

보리새우류의 바이러스 감염증의 진단

허문수[†] · 정초록* · 장경립*

제주대학교 해양과학대학 해양생산과학부

*부산대학교 자연과학대학 생명과학부

Diagnosis of Viral Infection of *Penaeide*

Moon-Soo Heo[†], Cho-Rok Jung* and Kyung-Lib Jang*

Faculty of Applied Marine science, College of Marine Science, Cheju National University, Cheju 690-756.

*Division of Biological Science, College of Natural Science, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract

Baculovirus(WSBV) was isolated from infected *Penaeide* was collected from shrimp farm at southern sea of Korea from 1993 to 1995. The Infectious virus was purified and used for diagnosis of infected shrimp. Anti-viral serum were used for immunological detection as enzyme linked immunoabsorbent assay(ELISA) and indirect fluorescent antibody technique(IFAT). In IFAT, stomach, lymphoid organ and antennae gland of infected shrimp showed fluorescent reaction. In ELISA, tissues of spontaneously infected shrimp appeared higher O.D. values than in artificial infected shrimp. Primer set was constructed from sequence of 420bp of cloned Baculovirus(WSBV) genome. Specific band for infected shrimp was detected in Polymerase chain reaction(PCR)

Key words - *Penaeide*, Baculovirus(WSBV), ELISA, IFAT, PCR

서론

보리새우류(Penaeidae)는 세계적으로 양식되고 있는 새우류중의 하나이다. 최근에 보리새우류 양식생산량이 급감하였는데 이는 중국, 인도네시아, 에쿠아도르 및 일본 동지에서 양식산 새우의 대량폐사가 일어났기 때문이다 [2,3,7].

우리나라에서는 1960년도 서해안에서 보리새우 양식이 처음 시작되었으나 기술과 경험부족으로 많은 어려움을 겪다가 1980년대에 인공부화 생산기술이 확립되고 국내의

시장수요가 증가함에 따라 새우 양식산업이 발달하여 1990년대에는 새우 양식장이 서, 남해안에 130여개소에 이르고 있다[18]. 우리나라에도 인근의 새우 양식국가에서와 같이 1993년 이래로 해마다 난치성 전염병이 발병하여 서해안 새우 양식장에 큰 타격이 되고 있다. 이러한 양식산 새우의 대량폐사의 원인으로 바이러스, 세균, 기생성 질병등이 보고 되고 있다[10,11].

새우에서 질병을 일으키는 바이러스종은 약 15여종에 이르고, 이들 바이러스는 환경, 수온, 지역 및 숙주 특이성에 따라 발병율과 발병되는 지역이 차이가 있다[8]. 새우

[†] Corresponding author

에서 대량 폐사를 일으키는 baculovirus로는 BP(baculovirus panaei)[6], MBV(monodon baculovirus)[11,15,27], BMNV (baculovirus midgut gland necrosis virus)[22]등이 보고되고 있다.

최근에는 일본, 중국에서도 양식산 새우가 대량폐사가 일어난 바 있고 우리나라에는 1993년 이래로 계속 발병되고 있다. 그래서 전세계적으로 주요 새우양식국가에서는 새우 바이러스성 질병으로 인한 피해를 최소화하기 위해 많은 연구를 수행해 오고 있는 실정이다. 그중에서 원인 바이러스를 분리하는 방법으로는 면역학적인 방법과 분자생물학적 방법등이 소개되어있다[19,21,24].

저자들은 한국 서해안의 새우의 대량폐사를 일으킨 태안, 고창, 영광의 새우 양식장으로 부터 시료를 채집하여 원인 바이러스를 분리하여 그 특성을 보고한바 있다. 분리된 바이러스는 Bculovirus의 일종이었으며 감염새우의 증상 때문에 White Spot Syndrome Baculovirus(WSBV)로 명명되었었다. 그리하여 본 연구에서는 바이러스를 순수 분리하여 진단에 사용하였다.

