

수입산 냉동 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*) 두흉갑의 흰 반점 육안 및 현미경 관찰

김보성 · 박효진 · 이대욱 · 이무근 · 김은전* · 강재연*†

부산검역관리조합

*국립수산물품질관리원 부산지원

Macroscopic and microscopic observation of white spot in carapace of imported white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*

Bo Seong Kim, Hyo Jin Park, Dae Uk Lee, Mu Kun Lee,
Eun Jeon Kim* and Jae Youn Kang*†

Busan Quarantine Management Union, Busan 49277, Korea

*National Fishery Products Quality Management Service, Busan 48943, Korea

In this study, white spots appearing in carapace of imported white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* were observed by macroscopic and microscopic examination. White spots due to white spot disease showed two types, white spots with a regular circular shape ranging from 0.4 mm to 1.7 mm and white spots with an irregular shape ranging from 0.05 mm to 2 mm. White spots due to other causes showed four types that appeared as crystalized materials in range of 100 μm around the tegumental gland, as polygonal inorganic deposits ranging from 58 μm to 188 μm, as Linear inorganic deposits ranging from 0.8 mm to 9 mm, as brownish spots ranging from 0.1 mm to 0.4 mm, and brownish spots containing melanin ranging from 0.1 mm to 2 mm. As a result, white spots occurred in imported white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* were divide two type, due to white spot disease or other causes, for quarantine works.

Key words: White spot, White spot syndrome disease, White leg shrimp, *Litopennaeus vannamei*, Imported shrimp

수산생물질병 관리법(법률 제16209호) 제 27조 및 동법 시행규칙(해양수산부령 제291호) 제 25조 관련의 지정검역물의 기존 범위에서 새우류가 추가로 확대되어 시행됨에 따라, 수입 새우류는 수산

생물전염병 검역대상으로 검역이 실시되고 있다 (MGL, 2019). 수출입 수산생물 지정검역물의 검역 방법 및 기준 등에 관한 고시(국립수산물품질관리원 고시 제2018-4호) 제2조 관련으로 수산물의 검역 방법은 서류 검사, 임상 검사, 정밀검사로 나뉘어져 있으며, 서류 검사는 검역 신청서류 등을 검토하여 적합 여부를 판단하는 검사, 임상검사는 지정검역물의 유영 및 행동의 정상 여부, 외부조건, 해부학적 소견을 종합하여 적합 여부를 판단하는

제1저자는 발행일자 기준 국립수산물과학원 전략양식부 수산방역과에 소속되어 있음.

†Corresponding author: Jae Youn Kang

Tel: +82-51-602-6001, Fax: +82-51-602-6088

E-mail: kangjy94@korea.kr

검사, 정밀검사는 병리조직학·분자생물학·혈청학·생화학·물리화학 및 미생물학적 분석방법 등에 따라 실시하는 검사로 정의하고 있다. 최초로 국내에 수입하는 수출국·품종(학명)·생산시설의 지정 검역물에 한하여 최초 정밀검사를 실시하며, 지정 검역물이 합격 처분을 받으면 이후 수입 지정검역물들은 임상검사 또는 정밀검사로 진행된다. 지정 검역물의 임상검사 결과에서 이상 징후가 나타나는 지정검역물은 정밀검사로 전환되어 진행되며, 불합격 처분을 받을시 동일국·동일품종(학명)·동일 생산시설의 지정검역물은 수입검역 신청횟수를 기준으로 추후 5회까지 정밀검사로 진행된다. 따라서, 임상검사 진행시 수산생물전염병에 의한 특징적인 증상의 정확한 구분이 매우 중요한 것으로 대두되고 있다. 하지만, 일부 수산생물전염병에 있어 특징적인 임상소견이 외부환경 내지 기타 원인에 의해 발생할 수 있는 여건을 가지고 있는 것으로 나타나며, 원활한 검역 진행을 위해 해당 증상의 소견이 필수적으로 구분되어야 한다.

