

## 우리 나라 연근해 자연산 해수 어종에서의 Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV)의 검출

김수미 · 박수일<sup>†</sup>  
부경대학교 수산생명의학과

## Detection of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) in Wild Marine Fishes in the Coastal Region of Korea

Su-Mi Kim and Soo-Il Park<sup>†</sup>

Department of Aquatic Life Medicine, College of Fisheries Science, Pukyong National University,  
Busan 608-737, Korea

In order to analyse the detection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in marine environment surrounding coastal region of Eastern and Southern sea of Korea, the pools of each organ sample of three fish were taken for virus assay from February to May in 2003. The samples comprised 42, taken from 9 species of marine fishes. The VHSV was detected from chub mackerel *Scomber japonicus* and striped mullet *Mugil cephalus* in epithelioma papulosum cyprini (EPC) cells. The identity of the virus was confirmed a reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). VHSV has previously been reported from chub mackerel, but not from striped mullet. The new isolates was classified as a member of genogroup I (American type) of VHSV and was closely related to the VHSV KVHS'01-1 based on comparisons of the partial nucleotide sequence of the glycoprotein (G) gene.

*Key words* : VHSV, Marine fish, G gene, Korea

Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)는 무지개송어를 비롯한 담수 연어과(科) 어류에 감염되어 대량 폐사를 일으키는 병원체로 잘 알려져 왔으나, 최근에 와서는 몇몇 해수 어류에서도 질병을 유발하는 것으로 밝혀지고 있다 (Issiki *et al.*, 2001; Mortensen *et al.*, 1999; Smail, 1999).

유럽 대륙 인근의 Atlantic Ocean 및 North Sea 에서는 Atlantic cod *Gadus morhua* (Jensen *et al.*, 1979)에서 처음 분리된 이후, turbot *Scophthalmus maximus* (Schlotfeldt *et al.*, 1991), Atlantic herring *Clupea harengus* (Dixon *et al.*, 1997), rockling *Rhinonemus cimbricus* 및 whiting *Merlangius melanogus* (Mortensen *et al.*, 1999) 등 십 여종의 해수

어류에서 VHSV가 분리되고 있다. 이에 비해 북미 인근의 Pacific Ocean에서는 coho salmon *Oncorhynchus kisutch* (Brunson *et al.*, 1989)과 chinook salmon *O. tshawytscha* (Hopper, 1989)에서 VHSV가 처음으로 분리된 이후, Pacific cod *Gadus macrocephalus* (Meyers *et al.*, 1992), Pacific herring *Clupea harengus pallasii* (Meyers *et al.*, 1994) 등에서 분리되었으나 European type VHSV strains와는 유전형이 다른 Pacific type strains로 분류되고 있다 (Batts *et al.*, 1993; Benmansour *et al.*, 1997; Stone *et al.*, 1997).

최근까지 한국, 일본 및 대만 등 동아시아 지역에서는 연어과 어류 뿐만 아니라 다른 양식

<sup>†</sup>Corresponding Author : Soo-Il Park, Tel : 051-620-6141,  
Fax : 051-620-6141, E-mail : parksi@mail.pknu.ac.kr

어류에서도 VHSV가 분리된 예는 전무하였으나 (Smail, 1999), 최근 일본 연안에 서식하는 8종의 자연산 어류를 조사한 결과 자연산 넙치 *Paralichthys olivaceus* 및 까나리 *Ammodytes personatus*에서 VHSV가 검출되었으며 (Takano *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2002), 양식 넙치에 심각한 질병을 유발하는 것으로 보고되고 있다 (Takano *et al.*, 2000; Issiki *et al.*, 2001).

이와 유사한 시기에 우리 나라에서도 양식 넙치에 VHSV로 추정되는 새로운 rhabdovirus성 질병이 발생하기 시작하여 수년간 동일한 양상의 질병이 유행하고 있으며 (Lee *et al.*, 2003), 이후 이들 질병의 원인체를 조사한 결과 북미 지역 및 일본에서 분리되는 VHSV와 유전형이 동일한 것으로 동정되었다 (Kim *et al.*, 2003).

자연산 해수 어류가 VHSV의 secondary reservoir이라는 관점 (Meyers and Winton, 1995)에서 여러 가지 해수 어류에 대한 VHSV의 분포 조사가 활발히 이루어지고 있으며 (Brundeseth and Evensen, 2002; Hedrick *et al.*, 2003; King *et al.*, 2001, Meyers *et al.*, 1999), VHSV가 분리되는 자연산 해수 어종은 매우 다양한 것으로 보고되고 있다 (Meier *et al.*, 1994). 우리 나라에서도 양식 넙치에서 VHSV 감염증이 매년 발생하고 있으므로 각 해역별 자연산 어종에 대한 VHSV의 검출 유무를 확인하는 것이 매우 중요한 현안 문제로 대두되게 되었다. 본 연구에서는 우리 나라 동해 및 남해안 일부 지역을 대상으로 그 인근 해역에 서식하는 자연산 어종을 채집하여 VHSV의 검출 여부를 조사하고 아울러 분리된 바이러스의 유전형을 검토하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 자연산 해수 어류의 채집