먼저 면역학적 진단을 위해 분리된 바이러스로 면역을 실시하여 항혈청을 만들었다. 항혈청으로 효소 면역항체법(ELISA)와 형광항체법(IFAT)를 실시하였고, 바이러스의 genome을 제한효소로 절단하여 clone하고 서열을 분석하여 특이적인 primer를 합성하여 polymerase chain reaction (PCR)을 실시하였다.

재료 및 방법

실험새우 및 바이러스분리

1993-1995년 사이에 한국 서해안에서 병든양식 보리새우(*Penaeus japonicus*)와 대하(*Penaeus chinensis*)로부터 바이러스(Baculovirus(WSBV))를 분리하였다. 병든 새우로부터 WSBV의 분리방법은 다음과 같았다. 위상피, 표피, 림프기관, 간체장 등의 두흉부 20 g을 80ml의 PBS에 넣어 4℃의 저온상태에서 유탕에 갈아서 7,000×g에 15분간 원심분리를 하고 그 상층액을 200,000×g에 2시간 동안 초원심분리를 하였다. 침전된 pellet을 3배량의 PBS에 넣어 현탁시킨 후 7,000×g에서 5분간 재원심분리를 하여 상층액을 sucrose (20~50% w/w) 농도구배에서 100,000×g에서 3시간 동안 초원심분리하여 바이러스를 분리하였다.

항혈청 제조

새우 바이러스를 순수 분리한 후 바이러스 농축액 1ml (바이러스량 100 μ g/ml)와 Freund's complete adjuvant (FCA, Difco) 1ml를 주사기로 잘 혼합하여 뉴질랜드산 흰토끼 수컷 (약 2kg)의 견갑골에 1.2ml, 양대퇴부에 0.4ml씩 주사하고 3주후에 바이러스 농축액 1ml와 Freund's incomplete adjuvant (FIA, Difco) 1ml를 같은 방법으로 재접종한 다음 3주 후에 최종적으로 바이러스 농축액만 1ml 접종하였다. 1주 후 귀동맥에서 채혈하여 최종항체를 ELISA를 통해 확인한 결과 1: 24,000이었고, 항체가 확인 후 심장에서 전채혈하여 실온에서 1시간 방치하여 응고시킨 후 10시간 정도 냉장고에서 정치시켰다가 1,500×g에서 10분간 원심분리하여 항혈청을 분리하였고, 분리된 항혈청을 -20℃에 동결보존하면서 실험에 사용하였다.

간접 형광항체법(IFAT)

병든 새우의 바이러스 입자확인은 Jor Gensen (1974)의 간접형광항체법 (indirect fluorescent antibody technique)으로 실시하였다. 즉 자연감염 새우와 인위감염 새우의 장기 조직을 cryostat에서 두께 4 μ m로 절단하여 무형광 슬라이드 (Matsunami class ind. LTD)에 부착시켜 30분간 건조시킨 후 아세톤으로 4℃에서 30분간 전처리하고 건조시킨다. 이 후 새우 바이러스 항원으로 면역시켜 얻은 rabbit anti shrimp virus serum ($\times 40$)으로 37℃로 유지된 습윤상자에서 1시간 동안 1차 반응시켰다 그 후 10 μ g/ml로 조정된 goat anti-rabbit IgG conjugated FITC (Sigma)로 20℃에서 60분간 2차 반응시킨 후 PBS로 3회 수세하고 탄산, 중탄산 무형광 글리세린 (pH 8.5)으로 봉입해서 형광항체현미경 (Nikon, $\times 1,000$)으로 형광항체 반응정도를 관찰하였다.

