

## 양식산 넙치 치어로부터 분리한 버나바이러스의 Marine Birnavirus(MBV)와 Infectious Pancreatic Necrosis Virus(IPNV)와의 연관성

오명주<sup>†</sup> · 정성주 · 김형락\*

여수대학교 어병학과, \*여수대학교 식품영양학과

1998년 12월에서 1999년 3월에 걸쳐 바이러스의 감염에 의한 넙치 치어의 대량 폐사가 일어났다. 감염 어 샘플을 CHSE-214에 접종한 3일 후부터 세포의 구형화, 용해를 특징으로 하는 CPE가 나타났으며, 전자 현미경 관찰에서는 크기가 52-56 nm의 구형의 바이러스입자가 세포질 내에서 관찰되었다. RT-PCR에 의한 버나바이러스 특이적 검출의 결과 양성이었다. 어류주화세포를 이용한 바이러스 배양 특성을 확인한 결과 분리바이러스는 MBV와 유사한 세포선택성을 나타내었으나 IPNV와는 세포내 배양특성이 다르게 나타났다. 바이러스 중화 시험에서 항MBV Y-6혈청과 완전히 중화되었으나, IPNV Ab, Sp, VR-299의 항혈청과는 중화 항체가 낮게 나타났다. 본 바이러스는 한국의 넙치에서 분리된 IPNV와 다른 새로운 버나바이러스로서 marine birnavirus(MBV)에 속한다.

**Key words** : Virus isolation, Birnavirus, Korea, Marine birnavirus, MBV, IPNV, Flounder

넙치 치어기 질병의 일종인 넙치 바이러스성 복수증(flounder viral ascites)은 1986년과 1987년 일본의 양식 넙치 치어의 복수증상과 두부 발적을 주요 증상으로 하는 바이러스성 질병으로 Kusuda 등(1989)에 의하여 처음 소개되어졌다. Kusuda 등(1993)은 넙치 치어에서 발생되어지는 본 감염증상의 원인 병원체가 버나바이러스에 속하는 점에서부터 해산 양식 방어에서 발생되어져 오고있던 버나바이러스 감염증의 원인 바이러스인 YAV (yellowtail ascites virus) 6종과 감염성 췌장괴사증 바이러스(infectious pancreatic necrosis virus, IPNV) 중의 IPNV VR-299, IPNV Ab 및 IPNV Sp 등과의 혈청학적 유연 관계 검토를 행하여 해산어 유래 버나바이러스와 연어과 유래 버나바이러스와의 항원성의 차이를 확인하였으며, Hosono 등(1996)은 각 바이러스의 분자생물학적 유연 관계 검토를 통하여 해산 양식어류의 발병원으로 작용되어지는 버나바이러스는 담수산 어류에서 분리되어지는 IPNV와는 유전형에서 차이가나는 새로운 genogroup임을 확인하여 해산어류의 버나바이러

스를 해양버나바이러스(marine birnavirus, MBV)로 구별하였다.

Jung(1998)은 어류 주화세포계에서의 MBV 분리에 있어 CHSE-214, RTG-2와 RSBK-2 cell line에서는 바이러스 접종에 의해 전형적인 CPE가 관찰되나, EPC, FHM과 BF-2세포 등의 세포를 사용하여 바이러스를 분리할 경우 CPE의 불형성으로 MBV의 증식확인이 불가능한 것으로 보고하였다. 한편 Fernandez 등(1993)은 IPNV의 배양 세포 선택 연구에서 RTG-2, CHSE-214, RTE-2, BF-2 등의 어류주화세포 뿐만 아니라 EPC 세포로서도 IPNV Sp 및 IPNV VR-299의 배양이 가능하다고 하여 어류 주화세포에 대한 MBV와 IPNV의 바이러스 증식 특성에 차이를 시사하고 있다. Jung 등(1999)은 일본의 동일지역의 양식장 은어 및 연어에서 버나바이러스를 분리하여 서로간의 혈청학적 비교를 통한 연구에서 MBV 및 IPNV의 특성을 갖는 바이러스를 구분 확인하였다.

