

## 양식 넙치 치어에서 분리한 birnavirus의 특성

손상규, 박명애, 도정완\*, 정초록, 박정우\*

국립수산진흥원 병리과,

\*울산대학교 미생물학과

최근 남해안 일대의 육상 양식장에서 사육중이던 넙치(*Paralichthy olivaceus*) 치어가 폐사하여 조사한 결과 3개 양식장에서 바이러스가 분리되었다. 분리된 바이러스들은 모두 외막이 없는 정육면체 모양이었으며 50~55nm 정도의 크기를 지녔다. 전기영동상에서 RNA와 구조 단백질의 patterns를 확인하고, IPNV에 대한 항혈청을 사용하여 중화실험을 수행한 결과, 분리한 세 바이러스는 birnavirus인 IPNV와 매우 유사함이 밝혀졌다. 특히 분리 바이러스중 CS는 IPNV의 AB 혈청형과 DS와 YJ는 SP 혈청형과 유사하였다.

Key Words : Flounder(*Paralichthy olivaceus*), Birnavirus, IPNV, Serotype

Birnavirus는 dsRNA 바이러스중 외막을 지니지 않는 icosahedral모양의 바이러스로서(Fields, 1985) 닭에 감염하는 infectious bursal disease(IBDV), 초파리에 감염하는 drosophila X virus(DXV), 패류에 감염하는 oyster virus(OV) 그리고 어류에 감염하는 infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) 등이 있다(Dobos *et al.*, 1979). 연어 및 송어류에 대량폐사를 일으키는 birnavirus인 IPNV (Pilcher and Fryer, 1980)는 구조단백질 및 핵산의 크기와 혈청학적인 특성 차이로 인해 VR-299, SP 및 AB의 세가지 표준 혈청형으로 구분된다(Macdonald and Gower, 1981).

Birnavirus는 해산 양식어류중 방어(Sorimachi *et al.*, 1985), 넙치(Kusuda *et al.*, 1989), 가자미(Novoa *et al.*, 1993; Mortensen *et al.*, 1993) 등에서도 분리되고 있으며, 이들 바이러스도 모양 및 혈청학적 특성에 있어서 담수어류에서 분리된 IPNV와 유사하다고 보고되고 있다. 이와 같이 birnavirus는 전세계적으로 많은 담수 및 해산어류에서 분리되고

있는데, 우리나라에서는 1984년부터 금붕어, 송어 및 연어류에서 IPNV가 분리되어(Hah *et al.*, 1984; Hedrick *et al.*, 1985; Park *et al.*, 1989), 특히 양식 무지개 송어에 많은 피해를 입히는 것으로 알려져 왔으나, 아직 해산어에서 birnavirus가 분리된 보고는 없다. 그렇지만 우리나라도 해산어 양식이 성행함에 따라 바이러스성 질병에 의한 폐사가 문제시 되고 있으며, 그 대표적인 어종으로 넙치를 들 수 있다.

지금까지 넙치에서 분리된 바이러스로서는 자어기에 표피 및 지느러미 상피세포를 이상증생시켜 대량폐사를 일으키는 herpesvirus(Iida *et al.*, 1989) 대량폐사를 일으키는 herpesvirus(Iida *et al.*, 1989)와 치어기에 두부출혈이나 복수정류 증상을 나타내 출혈, 생식선 울혈, 복수정류 증상을 나타내는 rhabdovirus(Gorie *et al.*, 1985) 등이 보고되고 있다.

따라서 본 연구에서는 1993년 및 1994년도에 남해안 일원 육상 양식장에서 폐사한 넙치 치어로부터 birnavirus를 분리하여 혈청학적 특성을 연구

하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포

바이러스 배양을 위한 숙주세포로서 CHSE-214 (chinook salmon embryo, Lannan *et al.*, 1984) cell line을 사용하였다. 세포는 10% fetal bovine serum과 penicillin-streptomycin(각 50 $\mu$ g/ml)이 첨가된 minimum essential medium(MEM)을 사용하여 18 $^{\circ}$ C에서 배양하였다.