효소면역항체법(ELISA)

자연감염 및 인공감염시킨 새우 장기조직내의 바이러스 감염여가는 Clark and Adam (1977) 방법에 준해 효소 면역항체법 (Enzyme linked immunosorbent assay)으로 실시하였다. 새우양식장에서 자연감염된 보리새우 5마리 (체장 평균 14.3cm)와 바이러스 접종후 5일째 경과한 인공 감염 보리새우 5마리(체장 평균 15cm)의 각 장기조직을 마쇄하여 DMEM(Dubelco modified egle's medium)으로 10배 희석한 다음 혈액원심분리기로 5분간 원심한 상층액을

결 과

취해 0.5M Carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6)로 10단 계씩 희석하여 ELISA plate (Nunc)에 200 μ l씩 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 처리하였다. 이후 PBS-Tween 20 으로 3회 세척하고 1% Bovine serum albumin-PBS로 실온에서 2시간 반응시켰다. 이어서 PBS-Tween 20으로 500배 희석한 goat-anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase (Sigma)를 첨가하여 실온에서 2시간 반응시킨 후, PBS-Tween 20으로 3회 수세하고 p-nitrophenyl phosphate용액 (1mg/ml in 9.7% v/v diethylamine, pH 9.8)으로 20분간 발색시킨후 1M NaOH로 반응을 중지시킨 다음 microplate reader (CLS 962)로 405nm에서 흡광도를 측정하여 장구조 직별 바이러스 감염 여부를 확인하였다.

PCR을 이용한 바이러스검출

PCR primer의 준비

Virus에 감염된 새우시료로부터 20-50% sucrose gradient법으로 virus를 분리한후 C.C. Lu[27]방법에 따라 바이러스 DNA를 분리하였고 분리된 DNA는 Sau3A로 digestion하였고, 이것을 vector PTZ 18R의 Bam HI site에 삽입하여 얻은 다수의 재조합 clone중 positive clone에 대해 dideoxy법으로 sequencing작업을 실시하여 약 400bp의 염기서열 결과를 얻었다. 이것을 바탕으로 하여 P1; 5'-ATCTGATGAGACAGCCCCAAG-3', P2; 5'-GGGAATGTTAAATATGTATCCG-3'의 primer세트를 (주)한국생공에 의뢰하여 제작, 정제하였다.

Total DNA의 분리

Virus에 감염된 새우에 대해 위상피와 표피를 적출하여 완전히 마쇄한 뒤, alkaline처리법에 의해 분리하였다. DNA의 분리여부는 0.7% agarose gel을 이용한 전기영동에 의해 확인하였다.

PCR증폭

PCR 반응은 총 50 μ l의 volume으로 행하였으며, 그 조성은 (주)한국생공의 Pre-mix 2 μ l, 100pM의 각 primer, 10ng의 template DNA를 사용하였다. PCR machine은 Perkin-Elmer사의 제품을 이용하였고, 반응조건은 94 $^{\circ}$ C에서 30초간 열변성, 55 $^{\circ}$ C에서 45초간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 45초간 polymerization (extension)시켰다. 이것을 30회 반복하여 산물을 얻었다. 증폭된 산물은 1.5% agarose gel을 이용한 전기영동에 의해 viral DNA band를 확인하였다.

바이러스 분리 항 혈청제조

수집된 병든 새우의 조직으로부터 바이러스를 분리하기 위해 20-50%(w/w) sucrose 농도구배 초원심분리를 한 결과, 30%부근에서 바이러스 침강선을 볼 수 있었다 (Fig. 1). 분리된 바이러스 분획을 항원으로 하여 얻은 항 혈청의 역가는 ELISA로 측정하였을 때 마지막주에 1: 24,000이었다.

간접형광 항체법(IFAT)

바이러스를 면역하여 제작한 혈청으로 자연감염새우및 인공감염새우의 각 장구조직내에서 존재하는 바이러스를 간접형광항체법(IFAT)으로 관찰하였다 (Table 1와 Fig. 2, 3). 그 결과, 자연감염 새우와 인공감염새우의 위상피, 림프기관, 촉각선에서는 밝은 형광반점이 나타났고 간췌장에서는 희미한 형광반점이 나타났다.

