Check for updates

JFMSE, 36(2), pp. 245~263, 2024.
수산해양교육연구, 제36권 제2호, 통권128호, 2024.
www.ksfme.or.kr
https://doi.org/10.13000/JFMSE.2024.4.36.2.245

국내 유통 중인 주요 미끼용 수산생물에 대한 병원체 분석 및 냉동제품의 전염성 조사

김인구 · 강경식 · 우원식 · 김경호 · 손민영 · 손하정 · 이재영* · 박찬일†
경상국립대학교(연구원) · *국립수산물품질관리원(주무관) · †경상국립대학교(교수)

Analysis of Pathogens in Bait Aquatic Organisms Distributed in the Domestic Market and Assessment of Infectiousness in Frozen Products

In-Gu KIM · Gyoungsik KANG · Won-Sik WOO · Kyung-Ho KIM · Min-Young SOHN · Ha-Jeong SON · Jae-Young LEE* · Chan-Il PARK†
Gyeongsang National University(researcher) · *National Fishery Products Quality Management Service(officer) · †Gyeongsang National University(professor)

Abstract

With the increasing fishing population, there is a growing demand for bait, leading to an expansion in the use of baitfish. However, there is a concern that baitfish carrying diseases may introduce infections into domestic water systems. In this study, various samples of baitfish, crustaceans, annelids, and mollusks were analyzed for the presence of 21 diseases registered in the World Organization for Animal Health (WOAH) Aquatic Animal Health Code. The disease analysis results revealed the detection of White spot syndrome viruses (WSSV) and Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in certain shrimp samples. WSSV and VpAHPND were detected 5 out of 10 analysis, with detection rates ranging from 3% to 100%. The study also examined the detection rates of these diseases in case of positive reactions. To assess the infectivity of WSSV, artificial infection experiments were conducted. The results of this research can serve as foundational data for the establishment of preventive measures against diseases associated with baitfish in aquaculture.

Key words : Bait, Disease analysis, Detection rate, White spot syndrome virus, WOAH

Ⅰ. 서 론

주 52시간 근무제가 도입되면서 국민들의 여가 활동에 대한 관심이 증가함에 따라 레저 활동으로 낚시를 즐기는 인구가 늘어나고 있다(Lee et al., 2022). 낚시 산업의 규모가 확장되어 낚시 미끼도 기존의 지렁이, 크릴새우, 민물새우, 떡밥 등에서 다양한 수산동물로 그 종류가 많아지고 있는데 이것은 낚시업이 발달하여 낚시 대상 품종이 다양해진 데에서 기인한다. 이로 인해 「낚시 관리 및 육성법」이 2012년 9월 12일에 시행되어 제5장 미끼의 관리 제40조에 미끼 기준이 설정되었으나, 적용 대상이 가공 미끼와 인조 미끼에 국한되어 있고 수산동물을 사용하는 미끼의 관리는 법률적으로 이루어지지 않고 있다. 우리나라의 낚시 미끼 관련 기관은 한국낚시업중앙회

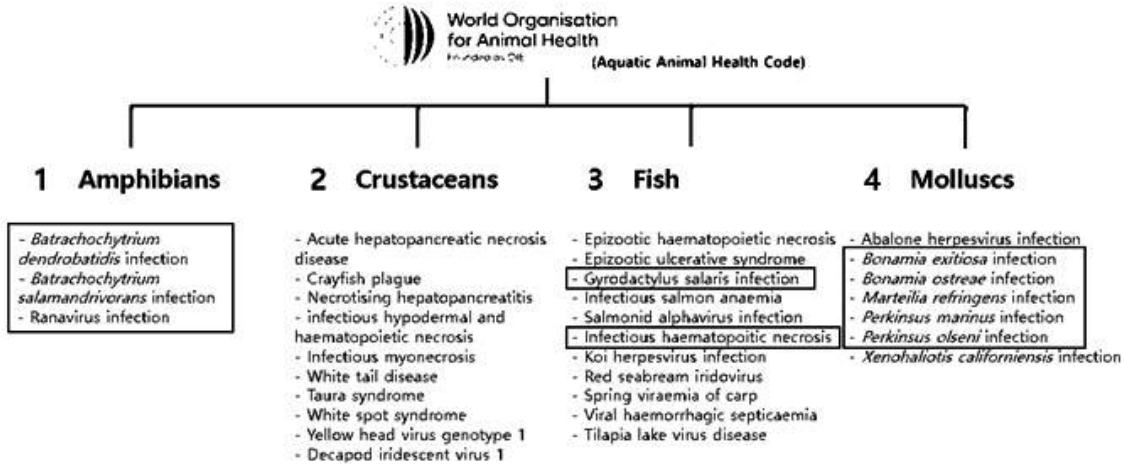
† Corresponding author : 055-672-9253, vinus96@hanmail.net
※ 이 논문은 국립수산물품질관리원 수산생물 검 · 방역관리 기술개발(NFQS2024001)의 지원으로 수행된 연구입니다.

가 있으나 미끼의 실제 유통 과정이나 수입량 등에 관한 자료가 전무한 실정이다.

한편, 국내 양식생물에 대한 방역체계는 「수산생물질병관리법」 시행 이후 괄목할 만한 수준에 도달하였으나 아직 낚시 미끼용 수산생물에 의한 전염병 발생 조사가 체계적으로 수행된 바 없다. 해외 연구진들이 질병이 수계에 유입되어 널리 확산되는 원인으로 미끼 또는 사료용 수생동물에 주목하여 질병 전염 사례를 보고해온 것과는 대조적이다(Faisal et al., 2019; Michel C et al., 1991). 미끼용 수산물은 수입 시 「수입식품안전관리 특별법」의 제 21조의 규정에 따른 수입 식품 검사를 받지 않는데다, 「수산생물질병관리법」에 따른 지정검역물 대상이 아님에 따라 별도의 검역 조치 없이 국내 수입되고 있다. 따라서 질병에 감염된 상품이 수입되어 수계에 직접 노출될 경우 질병 전파의 우려가 높을 것으로 예상된다. 한편, 양식장에서 발병한 질병으로 인해 식용으로 판매되지 못한 개체 역시 미끼 또는 사료용으로 낚시꾼들에게 유통, 판매되어 질병이 발생하지 않은 다른 양식장이나 낚시터에 병원체를 전염시켜 연쇄적으로 경제적 손실을 일으킬 수 있다.

해외에서 보고된 사례들을 보면 호주에서 발생한 redfin perch (Perca fluviatilis)의 유행성조혈기괴사증바이러스(epizootic hematopoietic necrosis virus, EHNV) 감염으로 인한 대량 폐사는 EHNV에 감염된 살아있는 미끼용 수산생물의 사용 결과 발생한 것으로 추정되고 있으며(Whttington et al., 2010), 미국의 Laurentian Great Lakes 유역에서는 낚시 미끼로 인해 바이러스성출혈성패혈증바이러스(viral hemorrhagic septicemia virus)가 확산된 것으로 추정되고 있다(VHSV Expert Panel and Working Group, 2010). 필리핀에서는 흰반점증후군바이러스(white spot syndrome virus, WSSV)에 감염된 사료용 로티퍼를 급이한 홍다리얼룩새우(Penaeus semisulcatus)에서 82%의 폐사가 발생하였으며(Corre et al., 2012), 중국에서는 흰다리새우(Penaeus vannamei) 모하의 먹이인 갯지렁이에서 십각류무지개바이러스(decapod iridescent virus 1, DIV1)가 검출되었다(Qiu et al., 2018). 또한 2015년 우리나라에서 최초로 발생한 흰다리새우(P. vannamei) 감염 전염성근괴사증(infectious myonecrosis virus, IMN)에 대한 역학조사 결과, 수입산 갯지렁이를 통해 IMNV가 유입되어 감염되었을 것으로 추정되고 있다(Kwon et al., 2019). 특히 숙주가 상대적으로 다양하고 광범위한 WSSV, VHSV 등의 병원체는 낚시 미끼용 수산물에 의해 질병이 전염된 사례가 다양한 국가에서 보고되어 있고 전염성과 폐사율 모두 높기 때문에 각별한 주의를 기울여야 한다(Mccoll et al., 2004; Gianville R et al., 2017; Manatu ahu matua, 2020; Goodwin AE et al., 2004). 예를 들면, 호주를 포함한 일부 국가들은 수입산 식용, 비식용 냉동 제품 새우에 대해 엄격한 검역을 실시하고 있다(Austrailian government department of agriculture, 2019; Canadian food inspection agency, 2019; Saudi food and drug authority, 2019).