### 2. 바이러스

실험에 사용한 바이러스는 1993년과 1994년 남해안 일원 육상 넙치양식장에서 병든 넙치 치어(5~10cm)로부터 분리한 것으로서, Standard method(Amos, 1985)에 따라 병든 넙치 치어 10마리 씩을 한 단위로 하여 모은 후 장기조직을 마쇄하여 penicillin-streptomycin(250 $\mu$ g/ml)으로 계균처리 후 CHSE-214세포에 접종하여 바이러스를 분리하였으며, 참조 바이러스는 IPNV의 세 표준혈청형인 VR-299, SP 그리고 AB를 사용하였다.

### 3. 바이러스의 순수분리

바이러스 순수분리는 숙주세포인 CHSE-214에 바이러스를 접종한 후 세포가 모두 파괴되었을 때(바이러스 접종 후 약 7일째) 배양액을 모아 4,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 원심분리를 하여 cell debris를 제거한 후 PEG-6,000을 9%(W/V)가 되게 첨가하였다. 이 용액을 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 stirring한 다음 6,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 원심분리하여 침전시킨 후, 소량의 TNE buffer(0.01M Tris, pH8.0, 0.1M NaCl, 1mM EDTA)를 사용하여 침전물을 녹여 CsCl step gradient(40%, 30% 그리고 20% CsCl-TNE) 상에서 150,000 $\times$ g, 8시간 원심분리하였다. 30%와 40%의 CsCl층 사이에 존재하는 바이러스를

취하여 150,000 $\times$ g에서 1시간 원심분리하여 바이러스를 침전시켰다. 침전된 바이러스를 소량의 TNE buffer로 재현탁시킨 후 sucrose continuous gradient(15%~50%)상에서 150,000 $\times$ g, 2시간 동안 원심분리를 하였다. 형성된 바이러스 band를 취한 후 150,000 $\times$ g, 1시간 원심분리하여 침전시켰다. 바이러스 침전물을 소량의 TNE buffer에 재현탁시킨 후 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

### 4. 바이러스 형태

바이러스의 모양을 확인하기 위하여 투과전자현미경으로 관찰하였다.

CHSE-214 세포에 바이러스를 감염시킨 후 2일째에 세포를 모아 2.5%의 glutaraldehyde가 포함된 인산 완충용액(pH 7.2)으로 4 $^{\circ}$ C에서 4시간 동안 고정하고, osmium tetroxide 1%가 포함된 인산 완충용액(pH 7.2)을 상온에서 2시간 동안 처리한 다음 에탄올을 사용하여 탈수시켜 Epon 812에 embedding하였다. Ultramicrotome(LKB, Nova, Sweden)을 사용하여 얇게 절편을 만든 후 uranyl acetate와 lead 용액으로 이중염색을 한 다음 투과전자현미경(JEOL 1200, EX-2)으로 관찰하였다.

### 5. 항혈청

IPNV의 세 표준 혈청형에 대한 항혈청은 newzealand white rabbit에 순수분리된 바이러스를 면역시켜 준비하였다. 즉, 첫번째 면역으로써 50 $\mu$ g의 순수분리된 바이러스를 Freund's complete adjuvant(Sigma, USA)와 유화시킨 후 토끼의 피하에 주사하고, 두번째 이후부터는 100 $\mu$ g의 바이러스를 Freund's incomplete adjuvant(Sigma, USA)와 유화시킨 후 주사하였다. 이와같은 방법으로 4번을 주사한 다음 귀정맥에서 채혈하여 혈청을 얻은 후 바이러스 중화실험과 면역 침전법에 사용하였다.

### 6. 바이러스 단백질의 면역 침전법

바이러스의 단백질을  $^{35}$ S-methionine으로 label한

후 면역 침전법으로 실험을 행하여 관찰하는데 실험과정을 간단하게 설명하면, 배양접시(직경 35mm, Falcon)에 CHSE-214 세포를 단층으로 배양한 후 바이러스를 5MOI 정도로 접종하였다. 상온에서 1 시간동안 반응을 시킨 후  $^{35}\text{S}$ -methionine이 20 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 의 농도로 들어 있는 MEM을 1ml 첨가하여 18 $^{\circ}\text{C}$ 에서 배양하였다.

