibco, USA)로 10배 희석 후 8000 × rpm, 4°C, 10분 원심분리를 하였다. 이후 상등액을 0.45 µm syringe filter로 여과하여 각 실험구($n=10$)에 100 µL씩 근육주사 하였으며 대조구는 PBS를 100 µL 접종하였다. 인위 감염 후 25°C에서 2주동안 폐사를 관찰하였으며, 실험 종료 후 아가미조직을 적출하여 핵산 추출 후, PCR amplification을 통해 바이러스 감염을 확인하였다.

결 과

수입 냉동새우에서의 바이러스 검출

2019년부터 2020년에 생산되어 국내로 수입 및 유통된 흰다리새우 및 홍다리얼룩새우를 생산 시기 및 국가별로 구분하여(10개 그룹, 총 pooling 시료 59개), 4가지 바이러스 (YHV, IHNV, IMNV, TSV)를 target으로 한 PCR을 수행하였다. 첫번째로, OIE YHV protocol 1,2를 수행한 결과 모든 그룹에서 검출되지 않았으나, OIE YHV protocol 3에 따른 nested PCR 결과, 10개 그룹 중 1개 그룹(20-MY-04)에서 YHV가 검출되었다(Table 1). 두번째로, IHNV의 OIE 수산 동물 진단 매뉴얼에 따라 총 5개 primer set에 대해 PCR을 진행하였다. 389F/R 와 392F/R primer set에 대한 PCR 결과 10개 그룹 중 4개 그룹(20-EC-1, 20-MY-3, 20-MY-4, 20-PE-1), 77012F/77353R 와 309F/R primer set에 대한 PCR 결과 10개 그룹 중 2개의 그룹(20-EC-1, 20-PE-1)에서 검출되었다. 또한, MG831F/R primer에 대한 PCR 결과 10개 그룹 중 2개의 그룹(20-MY-3, 20-MY-4)에서 PCR amplicon이 확인되었다. 본 연구에서 조사한 시료에서는 TSV와 IMNV가 검출되지 않았다(Table 1).

YHV genotyping

YHV 양성으로 확인된 1개의 그룹(20-MY-4)에 대하여 ORF 1b partial gene sequence (662 bp)을 분석하였다. 20-MY-4는 베트남에서 2001년도에 보고된 YHV3 isolate VNM-01-H41 (GenBank Accession

No. EU785040)과 97.58%로 가장 높은 상동성을 보였으며, YHV ORF 1b region의 염기 서열을 바탕으로 계통 분석 결과 YHV genotype 3 (YHV3)으로 확인되었다(Fig. 1).

IHNV genotyping

IHNV에 대한 PCR 수행 결과 양성으로 확인된 4개 그룹(20-EC-1, 20-MY-3, 20-MY-4, 20-PE-1)을 대상으로 ORF 2와 3 부위에 대한 염기서열 및 참조 서열과의 상동성을 분석하였다. 흰다리새우에서 검출된 20-EC-1과 20-PE-1 isolate의 ORF 2 서열(1,092 bp)은 모두 Ecuador에서 2003년도에 보고된 Ecuador strain (GenBank Accession No. AY362548)과 가장 높은 상동성을 보였고(99.72%, 99%), ORF 3 서열(990 bp)도 ORF 2 서열에서와 동일하게 Ecuador strain (GenBank Accession No. AY362548)과 가장 높은 상동성을 보였다(99.29 %, 99.17 %). 또한, 20-EC-1과 20-PE-1 isolate에 대한 계통학적 분석 시 infectious IHNV type 2로 분류되었다(Fig. 2 and 3). 홍다리얼룩새우에서 검출된 2개의 시료(20-MY-3, 20-MY-4)의 경우 ORF 2와 3 부위에 대한 PCR amplicon을 생성하지 않았지만 MG831F/R primer를 이용한 PCR 결과 amplicon을 형성하여 type A IHNV related sequence로 추정하였다.

병원성 분석

PCR 양성 조직 시료를 마쇄하여 흰다리새우에 인위 감염 후 생존율을 분석한 결과 20-MY-4 isolate (YHV3/type A IHNV related sequence)를 접종한 실험구에서 폐사가 발생하지 않았으며, OIE YHV protocol 3에 따른 nested PCR 결과 100% 검출(10/10)되었으며, type A IHNV related sequence은 검출되지 않았다. 또한 20-EC-1 (IHNV, type 2)를 접종한 실험구에서는 폐사가 일어나지 않았고, PCR 결과 100%가 검출(10/10)되었다. 20-PE-1 (IHNV, type 2)를 접종한 그룹은 접종 2일차에 1마리의 폐사가 있었으나 PCR 결과 amplicon을 형성하지 않았고, 나머지 생존그룹에서 100% 검출(9/9)을 확인하였다. 따라서 냉동새우에서 검출된 YHV3/type A IHNV related sequence (20-MY-4)과 IHNV (20-EC-1, 20-PE-1)는 흰다리새우에 폐사는 유발하