자연산 해수 어류에서 VHSV를 분리하기 위하여 2003년 2월부터 5월까지 4개월 동안 울진, 포항, 부산 및 남해 인근 해역 (Fig. 1)의 죽방렴 및 어선으로 어획한 어류를 채집하여 실험에 사

용하였다. 채집한 어류는 살아있는 상태로 실험실에 옮기거나 개체별로 포장하여 즉시 드라이아이스에 급냉하여 운반하였다. 바이러스 분리용 시료로 사용한 어류는 지역과 어종별로 구분하였으며 그 조성 및 어체의 평균 전장을 Table 1에 나타내었다. 조사한 자연산 어류는 모두 9종, 1회 조사시 지역별 어종별 3마리씩을 기준으로 42개의 바이러스 분리 시료를 사용하였다.

### 어류 주화 세포 및 대조 바이러스

실험에 사용한 어류 주화 세포는 EPC cell line (Fijan *et al.*, 1983)과 CHSE-214 (Lannan *et al.*, 1984) 이었으며, 세포 배양액은 100 IU/mL의 penicillin과 100 µg/mL의 streptomycin, 10 % Fetal bovine serum (FBS)을 첨가한 Eagle's minimum essential medium (MEM)을 사용하였으며, 바이러스 접종 후에는 5 % FBS 첨가 배지를 사용하였다.

VHSV에 대한 대조 바이러스로서 2001년 양식 넙치에서 분리한 KVHS'01-1 (Kim *et al.*, 2003)을 사용하였다.

### 시료의 처리

시험 어류는 전장을 측정된 후 무균적으로 해

**Table 1.** Wild fishes sampled for VHSV isolation

Sampling place	Sampled fish species	B.L. (cm)	Number of tested fish	Number of sample	
Uljin, Pohang	California herring	<i>Clupea pallasii</i>	18.2	6	2
	Dotted gizzard shad	<i>Konsirus punctatus</i>	17.8	9	3
	Horn fish	<i>Hemiramphus sajori</i>	22.7	6	2
	Striped mullet	<i>Mugil cephalus</i>	54.7	9	3
	Chub mackerel	<i>Scomber japonicus</i>	25.5	6	2
	Greenling	<i>Hexagrammos otakii</i>	20.3	9	3
	Finespotted flounder	<i>Pleuronichthys cornutua</i>	15.4	9	3
Busan	Black rockfish	<i>Sebastes sclegeli</i>	20.3	9	3
	California herring	<i>Clupea pallasii</i>	17.5	2	1
	Dotted gizzard shad	<i>Konsirus punctatus</i>	20.8	3	1
	Striped mullet	<i>Mugil cephalus</i>	50.4	9	3
	Chub mackerel	<i>Scomber japonicus</i>	20.0	2	1
	Greenling	<i>Hexagrammos otakii</i>	18.1	9	3
	Finespotted flounder	<i>Pleuronichthys cornutua</i>	17.4	9	3
Namhae	Dotted gizzard shad	<i>Konsirus punctatus</i>	20.9	3	1
	Striped mullet	<i>Mugil cephalus</i>	25.4	3	1
	Finespotted flounder	<i>Pleuronichthys cornutua</i>	15.5	9	3
	Black rockfish	<i>Sebastes sclegeli</i>	15.5	3	1
	Sea perch	<i>Lateolabrax japonicus</i>	23.0	9	3
Number of total sampled fish			124	42	

부하고 채집 지역별 어종별 각 3마리의 신장, 비장, 심장 및 뇌를 분리하여 정량하였다. 이들 조직을 멸균한 유발에 넣고 마쇄한 후 조직량의 9 배에 해당하는 Hank's balanced salt solution (HBSS)으로 희석하고 4 °C에서 4,000×g, 15 분 동안 원심 분리하였다. 상징액만을 취하여 0.45 μm membrane filter로 여과한 후 바이러스 분리 용 조직 여과액으로 사용하였으며, 실험에 사용하기 전까지 -80 °C에 보관하였다.

#### 바이러스의 분리 배양

24 well plate에 단층 배양된 EPC cells과

CHSE-214 cells에 조직여과액의 최종 농도가 1:10, 1:100, 1:1000이 되게 MEM으로 희석하여 well 당 100 μL씩 접종하고, 실온에서 30 분 동안 흡착시킨 후, 18 °C에서 7일간 배양하면서 바이러스에 의한 세포 변성 효과 (Cytopathic effect, CPE)를 관찰하였다. 배양 7일 후에도 CPE가 관찰되지 않는 시료는 맹목 계대 (Blind passage)하여 7일간 더 관찰한 후 실험을 종료하였다. CPE가 나타난 시료에 대해서는 배양상징액을 25 cm<sup>2</sup> T/C flask에 접종하여 전자현미경 및 RT-PCR 분석용 시료로 사용하였다. 모든 실험에서 MEM만을 접종한 세포를 negative con-

trol로, VHSV KVHS'01-1을 positive control로 사용하였다.

