

중합효소연쇄반응법(Polymerase Chain Reaction, PCR)에 의한 남해안 양식산 어류로부터 Birnavirus의 검출

오명주[†] · 정성주 · 김영진*

여수대학교 어병학과, *부산대학교 생물학과

복부팽만, 안구돌출 및 체색흑화의 외부증상을 대표적으로 나타내며, 세균 및 기생충과 같은 병원체 감염의 원인이 아닌 버나바이러스성으로 판단되어지는 남해안 양식산 넙치, 조피볼락, 농어를 대상으로 RT-PCR 법에 의한 체내 감염 바이러스 검출을 행하였다. IPNV 및 MBV만을 선택적으로 확인 검출 할 수 있으며 감염어체를 사용한 검출에서 배양 세포법(12/50)에 비하여 높은 검출 감도(46/50)를 나타내는 RT-PCR 진단법을 도입하였다. 아울러 우리나라 남해안 양식장에 버나바이러스의 감염이 폭넓게 진행되고 있음을 확인할 수 있었다.

Key words : Birnavirus, Polymerase chain reaction (PCR), Virus detection, Marine fish

양식 해산어의 바이러스성 감염증 중에서 버나 바이러스(birnavirus)에 의한 질병은 Sorimachi and Hara(1985)가 양식산 방어에서 복수증(ascites)을 특징으로 하는 질병의 원인체로 virus-like한 병원체를 분리한 것에서부터 알려지기 시작하였다. 어류 병원체로서의 이 바이러스는 그 이후 Egusa and Sorimachi(1986) 등의 병리조직학적 연구를 통하여 해산어류 감염병원체로서 확인되어져 YAV(yellowtail ascites virus)로 불리워지게 되었다(개정 어병명, Fish Pathology, 1990). 그 이후 Ishiki 등(1993)에 의하여 채란용 친어에서 치어로의 YAV의 수직감염이 면역학적 방법에 의하여 확인되어졌고, Kusuda 등(1993)에 의하여 YAV는 IPNV의 3가지 대표혈청형(Ab, Sp, VR-299) 바이러스와 혈청학적 특성이 다른 점이 확인되었다. Nakajima 등(1993) 및 Nakajima and Sorimachi(1994)는 이상유영 및 척추만곡 증상을 나타내는 양식 방어의 치어로부터 YAV 항혈청에 중화되어 지지만 배양세포 감수성 및 구조단백의 차이점을 갖는 유사 바이러스를 분리하여 viral deformity virus(VDV)를 보고하였다. Nguyen 등(1994)은 바이러스성 신경괴사증감염 넙치 치어에서 YAV와 유사한 버나바이러스를 분리하였다.

이와 같이 다양한 해산 어종에서 분리되어진 YAV는 숙주세포의 선택성 및 혈청학적 차이점으로 IPNV와는 다르게 취급되어져 오던 중에 Hosono 등(1994)에 의하여 바이러스 항원성 protein의 분석에 의해 YAV는 IPNV와는 항원성에 있어 차이가 있는 것으로 보고되어졌고, Hosono 등(1996)은 바이러스의 segment A에 존재하는 VP2와 NS의 경계영역의 염기배열을 조사하였다 그 결과 해산 어 유래 버나바이러스는 지금까지 담수어 유래로 분리되어졌던 20여종의 IPNV와는 다른 genogroup으로 구분되어, YAV로 대표되어지던 해산어 유래 버나바이러스는 해양버나바이러스(marine birnavirus, MBV)로 분류되어졌다.