한편, 국립수산물품질관리원은 수산생물질병관리법에 따라 매년 수입검역 정밀검사 계획을 수립하여 수입산 식용, 이식용, 관상용 및 시험·연구조사용 수산생물에 한해 수입검역을 실시하고 있다. 2024년에도 수산생물을 수출국, 학명, 생산시설에 따라 분류하여 수산생물전염병에 대한 정밀검사를 실시하고 있으며, 검사 대상은 최초 수입되거나 무작위 표본 등에 선정된 감수성이 있는 품종이다. 이 외에도 수입산 및 국내산 미끼의 종류, 유통, 사용에 이르기까지의 전반적인 관리 실태를 면밀하게 파악하여 질병 유입 차단을 위한 미끼용 수산물의 안전 및 품질관리 강화 대책 마련이 시급하다. 따라서 본 연구에서는 이러한 대책 마련을 위한 기초 자료를 제공하기 위해 현재 우리나라에 유통되고 있는 미끼용 수산생물 중 전염병의 유입 및 전파 위험이 높은 미끼 생물을 대상으로 다양한 병원체의 감염 여부를 조사하였다. 이를 통해 전염병의 유입 및



[Fig. 1] Excluding 3 amphibian disease, 2 fish diseases, and 6 echinoderm diseases, we analyzed 21 diseases listed in the Aquatic Health Code of the World Organization for Animal Health (WOAH). The diseases highlighted in boxes were excluded.

전파 가능성이 높은 미끼용 수산생물에 대한 실태를 점검하고 질병의 역학정보를 확보하여 전염병 관리방안을 마련하는데 도움이 되고자 하였다. 전염병 조사 및 검출 대상 미끼는 낚시 미끼와 통발 미끼를 선정하였다. 검출 대상 질병은 세계동물보건기구(World Organization for Animal Health, WOAH)의 수생동물위생규약(Aquatic Animal Health Code)에 기재된 31종의 질병을 기준으로 하여 국내 비법정 전염병 2종, 냉동 · 냉장 시 활성이 떨어지는 기생충성 질병 5종, 미끼용 수산생물 품종과 관련이 적은 양서류 질병 3종을 제외한 갑각류 질병 10종(AHPND, CP, NHP, IHHN, IMN, WTD, TSV, WSSV, YHV1, DIV1), 어류 질병 9종(EHN, EUS, ISA, SAV, KHD, RSIV, SVC, VHS, TiLVD) 그리고 연체동물 질병 2종(AbHV, WS) 등 총 21종을 선정하였다([Fig. l])

Ⅱ. 연구 방법

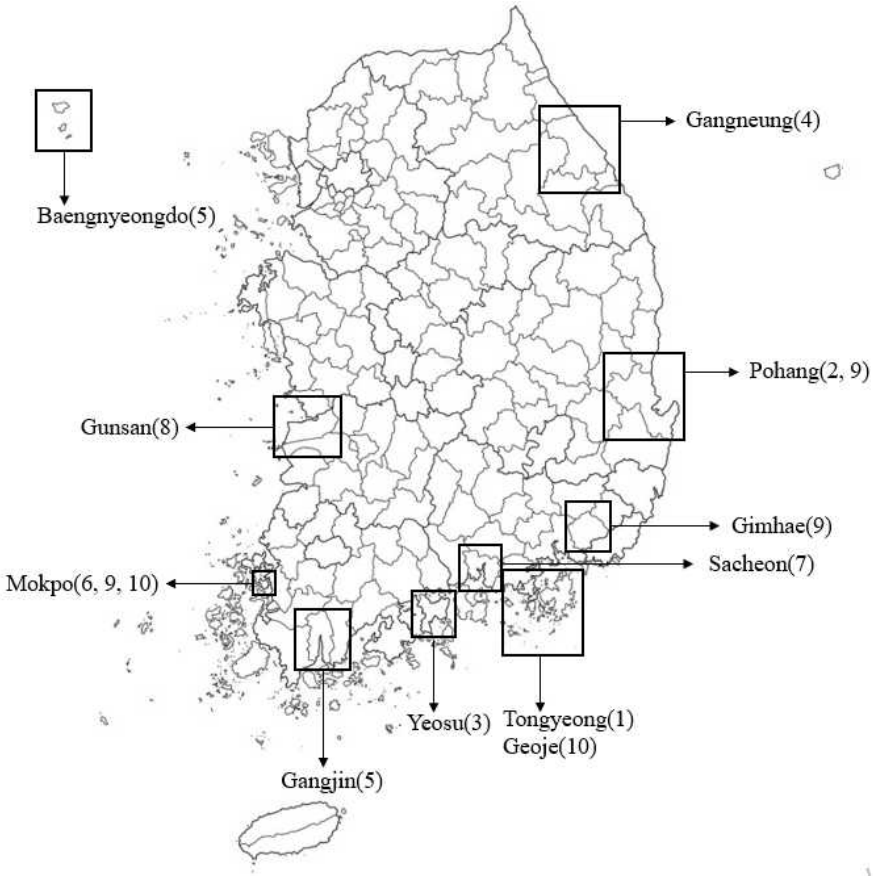
1. 샘플의 확보 및 샘플링

실험에 사용할 미끼용 수산생물은 2023년 5월부터 12월까지 경상북도, 전라남도, 전라북도, 강원도, 인천에 소재한 미끼 생물 판매업소로부터 총 10차례에 걸쳐 원산지를 확인한 후 구입하였다([Fig. 2]). 원산지가 표시되지 않은 경우 판매인에게 구두로 원산지를 문의한 후 구입하였다.

낚시 미끼로는 어류(정어리, 고등어, 갈치, 꽁치, 멸치), 갑각류(새우류, 게), 연체동물(오징어), 환형동물(갯지렁이류)을 구입하였고, 통발 미끼로는 어류(고등어, 꽁치, 정어리, 멸치, 방어), 갑각류(게)를, 구입하였다. 질병 검출에 사용할 샘플은 각 회차의 샘플 중 종별로 최대 30마리를 선별하여 해부하고, 5개체의 조직을 하나의 튜브에 20-30 mg이 되도록 pooling 하였다. 살아있는 시료의 경우 수령 즉시 조직을 적출하고 냉동 · 냉장 시료의 경우 상온에서 자연 해동한 후 장기가 완전히 녹지 않은 상태에서 해부하였다. 해부 후 조직은 genomic DNA 및 total RNA 추출 전까지 -80℃의 초저온 냉동고에 보관하였다.

2. 시료의 종 동정

생물 시료의 동정은 16S rRNA 또는 cytochrome c oxidase subunit I (CO1) 유전자를 표적으로 하는



[Fig. 2] The source of the samples used in the experiment was purchased a total of ten times nationwide. The numbers within blank indicate the order in which samples were acquired..

Universal primers를 사용하여 속에서 종 수준까지 동정하였다. 최종적으로 Sanger sequencing을 통해 핵산으로부터 염기서열 정보를 확보한 뒤 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 제공하는 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)의 데이터베이스 (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)에 존재하는 서열의 query cover 값과 상동성을 대조하여 속에서 종 수준까지 동정하였다. 샘플의 종 동정에 사용된 특이적 primer의 염기서열과 핵산 증폭 조건은 다음과 같다(<Table 1>).

3. 질병 검출 및 검출률 계산

가. 질병 검출

질병의 검출은 세계동물보건기구(World Organization for Animal Health, WOAH)의 Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animal (2023)에 따라 수행하였다. 시료는 갑각류(crustacean), 어류(fish), 연체류(molluscs) 그리고 환형동물(annelida) 분류군으로 나누어 해당 분류에 속하는 질병을 모두 검사하는 것을 기본으로 하고, WOAH에서 reservoir 혹은 vector로 지정하거나(예: molluscs의 WSSV 검사) 감수성 보고 문헌이 있는 경우(예: 갯지렁이류의 IMNV, TSV, IHHNV, DIV1 검사; Andrade, 2009; Qiu et al., 2018; Liu et al., 2020) 분류군이 다르더라도 추가검사를 수행하였다.

<Table 1> The primers used for species identification of the samples. Using primer sets targeting the target genes 16s rRNA or cytochrome oxidase subunit I (CO1), identification was conducted from genus to species level.

Target	Primers	Sequences (5' - 3')	Size (bp)	PCR condition	References
Fish (16S rRNA)	16sarF	CGC-CTG-TTT-ATC-AAA-AAC-AT	618	95℃ for 5 min, (95℃ for 30 sec, 50℃ for 30 sec, 72℃ for 60 sec) x 35 cycles, 72℃ for 8 min	Palumbi et al., 1991
	16sbrF	CCG-GTC-TGA-ACT-CAG-ATC-ACG-T			
Crustacean & molluscs & annelida (CO1)	Foward	GGT-CAA-CAA-ATC-ATA-AAG-ATA-TTG-G	680	94℃ for 5 min, (94℃ for 40 sec, 46℃ for 1 m, 72℃ for 1 m) x 30 cycles, 72℃ for 10 min	Folmer et al., 1994
	Reverse	TAA-ACT-TCA-GGG-TGA-CCA-AAA-AAT-CA			

먼저, 병원체 검출을 위해 샘플을 회차별, 종별로 구분하여 5개체의 조직 샘플을 pooling 방식으로 수집한 후, 시판 중인 kit를 사용하여 제조사의 설명서에 따라 genomic DNA와 total RNA를 추출하고 complementary DNA (cDNA)를 합성하였다. 핵산 정제 후, 분광광도계(Thermo Fisher Scientific Inc, USA)를 이용해 농도와 순도를 측정하여 품질을 확인하였다. 추출된 DNA와 합성된 cDNA는 질병 검출용 primer를 사용하여 병원체별 증폭 조건에 따라 PCR을 수행하는데 사용되었다. 핵산 증폭 산물은 1.5% agarose gel 상에서 전기영동으로 각 질병의 양성체 bp와 일치하는 target band를 확인하였다.