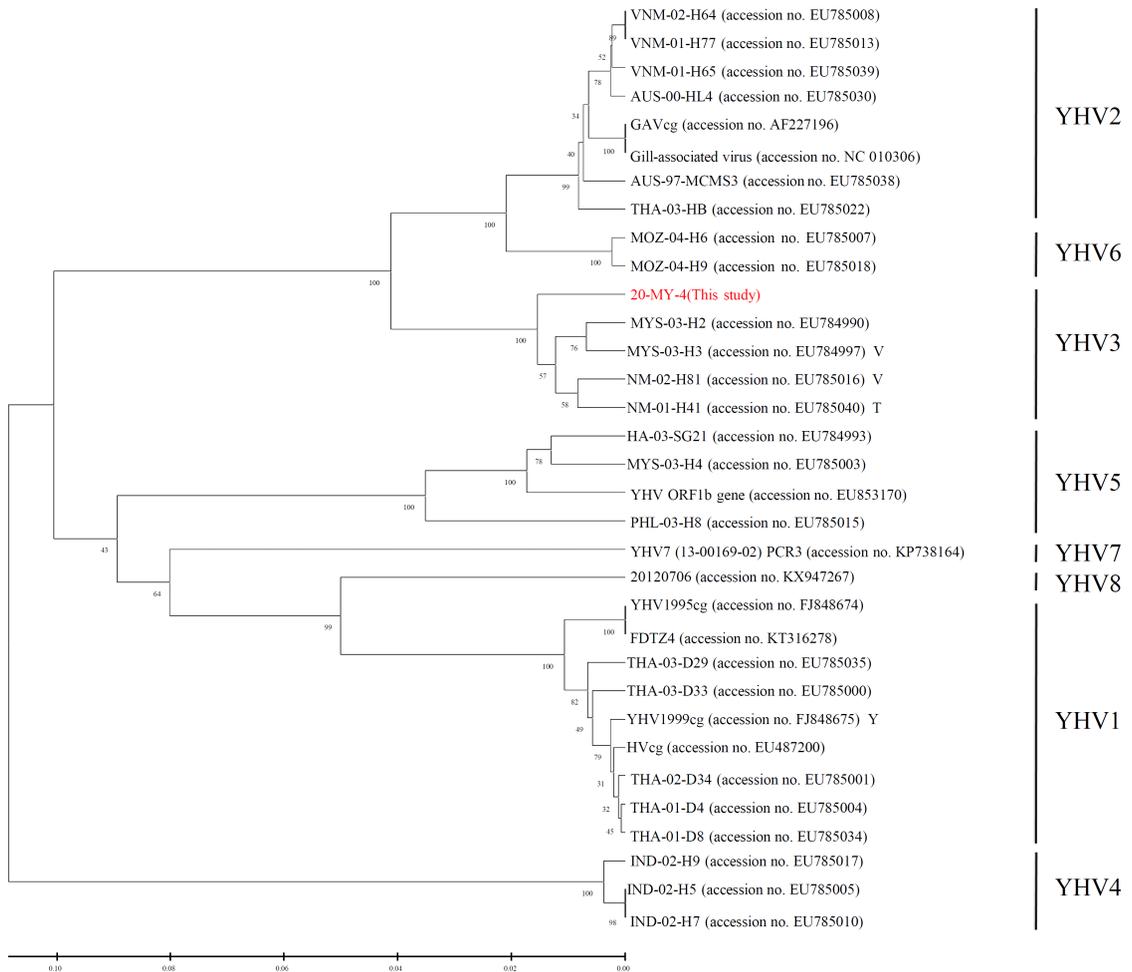


Fig. 1. Phylogenetic tree of YHV genotype 1 to 8 based on nucleotide sequence of the partial YHV ORF 1b region retrieved from GeneBank. The distinct genotype of YHV determined by Maximum likelihood analysis using Mega (ver 11.0.10) software. The numbers indicate the percentages of bootstrap support from 1000 replicates.

지 않으나 생체 내에서 복제는 되는 것으로 확인되었다.

고 찰

새우의 바이러스성 질병 중 흰반점병은 1990년대 국내로 유입 및 정착되어 현재까지 상존 전염병으로 지속적으로 발생되고 있으며, 이후 다양한 질병의 원인체들이 국내로 유입 및 노출되어 감염성 질병을 유발하여 새우 양식 산업에 막대한 경제적 손실을 초래하고 있다. 따라서, 본 연구에서는 국

내로 수입되어 유통되는 냉동 새우를 대상으로 현재 국내에서 지속적인 대량 폐사를 유발하지 않으나 수입과정에서 유입될 가능성이 있는 4종 전염병(YHD, IHNV, TS, IMN)을 유발하는 원인체의 유전자 조사 및 검출된 바이러스의 계통학적 분석을 실시하였으며, 흰다리새우 인위 감염을 통한 병원성을 알아보고자 하였다.

