

Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV)에 대한 단클론 항체 생산

공경희* · 오명주* · 김춘섭** · 김위식*†

*전남대학교 수산생명의학과, **(주)엔바이로젠

Production of monoclonal antibodies against infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV)

Kyoung-Hui Kong*, Myung-Joo Oh*, Choon-Sup Kim** and Wi-Sik Kim*†

*Department of Aqualife Medicine, College of Fisheries and Ocean Science,
Chonnam National University, Yeosu 59626, Korea

**Enbiogene, Yeosu 59771, Korea

Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) is a significant viral pathogen affecting cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Korea. In this study, five monoclonal antibodies (mAbs) (IHNV-1, 2, 3, 4, and 5) were produced using purified IHNV. Reactivities of these mAbs were analyzed by western blot (WB), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and indirect fluorescent antibody test (IFAT). These mAbs recognized glycoprotein (69 kDa, IHNV-1), nucleocapsid protein (39 kDa, IHNV-3, 4, and 5), or phosphoprotein (27 kDa, IHNV-2) of IHNV by WB analysis. ELISA results indicated that these five mAbs were specific to IHNV without showing any cross-reactivity against other fish viruses (herpesvirus, infectious pancreatic necrosis virus, and viral hemorrhagic septicemia virus). IFAT demonstrated specific fluorescence signals of IHNV-infected epithelioma papulosum cyprini (EPC) cells, whereas no reactivity of normal EPC cells was observed. These mAbs can be very useful for immuno-diagnosis of IHNV infection.

Key words: Infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV, monoclonal antibody

전염성조혈기괴사증(infectious hematopoietic necrosis, IHN)은 전 세계적으로 연어과 어류에 심각한 피해를 일으키는 바이러스성 질병으로 알려져 있다(Wolf, 1988; WOA, 2021). IHN의 원인병원체인 전염성조혈기괴사증바이러스(IHN virus, IHNV)는 유럽, 아시아 태평양, 아프리카 및 미국에서 보고되어 있다(WOA, 2021). IHNV는 *Rhabdoviridae*

과 *Novirhabdovirus* 속에 속하며, 6개의 gene (3'-N-P-M-G-NV-L-5')으로 구성된 약 11.1 kbp의 negative-sense RNA를 가지고 있다(Kurath *et al.*, 1985; Dietzgen *et al.*, 2011). IHNV는 glycoprotein (G) gene을 사용한 계통발생학적 분석을 통해 5개의 유전자형(genogroup U, M, L, E 및 J)으로 구분된다(WOA, 2021). 국내에서 분리된 IHNV는 일본과 중국 분리주가 포함되어 있는 genogroup J에 속해 있다(Nishizawa *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2019; Namba *et al.*, 2021).

†Corresponding author: Wi-Sik Kim
Tel. and Fax: +82-61-659-7177
E-mail: whisky@jnu.ac.kr

Genogroup J는 Shizuoka (JS), Nagano (JN) 및 North Kanto (JnK) lineage 구분되는데(Namba *et al.*, 2021), 국내 분리주들은 JS와 JN에 속해 있다(Kim *et al.*, 2016).

IHNV를 검사하는 방법으로는 어류 주화세포를 이용한 분리배양법, 유전자를 이용한 분자생물학적 방법인 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)과 real-time PCR, 항체를 이용한 면역학적 방법인 indirect fluorescent antibody test (IFAT)와 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 등이 사용되고 있다(WOAH, 2021). 국내에서는 IHNV를 검사하기 위해 RT-PCR과 어류 주화세포를 사용한 분리배양법을 주로 사용하고 있다. 이들 방법들은 민감도와 특이도가 우수하다는 장점이 있으나, 검사를 위해 전문 인력과 특수한 장비가 필요로 하므로 현장에서 사용하기에는 한계가 있다.

현장검사(point-of-care testing, POCT)는 실험실 환경에서의 복잡한 기반과 숙련된 기술자가 필요하지 않은 방법으로서 현장에서 누구나 손쉽게 신속·간편히 사용할 수 있다(Jani and Peter, 2013; Banerjee and Jaiswal, 2018; Andryukov, 2020). 측방 유동 면역 크로마토그래피법(lateral flow immunochromatographic assay, LFIA)은 항원-항체 반응을 기반으로 한 POCT 방법으로서, 현재 COVID-19의 원인체를 비롯한 다양한 종류의 어류 병원체들을 검사하는 데 사용되고 있다(Daoud *et al.*, 2020; Shyam *et al.*, 2020; 2022; 2023a; Kong *et al.*, 2021; Mahmoudinobar *et al.*, 2021). LFIA 기반 신속 진단 키트를 개발하기 위해서는 항체가 필요하다. 이에 본 연구에서는 LFIA 기반 IHNV 현장검사용 키트 개발을 위한 기초연구로서 IHNV에 대한 단클론 항체(monoclonal antibody, mAb)를 생산하고자 하였다.