나. 검출률 계산

target band 양성 반응을 나타낸 pooled 샘플에 대하여 겔 extraction 및 Sanger sequencing을 수행하고, 시퀀싱 결과 병원체 염기서열에 양성을 나타낸 pooled 샘플에 해당하는 모든 개체의 조직(pooling tube 1개당 5개체의 조직)들에 대하여 다시 한 번 동일한 절차로 질병 검출을 수행하여 해당 질병의 검출률(detection rate)을 계산하였다. 검출률 계산 공식은 다음과 같다.

$$\text{검출률}(D) = \frac{\text{양성 샘플 갯수}}{\text{모든 샘플 갯수}} \times 100$$

질병 검사에 사용된 양성대조군으로 검증된 합성 plasmid를 사용하였으며, 검출에 사용된 프라이머들은 아래 표와 같다(<Table 2>).

4. 전염성 조사

병원체가 검출된 경우, 해당 병원체의 전염성을 조사하기 위해 감수성이 있는 품종을 경상남도 통영시에 소재한 수산시장에서 구입하였다. 구입 후 인위감염을 수행할 병원체의 감염 여부를 진단한 다음, target band가 확인되지 않은 건강한 개체를 선별하여 인위감염 실험에 사용하였다.

5. 동물 윤리

모든 실험 생물의 취급과 처리는 경상국립대학교의 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호: GNU-231030-E0200)을 받은 다음 수행하였다.

<Table 2> The specific primers, their nucelotide sequences, and the amplification conditions used for the analysis of each disease

Red seabream iridovirus1 (RSIV1)	RSIV1F	CTC-AAA-CAC-TCT-GGC-TCA-TC	570	95℃ for 15 min, (94℃ for 30 sec, 58℃ for 1 min and 72℃ for 1 min) x 30 cycles, 72℃ for 5 min	Kurita et al., 1998
	RSIV1R	GCA-CCA-ACA-CAT-CTC-CTA-TC			
Acute hepato pancreatic necrosis disease (AHPND)	AP4-F1	ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-GAA-AC	1269	94℃ for 2 min, (94℃ for 30 sec, 55℃ for 30 sec and 72℃ for 90 sec) x 30 cycles, 72℃ for 2 min	Dangtip et al., 2015
	AP4-R1	ACG-ATT-TCG-ACG-TTC-CCC-AA			
	AP4-F2	TTG-AGA-ATA-CGG-GAC-GTG-GG	230	94℃ for 2 min, (94℃ for 20 sec, 55℃ for 20 sec and 72℃ for 20 sec) x 25 cycles	
	AP4-R2	GTT-AGT-CAT-GTG-AGC-ACC-TTC			
Crayfish plague (CP)	BO42F	GCT-TGT-GCT-GAG-GAT-GTT-CT	569	96℃ for 5 min, (96℃ for 1 min, 59℃ for 1 min and 72℃ for1 min) x 40 cycles, 72℃ for 7 min	Tuffs and Oidtmann., 2011
	BO640R	CTA-TCC-GAC-TCC-GCA-TTC-TG			
Necrotising hepato pancreatitis (NHP)	NHPF2	CGT-TGG-AGG-TTC-GTC-CTT-CAG-T	379	95℃ for 5 min, (95℃ for 30 sec, 60℃ for 30 sec and 72℃ for 30 sec) x 35 cycles, 60℃ for 1 min, 72℃ for 2 min	Aranguren et al., 2010
	NHPR2	GCC-ATG-AGG-ACC-TGA-CAT-CAT-C			
Taura syndrome (TS)	9992F	AAG-TAG-ACA-GCC-GCG-CTT	231	60℃ for 30 min, 94℃ for 2 min, (94℃ for 45 sec and 60℃ for 45 sec) x 40 cycles, 60℃ for 7 min	Nunan et al., 1998
	9195R	TCA-ATG-AGA-GCT-TGG-TCC			
White spot syndrome virus (WSSV)	146F1	ACT-ACT-AAC-TTC-AGC-CTA-TCT-AG	1447	94℃ for 4 min, 55℃ for 1 min, 72℃ for 2 min, (94℃ for 1 min, 55℃ for 1 min and 72℃ for 2 min) x 39 cycles, 72℃ for 5 min	Lo et al., 1996
	146R1	TAA-TGC-GGG-TGT-AAT-GTT-CTT-ACG-A			
	146F2	GTA-ACT-GCC-CCT-TCC-ATC-TCC-A	941		
	146R2	TAC-GGC-AGC-TGC-TGC-ACC-TTG-T			

< Over continued >

< Continued from >

Decapod iridescent virus 1 (DIV1)	SHIV-F1	GGG-CGG-GAG-ATG-GTG-TTA-GAT	457	95℃ for 3 min, (95℃ for 30 sec, 59℃ for 30 sec and 72℃ for 30 sec) x 35 cycles, 72℃ for 2 min	Qiu et al., 2017
	SHIV-R1	TCG-TTT-CGG-TAC-GAA-GAT-GTA			
	SHIV-F2	CGG-GAA-ACG-ATT-CGT-ATT-GGG	129	95℃ for 3 min, (95℃ for 30 sec, 59℃ for 30 sec and 72℃ for 20 sec) x 35 cycles, 72℃ for 2 min	
	SHIV-R2	TTG-CTT-GAT-CGG-CAT-CCT-TGA			
Epizootic ulcerative syndrome (EUS)	BO73	CTT-GTG-CTG-AGC-TCA-CAC-TC	564	96℃ for 5 min, (96℃ for 1 min, 58℃ for 1 min and 72℃ for 1 min) x 35 cycles, 72℃ for 5 min	Oidtmann et al., 2008
	BO639	ACA-CCA-GAT-TAC-ACT-ATC-TC			
Koi herpesvirus (KHD)	Gray SphF	GAC-ACC-ACA-TCT-GCA-AGG-AG	292	94℃ for 30 sec, (94℃ for 30 sec, 63℃ for 30 sec and 72℃ for 30 sec) x 40 cycles, 72℃ for 7 min	Yuasa et al., 2005
	Gray SphR	GAC-ACA-TGT-TAC-AAT-GGT-CGC			
Infectious salmon anaemia (ISA)	Forward	GAC-CAG-ACA-AGC-TTA-GGT-AAC-ACA-GA	304	0℃ for 30 min, 94℃ for 2 min, (94℃ for 30 sec, 55℃ for 30 sec and 72℃ for 30 sec) x 30 cycles	WOAH, 2023
	Reverse	GAT-GGT-GGA-ATT-CTA-CCT-CTA-GAC-TTG-TA			
Tilapia lake virus disease (TiLVD)	Ext-1	TAT-GCA-GTA-CTT-TCC-CTG-CC	491	0℃ for 15 min, 95℃ for 2 min, (95℃ for 30 sec, 60℃ for 30 sec and 72℃ for 1 min) x 25 cycles, 72℃ for 7 min	Tsofack et al., 2017
	Ext-2	TTG-CTC-TGA-GCA-AGA-GTA-CC			
	ME1	GTT-GGG-CAC-AAG-GCA-TCC-TA	250	95℃ for 2 min, (95℃ for 1 min, 60℃ for 1 min and 72℃ for 1 min) x 35 cycles, 72℃ for 5 min	
	ME2	TAT-CAC-GTG-CGT-ACT-CGT-TCA-GT			