국내에서의 양식 넙치로부터 버나바이러스의 분리는 손 등(1995)에 의하여 행하여져 IPNV의 Ab 및 Sp type과 유사하다고 하였다. 오 등(1999)은 남해안의 양식산 해산어로부터 PCR법을 이용한 버

<sup>†</sup>Corresponding author

나바이러스의 검출을 행하였으며 국내 해산어 양식장의 어류에 버나바이러스가 매우 폭넓게 감염되어져 있음을 확인하였다. 하지만 지금까지 국내 넙치 버나바이러스를 대상으로한 Kusuda 등(1993) 및 Jung 등(1999)의 MBV와의 혈청학적 연구결과와의 차이점 검토 및 배양세포 선택성의 차이점에 등에 대한 검토를 행한 보고는 없어 우리나라의 넙치 버나바이러스에 대한 재검토가 필요하다.

따라서, 본 연구에서는 우리나라의 넙치 종묘생산장에서 수년 전부터 생산 치어에 많은 폐사를 유발시키는 넙치 바이러스성 복수증의 원인 바이러스를 수종의 어류 주화세포 배양법을 이용하여 분리하고 그 배양 특성을 확인하였으며, 분리바이러스의 혈청학적 연구를 통하여 MBV 및 IPNV와 비교하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 바이러스 분리용 실험어 및 샘플처리

1998년 12월 원인 불명의 폐사가 진행되고 있는 경남 남해의 넙치 치어 종묘 생산장에서 체장 1.5-2.5 cm(평균 2.1 cm)의 치어를 제공받아 바이러스 분리를 실시하였다. 바이러스 검사용 시료는 각각의 샘플어체 한 마리씩을 오 등(1999)의 방법에 의해 HBSS로 1:9가되게 처리하여 호모지나이제하고, 그 마쇄액을 HA filter(0.45 um pore size)로 여과하여 준비하였다.

#### 주화세포

어류 샘플로부터 CPE 확인에 의한 바이러스 검출을 위하여 chinook salmon embryo cell line (CHSE-214; Lannan *et al.*, 1984)을 사용하였고, 분리 바이러스 및 MBV, IPNV의 세포선택성 조사에는 CHSE-214 cell line, rainbow trout gonad cell line(RTG-2; Wolf & Quimby 1962), fathead minnow caudal trunk cell line(FHM; Gravell and Malsberger, 1965), epithelioma papulosum cyprini cell line(EPC; Fijian *et al.*, 1983) 및 rainbow trout embryo cell line(RTE-2; Fernandez *et al.*, 1993)를 사용하였으며, 바이러스중화반응 실험에서는 CHSE-214 cell line을 사용하였다. 세포배양액은 100 IU/ml의 penicillin, 100 µg/ml의 streptomycin, 10% FBS(Fetal bovine serum) 첨가 MEM(Eagle's

minimum essential medium, Gibco)을 사용하였다.

#### Viruses

양식현장의 바이러스 분리용 샘플어로부터 분리된 바이러스주 중에서 바이러스학적, 혈청학적 특성을 확인하기 위하여 대표 바이러스 실험주(NF-4)를 택하고, 연어과 유래의 IPNV Ab, IPNV Sp 및 IPNV VR-299와 양식 해산어 유래의 MBV Y6를 일본 북해도대학의 Dr. Yoshimizu와 고치대학의 Dr. Suzuki로부터 분양 받아 비교용 바이러스로 사용하였다. 바이러스 검사용 시료는 Oh *et al.*(1995a)에 따라 준비하였고, 바이러스 감염가는 CPE 발현에 기준을 둔 TCID<sub>50</sub>법으로 측정하였다.

#### 전자현미경적 관찰

분리 바이러스의 형태적 확인을 위한 목적으로 MOI가 0.1되게 NF-4를 CHSE-214 cell에 감염시킨 후 15°C에서 24시간째 배양하여 scraper로 수확하고, 1000×g에서 15분간 원심하여 얻은 감염 세포펠렛을 글루타르알데하이드로 고정하여 상법에 따라 epoxy resin으로 포매 후, 초박절편을 제작하여, 5% uranyl acetate 및 0.04% lead citrate으로 이중염색하여 JOEL 1010 투과전자현미경으로 관찰하였다.