2018년 4월 1일부터 2019년 2월 15일까지 수입산 냉동 및 냉장 새우의 총 검역건수 1,647 건 중, 냉동 및 냉장 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*) 검역건수가 1,317건으로 수입 건수에서 차지하는 비중이 높은 것으로 나타났다. 해당 흰다리새우의 부적합 건수는 19건으로 나타났으며(NFQS, 2019), 부적합 사유의 다수는 WSD (White spot disease) 양성에 의한 것으로 나타났다. WSD는 지정검역물의 수산생물전염병 항목 중 하나이며, 갑각류의 갑각의 흰 반점 생성을 특징으로 하는 Nimaviridae 과의 white spot syndrome virus(WSSV)의 감염에 의해 발생하는 질병이다(Lightner 2011, Thitamadee *et al.* 2016). 하지만, 새우 두흉부에서 생성된 흰 반점은 WSD 이외에도 세균성 및 환경적 요인에 의해서 발생할 수 있는 것으로 보고되고 있다(Sahoo *et al.* 2005, Johnson 1989). 일부 문헌에서 세균성 및 WSD에 의한 흰 반점의 육안 사진과 현미경 사진을 보고하였지만(Bondad-Reantaso *et al.* 2001, Sahoo *et al.* 2005), 실제 수입 냉동새우의 검역에서 나타나는 소견에서는 상기의 원인 외에 다른 원인으로 생각되는 흰 반점도 관찰된다.

본 연구는 수입산 냉동 흰다리새우에서 나타나

는 흰 반점을 WSD에 의한 흰 반점과 기타 요인에 의한 흰 반점으로 구별, 정의하기 위해 흰 반점이 발생한 수입산 흰다리새우를 샘플링하여 육안 및 현미경적 소견을 관찰하였다. 2018년 4월 1일부터 2019년 2월 15일까지 부산지역으로 수입되는 냉동 흰다리새우 654건을 건당 5마리씩 일차적 검경을 하였으며, WSD 병증 및 비병증에 의한 흰 반점 구별은 수출입 수산생물 지정검역물의 검역 방법 및 기준 고시(국립수산물품질관리원고시 제 2018-4호)에 따라 국립수산물품질관리원의 정밀 검사 결과 WSSV에 감염된 새우 개체들에 한정하여 WSD에 의한 흰 반점 발현 양상으로 구별하였다. 새우 두흉갑의 흰 반점의 발현 양상을 관찰하기 위해 새우의 두흉부로부터 두흉갑을 제거 후 외부 및 내부에 혼재된 이물질과 epidermis를 제거하여 온전한 cuticle 을 육안 관찰 후 광학현미경(Olympus BX50, Japan)으로 검경하여 현미경용 디지털 카메라(Olympus DP72, Japan)로 촬영하였다.

육안상의 흰 반점 관찰 건수는 45건으로 0.05 mm 부터 1.7 mm 크기의 다양한 크기의 흰 반점이 관찰되었으며, 국립수산물품질관리원의 정밀 검사 결과를 기준으로 WSSV 감염성 흰 반점 13건과 WSSV 비감염성 흰 반점 32건으로 나누어 분류를 실시하였다.

WSSV에 감염된 흰다리새우의 흰 반점은 두가지 유형으로 나타나는 것으로 관찰되었다. 첫 번째로, 전형적인 흰 반점의 성상으로 육안상으로 0.4 mm 부터 1.7 mm 크기의 투명한 원형의 흰 반점이 관찰되었다(Fig. 1-A, C). 현미경으로 관찰시 원형 형태의 칼슘 침착이 형성되며(Fig. 1-B), 경우에 따라 원형의 흰 반점과 막대 형태의 무기질 침착 형태의 혼재를 관찰할 수 있었다(Fig. 1-D). 두번째로, 비전형 형태의 흰 반점이 생성된 경우로서, 육안상으로는 0.05 mm 부터 2 mm 길이로 밀집된 칼슘 침착소를 관찰할 수 있었다(Fig. 1-E). 현미경으로 관찰시 30~70 μ m 크기의 신생된 흰 반점 병소를 관찰할 수 있었다(Fig. 1-F). 일반적으로 WSD에 의한 흰 반점 형성은 pore canal 과 tegumental duct를 통하여 exocuticle으로 분비되어야 할 cuticle 구성 성분인 칼슘, 키틴, 단백질 등의 세포 유래성 물질이 세포 피사로 인하여 배출되지 못하여 cuticle 내