대부분의 세포가 파괴되었을 때 세포배양액을 모아 microcentrifuge(Beckman Instrument, USA)로 28,000 $\times g$  에서 3분간 원심분리하였다. 상층액을 모아 그중 300 $\mu\text{l}$ 를 취한 후 여기에 항혈청 30 $\mu\text{l}$  (anti-VR-299, 10 $\mu\text{l}$ ; anti-SP, 10 $\mu\text{l}$ ; anti-AB, 10 $\mu\text{l}$ )를 첨가하였다. 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 16시간동안 반응시켜 항원-항체의 복합체를 형성시킨 후 50% (v/v) protein-G-agarose 혼합액 5 $\mu\text{l}$ 를 첨가하였다.

상온에서 2시간 반응 시킨 후 28,000 $\times g$ 에서 10초간 원심분리를 하여 형성된 침전물을 완충용액(nonidet NP-40 1%, phenylmethylsulfonyl fluoride 0.1mM, in phosphate buffered saline pH 8.0)으로 3회 세척하였다. 침전물을 SDS-sample buffer와 섞은 후 Laemmli(1970)의 방법에 따라 10% SDS-PAGE gel에서 전기영동한 다음 1% coomassie blue 용액으로 염색을 하여 말렸다. 말린 gel을 X-ray film에 4~5일간 감광시켜 바이러스의 단백질을 확인하였다. 바이러스 단백질의 분자량을 표준단백질의 이동거리와 비교하여 결정하였다.

7. Genomic RNA의 분석

순수분리된 virus를 완충용액(10mM Tris pH 7.6, 5mM EDTA pH 8.0), 그리고 1% SDS에 현탁시킨 후 proteinase K(Sigma, USA)를 첨가하여(1mg/ml) 65 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 동안 반응시켰다. Phenol-chloroform-isoamyl alcohol을 사용하여 RNA를 추출한 후 0.3M potassium acetate가 포함된 ethanol로 RNA를 침전시킨 후 소량의 TE 완충용액으로 녹였다.

이와같이 분리한 RNA를 1% agarose gel(in TBE

buffer; 89mM Tris, 89mM boric acid 그리고 2mM EDTA)에서 전기영동한 후 EtBr로 염색하였다.

8. 바이러스 증화실험

바이러스 증화실험은 Okamoto(1983) 등의 방법에 따라 행하였다. 혈청이 첨가되지 않은 MEM을 사용하여 항혈청을 1/2씩 연속적으로 희석한 다음 96 multiwell plate에 0.05ml씩 넣었다. 얼리지 않은 새로 준비된 바이러스를 100 TCID<sub>50</sub>/0.05ml의 농도로 희석시킨 후 항혈청이 들어 있는 multiwell plate에 0.05ml씩 넣고 20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 흔들며 반응시켰다.

CHSE-214세포를 MEM-10 용액으로 1 $\times 10^5$  cells/ml 농도가 되도록 희석한 후 각 well에 0.1ml씩 넣고 18 $^{\circ}\text{C}$ 에서 7일간 배양하며 CPE를 관찰하였다. 항혈청의 증화역가는(ND<sub>50</sub>0.05ml) 접종된 세포의 50%를 바이러스로부터 보호하는 항혈청 희석치의 역수로부터 구하였다.

결 과

1. 바이러스

우리나라의 남해안 일대에서 양식중인 넙치 치어에서 많은 폐사가 발생하여 이들로 부터 바이러스를 분리하고, 각각 분리된 지역의 명칭을 따라 YJ, CS 그리고 DS라고 명명하였다(Table 1). 이들 분리된 바이러스는 전자현미경으로 관찰한 결과, 모두 외막이 없는 icosahedron 모양에 직경이 약 50~55nm 정도의 크기를 나타내었다(Fig. 1).

Table 1. Sources of virus strains in this study

Strain	Date	Size(cm)	Sampling sites
CS	May 1993	5~ 7	Chungmu
DS	May 1993	7~ 9	Yeosu
YJ	Apr 1994	7~10	Yangsang

Fig. 1. Electron microscopy of a birnavirus isolate grown in CHSE-214 cells. Bar represents 100nm.

## 2. 바이러스 단백질 및 핵산

분리된 바이러스들의 핵산을 추출하여 agarose gel상에서 전기영동한 결과 모두 IPNV와 비슷한 위치에 두 개의 gene segment가 있음이 확인되었다(Fig. 2). 이와같은 특성은 dsRNA의 genome을 가진 birnavirus의 전형적인 특성으로써 중화실험의 결과와 같이 이들 분리된 바이러스들이 birnavirus에 속함을 나타내었다.