< Over continued >

< Continued from >

Spring viraemia of carp (SVC)	SVCV F1	TCT-TGG-AGC-CAA-ATA-GCT-CAR-RTC	714	(95℃ for 1 min, 55℃ for 1 min and 72℃ for 1 min) x 35 cycles, 72℃ for 10 min	Stone et al., 2003
	SVCV R2	AGA-TGG-TAT-GGA-CCC-CAA-TAC-ATH-ACN-CAY			
Withering syndrome (WS)	RA5-1	GTT-GAA-CGT-GCC-TTC-AGT-TTA-C	160	95℃ for 5 min, (95℃ for 1 min, 62℃ for 30 sec, 72℃ for 30 sec) x 40 cycles 72℃ for 10 min	Andree et al., 2000
	RA3-6	ACT-TGG-ACT-CAT-TCA-AAA-GCG-GA			
Salmonid alphavirus (SAV)	E2F	CCG-TTG-CGG-CCA-CAC-TGG-ATG	516	50℃ for 10 min, 95℃ for 3 min, (95℃ for 10 sec and 60℃ for 20 sec) x 40 cycles	Fringuelli et al., 2008
	E2R	CCT-CAT-AGG-TGA-TCG-ACG-GCA-G			
Viral haemorrhagic septicaemia (VHS)	3F	GGG-ACA-GGA-ATG-ACC-ATG-AT	320	50℃ for 30 min, 95℃ for 15 min, (94℃ for 30 sec, 60℃ for 30 sec, 68℃ for 1 min) x 35 cycles, 68℃ for 7 min	Kim et al., 2018
	2R	TCT-GTC-ACC-TTG-ATC-CCC-TCC-AG			
Abalone herpesvirus (AbHV)	AbHV 16	GGC-TCG-TTC-GGT-CGT-AGA-ATG	588	95℃ for 15 min, (94℃ for 30 sec, 52℃ for 30 sec and 74℃ for 45 sec) x 40 cycles, 72℃ for 7 min	Corbeil et al., 2010
	AbHV 17	TCA-GCG-TGT-ACA-GAT-CCA-TGT-C			
White tail disease (WTD)	MrNV-F	GAT-ACA-GAT-CCA-CTA-GAT-GAC-C	681	52℃ for 30 min, 95℃ for 2 min, (94℃ for 40 sec, 55℃ for 40 sec and 68℃ for 1 min) x 30 cycles	Yoganandhan et al., 2005
	MrNV-R	GAC-GAT-AGC-TCT-GAT-AAT-CC			
	XSV-F	GGA-GAA-CCA-TGA-GAT-CAC-G	500		
	XSV-R	CTG-CTC-ATT-ACT-GTT-CGG-AGT-C			

< Over continued >

< Continued from >

Yellow head virus genotype 1 (YHV1)	YC-F1ab	ATC-GTC-GTC-AGY-TAY-CGY-AAY-ACY-GC	358	50℃ for 30 min, 94℃ for 2 min, 95℃ for 15 min, (94℃ for 45 sec, 60℃ for 45 sec and 68℃ for 45 sec) x 35 cycles, 68℃ for 7 min	WOAH, 2023
	YC-R1ab	TCT-KCR-YGT-GTG-AAC-ACY-TTC-TTR-GC			
	YC-F2ab	CGC-TTY-CAR-TGT-ATC-TGY-ATG-CAC-CA	146	95℃ for 15 min, (94℃ for 45 sec, 60℃ for 45 sec and 72℃ for 45 sec) x 35 cycles, 72℃ for 7 min	
	YC-R2ab	RTC-DGT-GTA-CAT-RTT-DGA-GAG-TTT-RTT			
Epizootic haemato poietic necrosis (EHN)	EHN Forward	CGC-AGT-CAA-GGC-CTT-GAT-GT	580	(95℃ for 1 min, 55℃ for 1 min and 72℃ for 1 min) x 35 cycles, 72℃ for 15 min	Hyatt et al., 2000
	EHN Reverse	AAA-GAC-CCG-TTT-TGC-AGC-AAA-C			
Infectious myo necrosis (IMN)	4587F	CGA-CGC-TGC-TAA-CCA-TAC-AA	328	60℃ for 30 min, 95℃ for 2 min, (95℃ for 45 sec and 60℃ for 45 sec) x 39 cycles, 60℃ for 7 min	Poulos and Lightner., 2006
	4914R	ACT-CGG-CTG-TTC-GAT-CAA-GT			
	4725NF	GGC-ACA-TGC-TCA-GAG-ACA	139	95℃ for 2 min, (95℃ for 30 sec, 65℃ for 30 sec and 72℃ for 30 sec) x 39 cycles, 72℃ for 2 min	
	4863NR	AGC-GCT-GAG-TCC-AGT-CTT-G			
Infectious hypodermal and hemato poietic necrosis virus (IHHNV)	389F	CGG-AAC-ACA-ACC-CGA-CTT-TA	392	95℃ for 5 min, (95℃ for 30 sec, 60℃ for 30 sec and 72℃ for 30 sec) x 35 cycles, 72℃ for 5 min	Tang et al., 2007
	389R	GGC-CAA-GAC-CAA-AAT-ACG-AA			

Ⅲ. 연구 결과

1. 종 동정 결과

총 10차례에 걸쳐 구입한 미끼 생물 샘플의 분자생물학적 종 동정 결과 어류 8종, 갑각류 12종, 연체동물 2종, 환형동물 7종으로 동정되었다 (<Table 3>).

<Table 3> Samples obtained over ten instances were subjected to species identification, yielding the following results: eight fish species, twelve crustacean species, two mollusk species, and seven Annelida species. species marked with a ★ indicate the presence of diseases

Animals	Scientific name
fishes	*Cololabis saira*
	Engraulis japonicus
	Sardinops sagax
	Scomber japonicu,
	Scomberesox saira
	Seriola quinqueradiata
	Spratelloides gracilis
	Truchiurus japonicus
crustaceans	*Artemia franciscana*
	Artemia parthenogenetica
	Brachionus plicatilis
	Eriocheir sinensis
	Euphausia superba
	Gaetice depressus
	Hemigrapsus penicillatus
	Hemigrapsus sanguiensis
	★ *Metapenaeus joyneri*
	Palaemon sinensis
	★ *Penaeus merguiensis*
	★ *Penaeus vannamei*
molluscs	*Dosidicus gigas*
	Illex argentinus
annelida	*Eisenia andrei*
	Eisenia fetida
	Marphysa sanguinea
	Marphysa sp.
	Perinereis linea
	Perinereis sp.
	Perinereis wilsoni

2. 질병 검출 결과 및 검출률

총 10차례에 걸쳐 29종 2,377마리의 시료를 분석한 결과, 21종의 질병 중 WSSV와 Vp_{AHPND}가 검출되었으며, 이외의 병원체들은 검출되지 않았다. WSSV의 경우 양성 반응이 나타난 1, 2, 3, 6, 7차 pooled 샘플에 대하여, 각 양성 pooled sample에 해당하는 모든 개별 샘플에 대해 PCR 방법으로 질병 검사를 수행하여 질병에 감염된 개체수를 확인하고 검출률을 계산하였다. WSSV는 흰다리새우(*P. vannamei*) 90마리 중 90마리, 중하속*(Metapenaeus joyneri*) 60마리 중 17마리, 바나나새우(*Penaeus merguiensis*) 28마리 중 26마리에서 검출되었고, Vp_{AHPND}는 바나나새우 28마리 중 1마리에서 검출되었다. 양성 반응을 나타낸 질병 및 질병의 검출률은 다음과 같다(<Table 4>).

3. 전염성 조사를 위한 실험 설계

질병 검출 결과, 일부 병원체가 검출됨에 따라 별도의 전염성 조사 실험을 설계하였다.

가. WSSV 인위감염 실험

① 실험 대상 동물 종 선정

WSSV는 흰다리새우(*P. vannamei*), 중하속(*M. joyneri*), 바나나새우(*P. merguinsis*) 3개 품종에서 검출되었는데, 이 중에서 흰다리새우의 검출률이 100%로 가장 높았다. 흰다리새우는 국내 주력 양식 품종으로 미끼용 수산생물로 인해 WSSV가 전염되는 경우 가장 큰 피해를 받을 품종으로 예상되어 인위감염 실험 대상 종으로 흰다리새우를 선정하였다.

② 실험 동물의 구입 및 병성 검사

흰다리새우는 경상남도 통영시에 소재한 수산시장에서 임상적으로 건강한 개체를 200마리 구입하였다. 이 중 임의로 선별한 30마리의 평균 체중은 30.4 ± 4.4 g, 전장은 16.7 ± 0.8 cm 이었다. 구입 후 무작위로 10마리를 선별하여 WSSV에 대한 분자생물학적 검사(PCR)를 통해 음성임

<Table 4> The detection rates for three shrimp species with detected WSSV and one shrimp species with detected AHPND

Order	Product name (Source)	Scientific name	Disease	Positive pooled sample (N/6)	Positive individual sample	Detection rate (%)
1st	Shrimp I (imported)	*Penaeus vannamei*	WSSV	6/6	30/30	100%
2nd	Shrimp I (domestic)	*Penaeus vannamei*	WSSV	6/6	30/30	100%
3rd	Shrimp I (domestic)	*Penaeus vannamei*	WSSV	6/6	30/30	100%
6th	Shrimp I (domestic)	*Metapenaeus joyneri*	WSSV	5/6	13/30	43%
	Shrimp II (domestic)	*Metapenaeus joyneri*	WSSV	3/6	4/30	13%
	Shrimp III (domestic)	*Penaeus merguiensis*	WSSV	6/6	26/28	93%
	Shrimp III (domestic)	*Penaeus merguiensis*	AHPND	1/6	1/28	4%
7th	Shrimp II (domestic)	*Metapenaeus joyneri*	WSSV	1/6	1/30	3%

을 확인한 뒤 인위감염을 수행하였다.