버나바이러스 검출에 대한 연구로 monoclonal antibody를 이용한 면역학적 검출(진단)법(Hattori et al., 1984; Chen et al., 1985; Rodack et al., 1988)과, 바이러스 gene으로부터 조립되어진 oligo DNA 혹은 cDNA를 사용한 nucleic acid hybridization법(Christie et al., 1988; Rimstad et al., 1990; Dopazo et al., 1994) 및 바이러스 특이 유전자의 증폭에 의한 중합효소연쇄반응법(polymerase chain reaction, PCR)(Lopez-Lastra et al., 1994)이 IPNV의 검출법으로 소개되어졌다. Suzuki 등(1997)은 IPNV(Heppell et al., 1992) 및 MBV(Hosono et al., 1996)의 sequence에 기초하여

[†]Corresponding author

birnavirus specific primer를 설계하고, 감염증상을 나타내는 해산어 뿐만 아니라 무중상 보균 상태의 해산어로부터 MBV를 검출할 수 있는 진단법을 제안하였다.

국내 양식 해산어로부터의 버나바이러스는 손 등 (1995)과 오 등(1997)이 넙치 치어에서, Seo 등 (1998)이 조피볼락 치어에서 배양주화세포를 이용하여 분리하였으며, 이들 바이러스는 IPNV와 유사한 것으로 보고되었다. 본 연구는 우리나라의 양식산 해산어에서 감염이 보고되고 있는 버나바이러스의 진단법을 확립하고 어체 및 생산과정중 감염 루트를 파악하여 질병 방역대책을 수립하기 위한 기초연구로서 남해안 일대의 넙치, 농어 및 조피볼락 종묘생산장에서 사육도중 발병되어진 병어를 채집하여 PCR에 의한 버나바이러스 검출을 시도하여 감염상황을 파악하고 진단방법으로서의 적용가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

Virus strain 및 배양

PCR법에 의한 해산어류로 부터 birnavirus의 검출 및 버나바이러스 특이적 검출확인을 위하여 해산어버나바이러스로 분리된 MBV Y6(Kusuda et al., 1993), 서로 다른 혈청형인 IPNV VR-299, IPNV Ab 및 IPNV Sp, 연어과 어류 랩도바이러스인 infectious hematopoietic necrosis virus(IHNV HV-1)를 일본 북해도대학의 Dr. Yoshimizu와 고

치대학의 Dr. Suzuki로부터 분양받아 사용하였고, 본연구실에 보존중인 연어과 어류 레트로바이러스인 retrovirus of salmonid(RVS BrCo-9221)와 국내 양식 해산어 바이러스에서 분리 보고된 것 중에서 랩도바이러스인 nubchi rhabdovirus(NRV, Oh and Choi 1998)와 이리도바이러스인 red seabream iridovirus(RSIV, Jung and Oh, 1999)를 사용하였다. 실험에 사용한 바이러스 배양액은 상법에 따라 CHSE-124 cell, RTG-2 cell 및 BF-2 cell을 사용하여 준비하였다.

Fish samples

PCR법 및 배양세포를 이용한 CPE 관찰법으로 해산어 버나바이러스 검출을 위해 사용한 어류 샘플을 Table 1에 나타내었다. 바이러스 검출용 시료어는 4종류의 양식산 해산어로서 1998년 및 1999년 초반까지 본 연구실에 검사의뢰 되어온 개체들 중에서 안구돌출, 채색흑화, 복부팽만 등의 감염성 질병으로 보여지는 외부증상을 나타내었으나 기생충성, 진균성, 세균성 감염증으로 확인되지 못한 원인불명(버나바이러스성 질병?) 병어로 -80°C에 냉동시켜오던 것 중에서 선택한 샘플(sample No. 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11) 및 1999년 1월부터 5월에 걸쳐 무중상 또는 일부 복부팽만의 증상을 나타내며 폐사가 일어난 양식현장에서 생잔어를 샘플링하여 -80°C로 냉동 보존하고 있던 개체들(sample No. 2, 5, 10, 12)을 사용하였고, 샘플어체 중에서 버나바이러스 감염어체를 직접 검출함에 있어 특