Yellow head virus(YHV)은 1990년 태국 중부에서 양식된 흰다리얼룩새우(*P. monodon*)에서 처음 보고되었으며(Limsuwan, 1991), 이후 인도, 인도네시아, 말레이시아, 필리핀, 스리랑카, 베트남 및 대

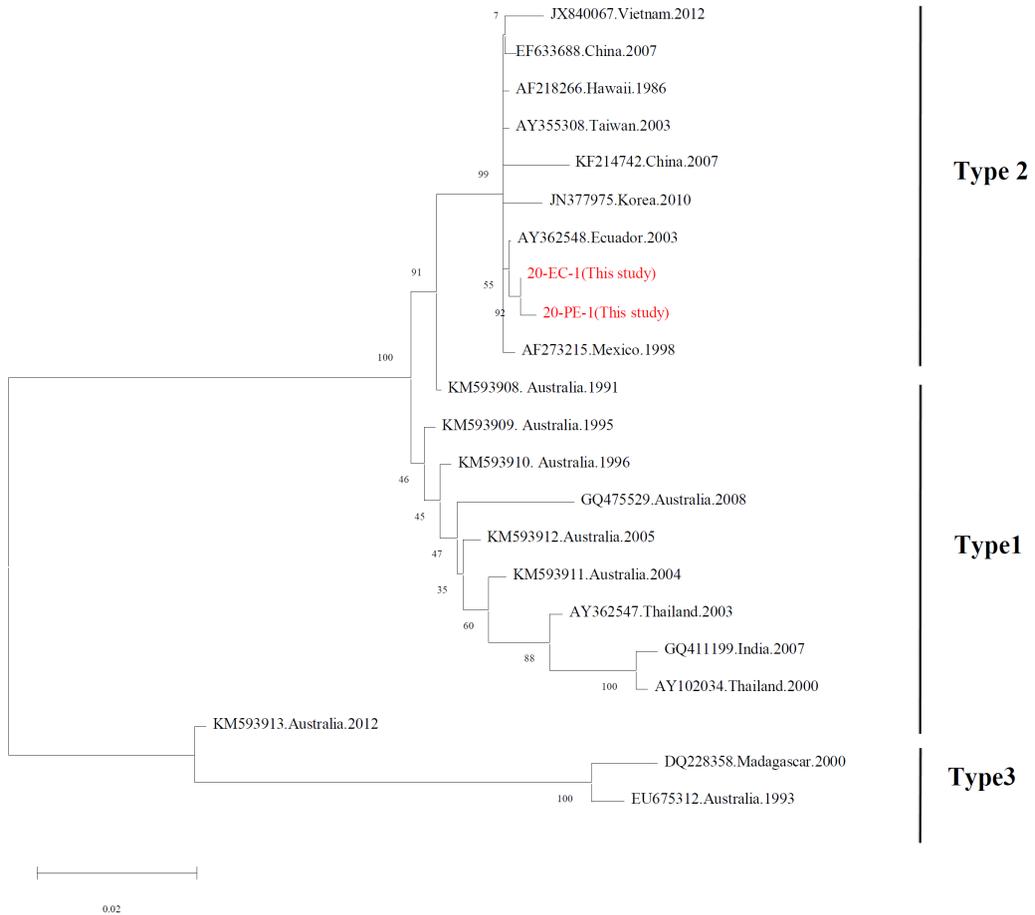


Fig. 2. Phylogenetic tree based on nucleotide sequence of the IHHNV ORF 2 retrieved from GeneBank. The distinct geographical isolates of IHHNV determined by Maximum likelihood analysis using MEGA (ver 11.0.10) software. The numbers indicate the percentages of bootstrap support from 1000 replicates.

만을 포함한 아시아의 주요 새우 양식 국가에서 보고되었다(Mohan *et al.*, 1998; Wang & Chang, 2000; WB, FAO, 2001; Natividad *et al.*, 2002). YHV의 ORF 1은 2개의 다른 ORF (ORF 1a, ORF 1b)를 암호화하는 long polyprotein이며, 그 중 ORF 1b region은 YHV의 significant sequence homology를 나타내어 총 8가지의 유전형으로 분류할 수 있으며 이를 통틀어 yellow head complex라고 한다(Kim *et al.*, 2020). YHV genotype 1 (YHV1)은 전형적인 YHD를 유발하며, YHV2는 gill-associated virus (GAV)로 YHV1보다 병원성이 높지는 않지만 홍다리얼룩새우에 감염을 일으켜 80%까지의 폐사를 일으킬 수 있다(Spann *et al.*, 2000). 한편, YHV genotype

3-8은 임상증상이 없는 건강한 새우에서 분리되었거나 폐사와의 직접적인 상관관계가 밝혀지지 않은 유전형으로 알려진 바 있다(OIE, 2019; Yang *et al.*, 2016; Mohr *et al.*, 2015). 본 연구에서 수입 냉동 새우를 대상으로 조사한 결과 nested PCR에서 1개의 시료(20-MY4)가 양성으로 확인되었고 계통학적 분석 시 YHV genotype 3 (YHV3)로 분류되었다(Fig. 1). YHV3은 Indonesia, Malaysia, Thailand, Vietnam, Mozambique, Chinese Taipei에서 건강한 새우의 post-larva 또는 broodstock 단계에 나타나는 것으로 알려져 있으며(Soowannayan *et al.*, 2003), 중국의 홍다리얼룩새우 양식장에서도 검출된 바가 있다(Chen *et al.*, 2018). 본 연구에서 확인된 YHV3