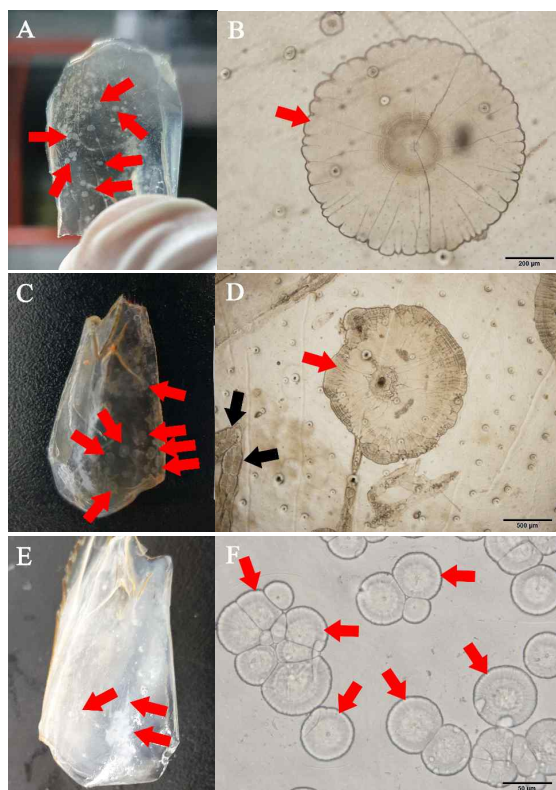


Fig. 1. Observation of carapace with white spots in White leg shrimp with positive reaction of WSD(white spot disease). Carapace of shrimp were observed by macroscopic observation in Fig. 1-A, 1-C and 1-E, and by microscopic observation in Fig. 1-B, 1-D and 1-F, respectively. A : White spots ranging from 0.4 mm to 0.8 mm (red arrows), B : White spots with 892 μ m diameter (red arrows), C : White spots ranging from 0.8 mm to 1.7 mm (red arrows), D : White spots with 1,585 μ m diameter (red arrows) and rod-shaped mineralization (black arrows), E : Irregular white spots ranging from 0.05 mm to 2 mm (red arrows), F : White spots ranging from 30 μ m to 70 μ m (red arrows).

부에서 점진적으로 축적 및 함입됨에 따라 흰 반점이 생성되는 것으로 알려져 있다(Wang *et al.* 1999). 이로 인해 흰 반점은 가장자리가 완만한 형태의 원형 구조를 형성하는 것으로 알려져 있으며, 칼슘이 축적되는데 시간이 필요하므로 육안상으로 크게 나타나는 흰 반점의 경우 주로 WSD의 만성 감염에서 볼 수 있는 것으로 알려져 있다.

WSSV에 감염되지 않은 흰다리새우의 흰 반점

은 주로 네가지 유형으로 나타나는 것으로 관찰되었다. 첫번째로, 0.1 mm 크기의 매우 밀집된 형태의 흰 반점으로서(Fig. 2-A), 해당 부위를 현미경으로 관찰시, cuticle 을 관통하는 Tegumental gland 주변으로 결정화된 물질의 침착이 두드러지게 나타났다(Fig. 2-B). 새우의 cuticle 은 상피세포와 Tegumental gland의 cuticle 생성 물질의 분비를 통해 두터워지며(Dall 1965, Stevenson 1985), molting 시기에는 chitinase, protease 등을 분비하여 다시 체내 흡수 작용을 실시하는 것으로 양방향 수송 시스템을 보유한 것으로 알려져 있다(Roer and Dillaman 1984). Tegumental gland의 도관은 다양한 제반적 요인(세균, 환경 등)에 의해 막힐 수 있으며, 이로 인해 내부에서 칼슘 침착이 발생할 수 있다(Sahoo *et al.* 2005). 본 연구에서 관찰한 첫번째 유형의 경우 Tegumental gland 주변에 현저한 결정형 무기질 침착이 나타났으며, 이는 Tegumental gland의 경색으로 인한 무기질 결정화에 해당하는 것으로 생각된다. 두번째 유형은 두흉갑의 균열을 따라 발생한 흰 반점으로 첫 번째 유형보다 현저히 투명한 특성을 나타내며(Fig. 2-C), 현미경으로 관찰할 때에 균열을 따라 작게는 58 μ m 부터 188 μ m까지 크기의 다발성 다각형 무기질 침착이 나타났다(Fig. 2-D). 세 번째 유형은 무기질 침착이 길게 이어진 막대 형태로서 육안상으로 0.8 mm 부터 9 mm 길이의 무기질 침착을 관찰할 수 있었다(Fig. 2-E). 현미경으로 관찰시 폭이 210~230 μ m으로 길게 이어진 막대 형태의 무기질 침착이 두드러지게 나타난 구조로 관찰된다(Fig. 2-F). 네번째 유형은 육안상으로 두흉갑에 0.1~0.4 mm 크기의 현저한 흰 반점을 나타내는 유형으로서(Fig. 2-G), 현미경 관찰시 갈색의 색소를 나타내는 다발성 무균질 침착소가 관찰되었다(Fig. 2-H). 이러한 병소는 *Bacillus subtilis* 의 감염 등에 의해 발생할 수 있는 무기질 침착소로 다양한 문헌에서 유사한 사례가 보고되어 있다(Bondad-Reantaso *et al.* 2001, Sahoo *et al.* 2005). 이러한 병소의 심화 형태로 Fig. 2-I에서는 육안상으로 훨씬 큰 0.1~2 mm 크기의 비정형 흰 반점이 형성되며, 현미경으로 관찰시 무균질 침착소 내부에 다수의 멜라닌 형성소가 관찰되었다(Fig. 2-J). 새우에서 멜라닌 형성은 면역반응에서