무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)로부터 분리한 IHNV(분리주: RtUi02, genogroup: JN, GenBank No. AB288207) (Kim *et al.*, 2007)를 항원으로 사용하여 mAb를 제작하였다. IHNV를 epithelioma papulosum cyprini (EPC) 세포에 접종하여 대량으로 배양한 후 4°C에서 12,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 세포 잔여물을 제거한 후 상층액을 분리하였다. IHNV 정제는 Jeong *et al.* (2017)의 방법에 따라

실시하였다. 분리된 바이러스 상층액에 polyethylene glycol (PEG)-6000 (Sigma-Aldrich, USA)과 NaCl을 각각 7.5% (w/v), 2.3% (w/v)로 첨가한 후 4°C에서 overnight 하였다. PEG가 처리된 바이러스 배양액을 4°C에서 12,000 rpm으로 30분간 원심분리한 후, pellet을 phosphate buffer saline (PBS: 0.13 M NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄) 완충용액으로 현탁하였다. 현탁액은 30,000 rpm에서 2시간 동안 초원심을 실시한 후 pellet을 PBS로 재부유시켜 바이러스를 정제하였다.

IHNV에 대한 mAb는 Kim *et al.* (2018)의 방법에 따라 제작하였다. 정제한 IHNV (100 µg)와 complete freund's adjuvant (Sigma-Aldrich, USA)를 동량으로 섞어 BALB/c 마우스의 복강에 1차 접종한 후, 2주 후에 동일한 IHNV (100 µg)를 사용하여 2차 면역하였다. 2차 접종 1주 후에 동일한 IHNV (100 µg)를 사용하여 3차 면역하였다. 최종 면역 3일 후 마우스의 비장 조직을 분리한 후 PEG-1500 (Roche, Germany)을 사용하여 myeloma cell (SP2/0Ag14)과 융합시킨 후 fetal bovine serum (FBS) (Gibco, USA) 이 10% 첨가된 hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT) 배지(Gibco, USA)로 현탁시킨 후 96 well plate에 분주하여 37°C로 설정된 CO₂ 배양기에서 배양하였다(Liddell and Cryer, 1991). 양성 hybridoma는 농축한 IHNV를 항원으로 사용하여 ELISA 법으로 선별하였고 3회 이상 제한 희석법으로 클로닝 하였다. 선별된 mAb의 isotype은 Pierce rapid ELISA mouse mAb isotyping kit (Thermo, USA)를 사용하여 결정하였다. 본 연구는 전남대학교 동물 실험윤리위원회의 승인(No. CNU IACUC-YS-2023-3)을 받아 진행하였다.

제작한 항체의 IHNV 인식부위를 확인하기 위해, 농축한 IHNV를 사용하여 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)와 western blot (WB)을 실시하였다(Laemmli, 1970; Towbin *et al.*, 1979). 농축한 IHNV를 12% polyacrylamide gel에 loading 한 후 30 mA에서 전기영동하였다. 전기영동 종료 후, gel을 0.2% coomassie brilliant blue R-250 (Wako, Japan)으로 염색하였다. WB는 전기영동 한 gel(항원: 농축한 IHNV)을 nitrocellulose membrane (Bio-Rad, USA)에 blotting 한

후, 본 연구에서 제작한 mAb (1차 항체)와 alkaline phosphatase (AP)가 붙어있는 goat anti-mouse IgG serum (novus, USA, 2차 항체)으로 반응시키고 발색제 [100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂ (pH 9.5) 20 ml, NBT (75 mg/ml 4-nitro-tetrazolium blue chloride) 90 µl, BCIP (50 mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate p-toluidine salt/dimethyl-formamide) 70 µl]로 발색하여 육안으로 확인한 후, 발색 정지액(1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl)을 첨가하였다.