효소 면역 항체법(ELISA)

바이러스를 면역하여 제작한 혈청으로 실시한 효소 면역 항체법(ELISA)에서는 Table 2에서 나타난 바와 같이

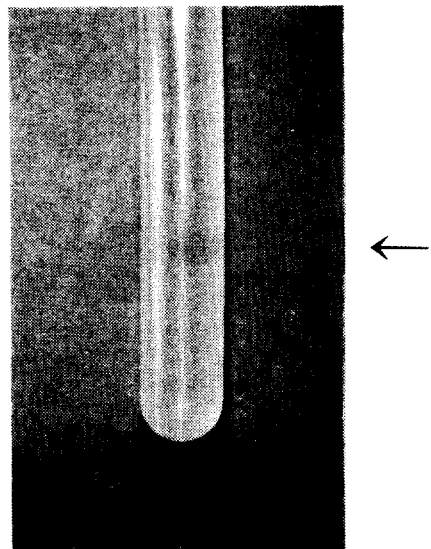


Fig. 1. The band of viral particles formed by ultracentrifugation in 20-50% sucrose gradient.

Table 1. Anatomical distribution of viruses in infected penaeid shrimp by indirect fluorescent antibody test

Shrimp	Organ			
	Hepatopancreas	Stomach	Lymphoid	Antennae gland
SI*	+	+++	+++	++
AI**	+	+++	+++	++
HS***	±	±	±	-

±: Faint fluorescence, +: Distinct fluorescence, ++: Clear fluorescence, +++: Intensive fluorescence.

*Spontaneously infected penaeid shrimp, **Artificially infected penaeid shrimp, ***Healthy shrimp.

자연감염 새우와 인공적으로 감염된 새우의 장기내의 405nm에서 O.D.값은 자연감염, 인공감염, 건강한 새우의 순으로 높게 나타났다. 자연감염된 새우의 hepatopancreas, stomach, lymphoid organ에서는 O.D.값이 1.04~1.21로 나타났다으며, 인공감염된 새우의 조직에서는 0.98~1.11사이의 O.D.값을 나타내었다. 그러나 건강한 새우의 조직에서는 0.30의 O.D.값을 나타내었다.

PCR을 이용한 바이러스 검출 primer 제작

WSBV의 genome을 클로닝하여 선택된 positive clone 의 약 400bp의 염기서열은 Fig. 3과 같았다. 이중 primer

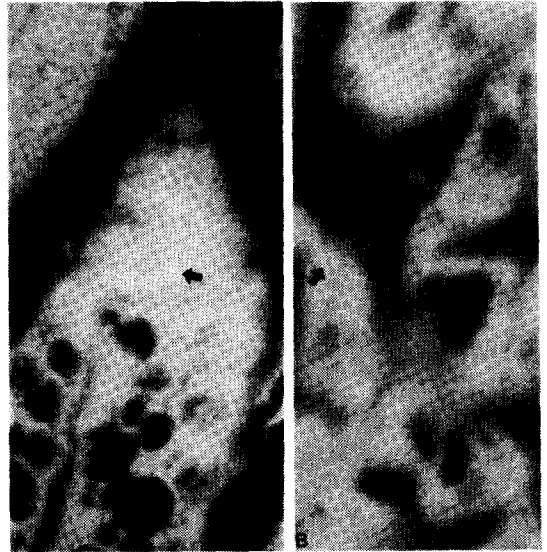


Fig. 2. Specific fluorescence in target organ of the spontaneously infected shrimp (× 1,000).

- (A) Stomach.
- (B) Hepatopancreas.

P1은 34번 염기로부터 52번까지 (P1; 5'-ATCTGATGAGACAGCCCAAG-3') 염기로 구성하였으며, P2는 377로부터 397번 (P2; 5'-GGGAATGTAAATATGTATCGG-3')의 서열로 구성하였다.

Table 2. Penaeid shrimp virus titers in organs of diseased shrimp by enzyme-linked immunosorbant assay

Shrimp	Organ	Dilution of organ homogenate*			
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
SI***	Hepatopancreas	1.04**	0.94	0.64	0.54
	Stomach	1.21	0.91	0.53	0.48
	Lymphoid organ	1.11	0.88	0.52	0.48
AI****	Hepatopancreas	0.98	0.74	0.41	0.38
	Stomach	1.11	0.96	0.71	0.50
	Lymphoid organ	0.98	0.82	0.50	0.38
HS*****	Hepatopancreas	0.43	0.39	0.39	0.33
	Stomach	0.51	0.39	0.37	0.34
	Lymphoid organ	0.54	0.38	0.37	0.31

*All the organ homogenates were adjusted to the initial concentration of 0.1g/ml, **O.D at 405nm, ***Spontaneously infected penaeid shrimp, ****Artificially infected penaeid shrimp, *****Healthy shrimp.