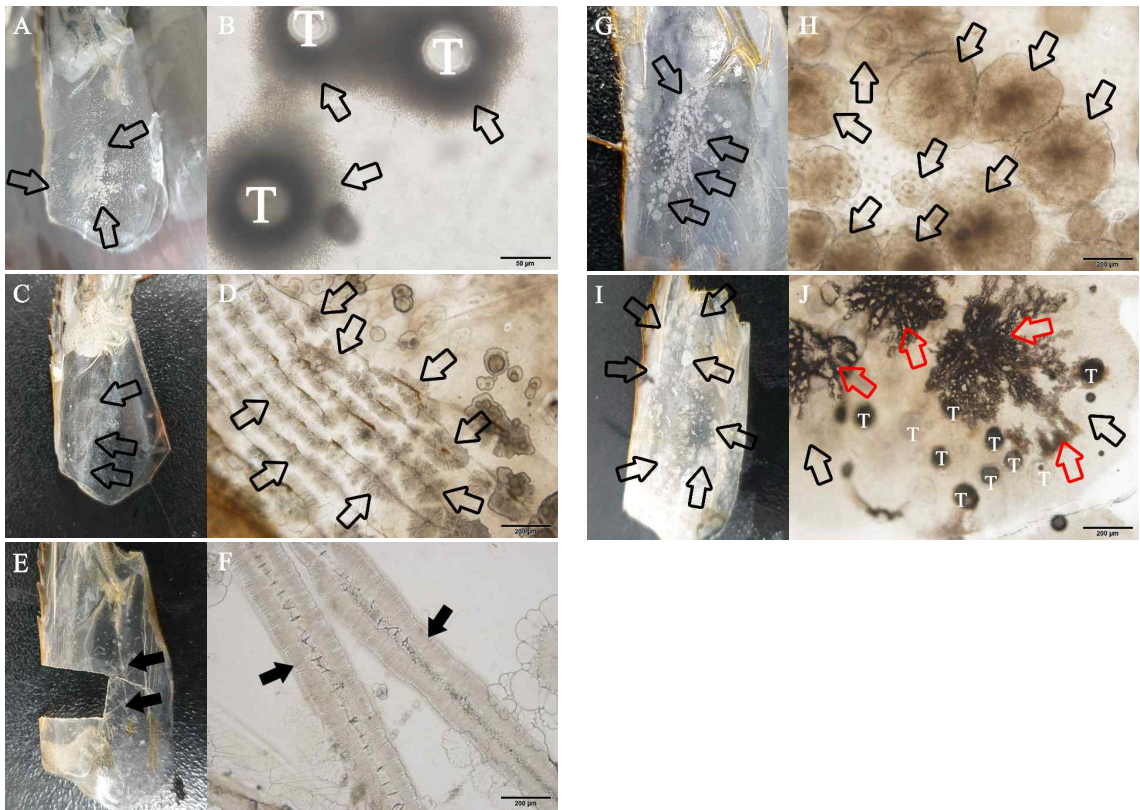


Fig. 2. Observation of carapace with white spots in white leg shrimp with negative reaction of WSD (white spot disease). Carapace of shrimp were observed by macroscopic observation in Fig. 2-A, 2-C, 2-E, 2-G and 2-I, and by microscopic observation in Fig. 2-B, 2-D, 2-F, 2-H and 2-J, respectively. A : White spots with approximately 0.1 mm diameter (transparent arrows), B : Crystallized materials (Transparent arrows) around tegumental gland (labelled with T), C : White spots (transparent arrows) on solid lines of carapace, D : Disseminated polygonal mineral deposits (transparent arrows) ranging from 58 μ m to 188 μ m on solid lines of carapace, E : Multi-directional thick line (black arrows) ranged from 0.8 mm to 9 mm, F : Linear deposition (black arrows) of minerals with 230 μ m width, G : Numerous white spots ranging from 0.1 mm to 0.4 mm, H : Various size of Brownish spots (transparent arrows), I : Numerous white spots ranging from 0.1 mm to 2 mm, J : Brownish spots (transparent arrows) on central part containing abundant melanin (reddish transparent arrows) and Tegumental gland (labelled with T) that showed from transparent to black color due to melanization.