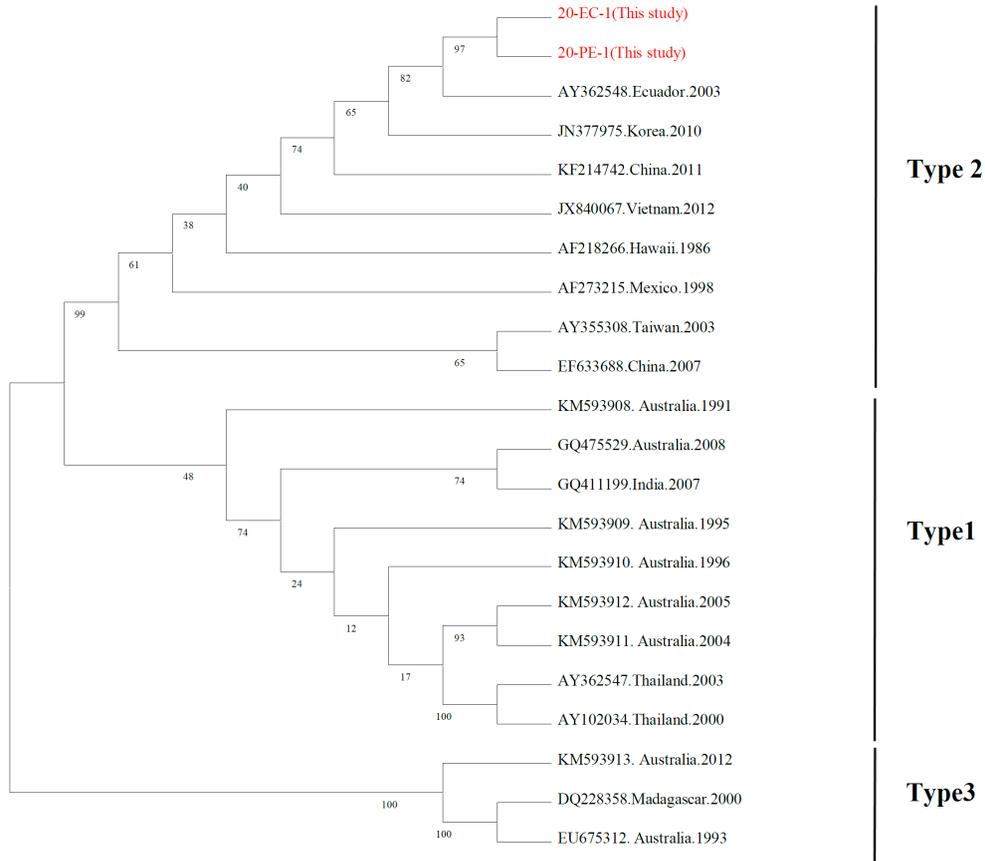


Fig. 3. Phylogenetic tree based on nucleotide sequence of the IHNV ORF 3 retrieved from GeneBank. The distinct geographical isolates of IHNV determined by Maximum likelihood analysis using MEGA (ver 11.0.10) software. The numbers indicate the percentages of bootstrap support from 1000 replicates.

은 2020년 12월에 Malaysia로부터 수입되어 국내로 유통된 홍다리얼룩새우에서 분리된 것으로 국내에서는 아직까지 보고된 바가 없다. OIE (2019)에서는 다양한 YHV 유전형 중 YHV1만을 전염병(OIE listed-disease)으로 지정하고 있다. 최근 국내 자연산 및 양식 새우에서 YHV8가 검출되어 보고된 바가 있으며(Kim *et al.*, 2020), YHV3이 국내로 수입되는 냉동 새우에서도 검출되어 국내에는 다양한 YHV 유전형이 존재할 가능성이 있다. 따라서, 본 연구에서 검출된 YHV3와 다른 유전형 또는 다른 새우 감염성 바이러스와의 co-infection에 대한 영향에 관한 연구도 필요할 것으로 사료된다.

IHNV(Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus)는 1981년 하와이의 청새우(*Litopenaeus stylirostris*) 양식장에서 최초 보고되었으며,

이후 미국 전역 새우 양식장의 청새우와 흰다리새우종에 널리 분포하는 것으로 밝혀졌다(Morales-Covarrubias *et al.*, 1999; Lightner, 2003; Motte *et al.*, 2003). 청새우에서 최초 발생 시 90%까지의 대량 폐사를 일으켰던 것과는 달리 흰다리새우에서 검출된 IHNV는 전형적인 IHNV 임상 증상 또는 폐사를 유발하지 않았다(Bell & Lightner, 1984). 이는 흰다리새우와 홍다리얼룩새우가 IHNV 내성을 획득함으로써 인해 더 이상의 폐사를 유발하지 않았거나(Morales-Covarrubias *et al.*, 1999; Tang & Lightner, 2002), runt deformity syndrome (RDS)라고 하는 큐티클의 변형과 성장을 억제시키는 증상을 초래할 수 있다(Bell & Lightner, 1984; Kalagayan *et*