③ 실험 디자인

질병에 감염되지 않은 건강한 흰다리새우 20마리를 선별하여 대조군으로 설정하고, WSSV가 검출된 샘플의 조직을 먹이로 먹일 새우들을 실험군으로 설정하였다.

1차, 2차, 3차, 6차 3개 그룹 (중하속 조직 급이 2개 그룹, 바나나새우 조직 급이 1개 그룹), 7차 총 7개의 그룹을 실험군으로 설정하였다. 대조군을 포함한 8개 그룹에 400 L 정수식 수조를 한 개씩 할당하여 20 마리씩 순치하고 오전과 오후에 1회씩 하루 2회 50%의 사육수를 환수하였다. 수온은 자동 온도 조절 장치로 26 ± 1 ℃를 유지하였고, 염도는 24 ± 0.2 ppt, pH는 8 ± 0.1로 유지하였다.

④ WSSV 감염 조직의 급이

WSSV의 경우 개발된 cell line이 없기 때문에 감염은 Cruz-Flores et al. (2020), Janewanthanakul et al. (2020), Trang et al. (2019) 등의 문헌을 참고하여 WSSV가 검출된 1차, 2차, 3차, 6차, 7차 새우 샘플을 실험 1일차, 7일차에 먹이로 급이하여 감염을 시도하였고, 2주간 폐사율을 관찰하였다. 1일차, 7일차를 제외한 기간에는 상업 사료를 오전과 오후에 각 1회씩 급이하였다.

⑤ 폐사 및 샘플링

실험 기간 동안 모든 그룹에서 폐사가 발생하였다. 대조군에서 2마리(3일, 5일), 실험군 I에서 2마리(9일, 12일), 실험군 II에서 5마리(1일, 10일, 12일), 실험군 III에서 1마리(1일), 실험군 IV에서 3마리(2일 5일, 12일), 실험군 V에서 4마리(2일, 3일, 7일), 실험군 VI에서 5마리(2일, 4일, 6일, 10일, 12일), 실험군 VII에서 3마리(4일, 6일, 10일)의 폐사가 발생하였으며, 폐사 개체는 즉시 수거하고 그룹별로 최대 5마리의 조직을 하나의 50 ml conical tube에 pooling 하였다. 실험 종료까지 생존한 개체는 얼음 위에서 기절시킨 뒤 해부하

<Table 5> WSSV challenge test results summary

Group	Weight (g)	Length (cm)	Temperature (℃)	D.O (mg/L)	Salinity (ppt)	pH	Number of deaths (day post infection, DPI)	Detection
Negative control	30.4 ± 4.4	16.7 ± 0.8	25 ± 1	6 ± 0.2	24 ± 0.2	8 ± 0.1	2 (3, 5)	X
1st							2 (9, 12)	
2nd							5 (1, 10, 12)	
3rd							1 (1)	
6th I							3 (2, 5, 12)	
6th II							4 (2, 3, 7)	
6th III							5 (2, 4, 6, 10, 12)	
7th							3 (4, 6, 10)	

여 조직을 수거하고 마찬가지로 최대 5마리의 조직을 하나의 50 ml conical tube에 pooling 하였다. 폐사 개체와 생존 개체 모두 꼬리 근육, 간, pleopod, 간췌장, 아가미를 pooling 하였다.

⑥ 질병 검사

인위감염 실험 종료 후 대조군과 실험군의 모든 흰다리새우의 pooled 샘플 38개에 대하여 PCR 및 전기영동으로 감염 여부를 확인하였으나 모든 pooled 샘플에서 target band가 확인되지 않아 WSSV가 전염력을 상실한 것으로 판단하였다.

나. Vp_{AHPND}의 배양 시도

일반적으로 세균은 세포 내 유리수가 냉동 상태일 때 빙결되어 세포가 파괴되는 것을 막아주는 Glycerol 용액에 넣어 냉동고에 장기 보관한다는 점에 착안하여, 병원성 세균이 극저온 하에서 새우 조직 내에서도 온전히 보존되어 배양 능력을 유지할 수 있는지 확인하기 위해 Vp_{AHPND}의 배양을 시도하였다. *Vibrio* spp.의 선택 배지인 TCBS (thiosulfate citrate bile sucrose agar) agar와 수생균 영양배지인 TS (tryptic soy) agar 각각에 AHPND에 양성 반응을 보인 6차 바나나새우 에 양성 반응을 보인 6차 바나나새우(M. joyneri) 샘플의 조직을 잘라서 접종 후 실험군으로 설정하였다. 대조군으로는 *Vibrio harveyi*를 선정하고 TCBS agar와 TS agar에 도말하였다. 27℃ 배양기에서 overnight로 *V. parahaemolyticus*의 1차 배양을 시도하였으나 TCBS agar 및 TS agar 모두에서 배양되지 않아 실험군의 세균은 전염력을 상실한 것으로 판단하였다.

Ⅳ. 결 론

이번 연구에서는 미끼용 수산생물에 대하여 WOAH가 지정한 다양한 전염병에 대해 검출을 시도하고 양성 반응이 나타난 질병에 한해 검출률을 조사하였다.

본 연구의 검출 대상인 WOAH의 Aquatic Animal Health Code에 기재된 21종의 질병 검출

결과 어류와 연체동물 및 환형동물에서는 질병이 검출되지 않았으며 갑각류 중 크릴(*E. superba*)과 줄새우(*P. sinensis*)를 제외한 냉동제품 상태의 흰다리새우, 바나나새우, 중하에서 WSSV와 Vp_{AHPND}가 검출되었다. 병원체가 검출되지 않은 샘플의 경우 바이러스가 숙주 내로 침투는 하였으나 반복적인 냉동과 해동의 반복으로 바이러스의 핵산이 손상되어 PCR을 통한 핵산 증폭이 이루어지지 않았을 가능성이 있다(Ross et al., 1990). 질병 전파 우려가 높은 중국산 미끼생물은 대부분이 갯지렁이 종으로, PCR 분석 결과 질병이 검출되지는 않았으나 동일한 이유로 핵산의 증폭이 이루어지지 않았을 가능성이 있다. 따라서 PCR 기법만으로 특정 질병에 대해 정확하게 양성 판정을 내리는 것은

어렵기 때문에 WOAH 에서는 현미경을 이용한 병리조직학적 분석을 권고하고 있다(Baek et al., 2022).

질병이 검출된 1차, 2차, 3차, 6차, 7차 새우 샘플은 각각 경남 통영, 경북 포항, 전남 여수, 전남 목포, 경남 사천에 소재한 판매장의 제품으로서 검출률이 최대 100%에 달하는 품종이 있는 만큼, 이들 지역 낚시터(오픈형, 폐쇄형) 및 낚시터 인근에 서식하는 수산생물에 대한 지속적인 질병 발생 모니터링 및 역학조사를 수행하여 질병 확산의 원인이 미끼인 사례가 있는지 확인하는 것이 필요하다.

한편, 전염성 조사의 일환으로 WSSV에 감염된 새우 조직을 먹이로 급이하는 인위감염 실험 결과 어떤 샘플에서도 WSSV가 검출되지 않았다. WSSV의 nested PCR 1단계 amplicon의 크기는 1,447 bp로 예상되고 내부 2단계 amplicon의 크기는 941 bp로 예상되는데 이들 프라이머는 WSSV의 캡시드 단백질 중 하나를 암호화하는 VP664 ORF (open reading frame)을 표적으로 한다(Lo et al., 1996). 본 연구의 인위감염 실험에서 nested PCR 결과 1,447 bp 및 941 bp amplicon이 증폭되지 않았는데 이것은 캡시드 외피 단백질의 ORF가 저하되어 감염성이 상실되었음을 나타낸다(Aranguren Caro et al., 2020). WSSV에 감염된 새우가 미끼용 제품으로의 가공 및 냉동 상태로 운반되는 과정에서, 동결 작용에 의해 흰다리새우에서 분리할 WSSV DNA 분자의 무결성이 손상되었을 가능성이 있다(Chung et al., 2017). 온도와 WSSV의 활성화 관계를 연구한 이전 연구에서는 WSSV DNA의 존재가 확인된 새우 샘플을 끓는 물에 1분 이상 삶거나 −20℃에서 2주간 저온 보관 후 잘게 썬 다음, 이상 증세가 없는 건강한 새우에게 먹이로 급이하였다(Aranguren Caro et al., 2020). 급이 후 폐사한 개체의 조직을 확보하고 nested PCR 방법으로 핵산 증폭을 시도하였으나 WSSV가 검출되지 않았다. 이것은 WSSV에 감염된 새우를 DNA 분자의 내성을 뛰어넘는 고온으로 처리(Rasmussen and Morrissey, 2008)하여 바이러스 DNA 분자의 구조적 손상이 발생했기 때문으로 추측된다. 또다른 연구에서도 상업적 목적으로 유통되는 과정에서 반복적인 냉동과 해동 처리가 바이러스의 유전자나 외피 단백질을 손상시켜 병원체를 불활성화 할 수 있음을 보고하였다(Hasson et al., 2006).