면역 침전법을 사용하여 바이러스 단백질들의 특성을 실험한 결과 Fig. 3과 같았다. <sup>35</sup>S-methionine으로 label한 바이러스 단백질들을 X-ray film에 감광한 결과 IPNV의 VP1 위치의 band는 보이지 않았다. 그렇지만 IPNV의 VP2와 VP3의 단백질 band는 뚜렷하게 나타났는데, 분자량 50kd 부근에 존재하는 VP2 단백질에는 band가 두개 이상이 관찰되었다. 이는 VP2 구조 단백질의 전구물질들도(Dobos, 1977) 항체에 같이 반응하여 나타난 것이라고 생각된다. 실험에 사용한 바이러스들 사이

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of RNA segments of birnaviruses. Proteinase K treated viral RNAs were analysed in 1.5% agarose gel. Following electrophoresis for 16hr at 50V, the gel was stained by EtBr and photographed under UV light.

에는 분자량 50kd 부근에 존재하는 VP2 단백질의 크기가 달랐는데, 분리된 3종류의 바이러스들 중 2종류는 같은 크기의 단백질을 지니고 있었으며 나머지 하나는 크기가 달랐다. 이를 IPNV의 세 표준형인 VR-299, SP 그리고 AB의 주 단백질과 비교한 결과, CS는 AB와 그리고 DS는 SP와 같은 양상을 나타내었다.

## 3. 중화실험

IPNV의 세 표준형인 VR-299, SP 그리고

대하여 높은 중화값을 나타내었으나, YJ는 세표준 혈청형중 SP에 약한 중화값을 나타내었다.

Table 2. Comparison of three virus isolates to three reference IPNV strains(VR299, SP and AB) by cross neutralization

Virus*	antisera		
	VR299	SP	AB
VR299	51200**	3200	3200
SP	1600	12800	800
AB	800	3200	12800
CS	600	1600	12800
YJ	200	800	400
DS	400	6400	800

\* The amount of virus used in each test was 100 TCID<sub>50</sub>

\*\* Reciprocal of the serum dilution giving protection to 50% of the test cel cultures.

Fig. 3. Comparisons of the virion polypeptides of three isolates and three reference strains of IPNV(VR299, SP and AB) immunoprecipitated from <sup>35</sup>S-methionine labeled CHSE-214 cells. The precipitates were analysed in 10% polyacrylamide gels. Following electrophoresis, the virion polypeptides were visualized by coomassie staining, followed by drying and development on X-ray film.

AB에 대한 항혈청을 사용하여 교차중화실험을 하였다(Table 2). 먼저 대조구로 사용한 IPNV의 세 표준혈청형의 경우 서로 다른 항혈청에 의하여도 중화가되는 교차중화현상을 보이므로써 세 표준혈청형 사이에 공통항원이 존재함을 알 수 있었다. 그런데 자신의 항혈청에 의하여 특히 높은 중화값을 보여 각 혈청형간에 분명한 차이를 나타냈다. 다음으로 넙치에서 분리된 바이러스들은 모두 IPNV의 세 표준혈청형에 대한 항혈청에 의하여 감염성이 중화되었다. 이 결과로부터 양식 넙치에서 분리된 3종류의 바이러스 모두 IPNV와 혈청학적 특성이 유사함을 알 수 있었고, 특히 CS는 AB 항혈청에 대하여 높은 중화값을 보였고, DS는 SP항혈청에

### 고 찰

1993년 및 1994년도 우리나라 남해안 일원 육상양식장에서 사육중이던 넙치의 병든치어로부터 바이러스를 분리하여 바이러스의 형태, 구조단백질 및 핵산의 분석, 그리고 항혈청을 사용한 중화실험등을 통하여 특성을 확인한 결과 세 바이러스 모두 IPNV와 유사한 특성을 지닌 birnavirus임이 확인되었으며, 특히 분리한 바이러스중 CS는 IPNV-AB 혈청형과 유사한 특성을 보였고, DS는 IPNV-SP 혈청형과 유사한 특성을 나타내었다.