#### PCR

버나바이러스 검출 목적으로 Suzuki *et al.* (1996)에 의하여 제안된 primer(P1, P2)를 이용하여 분리된 NF-4의 배양액을 오 등(1999)의 방법으로 핵산을 추출하고 역전사시켜 얻어진 cDNA를 주형으로 RT-PCR을 행하였다. 검출 확인용 바이러스로 MBV Y6 및 IPNV VR-299를 사용하였다.

#### 바이러스 중화시험

분리 바이러스 NF-4의 혈청학적 비교를 위하여 어류 유래의 버나바이러스(IPNV Ab, IPNV Sp, IPNV VR-299, MBV Y6) 및 항바이러스토끼혈청(Anti-IPNV Ab, IPNV Sp, IPNV VR-299, MBV Y6 rabbit serum)을 이용하여 중화 실험을 행하였다. 항혈청은 일본 북해도대학의 Dr. Yoshimizu 및 고치대학의 Dr. Suzuki로부터 제공받았다.

교차중화반응은 96well cell culture plate를 사용하여 100 TCID<sub>50</sub>/0.05 ml/well로 조정된 NF-4,

IPNV Ab, IPNV Sp, IPNV VR-299 및 MBV Y6를 50  $\mu$ l씩 넣고, 각각 희석 조정된 anti-IPNV Ab, IPNV Sp, IPNV VR-299 및 MBV Y6 rabbit serum을 각 4 well 씩의 희석열에 50  $\mu$ l씩 섞어 15°C 에서 60분간 반응시킨 후, 각 well에 0.1 ml 씩의 CHSE-214 세포( $2.0 \times 10^5$  cells /ml)를 첨가하여 15°C에서 7일간 배양하고 CPE를 관찰하여, 100 TCID<sub>50</sub>/well의 바이러스를 중화시키는 50% 종말희석점(ND<sub>50</sub>)을 구했다.

## 결과 및 고찰

### 바이러스 분리 및 어류주화세포내 배양특성

1998년 12월에서 3월에 걸쳐 남해안 지역의 넙치 치어 종묘 생산장에서 발병한 병어의 외부증상은 두부발적, 안구돌출과 복부팽만, 체색흑화가 특징적이었고(Fig. 1-1, 2), 복부 절개에 따른 관찰에서는 간의 발적, 장관내 액상물질 저류에 의한 팽만 및 장관내벽의 출혈이 보였다. 이러한 점은

Kusuda 등(1989)이 넙치 치어의 버나바이러스감염 증으로 보고한 감염증상과 일치한다. 병어로 부터의 세균 분리 실험 결과 어류에 감염성이 있는 병원세균의 출현은 관찰되지 않았으며, 바이러스 검사 사용 시료를 CHSE-214 cell에서 배양하며 관찰한 결과 세포의 구형화 및 용해를 특징으로 하는 버나바이러스 특유의 CPE가 관찰되었다(Fig. 1-4, Table 1).

분리 바이러스의 형태적 확인을 위한 목적으로 NF-4를 CHSE-214 cell에 감염시켜 배양 후 TEM으로 관찰한 결과 감염세포내 세포질에서 6각형 내지는 구형으로 볼 수 있는 바이러스입자가 밀집되어 있는 성상을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 바이러스 입자의 크기는 직경이 약 52-56 nm이었고 인벨롭의 구성을 가지고 있지 않았다. 이러한 바이러스 입자의 형태학적 특징은 일반적인 어류 버나바이러스의 공통적인 특징으로 손 등(1995)이

**Table 1.** Viruses isolated from diseased flounder for this study

Sample	Cell line	CPE	Strain No.
1	CHSE-214	+	NF-1
2	CHSE-214	+	NF-2
3	CHSE-214	+	NF-3
4	CHSE-214	+	NF-4
5	CHSE-214	+	NF-5

**Fig. 1.** Lateral and abdominal view showing distended abdomen (1 and 2). Cytopathic effect produced by the flounder samples in CHSE-214 cells incubated 15°C for 48 hrs (4).

**Fig. 2.** Electron micrograph of an ultrathin section of a CHSE-214 cell infected with large numbers of viral particles. Bar = 100 nm.