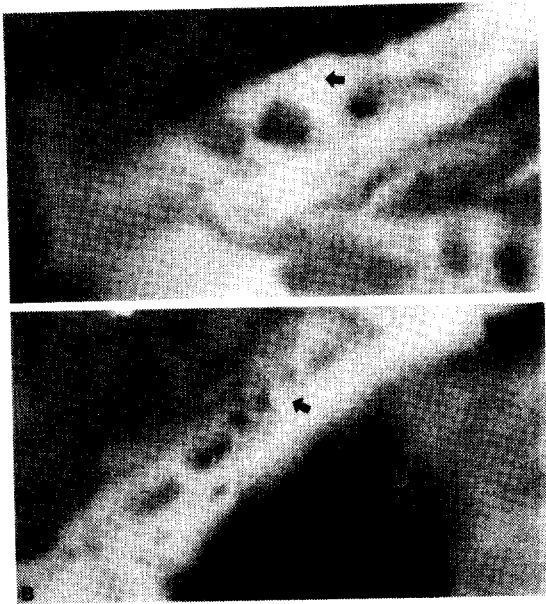


Fig. 3. Specific fluorescence in target organ of the artificially infected shrimp ($\times 1,000$).
(A) Stomach.
(B) Antennae gland.

PCR

위에서 제작된 primer set를 이용하여 감염된 새우로부터 바이러스 검출을 시도한 결과, Fig. 4 같은 결과를 얻었다. 태안, 고창, 영광에서 채집된 감염된 새우에서 특이 밴드가 나타났으나 건강한 새우에서는 나타나지 않았다.

P1

1 ggatccaatt gttgagagat ttgtcacaac taaatctgat gagacagccc aagttgtaa
 61 acaggccgtt gatgaaaaat acgatgaatt attagaagat aaggttgaag aatgagacc
 121 ggataatac aatgaagcat ccgaacata lgataacttg ctgctgatat gataagagag
 181 gtgacacta gtagtgttat tgcctctgca agtgcctgca cagtggcaag aactatcaat
 241 aatttaagag ataaaaggaa agaatafgaa aagaggetat ggacattagc ctacaaacca
 301 tggagaagat atgtacaagc aattacagtg atggaatttc gttatcata taaagacctg
 361 actgctcatg ccaattccga tacataattta acattcccit ttttaagaat aaaaaagatc
 P2

Fig. 4. Nucleotide sequence of the WSBV recombinant clone pTZ18RS1.
Underline show location of used primer set (P1, P2).

고찰

현재 보리새우류(Penaeidae)에 질병을 일으키는 것으로

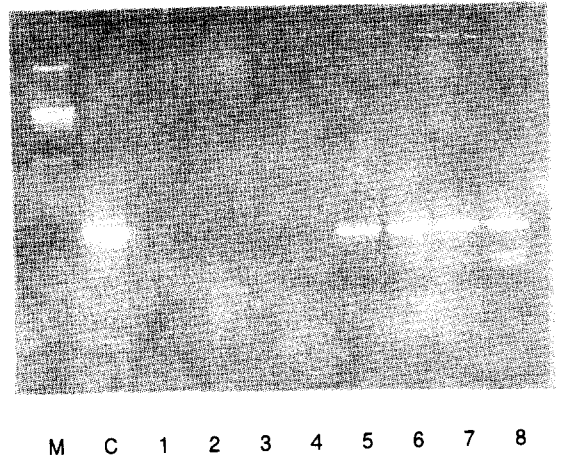


Fig. 5. Electrophoresis of PCR product of viral DNA.
Line; M: λ -Hind III size marker.
C: positive plasmid
1: PCR product of uninfected shrimp in Taeon 1.
2: PCR product of uninfected shrimp in Taeon 2.
3: PCR product of uninfected shrimp in Kochang.
4: PCR product of uninfected shrimp in Younggwang.
5: PCR product of infected shrimp in Taeon 1.
6: PCR product of infected shrimp in Taeon 2.
7: PCR product of infected shrimp in Kochang.
8: PCR product of infected shrimp in Younggwang.