지금까지 우리나라에서 IPNV들은 두가지 공통적인 특징이 있었다. 첫째, 모든 IPNV들은 담수에서 양식중이던 금붕어, 무지개송어, 연어등의 담수어에서 분리되었으며, 둘째, 혈청형을 정확하게 알수 없는 한 종류의 IPNV(Park *et al.*, 1989)를 제외하고는 모두 IPNV의 VR-299 혈청형이었다는 점이다. 그런데 이번에 우리나라의 양식 넙치 치어에서

분리된 birnavirus는 약간 다른 특성을 지니고 있었는데, 해산어에서 분리되었고 혈청형에 있어서 IPNV의 SP와 AB의 혈청형과 유사한 것들이라는 점이다. 따라서 이와 같은 특성을 지닌 바이러스의 기원은 현재로서는 정확하게 알 수가 없지만 두가지 가능성을 생각할 수가 있다. 첫째가 우리나라 수계에 이미 존재하고 있던 IPNV가 양식 넙치에 감염하였다고 생각할 수가 있으나 그 가능성은 그리 높지 않다. 왜냐하면 비록 1984년도부터 우리나라에서 양식중이던 연어류에서 여러번에 걸쳐 IPNV가 분리되었지만 지금까지 보고된 IPNV는 모두 우리나라의 중부지방에서만 분리되었고 또한, 하나의 예(Park *et al.*, 1989)를 제외하고는 모두 VR-299 혈청형이었다(Hah *et al.*, 1984; Hedrick *et al.*, 1985). 물론 VR-299 혈청형의 바이러스가 돌연변이를 통하여 이번 양식 넙치에서 분리된 것들과 같이 SP와 AB 혈청형이 나타날 수도 있다. 그렇지만 돌연변이가 생겨서 이와같은 혈청형이 나타나기에는 너무나 시간적으로 짧다. 두번째 가능성으로써, 일본은 오래전부터 넙치를 포함한 양식 해산어에 birnavirus가 감염되어 있고(Sorimachi and Hara, 1985; Kusuda *et al.*, 1989), 또한 양식 해산어에서 분리한 birnavirus에 IPNV-SP와 AB의 혈청학적 특성을 지니는 것들이 존재한다는 사실을 고려해보면(Hosono *et al.*, 1994) 이들 바이러스가 어류를 통해 유입되었을 가능성이 높지만, 이를 정확하게 확인하기 위하여는 분자생물학적인 연구가 더 진행되어야 하겠다.

일본의 경우와 마찬가지로 우리나라의 수계에 IPNV의 세 혈청형 모두 존재한다. 그런데 담수어에 감염하는 것은 주로 IPNV의 VR-299 혈청형인 반면 해산어에 감염하는 birnavirus는 주로 SP 혹은 AB 혈청형이다. 아직까지 더 많은 자료가 필요하겠지만 현재까지의 결과로 보면 IPNV의 혈청형에 따라 감염하는 숙주의 종류가 다르며 이는 birnavirus에 의한 질병의 조절에 중요한 정보를 제공하여 주는 것이라고 생각된다.

## 참 고 문 헌

- Amos, K. H. : Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens. 3rd ed. Am. Fish. Soc., Bethesda, MD, 1985.
- Chou, H. Y., Lo, C. F., Tung, M. C., Wang, C. H., Fukuda, H., and Sano, H. : The general characteristics of a birnavirus isolated from cultured loach(*Misgurnus-anguillicaudatus*) in Taiwan. Fish Pathol., 28 : 1-7, 1993.
- Dobos, P. : Virus specific protein synthesis in cells infected by infectious pancreatic necrosis virus. J. Virol., 21 : 242-258, 1977.
- Dobos, P., Hill, B. J., Hallet, R., Kells, D. T. C., Becht, H., and Teninges, D. : Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. J. Virol., 32(2) : 593-605, 1979.
- Fields, B. N. : Virology. Raven Press, pp. 17, New York, 1985.
- Gorie, S., Nakamoto, K. and Kimura, T. : *Rhabdovirus olivaceus*(hirame rhabdovirus) infection occurred among tank cultured hirame at hyogo prefecture. Bull. Hyogo Pref. Fish Exp. Stn., 24 : 43-47, 1986.
- Hah, Y. C., Hong, S. W., Kim, M. H., Fryer, J. L. and Winton, J. R. : Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from gold fish (*Carassius auratus*) and chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in Korea. Kor. J. Microbiol., 22 : 85-90, 1984.
- Hedrick, R. P., Eaton, W. D., Fryer, J. L., Hah, Y. C., Park, J. W. and Hong, S. W. : Biochemical and serological properties of birnaviruses isolated from fish in Korea. Fish Pathol., 20(4) : 463-468, 1985.