국산 넙치에서 보고한 바이러스 입자의 형태학적 특징과도 유사한 것으로 판단되었다.

분리바이러스인 NF-4 및 MBV Y6, IPNV VR-299를 대상으로 버나바이러스 검출용으로 선택된 primer(P1, P2)를 이용하여 RT-PCR을 행한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 배양 NF-4 및 MBV Y6, IPNV VR-299를 이용한 PCR 결과 모두 동일한 크기의 증폭산물이 확인되어졌다. Suzuki 등(1997)은 IPNV(Heppeil *et al.*, 1992) 및 MBV(Hosono *et al.*, 1996)의 sequence에 기초하여 binnavirus specific primer를 설계하였고, 그러한 프라이머를 이용한 PCR법으로 MBV, IPNV, EVE 등과 같은 버나바이러스를 특이적으로 검출할 수 있었다고 하였으며, 오 등(1999) 또한 국내 해산 양식어를 대상으로한 버나바이러스 검출법을 도입하는 연구에서 유사한 검출 특이성을 확인하였다. 이상과 같이 분리된 NF-4 바이러스주의 세포배양에 따른 세포변성효과의 특성, 전자현미경 관찰에 의한 바이러스 형태학적 특성 및 일부 유전학적 특성을 종합하여 볼 때 NF-4는 버나바이러스에 속하는 바이러스로 시사되어졌다.

NF-4, MBV Y6 및 IPNV VR-299를 각각의 배양세포에 10배 희석법으로 접종하고 배양 7일 후 배양세포액내의 바이러스 감염가를 측정된 결과를 Table 2에 나타내었다.

분리되어진 NF-4는 배양 7일째에 CHSE-214, RTG-2 및 RTE-2 세포에서 각각  $10^{10.8}$  TCID<sub>50</sub>/ml,  $10^{10.3}$  TCID<sub>50</sub>/ml  $10^{10.3}$  TCID<sub>50</sub>/ml의 바이러스 감염가가 얻어졌으며, MBV Y-6의 배양에서는 동

**Table 2.** Cell line susceptibility of the isolated virus

Cell line	NF-4		MBV Y6		IPNV VR-299	
	CPE*	Titer**	CPE	Titer	CPE	Titer
CHSE-214	+	10.8	+	11.8	+	8.3
RTG-2	+	10.3	+	10.3	+	7.8
RTE-2	+	10.3	+	11.3	+	8.8
FHM	-	-	-	-	-	-
EPC	-	-	-	-	+	5.3

\* cytopathic effect

\*\* Log TCID<sub>50</sub>/ml

일한 3종류의 세포에서 각각  $10^{11.8}$  TCID<sub>50</sub>/ml,  $10^{10.3}$  TCID<sub>50</sub>/ml,  $10^{11.3}$  TCID<sub>50</sub>/ml로 NF-4와 유사한 바이러스 감염가를 나타내어 매우 높은 세포내 바이러스 증식도를 보였다. 반면 IPNV VR-299의 경우 CHSE-214에서  $10^{8.3}$  TCID<sub>50</sub>/ml, RTG-2에서  $10^{7.8}$  TCID<sub>50</sub>/ml 그리고 RTE-2 세포에서  $10^{8.8}$  TCID<sub>50</sub>/ml로 NF-4 및 MBV Y6에 비하여는 비교적 낮았지만 일반적으로 보고되어지는 정도의 바이러스 감염가의 수치를 나타내고 있었다. EPC 및 FHM 세포에서의 바이러스 감염가는 배양 7일간 후 NF-4 및 MBV Y6 접종 실험구에서는 두 가지 세포 모두에서 감염가의 검출이 불가능하였는데 비하여 IPNV VR-299를 접종한 EPC 세포에서는  $10^{5.3}$  TCID<sub>50</sub>/ml의 바이러스 감염가가 검출되어졌다. Jung(1998)에 의하면 MBV는 CHSE-214, RTG-2에서 배양 7일 경과 후 바이러스 감염가가  $10^{12}$  TCID<sub>50</sub>/ml 전후로 대량증식 되어지지만 EPC, FHM 세포에 접종하였을 때에는 감염세포내의 바이러스항원의 검출은 인정되지만 바이러스의 세포내 증식의 결과로 나타나는 세포변성은 확인되어지지 않는다고 하였다. Fernandez 등(1993)은 IPNV Sp 및 IPNV VR-299 바이러스주를 사용하

**Fig. 3.** Comparison of the virus gene by RT-PCR amplification. A 360-bp fragment in RT-PCR were detected. Amplified products in agarose gel were stained with ethidium bromide. The strains of IPNV VR-299 (VR), MBV Y6 (Y6) and present isolates (NF4) are indicated at the top of lanes. DNA molecular weight maker (M) were also run.