al., 1991; Primavera & Qunitio, 2000). 2019년도부터 2020년도까지 국내로 수입 및 유통된 냉동 새우에 대해 다양한 PCR primer set를 이용하여 IHNV를 조사한 결과 389 F/R와 392F/R primer set를 이용한 PCR에서 4개 시료, 77012F/77353R 와 309F/R primer set에서는 2개 시료, 홍다리얼룩새우의 Type A IHNV related sequence을 검출하는 MG831F/MG831R primer set에서는 2개 시료(20-MY-3, 20-MY-4)에서 PCR amplicon이 확인되었다(Table 1). 각 PCR primer set 별로 검출 결과가 상이한 이유는 IHNV genomic variant 및 일부 primer의 경우 shrimp genome DNA와 single nucleotide polymorphism (SNP)이 존재하기 때문이다 (Tang *et al.*, 2007). 389 F/R primer의 경우 non-structure protein (ORF 1)을 서열을 기반으로 설계되었으며 (OIE, 2018) primer binding region이 홍다리얼룩새우의 type A IHNV related sequence을 포함하고 있으며, IHNV 392F/R primer set의 경우 IHNV Hawaiian isolate (GeneBank accession No. AF218266)를 기반으로 하여 제작된 primer set로 (Tang *et al.*, 2000), primer 서열 내 부분적인 SNP가 존재하여 IHNV related sequence도 검출할 수 있다. 즉, 389 F/R과 392 F/R primer를 이용하였을 때 infectious IHNV genome을 비롯하여 홍다리얼룩새우의 IHNV related sequence도 함께 검출될 수 있어 infectious IHNV만 구별하는 것에는 한계가 있다(Tang *et al.*, 2000 and 2007). 또한, MG831F/R primer의 경우 IHNV related sequence로 알려진 홍다리얼룩새우의 genome과 반응을 하는 것으로 알려져 있다 (Tang and Lighther, 2006; Tang *et al.*, 2007). 309 F/R primer set의 경우 infectious IHNV 유전자를 검출할 수 있는 것으로 알려져 있으나 (Tang *et al.*, 2007), PCR 기법 만으로는 IHNV에 대한 정확한 양성 판정이 어려워 병리조직 분석 등이 필요한 것으로 OIE에서는 권고하고 있다(OIE, 2018). 본 연구에서 389 F/R 및 392 F/R PCR primer set로 분석 시 양성으로 확인된 4개의 시료에 대한 ORF 2 및 3 서열 기반의 계통학적 분석 결과에서도 각 특이적 PCR primer set의 PCR 결과와 유사한 경향이 확인되었다. 309 F/R primer를 이용한 PCR에서도 양성으로 확인된 흰다리새우 2개 시료(20-EC-1,

20-PE-1)의 ORF 2 및 3 유전자 서열 모두 미국, 대만, 중국, 에콰도르 및 과거 국내에서 검출된 유전형과 유사한 infectious IHNV type 2로 분류되었다. 또한, MG831 F/R primer set를 이용한 PCR에서 양성으로 확인된 홍다리얼룩새우 시료 2개 (20-MY-03, 20-MY-04)의 경우 ORF 2와 3 유전자 증폭은 되지 않았으나 이들 시료는 309F/R primer set에서는 검출되지 않은 점을 미루어 볼 때 홍다리얼룩새우의 genome 중 type A IHNV related sequence로 사료된다. 국내에서는 수산생물질병관리법 시행규칙 제28조에 의거하여 OIE에서 지정한 수산생물전염병 중 국내와 수출국에서 동일하게 발생한 수산생물전염병의 대상이 되는 지정검역물에 대해 검역증명서를 첨부 면제 할 수 있도록 규정하고 있다. 현재 IHNV는 검역증명서 첨부 면제 질병으로 국내에서는 수입 새우에 대한 IHNV 검역이 이루어지지 않고 있다. 국내 양식 새우의 대부분은 IHNV의 감수성 품종인 흰다리새우로 IHNV에 감염 시 생산성 저하로 이어질 수 있다. 국내로 수입되고 있는 새우류 중 홍다리얼룩새우의 경우 IHNV에 대한 감염은 쉽게 이루어지나 증상이 없는 carrier로서의 역할을 할 수 있으며, IHNV이 수입 과정에 국내로 유입 및 정착 시 감염에 의한 피해가 생겨날 잠재적 가능성은 충분하다. 따라서 수입 새우 제품의 용도 및 형태별로 IHNV의 전파에 대한 위험성 평가를 통해 검역 대상 질병으로 재검토할 필요성이 있다.