- Hosono, N., Suzuki, S. and Kusuda, R. : Evidence for relativeness of Japanese isolates of birnaviruses from marine fish to IPNV. *J. Fish Dis.*, 17 : 433-437, 1994.
- Iida, Y., Masumura, K., Nakai, T., Sorimachi, M. and Matsuda, H. : A viral disease in larvae and juveniles of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *J. Aquatic Animal Health*, 1 : 7-12, 1989.
- Kelly, R. K., and Nielsen, O. : Comparative serology of 3 recent Canadian isolates of aquatic birnavirus. *Fish Pathol.*, 28 : 161-164, 1993.
- Kusuda, R., Kado, K., Takeuchi, Y. and Kawai, K. Characteristics of two virus strains isolated from young Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Suisanzoushoku*, 37 : 115-120, 1989.
- Laemmli, U. K. : Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T5. *Nature(London)*, 227 : 680-685, 1970.
- Lannan, C. N., Winton, J. R. and Fryer, J. L. : Fish cell lines : establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. *In Vitro*, 20 : 671-676, 1984.
- Macdonald, R. D. and Gower, D. A. : Genomic and phenotypic divergence among three serotypes of aquatic birnaviruses(Infectious Pancreatic Necrosis Virus). *Virol.*, 114 : 187-195, 1981.
- Mortensen, S. H., Evensen, O., Rodseth, O. M. and Hjeltnes, B. K. : The relevance of Infectious Pancreatic Necrosis Virus(IPNV) in farmed Norwegian Turbot(*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 115 : 243-252, 1993.
- Novoa, B., Toranzo, A. E., Dopazo, C. P., Barja, J. L. and Figueras, A. : Isolation of IPN virus serotype VR-299 from Turbot in Europe. *Dis. Aquat. Organ.*, 17 : 61-65, 1993.
- Novoa, B., Figueras, A., Puentes, C. F., Ledo, A. and Toranzo, A. E. : Characterization of a birnavirus isolated from diseased turbot cultured in Spain. *Dis. Aquat. Organ.*, 15 : 163-169, 1993.
- Okamoto, N., Sano, T., Hedrick, R. P. and Fryer, J. L. : Antigenic relationships of selected strains of infectious pancreatic necrosis virus(IPNV) and eel virus european(EVE). *J. Fish Dis.*, 6 : 19-25, 1983.
- Park, J. W., Lee, J. J., Jeong, G. and Hah, Y. C. : Characterization of the infectious pancreatic necrosis virus(IPNV) isolated from cultured rainbow trout in Korea. *Kor. J. Microbiol.*, 27(3) : 225-230, 1989.
- Pilcher, K. S., and Fryer, J. L. : The viral disease of fish : a review through 1978. *Crit. Rev. Microbiol.*, 7 : 287-364, 1980.

## Characterization of birnavirus isolated from cultured flounder fry

Sang-Gyu SOHN, Myoung-Ae PARK, Jeong-Wan DO\*,  
Cho-Rok JUNG and Jeong-Woo PARK\*

*Pathology Division, National Fisheries Research and  
Development Agency, Pusan, 619-900, Korea\**  
*Department of Microbiology, University of Ulsan,  
Kyongnam, 600-749, Korea*

During 1993 and 1994, some mortalities of flounder(*Paralichthy olivaceus*) fry were recorded in several fish farms and viruses were isolated from 3 of the farms. Electron microscopic examination revealed that the virus particles were hexagonal and unenveloped with an average diameter of 50 to 55nm. Serological and molecular properties of these isolates were examined. The viral RNA and polypeptides patterns on electrophoresis, as well as neutralization test results, showed that these isolates were birnaviruses and two were closely related to infectious pancreatic necrosis virus(IPNV) serotype AB and one was to IPNV serotype SP. This is the first isolation of birnaviruses from marine fish in Korea.

---

Key Words : Flounder(*Paralichthy olivaceus*), Birnavirus, IPNV, Serotype