제작한 mAb의 특이도를 분석하기 위해 4종의 어류 바이러스 상층액을 사용하여 Kong *et al.* (2019) 방법에 준해 ELISA를 실시하였다. 4종의 어류 바이러스[IHNV (RtUi02) (10^{7.8} tissue culture infective dose (TCID₅₀/ml), 넙치렙도바이러스(hirame rhabdovirus, HIRRV: 10^{8.05} TCID₅₀/ml) (CA-9703, GenBank No. AF104985) (Kim *et al.*, 2005), 전염성췌장괴사증바이러스(infectious pancreatic necrosis virus, IPNV: 10^{8.3} TCID₅₀/ml) (VR-299, GenBank No. AF343572) (Blake *et al.*, 2001), 바이러스성출혈성 패혈증바이러스(viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV: 10^{7.8} TCID₅₀/ml) (FYeosu05, GenBank No. KF477302) (Kim *et al.*, 2009)]를 ELISA coating buffer (0.05 M sodium carbonate/bicarbonate)로 320배 희석하여 96 well ELISA plate (Greiner bioone, Germany)에 각각 50 µl씩 분주한 후 4°C에서 overnight 하여 항원을 코팅하였다. 1차 항체로는 본 연구에서 제작한 mAb를 50 µl씩 분주하여 25°C에서 1시간 동안 반응시켰고, 2차 항체는 horseradish peroxidase (HRP)가 표식되어 있는 goat anti-mouse IgG serum (Youngin, Korea)을 5% skim milk로 1,000배 희석하여 50 µl/well 분주하였다. ELISA 발색액[tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution] (Surmodics, USA)을 50 µl/well 분주하여 30분간 발색한 후 1N H₂SO₄를 50 µl/well 넣어 발색을 중지시키고, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

제작한 mAb의 특성을 분석하기 IFAT를 실시하였다. EPC에 IHNV (10^{5.3} TCID₅₀/100 µl)를 접종하여 cytopathic effect (CPE)가 관찰되면 10% formalin을 첨가하여 1시간 동안 고정하였다. 바이러스가 감염된 세포와 정상 세포를 PBS로 3회 세정한 후,

5% skim milk로 380 µl씩 분주하여 25°C에서 1시간 동안 blocking 하였다. 1차 항체로는 본 연구에서 제작한 mAb를 50 µl씩 분주하여 25°C에서 1시간 동안 반응시켰고, 2차 항체는 fluorescein isothiocyanate (FITC)가 표식되어 있는 goat anti-mouse IgG (Novus, USA)를 5% skim milk로 50배 희석하여 50 µl/well 분주하여 25°C에서 1시간 동안 반응하였다. 세포를 PBS로 5회 세정한 후 형광현미경 (Olympus, IX73, Japan)으로 관찰하였다.

농축한 IHNV를 사용하여 SDS-PAGE를 실시한 결과, 총 5개의 밴드(약 200 kDa, 69 kDa, 40 kDa, 28 kDa 및 21 kDa)가 관찰되었다(Fig. 1a). IHNV의 구조 단백질은 150-205 kDa (polymerase, L), 67-72 kDa (G), 40-43 kDa (nucleocapsid, N), 22-27 kDa (phosphoprotein, P) 및 20-22 kDa (matrix protein, M)으로 구성되어 있다고 보고되어 있다(Mcallister and Wagner, 1975; Hsu *et al.*, 1985; Alonso *et al.*, 1999). 본 연구의 SDS-PAGE 패턴은 기존에 보고된 결과와 유사하였다.

농축한 IHNV를 마우스에 면역시킨 후 마우스의 비장 조직과 myeloma 세포를 융합시켜 총 5개의 mAb를 생산하였다(IHNV-1, 2, 3, 4 및 5). 5개의 mAb의 isotype을 분석한 결과, 2개의 mAb (IHNV-3과 5)와 3개의 mAb (IHNV-1, 2 및 4)의 heavy chain은 각각 IgG1과 IgG2b로 나타났으며, 5개의 mAb 모두 light chain은 kappa로 나타났었다(data not shown).

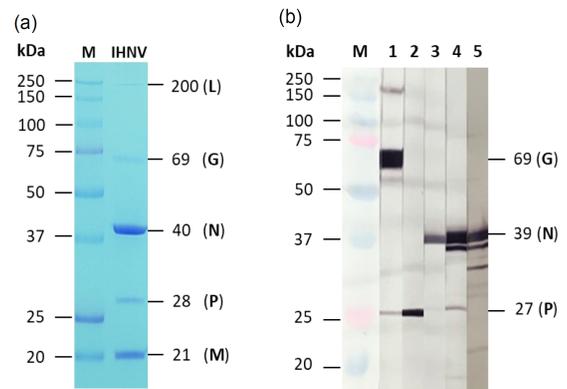


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of purified IHNV (a), and IHNV recognition sites for five monoclonal antibodies (mAbs, IHNV-1, 2, 3, 4, and 5) in western blot (b). M: molecular marker.