YHV와 IHNV에 대한 PCR 양성 시료 3개 [20-MY-04 (YHV3/type A IHNV related sequence)과 20-EC-1, 20-PE-1 (infectious IHNV, Type 2)] 조직을 흰다리새우 인위 감염 시 폐사가 발생되지 않았으나 각 실험구에서 YHV3 및 IHNV에 대한 PCR amplicon은 확인되어 무증상 감염(sub-clinical infection)이 나타난 것으로 사료된다. 이를 통해 20-MY-04 시료의 YHV3의 경우 기준에 알려진 바와 같이 감염되더라도 병원성이 없는 것으로 추정되며, 20-MY-04 시료의 type A IHNV related sequence은 홍다리얼룩새우 genome 일부로 이를 흰다리새우에 접종하더라도 replication이 될 수 없어 IHNV가 검출되지 않으며, 이는 Tang *et al.* (2006)의 결과와도 일치함을 보여주었다. IHNV 양성

시료(20-EC-1과 20-PE-1)의 유전형 분류 시 infectious type였음에도 불구하고 폐사를 유발하지 않았으며, 이는 본 연구에서 검출된 IHHNV가 수입 및 유통 과정 중 다양한 요인으로 인한 병원성 저하 또는 non-pathogenic particle 형태로 된 것으로 추정된다. 현재까지도 새우의 냉동 및 운송과정에서 바이러스의 병원성 감소에 대한 경로를 특정하는 데는 한계가 있기 때문에 냉동 상태의 식품 및 살아있는 수산생물의 국가간 교역에 따른 바이러스 확산에 실험적 평가 및 역학적 측면에서 모델링 연구가 필요할 것으로 사료된다.

IMNV와 TSV에 대한 조사 결과 본 연구에서 분석에 이용한 시료에서는 검출되지 않았다. 하지만 IMNV의 경우 2006년 브라질로부터 수입한 새우 종묘를 이식한 인도네시아에서 발병하여 이후 동남아시아 전역으로 전파되었던 이력(Senapin *et al.*, 2007)과 2015년 충남의 흰다리새우 양식장에서 발생하여 40%에 달하는 폐사를 유발한 사례(권 등, 2019)를 미루어 볼 때 지속적인 감시가 필요할 것으로 사료된다. 또한, TSV의 경우 *Penaeus vannamei*, *P. schmitti*, *P. setiferus*에 감염 시 최대 90% 수준의 폐사를 유발할 수 있는 전염병(Lightner, 1996; Bonami *et al.*, 1997)으로 비록 국내에서는 2004년 천수만 흰다리새우 양식장에서 발생하여 대량 폐사를 유발하였으나 (Do *et al.*, 2006), 이후 TSV로 인한 피해와 검출은 보고되지 않고 있어 향후 국내로의 유입 차단과 발생 예방을 위한 대책이 중요할 것이다.

본 연구에서 2019-2020년 국내로 수입되는 냉동 새우를 대상으로 현재 국내에서 지속적인 대량 폐사를 유발하지 않으나 수입과정에서 유입될 가능성이 있는 바이러스 4종을 조사한 결과, IMNV와 TSV는 검출되지 않았으며 YHV의 경우 YHV3 type (1/10), IHHNV의 경우 type A IHHNV related sequence (2/10)과 infectious IHHNV type(2/10, type 2)로 확인되었다. 국내 수입되는 새우 량의 증가와 종 및 형태의 다양성은 국외 바이러스의 유입 및 국내 정착 가능성을 제공하므로 향후에도 지속적인 검역 강화 및 능동적인 감시(active surveillance)가 이루어져야 할 것이다.

요 약

2019년부터 2020년도까지 국내로 수입 및 유통되고 있는 냉동 새우에 대하여 갑각류 전염병인 전염성피하및조혈기괴사증(infectious hypodermal andhematopoietic necrosis, IHHN), 노란머리병(yellow head disease, YHD), 타우라증후군(taura syndrome, TS), 전염성근괴사증(infectious myonecrosis, IMN)의 병원체 유전자 검출 여부를 조사하였다. Polymerase chain reaction (PCR) 분석을 수행한 결과 5개 국가에서 수입된 총 10개 그룹의 시료에서 YHV (1/10), IHHNV (2/10)가 검출되었으며 TSV와 IMNV는 검출되지 않았다. 또한, 검출된 IHHNV의 경우 type A IHHNV related gene을 증폭시킬 수 있는 MG831F/R primer를 이용한 PCR 결과에서도 양성으로 확인되었다. 유전자가 검출된 시료에 대해 염기서열 및 계통학적 분석 결과 YHV는 genotype 3 (YHV3)로 분류되었으며 IHHNV는 infectious IHHNV type 2로 분류되었다. PCR 양성 조직 시료를 마쇄 후 흰다리새우에 인위 감염 실험을 수행한 결과, 폐사는 나타나지 않았으나 접종한 바이러스 유전자는 검출되었다. 이러한 결과는 YHV3와 IHHNV가 냉동 새우의 수입 과정에서 국내로 유입되고 있음을 시사한다. 본 연구에서 검출된 YHV3와 IHHNV는 병원성이 없는 유전형 또는 수입 및 유통 과정에서 불활화에 따라 흰다리새우에 폐사를 유발하기에는 감염성이 낮은 수준의 형태로 존재하고 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2021학년도 부경대학교 국립대학육성사업 지원비(PhiNX 보호학문 차세대육성)에 의하여 연구되었음.