미끼용 수산생물로 사용되는 새우 중 일부 종은 식용으로도 널리 소비되고 있는데, 흰다리새우(*P. vannamei*)와 중하(*M. joyneri*), 바나나새우(*P. merguiensis*) 등이 있다. 이들 새우는 낚시 목적보다는 소비 목적으로 더 많이 유통되기 때문에 다양한 유통경로를 통해 WSSV가 확산될 위험이 존재한다. 본 연구에서 확보한 바나나새우(*P. merguiensis*)는 국내에선 양식을 하지 않는 품종으로서 그 공급은 수입에 의존한다. 하지만 포장지에는 국내산으로 표기되어 있었는데, 이는 수입산 제품을 국내산으로 둔갑하여 유통하였거나 원산지 오기로 인한 것으로 추정된다. 본 연구의 질병 검출 결과 바나나새우(*P. merguiensis*) 샘플에서 WSSV와 Vp_{AHPND}의 동시 감염 사례가 관찰되었다. 실제 새우 양식장에서는 여러 병원체에 의한 공동감염이 흔하다(Jang et al., 2014). 두 병

원체의 동시 감염을 시도한 한 연구에서는 동시 감염된 그룹이 WSSV 또는 Vp_{AHPND}에만 감염된 그룹보다 누적 폐사율이 유의하게 증가하였다고 보고하였는데, 이것은 WSSV에 감염된 새우의 체액을 순환하는 백혈구 수가 감소하여 면역력이 저하된 상태에서 뒤이은 Vp_{AHPND}의 2차 감염으로 폐사가 가속화되었기 때문이라고 보고하였다(Han et al., 2019). 하지만 본 연구의 샘플에서는 두 병원체 모두 활성을 상실하였는데, 이 역시 수생환경에서 병원체에 감염된 수산동물이 포획 후 미끼용 제품으로 가공 및 운반되는 과정에서 급격한 온도변화를 겪어감에 따라 병원체가 활성을 상실한 것으로 보인다.

현재 우리나라에서 미끼용으로 유통되고 있는 갯지렁이들은 대부분 중국에서 수입하고 있는데, 갯지렁이의 품목 분류 HS-CODE는 010690310이며 원산지 제도 운영에 관한 고시에 의거하여 원산지표시 '비대상', 적정표시방법 '비대상' 품목으로 분류되어 질병 검사 없이 수입되고 있다

(Kwon et al., 2019). 또한 일부 중국산 홍다리얼룩새우(*P. monodon*)와 흰다리새우(*P. vannamei*), 중하(*M. joyneri*) 등 갑각류에서 WSSV와 AHPND가 검출된 사례가 있기 때문에(Kang et al., 2023) 주의가 필요하다. 한국해양수산개발원과 해양수산부가 발간한 자료에 따르면, 2023년 우리나라가 중국으로부터 수입한 새우는 2,423톤으로 전년대비(3,422톤) 약 29.2% 감소하였으나 여전히 많은 양을 수입하고 있다

(Kfishinfo, 2023). 특히 중국은 우리나라와 무역이 활발한 국가인 만큼 새우류 외에도 다양한 비식용 수산물을 수입하고 있는데 낚시 미끼로 갯지렁이류, 오징어, 활미꾸라지 뿐만 아니라 통발 미끼로 활용되는 멸치와 참게도 수입하고 있다. 낚시 미끼용 갯지렁이의 경우 여러 종류가 수입되고 있음에도 불구하고 HS-CODE는 1개(갯지렁이류)로 등록되어있어 품종별로 수입량을 파악하기엔 어려운 실정이다. 또한 통발 미끼인 '참게'의 경우 별도의 HS-CODE가 아닌 '기타 냉장 게' 품목으로 참게 이외의 '게'가 포함되어 있어 정확한 수입량을 파악하는 것이 쉽지 않다. 멸치는 냉동 형태로 수입되어 낚시용 또는 통발용 미끼로 이용되고 있으나 '냉동 멸치'는 별도의 HS-CODE가 없고 '기타 어류(냉동)'품목으로 잡어도 포함되어 있어 정확한 수입량을 파악하기에 어려움이 있다. 따라서 수입산 미끼 상품에 대해 품목별로 HS-CODE를 할당하여 체계적으로 관리할 필요가 있다. 한편, 우리나라로 수입되는 새우는 2023년 기준 베트남산이 가장 많았다. 2023년 우리나라가 베트남으로부터 수입한 새우는 약 2,693톤으로 중국을 넘어섰다(Kfishinfo, 2023). 지금까지 조사한 국내 낚시 미끼용 시료 중 베트남산은 없었으나 식용 및 사료용 새우가 미끼용으로도 유통이 되는 만큼 베트남산 새우도 추후 미끼용으로 유통될 가능성이 높다. 따라서 베트남에서의 전염 사례 역시 조사할 필요가 있다. 한국은 미국, 중국, 일본, 스페인, 프랑스에 이어 세계에서 새우를 6번째로 많이 수입하는 국가이다. 2020년 기준 7억 3116만 달러를 수입하여 전세계 새우 교역량의 3.2%를 차지하고 있다(FAO, 2022). 따라서 우리나라로 새우를 수출하는 국가에 만연해 있는 갑각류 질병이 교역을 통해 우리나라로 유입될 위험성이 있다. 우리나라로 수입되는 새우는 활새우를 포함하여 냉동 및 건조 상태로 식품용과 사료용으로 수입되고 있으며 미끼용은 따로 분류되고 있지 않다. 관세청 수입 품목 분류상 미끼 새우는 일반 새우와 같은 품목으로 수입되고 있는데, 질병이 유행하는 국가에서 수입한 냉동 새우가 종종 미끼용 새우로 사용되는 것을 고려하면 이들이 유통될 경우 국내 양식장, 낚시장 및 수계에 새우 바이러스가 창궐할 우려가 있다. 현재 우리나라로 새우를 수출하는 국가에 유행하고 있는 수산질병에 관한 정보가 부족한 상태이며, 수출국 중 비위생적인 양식 환경과 가공 절차 등으로 인해 각종 수산질병이 발생할 가능성이 있기 때문에 각별한 주의가 필요하다.

한편, WSSV의 전염성 평가를 위한 인위감염 실험 결과, 대조군을 포함한 모든 그룹에서 흰다리새우의 폐사가 발생하였다. 육안으로 폐사체의 외부적 임상증상을 관찰하였으나 대표적 증상인 흰반점은 확인되지 않았다. 흰반점은 다양한 환경적 스트레스 요인에 의해서 발생할 수 있으며, WSSV에 감염된 새우 중에는 흰반점이 나타나지 않는 경우도 있다. 따라서 흰반점은 WSSV 감염의 신뢰할 수 있는 진단 증상이 아님에 유의해야 한다(WOAH 2023). 인위감염 실험에서 발생한 폐사는 WSSV에 의한 것이 아니라 기타 스트레스 요인에 의한 것으로 여겨진다. 폐사체의 조직으로부터 핵산을 추출하고 PCR 방법으로 질병을 검사한 결과 전부 음성이었는데, 먹이로서 급이했던 냉동 상태의 감염된 새우 조직이 실험군의 섭식으로 이동하는 과정에서 전염성이 약화된 것으로 추정된다. 동족포식이 거듭됨에 따른 질병의 확산 정도를 정확하게 파악하기 위해서는 추가적인 감염 역학연구가 필요하다. 본 연구의 인위 감염 실험에서 새우들의 습성인 동족포식이 빈번하게 관찰되었다. WSSV 전염의 주요 경로 중 하나인 동족포식(Hoa TTT et al., 2011)은 WSSV 확산의 주원인이며, 양식장 환경에서 바이러스의 전파를 촉진한다(Desrina et al., 2022; Soto and Lotz, 2001). 상대적으로 좁은 공간에서 고밀도로 사육하는 새우 양식장 특성상 갑각류의 습성인 동족포식은 빈번하게 일어난다. 이로 인한 WSSV 확산을 막기 위해서는 폐사체를 발견하는 즉시 수거하여 동족포식을 차단하는 등 양식장 단위에서도 질병 확산을 막기 위해 노력이 요구된다. 이것은 국내산 양식 새우가 미끼 상품으로 가공 · 유통되는 과정의 처음 단계이므로 질병의 확산을 차단하는 선제조치로서 중요하다. 이전 연구에 따르면 WSSV는 흰다리새우의 열 내성 범위와 겹치는 넓은 내열성을 갖는다. 흰다리새우는 최대 42℃의 수온까지 견딜 수 있으며 27~30℃에서 최적의 성장률을 보인다(Wyban et al., 1995). WSSV는 최대 50℃의 수온에서도 활성을 유지할 수 있고 자손의 복제는 15~35℃ 수온 범위에서 가능하며 25~28℃에서 최적의 복제가 일어난다(Millard et al., 2021). 50℃ 이상의 고온으로 120분간 노출하면 WSSV가 비활성화되지만(Nakano et al., 1998), 새우가 견딜 수 있는 한계 수온을 초과하여 양식장 새우에게는 폐사를 일으키므로 단편적인 사육수 온도 조절은 흰반점병(WSD)의 효과적인 제어 수단이 될 수 없다. 대신에 냉동 포장 상태의 국내산 및 수입산 제품에 대하여 이러한 고온 처리 방식으로 바이러스를 불활성화시키는 방식을 구상해볼 수 있을 것이다. 한편, TCBS agar에서의 Vp_{AHPND} 배양은 이루어지지 않았다. 이는 AHPND의 원인 병원체인 *V. parahaemolyticus*가 극저온 상태에서 유전체는 보존하였으나 세포의 구조가 손상되어 정상적인 배양이 불가능해진 것 때문이라 여겨진다.