Table 1. List of clinical fish samples employed in this study

Sample (No of fish)	Scientific name	Sampling date & sampling site	Average length (cm)
1. Flounder (5)	<i>Paralichthys olivaceus</i>	11. Dec. 1998, Namhae	2.1
2. Flounder (5)	<i>Paralichthys olivaceus</i>	17. Jan. 1999, Yosu	2.5
3. Flounder (3)	<i>Paralichthys olivaceus</i>	19. Jan. 1999, Wando	2.5
4. Flounder (4)	<i>Paralichthys olivaceus</i>	3. Feb. 1999, Toyoung	2.8
5. Flounder (5)	<i>Paralichthys olivaceus</i>	14. Apr. 1999, Jindo	11.2
6. Flounder (3)	<i>Paralichthys olivaceus</i>	16. Apr. 1999, Daechon	11.2
7. Rock fish (5)	<i>Sebastes schiegeli</i>	12. Jun. 1998, Yosu	5.5
8. Rock fish (3)	<i>Sebastes schiegeli</i>	5. Jul. 1998, Namhae	13
9. Rock fish (4)	<i>Sebastes schiegeli</i>	21. Jul. 1998, Daechon	15
10. Rock fish (5)	<i>Sebastes schiegeli</i>	23. May 1999, Yosu	2.0
11. Sea bass (5)	<i>Lateolrax japonicus</i>	23. Feb. 1998, Namhae	1.5
12. Sea bass (3)	<i>Lateolrax japonicus</i>	24. Feb. 1999, Yosu	2.0
13. Flounder	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Yosu	2.5

이적 검출을 확인하기 위한 무감염 정상어체는 산란 친어로부터 지속적으로 질병을 관리하여 오던 여수지역의 특정 양어장 넘치 치어(sample No. 13)를 사용하였다. 바이러스 검출용 샘플어의 공급지역은 여수(돌산, 거문도 포함), 완도, 진도, 대천, 남해, 통영 등의 남해안 및 서해안의 일부로서 어종은 넘치, 조피볼락 및 농어에 한정하였다.

Extraction of RNA

바이러스 검출을 위한 핵산의 추출은 시료번호 1, 2, 3, 4, 7, 10, 11, 12은 개체 전체를, 시료번호 5, 6, 8, 9는 각 개체의 신장 및 비장을 함께 취하였다. 시료는 각각의 멸균된 stomacher bag에 넣어 3회 얼리고-녹임을 반복한 후, TE buffe(0.2 M Tris-HCl, pH 8.3, 0.1 M EDTA)와 시료를 9 : 1의 비율로 넣고 균질화시켰고, 이 액을 0.45 µm filter로 여과하여 얻은 전처리 시료로부터 RNA Isolation Kit(Boehringer mannheim Co.)를 이용하여 RNA를 분리하였다.

Reverse Transcription

감염 어체로부터 추출된 RNA를 70°C에서 10분간 변성시킨 후 즉시 얼음위에서 냉각시키고, 여기에 Oligo(dT)15 primer와 reverse transcription mixture를 넣어 전체 20 µl내의 조성을 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTPs, 10 mM DTT, 10 units reverse transcriptase(GibcoBRL)가 되게 하였다. 역전사 반응은 42°C에서 50분간 실시하였고 70°C에서 15분간 처리하여 잔존효소활성을 제거하였으며, 이와 같은 처리로 얻어진 cDNA를 PCR의 주형으로 이용하였다.

Polymerase Chain Reaction

PCR primer는 Suzuki 등(1997)에 의해 IPNV Jasper strain의 segment A서열로부터 디자인된 프라이머(P1/P2)를 사용하였다(Table 2).

PCR 증폭반응은 100 pM의 각 primer, 0.2 mM

dNTPs, 1 U Taq DNA polymerase, 2.5 mM MgCl₂ 이 포함된 혼합물에 10 ng의 template를 첨가하여 실시하였다. 반응조건은 우선 95°C에서 1분간 변성, 48°C에서 1분간 결합, 72°C에서 1분간 신장시키는 조건으로 30 cycle을 진행하였다. 반응산물은 1.5% agarose gel을 이용하여 확인하였다.