알려진 바이러스로는 Baculovirus penaei[6] 및 Monodon baculovirus[8,13,14], Baculoviral mid-gut gland necrosis virus[22], Plebejus baculovirus, Yellow head disease baculovirus등 5종의 baculovirus[3,27]외에 Polydnavirus로 추정되는 Penaeus hybrid rod shaped virus, Hepatopancreatic parvo-like virus, Parvo-virus[23]로 추정되는 전염성 피하 및 조혈기 괴사증(Infected hypodermal and hematopoietic necrosis virus)[7,18]등이 보고되어 있다.

바이러스를 검출하기 위해 연구자들은 지금까지 면역학적방법과 조직학적 방법을 사용하여왔다[19,21,24]. 면역학적 방법으로는 바이러스의 특이항원로부터 제조된 항혈청으로 효소면역항체법(ELISA)[10,11,17,25]과 형광항체법(IFAT)[20]을 실시하는 것이다. 이 방법들은 바이러스 항원과 특이적인 1차 항체와 다시 결합 할 수 있는 항체에 효소나 형광물질을 결합시켜 항원과 항체의 반응 정도를 관찰하는 것이다. 최근에는 분자생물학의 발전에 더불어 특정 유전자의 증폭이 polymerase chain reaction (PCR)법

[28]으로 쉽게 이루어 질수 있게 되었다. 저자들은 서해안의 양식장에서 일어난 새우폐사의 원인체인 바이러스를 분리하여 특징을 규명한바 있다. 본 연구에서는 분리된 바이러스를 면역하여 얻은 혈청을 이용하여 감염된 조직으로부터 효소면역항체법(ELISA)과 간접 형광항체법(IFAT)을 실시하여 바이러스 진단에 이용하고자 하였다. 효소 면역항체법(ELISA)에서는 자연감염된 조직에서 가장 높은 반응을 나타내었다. 감염조직의 마쇄액의 농도에 감소함에 따라 반응도 낮게 나타났다. 그러나 건강한 새우에서는 마쇄액의 농도에 관계없이 평균 0.30대의 값을 나타내어 항혈청을 이용한 ELISA법은 조직내의 바이러스의 검출에 이용이 가능한 것으로 나타났다. 형광항체법(IFAT)에서는 위상피, 안테나 gland, 림프구의 세포질에서 바이러스 입자의 증식에 의한 형광반점을 관찰할수 있었다. 이러한 결과에서 볼때 바이러스의 표면 단백질중 immunodominant한 단백질을 찾아 이에 대한 단클론 항체를 생산한다면 효소면역항체법과 형광항체법을 이용하여 본바이러스의 검출에 활용할 수 있을것으로 사료된다.

WSBV의 전체 viral genome으로 부터 cloning하여 얻은 약 400 bp의 염기쌍을 바탕으로 제작한 primer set를 가지고 PCR법을 실시하여 바이러스 검출에 이용하고자 하였다. PCR 실시 결과, 전술한 면역학적 방법과 동일하게 바이러스감염을 확인할수 있었다. PCR은 기존의 방법에 비해 신속성이 뛰어난 특징을 가지고 있으므로 이러한 진단법의 정확성, 특이성을, 발전시킨다면 양식 새우의 Virus성 질병의 조기진단에 활용할 수 있을것으로 생각된다.