Reference

- Bell TA, Lightner DV.: IHHN virus: infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*.: Aquaculture, 38: 185-194, 1984.
- Bonami J.R., K.W. Hasson, J. Mari, B.T. Poulos, D.V. Lightner.: Taura syndrome of marine penaeid shrimp:

- characterization of the viral agent.: *Journal of General Virology*, 78: 313-319, 1997.
- Chen, Jiayuan, et al.: First detection of yellow head virus genotype 3 (YHV-3) in cultured *Penaeus monodon*, mainland China.: *Journal of Fish Diseases*, 41(9): 1449-1451, 2018.
- Do, J. W., Cha, S. J., Lee, N. S., Kim, Y. C., Kim, J. W., Kim, J. D., & Park, J. W.: Taura syndrome virus from *Penaeus vannamei* shrimp cultured in Korea.: *Diseases of aquatic organisms*, 70: 171-174, 2006.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA). https://www.fao.org/fishery/static/Yearbook/YB2017_USBcard/index.ht, 2020.
- Flegel, Timothy William.: Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand.: *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13.4: 433-442, 1997.
- Hwang, S. D., Hwang, J. Y., Sohn, S., Kim, S. M., Kim, S. R., Kim, K. I., Kwon, M. G., Jung, M., Lee, K. Y., Kang, B. C. & Seo, J. S.: Genome data of shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease causative *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from South Korea aquaculture farms.: *Data in Brief*, 31: 105697, 2020.
- Kalagayan, H., Godin, D., Kanna, R., Hagino, G., Sweetney, J., Wyban, J., & Brock, J.: IHHN virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome (RDS) of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii.: *Journal of the World Aquaculture society*, 22(4): 235-243, 1991.
- Kim, C. K., Sohn, S. G., Heo, M. S., Lee, T. H., Hun, H. K., Jang, K. L.: Partial genomic sequence of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) isolated from penaeid shrimp *P. chinensis*.: *Journal of Fish Pathology*, 10: 87-95, 1997.
- Kim, J. H., Choresca Jr, C. H., Shin, S. P., Han, J. E., Jun, J. W., Han, S. Y., & Park, S. C.: Detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Litopenaeus vannamei* shrimp cultured in South Korea.: *Aquaculture*, 313(1-4): 161-164, 2011.
- Kim, S. R., CWR, G., SHMP, W., & Shin, G. W.: Detection and genetic characteristic of Yellow-head virus genotype 8 (YHV-8) Cultured *Litopenaeus vanamei*, in Korea.: *Journal of fish pathology*, 33(1): 77-81, 2020.
- KMI 한국해양수산개발원. <https://fta.kmi.re.kr/> FTA 이행에 따른 어업인등 지원센터 > 발간 자료 > 수산물 수입 동향(2021년 3분기 FTA체결국 수산물 수입 동향).
- Lightner DV.: *A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp*.: World Aquaculture Society Baton Rouge: 1996.
- Lightner DV.: The penaeid shrimp viral pandemics due to IHHNV, WSSV, TSV and YHV: history in the Americas and current status. In: *Proceedings of the 32nd Joint UJNR Aquaculture Panel Symposium*, Davis and Santa Barbara, California, USA, pp. 17-20, 2003.
- Limsuwan C.: *Handbook for Cultivation of Black Tiger Prawns*. Tansetakit, Bangkok (in Thai), 1991.
- Lotz, J. M.: Viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture.: *World journal of microbiology and biotechnology*, 13(4): 405-413, 1997.
- Manimozhi, E.: An emerging shrimp pathogen: Decapod iridescent virus (DIV1).: *The Pharma Innovation Journal*, SP-10(11): 850-854, 2021
- Mohan, C. V., Shankar, K. M., Kulkarni, S., & Sudha, P. M.: Histopathology of cultured shrimp showing gross signs of yellow head syndrome and white spot syndrome during 1994 Indian epizootics.: *Diseases of aquatic organisms*, 34(1): 9-12, 1998
- Mohr, Peter G., et al.: New yellow head virus genotype (YHV7) in giant tiger shrimp *Penaeus monodon* indigenous to northern Australia.: *Diseases of aquatic organisms*, 115.3: 263-268, 2015.
- Morales-Covarrubias, M. S., Nunan, L. M., Lightner, D. V., Mota-Urbina, J. C., Garza-Aguirre, M. C., & Chavez-Sanchez, M. C.: Prevalence of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) in wild adult blue shrimp *Penaeus stylirostris* from the northern Gulf of California, Mexico.: *Journal of aquatic animal health*, 11(3): 296-301, K.
- Motte E, Yugcha E, Luzardo J, Castro F, Leclercq G, Rodriguez J et al.: Prevention of IHHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*.: *Aquaculture*, 219: 57-70, 2003.
- Natividad, Karlo Dante T., et al.: Prevalence of yellow head virus in cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon Fabricius*) from selected shrimp farms in the Philippines.: *Diseases in Asian aquaculture IV: Proceedings of the Fourth Symposium on Diseases in Asian Aquaculture*, 22-26 November 1999, Cebu City, Philippines. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, 2002.