Virus isolation

배양세포를 이용한 샘플어의 바이러스 감염확인 은 CHSE-214 cell을 사용하여 행하였다. 상기의 PCR용 샘플제작에 사용되어진 어체의 마쇄액 일부를 취하여 HBSS에 희석하고 재 마쇄후 450 nm millipore filter로 여과하여, 미리 준비한 CHSE-214 세포에 접종하고 CPE의 발현을 관찰하여 MBV 감염에 의한 특이적인 세포변성효과의 관찰 결과에 따라 virus 양성임을 확인하였다. 세포배양액은 100 IU/ml의 penicillin, 100 µg/ml의 streptomycin, 10% FBS(Fetal bovine serum) 첨가 MEM(Eagle's minimum essential medium, Gibco)을 사용하였다.

결 과

MBV 및 IPNV strain의 RT-PCR

해산 양식 방어로부터 분리 보고되어진 MBV Y6 및 연어과 어류로부터 분리되어진 IPNV(IPNV Ab, IPNV Sp, IPNV VR-299)를 CHSE-214 cell line에 배양하여 각각의 바이러스 추출핵산을 대상으로 Suzuki *et al.*(1997)이 제안한 primer(P1, P2)로 RT-PCR하고 얻어진 특이영역의 핵산 증폭 산물을 1% agarose gel에서 전기영동한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 4종의 어류 유래 버나바이러스는 PCR에 의하여 360 bp의 크기를 갖는 DNA band를 공통적으로 나타내었다.

Specificities of PCR

다양한 종류의 어류 유래 바이러스를 이용하여

Table 2. Primers used for RT-PCR amplification of birnavirus gene

Primer code	Primer sequence	Product length (bp)
P1	5'-AGA-GAT-CAC-TGA-CTT-CAC-AAG-TGA-C-3'	360
P2	5'-TGT-GCA-CCA-CAG-GAA-AGA-TGA-CTC-3'	

Fig. 1. PCR products in RT-PCR. A 360-bp fragment in RT-PCR were detected. Three strains of IPNV (Ab, Sp, VR-299) and MBV (MBV Y6) tested are indicated at the top of lanes. DNA molecular weight maker (M) were also run.

본 연구에서 사용하고자 하는 버나바이러스 검출용 primer를 이용한 PCR법의 바이러스 선택 특이성을 조사한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. MBV Y6의 증폭산물 만이 전기영동에 의해 버나바이러스 특이적 밴드를 360 bp의 크기에서 나타내었으나, 그외 연어과 어류 램도바이러스인 IHNV, 연어과 어류 레트로바이러스인 RVS, 넙치 램도바이러스인 NRV 및 돝류 이리도바이러스인 RSIV 추출액산의 PCR에서는 생산된 DNA 산물의 확인이 불가능하였다.

PCR법을 이용하여 감염어체를 직접 시료로 사용하였을 때의 감염어 및 무감염어의 선택성을 확인하기 위하여 CPE 확인이되어진 버나바이러스 감염어(sample No. 1) 및 무감염 정상어(sample No. 13)의 신장 및 비장 homogenized sample을 반응시킨 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 바이러스 감염 유무를 지속적으로 확인해온 무감염 정상어의 경우(N1, N2, N3) PCR 증폭산물이 전기영동에 의하여 확인되지 않았으나, 바이러스 감염어(V1, V2,

Fig. 2. Species specificity of PCR. Viruses employed are indicated at the top of the lanes. DNA molecular weight maker (M) were also run.

Fig. 3. RT-PCR in normal and infected flounder. Normal fish (sample No. 13, N1, N2, N3) and virus-infected fish (sample No. 1, V1, V2, V3) were tested. DNA molecular weight maker (M) were also run.

V3)의 3마리의 검사어 모두에서 MBV Y6 및 IPNV를 이용한 결과에서와 마찬가지로 크기의 버나바이러스 특이적 증폭산물이 확인되어졌다.