요 약

1993년부터 1995년 6월에서 9월에 걸쳐 발생한 양식 새우 *Penaeus chinensis*와 *Penaeus japonicus*의 대량 폐사때 분리한 바이러스로 항혈청과 PCR primers를 제작하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

분리된 바이러스로 만든 항혈청으로 간접 형광항체법(IFAT)을 이용하여 감염된 새우의 조직에서 바이러스의 존재를 확인한 결과, 위상피, 림프기관, 촉각선에서는 밝은 형광반점이 나타났고 간체장에서는 희미한 형광반점이 나타났다. 그러므로 분리된 바이러스는 간체장 보다 위상피 등의 기관에서 더 잘증식하는 것으로 사료되었다.

효소 면역항체법(ELISA)을 실시한 결과, 자연감염 새우와 인위적으로 감염된 새우의 장기내의 O.D.값은 자연감염, 인위감염, 대조군의 순으로 높게 나타났다.

WSVB의 viral genome positive clone의 염기서열 분석을 통해 P1; 5'-ATCTGATGAGACAGCCCAAG-3', P2; 5'-GGGAATGTAAATATGTATCCG-3'의 primer를 제작하였다. 이 primer로 PCR을 실시하여 본 바이러스에 특이한 밴드를 확인하였다. 그러나 건강한 대조군에서는 밴드가 나타나지 않았다.

참 고 문 헌

1. Adams, J. R., Mc Clintock, J. T. 1991. Baculoviridae. Nuclear polyhedrosis viruses. Part I. Nuclear polyhedrosis virus of insects. In: Adams JR, Bonami JR(eds) Atlas of invertebrate viruses. CRC press, Boca Raton, p987-204.
2. Anonymous Asian shrimp News, 2nd Quarter, No 14, Bangkok, 1993.
3. Baozhen P., R. Jiaming, S. Juying, Z. Guoying, G. Huiting, S. Yalin, E. Guoxing and G. Zuxun. 1995. The study on baculovirus - caused of prawns(*penaeus chinensis* OSBECK) in Shanhai suburb. *Chinese J. Virol.*, **11**, 151~157.
4. Bell, T. A. and Lightner, D. V. 1987. IHNV disease of *penaeus stylirostris* : Effects of shrimp size on disease expression. *J. Fish. Disease*, **10**. 165-170.
5. Bell, T. A., Lightner, D. V. 1988. A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture society, Baton Rouge.
6. Brock, J. A. and Lightner, D. V. 1990. Diseases of Crustacea, Disease caused by microorganisms. In Disease of marine animals, vol.3, pp.245-349, ed., kinne, O., John Wiley & Sons, New York.
7. Chinese Yellow Sea Fisheries Institute. 1995. *Marine Fisheries Research*. **16**, No.1.
8. Cole, R. M., Tully J. G., Popkin T. G. and Bove, J. M. 1973. Morphology, ultrastructure and bacteriophage infection of helical mycoplasma like organism (*spiroplasma citi* gen. nov., sp. nov.) cultured from "stubborn" disease of citrus. *J. Bacteriol.*, **115**, 367-386.
9. Coons A. H. 1958. Fluorescent antibody method. *Generalcyto chemical Methods*(ed. by J. F. Danielli). pp.85-129 Academic Press, New York.
10. Dixon, P. H. & Mill. B. J.: Rapid detection of infectious pancreatic necrosis virus(IPNV) by the