- Navarro, S. A., Tang, K. F., & Lightner, D. V.: An improved Taura syndrome virus (TSV) RT-PCR using newly designed primers.: *Aquaculture*, 293(3-4): 290-292, 2009.
- Nunan, L. M., Poulos, B. T., & Lightner, D. V.: Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used for the detection of Taura syndrome virus (TSV) in experimentally infected shrimp.: *Diseases of Aquatic Organisms*, 34(2): 87-91, 1998.
- Nunan, L. M., Poulos, B. T., & Lightner, D. V.: Use of polymerase chain reaction for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp.: *Marine biotechnology*, 2(4): 319-328, 2000.
- Park, Seul Chan, et al.: Detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and white spot syndrome virus in whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*) imported from Vietnam to South Korea.: *Journal of Veterinary Science* 21.2, 2020.
- Poulos, B. T., & Lightner, D. V.: Detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) of penaeid shrimp by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR):. *Diseases of aquatic organisms*, 73(1): 69-72, 2006.
- Primavera, J. H., & Qunitio, E. T. Runt-deformity syndrome in cultured giant tiger prawn *Penaeus monodon*:. *Journal of Crustacean Biology*, 20(4): 796-802, 2000.
- Rai, P., Pradeep, B., Safeena, M. P., Karunasagar, I., & Karunasagar, I.: Simultaneous presence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) and Type A virus-related sequence in *Penaeus monodon* from India.: *Aquaculture*, 295(3-4): 168-174, 2009.
- Robles-Sikisaka, R., Bohonak, A. J., McClenaghan Jr, L. R., & Dhar, A. K.: Genetic signature of rapid IHNV (infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus) expansion in wild *Penaeus* shrimp populations.: *PLoS One*, 5(7): e11799, 2010.
- Senapin S, Phewsaiya K, Briggs M, Flegel TW.: Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method.: *Aquaculture*, 266: 32-38, 2007.
- Soowannayan, Chumporn, et al.: Detection and differentiation of yellow head complex viruses using monoclonal antibodies.: *Diseases of aquatic organisms*, 57.3: 193-200, 2003.
- Spann, K. M., Donaldson, R. A., Cowley, J. A., & Walker, P. J.: Differences in the susceptibility of some penaeid prawn species to gill-associated virus (GAV) infection.: *Diseases of aquatic organisms*, 42(3): 221-225, 2000.
- Tang, K. F., Navarro, S. A., & Lightner, D. V.: PCR assay for discriminating between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) and virus-related sequences in the genome of *Penaeus monodon*:. *Diseases of aquatic organisms*, 74(2): 165-170, 2007.
- Tang KFJ, Lightner DV.: Low sequence variation among isolates of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) originating from Hawaii and the Americas.: *Diseases of Aquatic Organisms*, 49: 93-97, 2002.
- Tang, K. F., Durand, S. V., White, B. L., Redman, R. M., Pantoja, C. R., & Lightner, D. V.: Postlarvae and juveniles of a selected line of *Penaeus stylirostris* are resistant to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection.: *Aquaculture*, 190(3-4): 203-210, 2000.
- Tang, K. F., Navarro, S. A., & Lightner, D. V.: PCR assay for discriminating between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) and virus-related sequences in the genome of *Penaeus monodon*:. *Diseases of aquatic organisms*, 74(2): 165-170, 2006.
- Wang YC, Chang PS.: Yellow head virus infection in the giant tiger prawn *Penaeus monodon* cultured in Taiwan.: *Fish Pathology*, 35: 1-10, 2000.
- WB, NACA, WWF, FAO (2001) Thematic review on management strategies for major diseases in shrimp aquaculture. In: Subasinghe R, Arthur R, Phillips MJ, Reantaso M (eds) Proceedings of a workshop held in Cebu, Philippines on 28-30 November 1999, pp. 1-135. The World Bank, Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, World Wildlife Fund and Food and Agriculture Organization of the United Nations Consortium Program on Shrimp Farming and the Environment. Work in Progress for Public Discussion. Published by the Consortium.
- Wijegoonawardane, P. K., Cowley, J. A., Phan, T., Hodgson, R. A., Nielsen, L., Kiatpathomchai, W., & Walker, P. J.: Genetic diversity in the yellow head nidovirus complex.: *Virology*, 380(2): 213-225, 2008.
- World organisation for animal health (OIE): Infection with infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus. Manual of diagnostic tests for aquatic animals.: 2018.

- World organisation for animal health (OIE): Infection with yellow head virus genotype 1. Manual of diagnostic tests for aquatic animals.: 2019.
- YANG, H.-L., et al.: A novel method of real-time reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification developed for rapid and quantitative detection of a new genotype (YHV-8) of yellow head virus.: Letters in applied microbiology, 63.2: 103-110, 2016.
- 권문경, 김수미, 신기원, 조미영, 황성돈, 서정수, 황지연 & 지보영: 우리나라 양식 흰다리새우 (*Litopenaeus vannamei*) 에서 발생한 전염성근괴사증 (Infectious Myonecrosis) 역학 조사: 수산해양교육연구, 31: 94-99, 2019.
- 조미영, 김광일, 민은영, 정승희: 양식생물의 신종질병 및 국내 대응방안. 해양정책연구, 34: 67-88, 2019.

Manuscript Received : Feb 08, 2022

Revised : Mar 04, 2022

Accepted : Mar 15, 2022