PCRs of clinical samples

국내 해산어 양식장에서 채집된 넙치, 조피볼락, 농어 및 능성어를 대상으로 PCR법 및 배양세포접종법에 의한 버나바이러스 감염어의 검출 결과를 Table 3에 나타내었다. 넙치의 경우 남해(1), 여수(2), 완도(3), 통영(4), 진도(5) 및 대천(6) 등 전 지역의 검사구에서 PCR에 의한 버나바이러스 검출이 확인되어졌고, 조피볼락 샘플의 경우 여수(7, 10), 남해(8), 대천(9) 등의 양식장에서 마찬가지로 버나바이러스가 검출되어졌다. 또한 남해(11) 및 여수(12)에서 생산중이던 농어에서도 어체내 버나바이러스의 감염상태가 확인되어졌다.

Table 3. Detection results of birnavirus genome by RT-PCR and virus isolation in cell culture

Sample (No of fish)	PCR	CPE
1. Flounder (5)	+ 5/5	+ 3/5
2. Flounder (5)	+ 5/5	+ 3/5
3. Flounder (3)	+ 3/3	+ 1/3
4. Flounder (4)	+ 4/4	+ 1/4
5. Flounder (5)	+ 5/5	-
6. Flounder (3)	+ 3/3	+ 1/3
7. Rock fish (5)	+ 2/5	-
8. Rock fish (3)	+ 3/3	-
9. Rock fish (4)	+ 4/4	+ 1/4
10. Rock fish (5)	+ 5/5	+ 2/5
11. Sea bass (5)	+ 2/5	-
12. Sea bass (3)	+ 3/3	-
13. Flounder (5)	-	-

고 찰

해산어류의 종묘생산기에 있어서 가장 문제가 되고있는 질병의 하나가 버나바이러스로, 해산어류로부터 분리되는 버나바이러스를 통틀어 MBV라 한다. MBV는 넓은 숙주역을 가지며, 방어나 넙치에서는 복수를 주 증상으로 하지만, 어종에 따라서는 복수의 증상은 없고, 안구돌출과 신장의 퇴색만을 나타내기도 한다(Suzuki, 1996). 이처럼 MBV는 숙주역이 넓은 반면, 숙주에 따라 병의 증상도 다르므로 진단에 어려움이 있다. Lopez-Lastra *et al.* (1994) 와 Blake *et al.*(1995)은 PCR법을 이용하여 장기의 생시료로부터 IPNV의 유전자를 검출하였으며, Suzuki *et al.*(1997)도 nested-PCR법으로 MBV를 검출하여, 다양한 증상을 나타내는 MBV를 손쉽고 높은 감도로 검출하는 방법을 제안했다. PCR법은 바이러스분리법과 비교하면, 분리후의 동정에 필요한 중화반응이나 enzyme immunoassay의 단계가 필요하지 않으므로 생시료로부터 신속, 정확하게 진단에 사용이 가능한 장점이 있다. 본 연구에서는 Suzuki *et al.*이 제안한 primer set으로, 버나바이러스 감염증으로 보이는 어류로부터 PCR법으로 바이러스 유전자를 검출하여, 한국에서 나타나고 있는 해산어류로부터의 버나바이러스의 검출에 PCR법의 이용이 가능함을 검증하였다. 또한, 이 방법을 사용할 경우, 현재 우리 나라에서 발병하고 있는 해산어의 여러 바이러스성 질병의 원인 바이러스와는 교차반응을 나타내지 않고, 버나바이러스만을 특이적으로 검출 가능하다는 것을 증명하였다.

현재까지, 우리 나라에 있어서는 넙치와 조피볼락에서 버나바이러스가 분리된다는 보고가 있다(손 등, 1995; 오 등, 1997; Seo 등, 1998). 이들 보고는 배양주화세포를 이용하여 바이러스를 분리한 것으로, 본 연구를 통하여 이외에도 많은 어종에서 이미 MBV가 만연하고 있을 것으로 생각되어 졌다. 본 연구에서는 남해안 각지에서 취한 버나바이러스 감염증으로 보이는 넙치, 조피볼락 및 농어 50샘플로부터 PCR법을 이용하여 버나바이러스의 특이유전자를 검출하였다. 그 결과 남해안의 시료를 취한 모든 지역에서 바이러스의 유전자가 검출되었으며, 넙치, 조피볼락, 농어에서 높은 빈도로 나타나, 50샘플중 46샘플이 양성이었다. 또한, 바