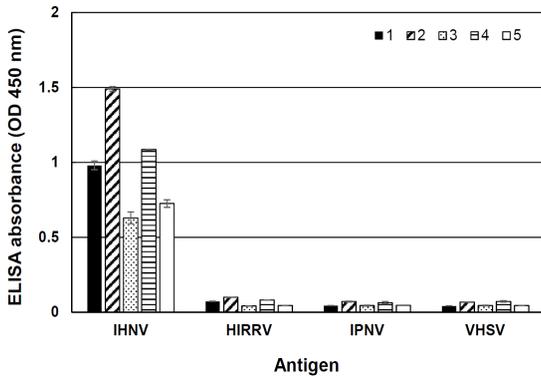


Fig. 2. Specificity analysis of five monoclonal antibodies (mAbs IHN-1, 2, 3, 4, and 5) using ELISA against four fish viruses (IHN, HIRRV, IPNV, and VHSV).

제작된 mAb를 사용하여 WB를 실시한 결과, IHN-1은 약 69 kDa (G로 추정)을 강하게 인식하였고, 약 27 kDa을 약하게 인식하였다(Fig. 1b). IHN-2는 약 27 kDa (P로 추정)을 강하게 인식하였다. IHN-3은 약 39 kDa (N으로 추정)를 강하게 인식하였다. IHN-4는 약 39 kDa (N으로 추정)를 강하게 인식하였고, 약 36 kDa과 28 kDa을 인식하였다. IHN-5는 약 39 kDa (N으로 추정)를 강하게 인식하였고, 약 36 kDa과 32 kDa을 인식하였다. 이상의 결과로 mAb IHN-1은 IHN의 구조 단백질인 G, IHN-2는 P, IHN-3, 4 및 5는 N을 강하게 인식하는 것으로 사료된다. 하지만 3개의 mAb (IHN-1, 4 및 5)는 일부 다른 크기의 단백질에 대해서도 약하게 반응하기 때문에, 정확한 원인을 규명하기 위해서는 향후 다양한 연구들이 수행되어야 할 것이다.

4종의 어류 바이러스(항원: IHN, HIRRV, IPNV

및 VHSV)를 사용하여 ELISA를 실시한 결과에서는 5개의 mAb 모두 IHN에서 높은 OD값(0.6-1.49)을 보였고, 3종의 어류 바이러스(HIRRV, IPNV, VHSV)에서 낮은 OD값(0.04-0.1)을 나타내었다(Fig. 2). IHN에 감염된 EPC와 정상 EPC를 사용하여 IFAT를 실시한 결과에서는 5개의 mAb 모두 IHN 감염 세포에서만 강한 형광반응을 보였고, 정상 세포에는 반응하지 않았다(Fig. 3). 이상의 결과, 본 연구에서 제작한 5종의 mAb는 IHN에만 특이적으로 반응하는 것이 확인되어, 항체를 기반으로 한 면역학적인 검사방법(ELISA와 IFAT)에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

일반적으로 LFIA를 사용한 병원체 검사는 10-30분 사이에 완료되기 때문에, LFIA에 사용되는 항체는 항원에 대한 친화력이 매우 우수하고 아주 짧은 시간 내에 항원-항체 반응이 완료되어야 한다(Shyam *et al.*, 2022). 이전의 연구 결과를 보면, WB, ELISA 또는 IFAT에 양성 반응을 보이는 항체는 LFIA 키트에서 음성 반응을 보이는 경우가 많이 있으며(Kim *et al.*, 2018; Kong *et al.*, 2019; 2021; 2022; Shyam *et al.*, 2020; 2023a; 2023b), 이해 반해 WB과 indirect immunofluorescence (IIF)에서 음성 반응을 보일지라도 LFIA 키트에서는 강한 양성 반응을 보이는 경우가 있다(Kong *et al.*, 2022). 본 연구에서 제작된 mAb는 WB, ELISA 및 IFAT에 양성 반응을 보였으나 LFIA의 사용 가능 여부는 향후 연구를 통해 확인되어야 한다. 더불어 국내 IHN 분리주들은 genogroup JS와 JN에 속해 있으므로(Kim *et al.*, 2016), 향후 LFIA 키트 개발 있어, JS와 JN에 속해 있는 다양한 IHN 분리주들을 사용하여