매우 중요한 반응으로서 알려져 있으며 (Tassanakajon *et al.* 2013), WSD에 의한 흰 반점에서도 다수 관찰되며 이는 염증성 반응의 심도에 따라 발생하는 것으로 알려져 있다 (Dewangan *et al.* 2017, Afsharnasab *et al.* 2014, Wang *et al.* 1999). 일부 문헌에서는 WSD와 기타 요소에 의한 흰 반점 구별을 멜라닌 침착으로 구분할 수 있는 것으로 나타내었으나 (Wang *et al.* 2000), 해당 사례처럼 심한 병소 발생 시 멜라닌 침착은 충분히 발생

가능하므로 멜라닌 침착의 유무로 구분하기에는 한계가 있다고 생각된다.

본 연구에서는 수입산 냉동 흰다리새우의 두흉갑에서 발생할 수 있는 흰 반점의 양상을 WSSV 감염 및 비감염 경우로 나누어 구분하였다. WSSV 감염된 흰다리새우의 두흉갑에서는 전형적인 흰 반점과 비정형 형태의 흰반점이 관찰되었으며, 비정형 흰 반점에서는 주로 신생된 흰 반점이 관찰되었다. WSSV에 감염되지 않은 흰다리새우에서 발

생한 흰 반점은 네 가지 유형으로 Tegumental gland 주변 흰 반점, 두흉갑의 균열을 따라 발생한 흰 반점, 막대 형태의 흰 반점, 세균성 흰 반점으로 관찰되었다. 원활한 검역 진행을 위해 상기 증상의 소견은 임상검사 시에 참조할 수 있는 사례가 될 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 국립수산물품질관리원의 지원을 받아 수행되었습니다.

References

- Afsharnasab, M., Kakoolaki, S. & Afzali, F. The Status of white spot syndrome virus (WSSV) in Islamic Republic of Iran. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 13, 1021-1055. 2014.
- Bondad-Reantaso, M.G., Mcgladdery, S.E., East, I. & Subasinghe, R. *Asia diagnostic guide to aquatic animal diseases*. 2001.
- Dall, W. Studies on the physiology of a shrimp, *Metapenaeus* sp.(Crustacea: Decapoda: Penaeidae). III. Composition and structure of the integument. *Marine and Freshwater Research*, 16, 13-24. 1965.
- Dewangan, N.K., Ayyaru, G., Kuzhanthaivel, R., Thirugnanasambandan, S.S., Martin, G.G., Daniel, K. & Ramakrishna, R.S. Incidence of simultaneous infection of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) and white spot syndrome virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 471, 1-7. 2017.
- Johnson, S.K. *Handbook of shrimp diseases*. 1989.
- Lightner, D. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): a review. *Journal of invertebrate pathology*, 106, 110-130. 2011.
- MGL. (Ministry of Government Legislation) Aquatic animal disease management law. 2019. Retrieved from <http://www.law.go.kr/lsSc.do?tabMenuId=tab18&query=%EC%88%98%EC%82%B0%EC%83%9D#undefined>
- NFQS. (National Fishery Products Quality Management Service) Imports(exports) quarantine statistics. 2019. Retrieved from <http://www.nfqs.go.kr/2013/contents.asp?m=5&s=8&s2=3#>
- Roer, R. & Dillaman, R. The structure and calcification of the crustacean cuticle. *American Zoologist*, 24, 893-909. 1984.
- Sahoo, A., Patil, P. & Shankar, K. White spots? A loaded question for shrimp farmers. *Current Science*, 88, 1914-1917. 2005.
- Stevenson, J. Dynamics of the integument. *The biology of Crustacea*, 9, 1-42. 1985.
- Tassanakajon, A., Somboonwiwat, K., Supungul, P. & Tang, S. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish & shellfish immunology*, 34, 954-967. 2013.
- Thitamadee, S., Prachumwat, A., Srisala, J., Jaroenlak, P., Salachan, P.V., Sritunyalucksana, K., Flegel, T. W. & Itsathiphaisam, O. Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. *Aquaculture*, 452, 69-87. 2016.
- Wang, Y., Hassan, M., Shariff, M., Zamri, S. & Chen, X. Histopathology and cytopathology of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* from peninsular Malaysia with emphasis on pathogenesis and the mechanism of white spot formation. *Diseases of aquatic organisms*, 39, 1-11. 1999.
- Wang, Y., Lee, K., Najiah, M., Shariff, M. & Hassan, M. A new bacterial white spot syndrome (BWSS) in cultured tiger shrimp *Penaeus monodon* and its comparison with white spot syndrome (WSS) caused by virus. *Diseases of aquatic organisms*, 41, 9-18. 2000.

Manuscript Received : Mar 19, 2019

Revised : Jun 10, 2019

Accepted : Jun 11, 2019