**Table 3.** Serological relationship of the flounder isolate (NF4) with the reference serotypes. Note the serum titers of the NF4 with the anti-MBV Y6 serum

Virus strain	Anti-sera			
	Ab	Sp	VR-299	MBV Y6
IPNV Ab	4787	166	1136	1328
IPNV Sp	568	37902	2272	1327
IPNV VR-299	44	332	4725	315
MBV Y6	627	178	1136	14202
NF4	3939	1212	2425	15012

여 RTG-2, CHSE-214, RTE-2, CHH-1, YNK 등의 연어과 어류 유래 주화세포에서의 바이러스 배양에서 배양 7일째의 감염가는  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml 전후로 나타난다고 하였고, EO-2, BF-2, EPC 등과 같은 비연어과 담수어류 유래 주화세포에서도 바이러스 감염가는  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml에서  $10^{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml의 범위로 나타나지만 CCO 및 FHM 세포에서는 CPE의 형성에 의한 바이러스 확인이 불가능하다고 하였다. MBV를 사용한 Jung(1998)과 IPNV를 사용한 Fernandez(1993)의 연구를 종합하면 TCID<sub>50</sub>법에 의한 바이러스 감염가의 검출에 있어 RTG-2, CHSE-214 세포는 MBV와 IPNV 모두를 확인할 수 있지만, EPC세포의 경우 MBV의 배양에 의한 CPE의 검출이 불가능 것에 반하여 IPNV의 경우 배양 후 3일째부터 CPE의 관찰이 가능한 점으로부터 어류유래 버나바이러스라고 할지라도 MBV와 IPNV간의 주화세포 선택성의 차이점이 있음을 알 수 있는데, 본 실험에서의 넘치로부터 분리한 바이러스의 CPE 관찰 및 세포내 증식 결과는 Jung(1998)의 경우와 같은 경향으로 나타나 바이러스의 숙주세포 선택성의 차이점에서 볼 때 IPNV와는 다른 MBV의 특성을 갖고 있는 것으로 생각되어졌다. 아울러 본 실험을 통하여 MBV 및 IPNV의 세포내 바이러스 증식특성의 연구를 위한 one-step growth test등의 일련의 연구가 필요하며, 담수산 및 해산 어종에 대한 IPNV, MBV 및 본 분리바이러스의 병원성 발현과 바이러스 감염가의 변동 등의 확인을 통하여 Hosono 등(1996)이 확인한 genogroup 간의 숙주선택의 연관성을 검토할 필요가 있는 것으로 생각된다.

### 바이러스의 혈청학적 특성

분리 바이러스 혈청학적 비교를 위하여 100 TCID<sub>50</sub>/ml로 조정된 NF-4, IPNV Ab, IPNV Sp, IPNV VR-299 및 MBV Y6에 대한 Anti-IPNV Ab, IPNV Sp, IPNV VR-299 및 MBV Y6 rabbit serum의 교차중화반응 실험의 결과를 Table 3에 나타내었다.

중화 시험에서는 이번에 넘치에서 분리된 NF4는 항MBV Y-6 혈청과 완전히 중화되었으며, IPNV Ab, Sp, VR-299의 항혈청은 중화항체가 낮게 나타났다. 이는 한국의 넘치에서 분리된 버나바이러스가 일본의 복수증을 나타낸 방어에서