AHPND에 감염된 냉동 새우가 국제 무역을 통해 AHPND를 확산시키는 원인이라는 가설을 제시한 이전 연구에서는, 침지 방식으로 새우를 AHPND에 감염시킨 후 2주간 −80℃로 냉동 보관하였다. 그 후 감염된 새우의 간췌장을 건강한 새우에 급이하였는데 118시간 이내에 70%의 개체가 폐사하였다(Lee et al., 2022). 극저온 상태에서 *V. parahaemolyticus*의 전염성과 독성이 유지된 사례가 보고된 만큼 냉동 새우에서의 AHPND 전염에 관한 추가적인 연구가 필요하다.

References

Andrade TPD and Lightner DV(2009). Development of a method for the detection of infectious myonecrosis virus by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification nucleic acid lateral flow hybrid assay, J. Fish Dis, 32(11): 911-924.
https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01072.x

Andree KB, Friedman CS, Moore JD and Hedrick RP, Antonio DB(2000). A polymerase chain reaction for detection of genomic DNA of a

Richettsiales-like prokaryote associated with withering syndrome in black abalone (*Haliotis cracherodii*), J. Shellfish Res, 19(1): 213-218. https://doi.org/10.1006/jipa.1999.4906

Aranguren LF, Mai HN, Nunan L, Lin J, Noble B and Dhar AK(2020). Assessment of transmission risk in WSSV-infected shrimp *Litopenaeus vannamei* upon cooking, J Fish Dis, 43(4): 403~411 https://doi.org/10.1111/jfd.13128

Aranguren LF, Tang KFJ and Lightner DV(2010). Quantification of the bacterial agent of necrotizing hepatopancreatitis (NHP-B) by real-time PCR and comparison of survival and NHP load of two shrimp populations, Aquaculture, 307(3-4): 187~192. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.07.022

Australian government department of agruculture (2019). Uncooked prawn consignments-Biosecurity, retrived from https://www.agriculture.gov.au/import/goods/uncooked-prawns/uncooked-prawn-consignments

Baek EJ, Jeong YJ, Jeong MA, Park JU and Kim KI(2022). Phylogenetic and pathogenic traits of YHV3 and IHHNV detected from imported frozen shrimp, J. Fish Pathol, 35(1): 27~40. https://dx.doi.org/10.7847/jfp.2022.35.1.027

Canadian food inspection agency(2019). General import requirements. retrived from https://www.inspection.gc.ca/food/importing-food/general-requirments/eng/152665464895/1526656465161

Chung WJ, Cui YJ, Chen CS, Wei WH, Chang RS, Shu WY and Hsu IC(2017). Freezing shortens the lifetime of DNA molecules under tension, J. Biol Phys, 43(4): 511~524. https://doi.org/10.1007/s10867-017-9466-3

Corbeil S, Colling A, Williams LM, Wong FYK, Savin K, Warner S, Murdoch B, Cogan NOI, Sawbridge TI, Fegan M, Mohammad I, Sunarto A, Handlinger J, Pyecroft S, Douglas M, Chang PH and Crane M st J(2010). Development and validation of a TaqMan PCR assay for the Australian abalone herpes-like virus, Dis Aquat Org, 92(1): 1~10. https://doi.org/10.3354/dao02277

Corre VR, Faisan JP and Kawagoshi RJC(2012). Evidence of WSSV transmission from the rotifer (*Brachionus plicatilis*) to the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) postlarvae and means to control rotifer resting eggs using industrial disinfectants, AACL Bioflux, 5(2): 64~68.

Cruz-Flores R, Mai HN, Kanrar SH, Aranguren Caro LF and Dhar AK(2020). Genome reconstruction of white spor syndrome virus (WSSV) from archival Davidson's-fixed paraffin embedded shrimp (*Penaeus vannamei*) tissue, Scientific reports, 10(1): 13425. https://doi.org/10.1038/s41598-020-70435-x

Dangtip ST, Sirikharin RC, Sanguanrut PC, Thitamadee SP, Sritunyalucksana KL, Taengchaiyaphum SP, Mavichak RP, Proespraiwong PR and Flegel TW(2015). AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus,* Aquaculture Reports, 2: 158~162. https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2015.10.002

Desrina, Prayitno SB, Verdegem MCJ, Verreth JAJ and Vlak JM(2022). White spot syndrome virus host range and impact on transmission, Review in aquaculture, 14(4): 1843~1860. https://doi.org/10.1111/raq.12676

Faisal M, Boonthai T, Loch TP, Zhang Q, Van deuren MG, Whelan GE and Herbst SJ(2018). Retail baitfish in Michigan harbor serious fish viral pathogens, J. Aquat Anim Health, 30(4): 253~263. https://doi.org/10.1002/aah.10034

FAO(2022). The state of world fisheries and aquaculture 2022, 38~54. https://doi.org/10.4060/cc0461en

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R and Vrijenhoek R(1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates, Mol Mar Biol Biotechnol, 3(5): 294~299.

Fringuelli E, Rowley HM, Wilson JC, Hunter R, Rodger H and Graham DA(2008). Phylogenetic analysis and molecular epidemiology of European salmonid alphaviruses (SAV) based on partial E2 and nsP3 gene nucleotide sequences, J. Fish. Dis, 31(11): 811~823. https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2008.00944.x

Gianville R, Neville P and Walker P(2017). White spot disease of prawns Queensland reponse 2016-17 scenario planning advisory panel report,

Queensland government policy, 3~31.

Goodwin AE, Peterson JE, Meyers TR and Money DJ(2004). Transmission of exotic fish viruses, Fisheries magazine, 29(5): 19~23. https://doi.org/10.1577/1548-8446(2004)29[19:TOEFV]2.0.CO;2

Han JE, Kim JE, Jo HY, Eun JS, Lee CR, Kim JH, Lee KJ and Kim JW(2019). Increased susceptibility of white spot syndrome virus-exposed *Penaeus vannamei* to *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease, Aquaculture, 512: 734333. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734333

Hasson KW, Fan Y, Reisinger T, Venuti J and Varner PW(2006). White-spot-syndrome virus (WSSV) introduction into the Gulf of Mexico and Texas freshwater systems through imported, frozen bait-shrimp, Dis Aquat Org, 71, 91~100. https://doi.org/10.3354/dao071091

Hoa TTT, Zwart MP, Phuong NY, Vlak JM and De jong MCM(2011). Transmission of white spot syndrome virus in improved-extensive and semi-intensive shrimp production systems: A molecular epidemiology study, Aquaculture, 313(1-4): 7~14. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.01.013

Hyatt AD, Gould AR, Zupanovic A, Cunningham AA, Hengstberger S, Whittington RJ, Kattenbelt J and Coupar BE(2000). Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses, Arch Virol, 145(2): 301~331. https://doi.org/10.1007/s007050050025

Janewanthanakul SPM, Supungul PRT, Tand SRR and Tassanakajon ACL(2020). Heat shock protein 70 from *Litopenaeus vannamei* (LvHSP70) is involved in the innate immune response against white spot syndrome virus (WSSV) infection, Dev Comp Immunol, 102, 103476. https://doi.org/10:1016/j.dci.2019.103476

Jang IK, Qiao G and Kim SK(2014). Effect of multiple infections with white spot syndrome virus and *Vibrio anguillarum* on pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (L.): mortality and viral replication, J. Fish Dis, 37(10): 911~920. https://doi.org/10.1111/jfd.12194

Japhette EKT, Rachel Z, Salsabeel W, Asaf B, Ezra R, Nischay Mishra, Thomas Briese, Lipkin WL, Richard MK, Hugh F, Jorge DP, Avi E and Eran B(2017). Detection of tilapia lake virus in clinical samples by culturing and nested reverse transcription-PCR, J. Clin Microbiol, 55(3): 759~767. https://doi.org/10.1128/jcm.01808-16

Kang KS, Woo WS, Kim KH, Son HJ, Son MY, Kong HJ, Kim YO, Kim DG, Kim EM, No ES and Park CI(2023). Identification of potential hazards associated with south korean prawns and monitoring results targeting fishing bait, Pathogen, 12(10): 1228. https://doi.org/10.3390/pathogens12101228

Kfishinfo(2023). Statistic database for trade status of domestic seafood by country. retrived from https://www.kfishinfo.co.kr/kor/view.do?no=625#none on December 27.