이러스 배양에 의한 검출법 보다는 높은 감도를 보였다. 이 결과로부터, 우리 나라 남해안의 넓은 지역에 걸쳐 MBV가 만연하고 있으며, 그 대책이 시급한 것으로 생각된다. 현재의 바이러스성 질병의 대책으로는 원인바이러스의 조기검출에 의한 예방이 최우선책으로, 감도가 높은 PCR법을 이용하여 친어로부터의 수직 감염 루트를 차단하는 방법 등의 예방대책이 가능하다.

한국에서는 MBV가 종묘생산기의 넙치에 복수를 일으키며 폐사를 일으키는 것으로 보고되고 있으나, 현재까지 넙치에 대한 병원성의 검증은 이루어지지 않고 있어 넙치에의 병원성의 검증이 꼭 필요하다. 또한, 본 연구에서 분리된 12개의 strain사이의 혈청학적 분자생물학적 연구를 계획하고 있다.

사 사

이 논문은 1998년도 학술진흥재단의 신진교수연구비 지원에 의해 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Blake, S. L., Schill, W. B., McAllister, P. E., Lee, M. K., Slinger, J. T. and Nicholson, B. L. : Detection and identification of aquatic bimaviruses by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 835-839, 1995.
- Chen, S. N., Kou, G. H. Hedrick, R. P. and Fryer, J. L. : The occurrence of viral infection of fish in Taiwan. In: Ellis A.E.(ed). *Fish and shellfish pathology*, pp. 313-319, 1985.
- Christie, E. K., Harvarstein, L. S., Djupvik, H. O., Ness, S. and Endersen, C. : Characerization of a new serotype of infectious pancreatic necrosis virus isolated from atlantic salmon. *Arch. Virol.*, 103: 167-177, 1988.
- Dopazo, C. P. Hetrick, F. M. and Samal, S. K.: Use of cloned cDNA probes for diagnosis of infectious pancreatic necrosis virus infections. *J. Fish Dis.*, 17: 1-16, 1994.
- Egusa, S. and Sorimachi, M.: A histopathological study of yellowtail ascites virus (YAV) infection of fingerling yellowtail. *Fish Pathol.*, 21: 113-121. 1986.
- Hattori, M., Kodama, H., Ishiguro, A., Honda, A., Mikami, T. and Izawa, H. : In vitro and in vivo detection of infectious pancreatic necrosis virus in fish by ELISA. *Am. J. Vet. Res.*, 45: 1876-1879, 1984.