분리된 Y-6와 혈청학적으로 동일한 것임을 나타내고 있다. 손 등(1995)은 한국산 양식넙치에서 분리한 3종류의 버나바이러스 strain과 IPNV의 Ab, Sp와 VR-299와의 혈청학적 비교에서 Ab와 유사한 strain이 한 종류, Sp와 유사한 것이 한 종류, Ab, Sp, VR-299의 그 어디에도 속하지 않는 것이 한 종류로 세 strain이 모두 혈청학적으로 다른 것으로 보고하고 있다. 그들의 연구에서는 MBV와의 혈청학적 연구는 행해지지는 않았으나, 본 연구의 결과를 같이 생각해 본다면, 한국의 넙치에서 분리되고 있는 버나바이러스는 Ab, Sp, MBV의 3종류의 혈청형으로 보아진다. 그러나, 지역적으로 가까운 곳에 위치한 곳에서 비슷한 시기에 같은 어종에서 분리한 버나바이러스가 3종류의 다른 혈청형으로 분류되는 것은 드문 일로, 여러 종류의 strain에 대한 종합적인 혈청학적 연구가 필요하다. 이와 함께, 넙치에서 분리되고 있는 여러 strain들에 대한 보다 정확한 IPNV와 MBV와의 연관성을 밝히기 위하여, 분자생물학적 연구를 진행하고 있는 중이다.

## 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 birnaviruses 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. : Characterization 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.
- Fernandez, R. D., Yoshimizu, M., Ezura, Y. and Kimura, T. : Establishment and characterization of seven continuous cell lines from freshwater fish. *J. Aquat. Anima. Health*, 5: 137-147, 1993.
- Fijian, N. D., Suilimanovic, M., Bearzotti, D., Mutinic, L. O., Zwillenberg, S., Chimonczyk, J. F. and de Kinkelin, P. : Some properties of the EPC cell line from carp. *Ann. Virol.*, 134: 207-220, 1983.
- Gravell, M. and Malsoberge, R. G. : A permanent cell line from the fathead minnow. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 126: 555-565, 1965.
- 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. : 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.
- Jung, S. J. : Change of infection properties of subcultured marine birnavirus in several fish cell lines. *J. Fish Pathol.*, 11: 89-96, 1998.
- 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., Kado, K., Takeuchi, Y. and Kawai, K. : Characteristics of two virus strains isolated from young Japanese flounder. *SuisanZoushoku*, 37: 115-120, 1989.
- 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.
- 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, 1994.
- Oh, M. J., Yoshimizu, M., Kimura, T. and Ezura, Y. : A new virus isolated from salmonid fish. *Fish Pathol.*, 30: 23-32, 1995.
- Oh, M. J., Jung, S. J. and Kim Y. J. : Detection of birnavirus from marine cultured fish using polymerase chain reaction (PCR). *J. Fish Pathol.*, 12(1), 1999.
- Sohn, S., Park, M., Do, J., Choi, J. and Park, J. : Birnavirus isolated from cultured flounder in Korea. *Fish Pathol.*, 30: 279-280, 1995.
- 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.
- Wolf, K. and Quimby, M. C. : Established eurythermic line of fish cells in vitro. *Science*, 135: 1065-1066, 1962.

## **Biological and Serological Characteristics of Birnavirus Isolated from Cultured Japanese Flounder in 1999**

**Myung-Joo Oh, Sung-Ju Jung and Hyeung-Rak Kim\***

*Department of Fish Pathology, Yosu National University*

*\*Department of Food Science & Nutrition, Yosu National University*

Since 1998, mass mortality of the Japanese flounder has widely occurred in the south and west coastal area of Korea. A new serotype birnavirus was isolated during the investigation of the cause of the disease. By the electromicroscopic examination, the isolated virus particles appeared hexagonal and unenveloped with an average diameter 52 to 56 nm. Birnavirus specific fragment was amplified by RT-PCR. High yield of virus (10.3 to 10.8 log TCID<sub>50</sub>/ml) was produced in CHSE-214, RTG-2 and RTE-2 cells. Typical birnavirus CPE was observed in these cells. On the contrary, the virus CPE was not shown in the FHM and EPC cells. By a cross-neutralization test with IPNV Ab, IPNV Sp, IPNV VR-299 and MBV Y6, the isolated virus was closely related to marine birnavirus (MBV).

*Key words* : Virus isolation, Korea, Birnavirus, Marine birnavirus, MBV, IPNV, Flounder