Kim HJ, Cuenca A and Olsen NJ(2018). Validation of a novel one-step reverse transcription polymerase chain reaction method for detecting viral haemorrhagic septicaemia virus, Aquaculture, 492: 170~183. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.03.047

Kurita J, Nakajima K, Hirono I and Aoki T(1998). polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA of red sea bream iridovirus (RSIV), J. Fish Pathol, 33(1): 17~23. https://doi.org/10.3147/jsfp.33.17

Kwon MG, Kim SM, Shin KW, Cho MY, Hwang SD, Seo JS, Hwang JY and Jee BY(2019). Epidemiological survey of infectious myonecrosis in farmed white leg shrimps (*Litopenaeus vannamei*) in Korea, Journal of fisheries and marine sciences education, 31(1): 94~99. https://doi.org/10.13000/JFMSE.2019.2.31.1.94

Lee CR, Jeon HJ, Kim BK, Choi SK, Kim SM, Jang GI, Kim JH and Han JE(2022). Infectivity and transmissibility of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease Associated Vibrio parahaemolyticus in Frozen Shrimp Archived at －80℃, fishes, 7(3): 125. https://doi.org/10.3390/fishes7030125

Lee KN, Lee KH, Huh JY and Lee DH(2022). Analysis of estimating fisheries resource catch amount in recreation fishing vessel, J. Korean Soc

Fish Ocean Technol, 58(1): 75~84.
https://doi.org/10.3796/KSFOT.2022.58.1.075

Liu SY, Rao M, Cowley JA, Morgan JAT, Barnes AC and Palmer PJ(2020). Polychaetes (*Perinereis helleri*) reared in sand beds filtering nutrients from shrimp (*Penaeus monodon)* culture ponds can transiently carry IHHNV, Aquaculture, 528(1): 735560.
https://doi.org/10.1016//j.aquaculture.2020.735560

Lo CF, Leu JH, Ho CH, Chen CH, Peng SE, Chen YT and Kou GH(1996). Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction, Dis Aquat Organ, 25(1-2): 133~141.
https://doi.org/10.3354/dao025133

Manatu ahu matua(2020). Supplementary import risk analysis: frozen fish and cephalopod molluscs for fish bait, Biosecurity Newzealand, 21~81.
ISBN No:978-1-004381-9(online).

Mccoll KA, Slater J, Jeyasekaran G, Hyatt AD and Crane M STJ(2004). Detection of white spot syndrome virus and yellowhead virus in prawns imported into Austraila, Aust Vet J, 82(1-2): 69~74.
https://10.1111/j.1751-0813.2004.tb14647.x

Michel C, Bruno M, Gilles B and Jean-robert B(1991). Viral infection associated with rotifer mortalities in mass culture, Aquaculture, 93(1): 1~7.
https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90200-Q

Millard RS, Ellis RP, Bateman KS, Bickley LK, Tyler CR, Aerle RV and Santos EM(2021). How do abiotic environmental conditions influence shrimp susceptibility to disease? A critical analysis focussed on white spot disease, J. Invertebr Pathol, 186: 107369.
https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107369

Nakano H, Hiraoka M, Sameshima M, Kimura T and momoyama K(1998). Inactivation of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), the causative agent of penaeid acute viremia (PAV), by some clinical and physical treatments, J. Fish Pathol, 33: 65~71.
https://doi.org/10.3147/jsfp.33.65

National Fishery Products Quality Management Service(2023). 2024 import inspection plan for aquatic organisms, Quarantine inspection department, 1.

Nunan LM, Poulos BT and Lightner DV(1998). Revverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used for the detection of Taura syndrome virus (TSV) in experimentally infected a shrimp, Dis Aquat Organ, 34(2): 87~91.
https://doi.org/10.3354/dao034087

Oidtmann B, Steinbauer P, Geiger S and Hoffmann RW(2008). Experimental infection and detection of *Aphanomyces invadans* in European catfish, rainbow trout and European eel, Dis Aquat Org, 82(3): 195~207.
https://doi.org/10.3354/dao01973

Palumbi SR and Romano S(1997). Molecular evolution of a portion of the mitochondrial 16s ribosomal gene region in scleractinian corals, J. Mol. Evol, 45(4): 397~411.
https://doi.org/10.1007/PL00006245

Poulos BT and Lightner DV(2006). Detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) of penaeid shrimp by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), Dis Aquat Org, 73(1): 69~72.
https://doi.org/10.3354/dao073069

Qiu L, Chen MM, Wan XY, Li C, Zhang QL, Wang RY, Cheng DY, Dong X, Yang B, Wang XH, Xiang JH and Huang J(2017). Characterization of a new member of *Iridoviridae*, shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV), found in whtie leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*), Sci Rep, 7: 11834.
https://doi.org/10.1038/s41598-017-10738-8

Qiu L, Chen MM, Wan XY, Zhang QL, Li C, Dong X, Yang B and Huang L(2018). Detection and quantification of shrimp hemocyte iridescent virus by TaqMan probe based real-time PCR, J. Invertebr Pathol, 154, 95~101.
https://doi.org/10.1016/j.jip.2j018.04.005

Rasmussn RS and Morrissey MT(2008). DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species, Compr. Rev. Food Sci. Food Saf, 7(3): 280~295.
https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2008.00046.x

Ross KS, Haites NE and Kellt KF(1990). Repeated freezing and thawing of peripheral blood and DNA in suspension: effects on DNA yield and integrity, J. Med Genet, 27(9): 569~570.
https://doi.org/10.1136/jmg.27.9.569

Saudi food and drug authority(2019). Import food requirments, retrived from
https://www.sfda.gov.sa/en/food/about/administration/management_food/Pages/Introduction.aspx

Soto MA and Lotz JM(2001). Epidermiological parameters of white spot syndrome virus infections in *Litopenaeus vannamei and L. setiferus*, J. Invertebr Pathol, 78(1): 9~15. https://doi.org/10.1006/jipa.2001.5035

Stone DM, Ahne W, Denham KD, Dixon PF, Liu CTY, Sheppard AM, Taylor GR and Way K(2003). Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp virus and pike fry rhabdovirus isolates reveals four genogroups, Dis Aquat Org, 27(53): 203~210. https://doi.org/10.3354/dao053203

Tang KFJ, Solangel A, Navarro SA and Lightner DV(2007). PCR assay for discriminating between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and virus-related sequences in the genome of *Penaeus monodon*, Dis Aquat Organ, 74(2): 165~170. https://doi.org/10.3354/dao074165

Trang TT, Hung NG, Ninh NH, Knibb W, Nguyen NH(2019). Genetic variation in disease resistance against whtie spot syndrome virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei*, Front Genet, 10, 264. https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00264

Tsofack JEK, Zamostiano R, Watted S, Berkowitz A, Rosenbluth E, Mishra N and Pozo JD(2017). https://doi.org/10.1038/s41598-020-70435-x

Tuffs SP and Oidtmann BG(2011). A comparative study of molecular diagnostic methods designed to detect the crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*, Vet Microbiol, 153(3-4): 343~353. https://doi.org/10.1016/vetmic.2011.06.012

VHSV Expert Panel and Working Group(2010). Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV IVb) risk factors and association measures derived by expert panel, Prev Vet Med, 94(1-2): 128~139. https://doi.org/10.1016/j.prevented.2009.11.020

Whittington RJ, Becker JA and Dennis MM(2010). Iridovirus infections in finfish – critical review with emphasis on ranaviruses, J. Fish Dis, 33, 95~122 https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01110.x.

WOAH(2023). Manual of diagnostic tests for aquatic animals. retrieved from https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/aquatic-manual-online-access/

Wyban J, Walsh WA and Godin DM(1995). Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*), Aquaculture, 138(1-4): 267~279. https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)00032-1

Yoganandhan K, Leartvibhas M, Sriwongpuk S and Limsuwan C(2006). White tail disease of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* in Thailand, Dis Aquat Organ, 69(2-3): 255~258. https://doi.org/10.3354/dao069255

Yuasa k, Ito T and Sano M(2008). Effect of water temperature on mortality and virus shedding in carp experimentally infected with koi herpesvirus, J. Fish Pathol, 43(2): 83~85. https://doi.org/10.3147/jsfp.43.83

• Received : 02 February, 2024
• Revised : 19 February, 2024
• Accepted : 23 February, 2024