- Heppell, J., Berthiaume, L., Yarrab, E., Lecomte, L. and Arella, M. : Evidence of genomic variations between infectious pancreatic necrosis virus strains determined by restriction fragment profiles. *J. Ge. Virol.*, 72: 2863-2870, 1992.
- Hosono, N., Suzuki, S. and Kusuda, R. : Evidence for relatedness of Japanese isolates of birnaviruses from marine fish to IPNV. *J. Fish Dis.*, 17: 433-437, 1994.
- Hosono, N., Suzuki, S. and Kusuda, R. : Genogrouping of birnaviruses isolated from marine fish: a comparison of VP2/NS junction regions on genome segment A. *J. Fish Dis.*, 19: 295-302, 1996.
- Isshiki, T., Kawai, K. and Kusuda, R. : Detection of yellowtail ascites virus and neutralizing antibody in brood stocks of yellowtail. *Fish Pathol.*, 28(2): 65-69, 1993.
- Jung, S. J., and Oh, M. J. : Iridovirus-like infection associated with high mortality in a south coastal area of the Korean peninsula. *J. Fish Dis.*, in press
- Kusuda, R., Nishi, Y., Hosono, N. and Suzuki, S. : Serological comparison of birnaviruses isolated from several species of marine fish in south west Japan. *Fish Pathol.*, 28 (2): 91-92, 1993
- Kusuda, R., Nishi, Y., Hosono, N. and Suzuki, S. : Serological comparison of birnaviruses isolated from several species of marine fish in south west Japan. *Fish Pathol.*, 28: 91-92, 1998.
- Lopez-Lastra, M., Gonzalez, M., Jasehes, M. and Sandino, A. : A detection method for infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) based on reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR). *J. Fish Dis.*, 17: 269-282, 1994.
- Nakajima, K., Maeno, T., Arimoto, M., Inoue, K. and Sorimachi, M. : Viral derfomity of yellowtail fingerlings. *Fish Pathol.*, 28 (3): 125-129, 1993
- Nakajima, K. and Sorimachi, M. : Serological and biochemical characterization of two birnavirus; VDV and YAV isolated from cultured yellowtail. *Fish Pathol.*, 29: 183-186, 1994.
- Nguyen, H. D., Mekuchi, T., Imura, K., Nakai, T., Nishizawa, T. and Muroga, M. : Occurrence of viral nervous necrosis (VNN) in hatchery-reared juvenile Japanese flounder. *Fish Sci.*, 60: 551-554, 1994.
- Oh, M. J., Choi, T. J., Sim, D. S., Park, M. A., Sohn, S. K., Kim, J. W. and Kim, Y. J. : Effects of environmental seawater on the infectivities of HRV, FBV and RVS. *J. Fish Pathol.*, 10: 165-176, 1997.
- Oh, M. J. and Choi, T. J. : A new rhabdovirus isolated in Korea from cultured Japanese flounder. *J. Fish Pathol.*, 11: 129-136, 1998.
- Rimstad, E., Krona, R., Hornse, E., Olsvik, O. and Hyllseth, B. : Detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) RNA by hybridization with an oligo-nucleotide DNA probe. *Vet. Microbiol.*, 23: 211-219, 1990.
- Rodack, L., Pospisil, Z., Tomanek, J., Vesely, T., Obr, T. and Valieek, L. : ELISA detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in culture fluids and tissue homogenates of rainbow trout. *J. Fish Dis.*, 11: 225-235, 1988
- Seo, J. J., Heo, G. J. and Lee, C. H. : Characterization of aquatic birnavirus isolated from rock fisk cultured in Korea. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 18: 87-92, 1998.
- Sohn, S., Park, M., Do, J., Choi, J. and Park, J. : Birnavirus Isolated from Cultured Flounder in Korea. *Fish Pathol.*, 30: 279-280, 1995.
- Sorimachi, M. and Hara, T. : Characteristics and pathogenicity of virus isolated from yellowtail fingerlings showing ascites. *Fish Pathol.*, 19: 231-238, 1985.
- Suzuki, S.: Molecularbiological study of fish birnavirus. *Virus* 46(1): 73-78, 1996.
- Suzuki, S., Hosono, N. and Kusuda, R. : Detection of aquatic birnavirus gene from marine fish using a combination of reverse transcription and nested PCR, *J. Mar. Biotechnol.*, 5: 205-209, 1997.

Detection of Birnavirus from Cultured Marine Fish Using Polymerase Chain Reaction (PCR)

Myung-Joo Oh, Sung-Ju Jung and Young-Jin Kim*

Department of Fish Pathology, Yosu National University

**Department of Biology, Pusan National University*

To detect birnavirus from cultured marine fish, RT-PCR assay was developed. This method was specific for aquatic birnaviruses that include IPNV Sp., IPNV Ab, IPNV VR-299 and MBV Y6. The birnavirus gene was detected (birnavirus positive samples detected 46/50) from clinical samples signed with abdominal distension and overall darkening even though the samples gave negative results in virus isolation (birnavirus isolate with CHSE-214 cell showed 12/50).

Key words : Birnavirus, Polymerase chain reaction (PCR), Virus detection, Marine fish