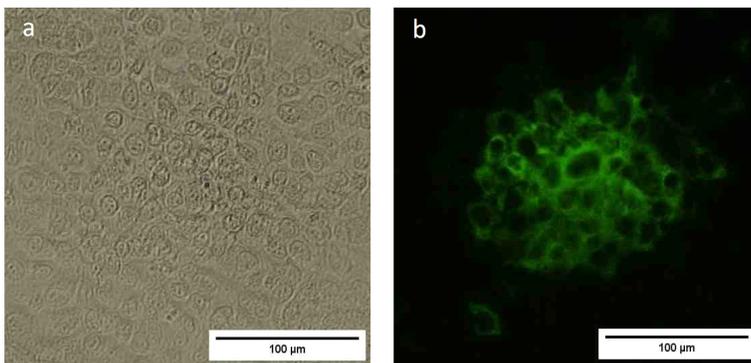


Fig. 3. Reactivity of anti-IHN mAb (IHN-3) to IHN-infected cells as assessed using indirect fluorescent antibody test (IFAT). (a, b) IHN-infected EPC cells, where (b) indicates the positive green fluorescence upon reacted with anti-IHN mAb suggest the existence of IHN.

특이도, 민감도 및 유효성을 평가해야 할 것이다.

감사의 글

이 논문은 2023년 전라남도(재)전남테크노파크의 지역수요맞춤형 연구개발사업의 지원을 받아 수행된 연구임.

References

- Alonso, M., Rodríguez, S. and Pérez-Prieto, S.I.: Viral coinfection in salmonids: infectious pancreatic necrosis virus interferes with infectious hematopoietic necrosis virus. *Arch. Virol.*, 144: 657-673, 1999.
- Andryukov, B.G.: Six decades of lateral flow immunoassay: from determining metabolic markers to diagnosing COVID-19. *AIMS Microbiol.*, 6: 280-304, 2020.
- Banerjee, R. and Jaiswal, A.: Recent advances in nanoparticle-based lateral flow immunoassay as a point-of-care diagnostic tool for infectious agents and diseases. *Analyst.*, 143: 1970-1996, 2018.
- Blake, S., Ma, J.Y., Caporale, D.A., Jairath, S. and Nicholson, B.L.: Phylogenetic relationships of a aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment A cDNA. *Dis. Aquat. Arg.*, 45: 89-102, 2001.
- Daoud, Z., McLeod, J. and Stockman, D.L.: Higher sensitivity provided by the combination of two lateral flow immunoassay tests for the detection of COVID-19 immunoglobulins. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 10: 479, 2020.
- Dietzgen, R.G., Calisher, C.H., Kurath, G., Kuzmin, I.V., Rodriguez, L.L., Stone, D.M., Tesh, R.B., Tordo, N., Walker, P.J., Wetzel, T. and Whitfield, A.E.: Family *Rhabdoviridae*. In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (eds) *Virus Taxonomy: Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, pp. 686-713, 2011.
- Hsu, Y.L., Engelking, H.M. and Leong, J.C.: Analysis of the quantity and synthesis of the virion proteins of infectious hematopoietic necrosis virus. *Fish Pathol.*, 20: 331-338, 1985.
- Jani, I.V. and Peter, T.F.: How point-of-care testing could drive innovation in global health. *N. Engl. J. Med.*, 368: 2319-2324, 2013.
- Jeong, H.N., Jang, M.S., Oh, M.J. and Kim, W.S.: Production of monoclonal antibodies against viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV, genotype IVa) from olive flounder. *J. Fish Pathol.*, 30: 149-154, 2017.
- Kim, D.H., Oh, H.K., Eou, J.I., Seo, H.J., Kim, S.K., Oh, M.J., Nam, S.W. and Choi, T.J.: Complete nucleotide sequence of the hirame rhabdovirus, a pathogen of marine fish. *Virus Research*, 107: 1-9, 2005.
- Kim, K.I., Cha, S.J., Lee, C., Baek, H., Hwang, S.D., Cho, M.Y., Jee, B.Y. and Park, M.A.: Genetic relatedness of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) from cultured salmonids in Korea. *Arch. Virol.*, 161: 2305-2310, 2016.
- Kim, W.S., Oh, M.J., Nishizawa, T., Park, J.W., Kurath, G. and Yoshimizu, M.: Genotyping of Korean isolates of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) based on the glycoprotein gene. *Arch. Virol.*, 152: 2119-2124, 2007.
- Kim, W.S., Kim, S.R., Kim, D., Kim, J.O., Park, M.A., Kitamura, S.I., Kim, H.Y., Kim, D.H., Han, H.J., Jung, S.J. and Oh, M.J.: An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea. *Aquaculture*, 296: 165-168, 2009.
- Kim, W.S., Kim, S.W. and Oh, M.J.: Production of monoclonal antibodies against nervous necrosis virus (NNV, RGNNV genotype). *Korean J. Fish. Aquat. Sci.*, 51: 328-331, 2018.
- Kong, K.H., Oh, M.J., Jang, M.S., Kim, C.S. and Kim, W.S.: Development of monoclonal antibodies against viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV, genotype IVa), the causative agent of VHS. *J. Fish Pathol.*, 32: 59-67, 2019.
- Kong, K.H., Jeong, H.N., Shyam, K.U., Oh, M.J., Kim, C.S., Kim, H.J. and Kim, W.S.: Development and validation of a lateral flow immunochromatographic assay for specific detection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV, genotype IVa) in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 537: 736491, 2021.
- Kong, K.H., Kim, C.S., Kim, D.H. and Kim, W.S.: Production and characterization of monoclonal antibodies against white spot syndrome virus (WSSV). *J. Fish Pathol.*, 35: 241-246, 2022.
- Kurath, C., Ahern, K.G., Pearson, G.D. and Leong, J.C.: Molecular cloning of the six mRNA species of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus, and gene order determination by R-loop mapping. *J. Virol.*, 53: 469-476, 1985.
- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during