- Enzyme-linked immunosorbant assay(ELISA). *J. Gen. Virology*, **64**, 321-330.
11. Fegan, T. W., Flegel, D. F., Kongsom, S., Vuthikornudomkit S, Sriurairatana S, Boonyaratpalin S, Chantanachookhin C, Vickers JE, Macdonald OD. 1992. Occurrence, diagnosis and treatment of shrimp disease in Thailand. In: Fulks W, Main KL(eds) Disease of cultured penaeid shrimp in Asia and the United States. Oceanic Institute, Honolulu, p.57-112.
 12. Fegan, D. F., Flegel, T. W., Sriurairatana, S., Waiyakruttha, M. 1991. The occurrence, development and histopathology of monodon baculovirus in *Penaeus monodon* in southern Thailand. *Aquaculture*, **96**, 205-217.
 13. Francki, R. I. B., Fauquet, C. M., Knudson, D. L., Brown, F.(eds). 1991. Classification and nomenclature of viruses, 5th report of the International committee on taxonomy of viruses. Springer -Verlag, New York.
 14. Fukuda, H., Momoyama, K., Sano, T. 1988. First detection of Monodon Baculovirus in Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 45-48.
 15. Heiji, N., Hiroshi, K., Statoshi, U., Kazuo, M., Midori, H., Kiyoshi, I. and Norihisa, O. 1994. Mass Mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: Epizootical survey and Infection *Trials. Fish. Pathol.*, **29**, 135-139.
 16. Heo, M. S., J. W. Ju., C. R. Jung. 1998. Viral disease of the *Penaeus japonicus* and *Penaeus chinensis*. *J. Korean Soc. Microbiol.*, **33**, 381-389.
 17. Kelley, D., Edwards, M. L., Evans, H. F. & Robertson, J. S. 1978. The use of the Enzyme-linked immunosorbant assay to detect nuclear polyhedrosis virus in *Heliothis armigera* larvae. *J. Gen. Virology*, **40**, 460-469.
 18. Kim, J. H., Lee, J. H. 1993. The culture of Shrimp, Academic Press.
 19. Kimura, T., Yamano, K., Nakano, H., Momoyama, K. Hiraoka, M. and Inouye, K. 1996. Detection of Penaeid Rod-shapes DNA virus(PRDV) by PCR. *Fish Pathol.*, **31**, 93-98.
 20. Lewis, D. H. 1986. An Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) for detecting penaeid baculovirus. *J. Fish. Pathol.*, **9**, 519-522.
 21. Lightner, D. V., L. L. Mohny, R. R. Willams and R. M. Redman. 1987. Glycerol tolerance of IHHN virus of penaeid shrimp. *J. World Aquacult. Soc.*, **18**, 196-197.
 22. Lightner, D. V., Poulos, B. T., Bruce, L., Redman, R. M., Mari, J. and Bomami, J. R. 1992. New developments and in penaeid shrimp virology: Application of biotechnology in research and disease diagnosis for shrimp viruses of concern in the Americas. In "Proceeding of the Diseases of cultured penaeid shrimp in Asia and the United States"(ed. by W. Fulks and K. L. Main) The Oceanic Institute, 234-253.
 23. Lightner, D. V. and Redman, R. M. 1981. A baculovirus caused disease of penaeid shrimp, *Penaeus monodon*. *J. Invertebr. Pathol.*, **38**, 299-302.
 24. Lightner, D. V. and Redman, R. M. 1985. A parvovirus-like virus disease of penaeid shrimp. *J. Invertebr. Pathol.*, **45**, 47-53.
 25. Lightner, D. V.: A review of diseases of cultured penaeid shrimp and prawns with emphasis on recent discoveries. and developments. In Proc. 1st Intern. Conference on the culture of enaeid prawns/ shrimps, Iloilo city, philippines(1994), pp.79-103, SEAFDEC Aquaculture Dept., Iloilo(publ).
 26. Longwarth, J. F. & Carey, G. P. 1980. The use of an indirect Enzyme -linked immunosorbant assay to detect baculovirus in larvae and adult of *Oryctes rhinoceros* from Tonga. *J. Gen. Virology*, **47**, p.431-438.
 27. Lu, C. C., Tang, K. F. J., Kou, G. H. and Chen, S. N. 1993. Development of a *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV) DNA probe by polymerase chain reaction and sequence analysis. *Journal of Fish Diseases*, **16**, 551~559.
 28. Momoyama, K. M., Hiraoka, K., Inouye, T. Kimura and H. Nakano. 1995. Diagnostic techniques of the rod shaped nuclear virus infection in the Kuruma shrimp, *penaeus japonicus*. *Fish pathol.*, **30**, 263-269.
 29. Van der Wilk, F. Van. Lent, J. W. M. and Valk, J. M. 1987. Immunological detection of polyhedrin, p10 and virion antigen in autographa californica nuclear polyhedrosis virus-infected *spodoptera frugiperda* cells, *J. Gen. Virology*. **68**, 2615-2623.