- the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
- Liddell, J.E. and Cryer, A.: A practical guide to monoclonal antibodies, pp. 67-88, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1991.
- Mahmoudinobar, F., Britton, D. and Montclare, J.K.: Protein-based lateral flow assays for COVID-19 detection. *PEDS*, 34: 1-10, 2021.
- Mcallister, P.E. and Wagner, R.R.: Structural proteins of two salmonid rhabdoviruses. *J. Virol.*, 15: 733-738, 1975.
- Namba, A., Minakami, K., Takee, T., Shiibashi, K., Sugino, M., Yasuda, S., Takeuchi, H., Ishikawa, T., Matsubara, T., Arai, H., Nakanishi, T. and Mano, N.: Temporal change in genetical lineages of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in the north kanto region of Japan from 1981 to 2015. *Fish. Pathol.*, 56: 35-42, 2021.
- Nishizawa, T., Kinoshita, S., Kim, W.S. Higashi, S. and Yoshimizu, M.: Nucleotide diversity of Japanese isolates of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) based on the glycoprotein gene. *Dis. Aquat. Org.*, 71: 267-272, 2006.
- Shyam, K.U., Jeong, H.N., Oh, M.J., Kim, C.S. and Kim, W.S.: Development of a lateral flow immuno-chromatic strip assay for the detection of nervous necrosis virus (NNV, RGNNV genotype). *Aquaculture*, 520: 734944, 2020.
- Shyam, K.U., Kim, H.J., Kole, S., Oh, M.J., Kim, C.S., Kim, D.H. and Kim, W.S.: Antibody-based lateral flow chromatographic assays for detecting fish and shrimp pathogens: A technical review. *Aquaculture*, 558: 738345, 2022.
- Shyam, K.U., Kong, K.H., Oh, M.J., Kim, T., Kim, C.S. and Kim, W.S.: Development of a lateral flow immunochromatographic assay (LFIA) for the detection of hiramé novirhabdovirus (HIRRV) in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 568: 739341, 2023.
- Shyam, K.U., Jang, M.S., Kong, K.H., Oh, M.J. and Kim, W.S.: Production and characterization of monoclonal antibodies against structural proteins of hiramé novirhabdovirus. *Monoclonal Antib. Immunodiagn. Immunother.*, 42: 53-58, 2023.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76: 4350-4354, 1979.
- WOAH. Manual of Diagnostic tests for Aquatic Animals. 2.3.5 Infection with infectious haematopoietic necrosis virus; Office International des Epizooties: Paris, France, 2021.
- Wolf, K.: Infectious hematopoietic necrosis. In Wolf, K., editor. *Fish viruses and fish viral diseases*. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA. pp. 83-114, 1988.
- Xu, L., Zhao, J., Liu, M., Kurath, G., Breyta, R.B., Ren, G., Yin, J., Liu, H. and Lu, T.: Phylogeography and evolution of infectious hematopoietic necrosis virus in China. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 131: 19-28, 2019.

Manuscript Received : Nov 14 2023

Revised : Nov 30 2023

Accepted : Dec 01 2023