### 바이러스 입자의 관찰

대조 바이러스 (KVHS'01-1) 및 분리 바이러스 (Mackerel-1pV)를 EPC cells에 접종한 후 CPE가 나타나기 시작하였을 때 세포를 수거하여 2.5 % glutaraldehyde (pH 7.2, 4 °C)에 4 시간 전고정하고 1 % osmium tetroxide (pH 7.2)로 4 °C에서 2 시간 동안 후고정하였다. Alcohol 탈수 과정을 거쳐 propylene oxide로 치환한 후 EPON 혼합물로 열중합 처리를 한 후 열중합된 시료를 ultrathin section (60~90 nm)하여 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하고 75 kV에서 투과형 전자현미경 (JEM 1200-II, JEOL)으로 관찰하였다.

### RT-PCR

대조 바이러스 및 각각의 바이러스 분리용 시료를 접종한 후 3일째, CPE가 나타나기 시작한 EPC cells을 수거하고 RNA Isolation Kit (Trizol, Gibco BRL)을 사용하여 total RNA를 분리하였다. 추출한 total RNA와 oligo (dT)<sub>15</sub> primer, Reverse Transcription Kit (Invitrogen)를 사용하여 역전사 시킨 cDNA를 PCR의 주형으로 사용하였다. PCR에 사용한 primer는 VHSV의 glycoprotein gene에서 제작된 VG1-VD3 primer를 (Miller *et al.*, 1998) 사용하였으며, 예상 증폭 산물은 697 bp이었다. PCR 증폭 산물은 1.5 % agarose gel 을 사용하여 전기 영동한 후 UV transilluminator상에서 전기 영동상을 확인하였다.

### 유전자 분석

대조 바이러스 및 분리 바이러스의 PCR products는 High pure PCR product purification kit (Roch)를 사용하여 정제한 후, pGEM-T easy vector system (Promega)과 DH 5 $\alpha$  *E. coli*를 사용하여 gene cloning한 후 Big Dye Terminator Cycle DNA Sequencing Kit (ABI PRISM PE Applied

Biosystems)를 사용하여 sequencing하였다. 본 분리 바이러스의 유전자 염기 배열을 대조 바이러스 (KVHS'01-1) 및 기보고된 VHSV strains의 유전자를 Clustal W program (Thompson *et al.*, 1994)을 이용하여 multiple alignment하고 각 유전자 간의 상동성을 비교 분석하였다.

## 결 과

### 바이러스 분리

모두 9종의 자연산 해수 어류를 대상으로 VHSV를 검출한 결과는 Table 2와 같다. 어종 당 3마리를 하나의 기준 단위로 총 42개의 분리 시료를 EPC와 CHSE-214 cell line에 접종하여 바이러스를 배양한 결과, 포항 인근 해역에서 4월에 채집한 송어 *Mugil cephalus*와 부산 인근 해역에서 5월에 채집한 송어 및 4월 포항 인근 해역에서 채집한 고등어 *Scomber japonicus*에서 CPE를 관찰할 수 있었다. 이때 CPE는 EPC cells에서는 접종 후 5일째부터 세포가 둥글어지고 포도송이 모양으로 모이다가 바닥에서 탈락하였으며 이들 CPE는 대조 바이러스인 KVHS'01-1과 유사하게 나타났으며 대조 바이러스 및 분리 바이러스에 감염된 세포를 전자현미경으로 관찰하였을 때 막대모양의 바이러스 입자를 관찰할 수 있었다 (Fig 2). 시험에 사용한 모든 어류는 외관상 특이할 만한 증상은 없었으며 분리된 virus isolates는 각각 mullet-1pV, mullet-2bV, mackerel-1pV로 명명하였다.

### 분리 바이러스의 유전자 분석

CPE가 나타난 3개의 시료에 대해서는 세포 배양액을 0.45  $\mu$ m membrane filter로 여과하여 단층 배양된 EPC cells (25cm<sup>2</sup> T/C flask)에 재접종하고 48시간 경과 후에 세포를 수거하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 3개의 분리 바이러스는 VHSV의 특이 primer와 반응하여 유전자 증폭 산물을 나타내었고 PCR products를

**Table 2.** Distribution of VHSV in various wild marine fishes

Sampled fish species		Number of sample	Number of CPE positive	Virus isolates designation
California herring	<i>Clupea pallasii</i>	3	0	–
Dotted gizzard shad	<i>Konsirus punctatus</i>	5	0	–
Horn fish	<i>Hemiramphus sajori</i>	2	0	–
Striped mullet	<i>Mugil cephalus</i>	7	2	mullet-1pV <sup>a</sup> mullet-2bV <sup>b</sup>
Chub mackerel	<i>Scomber japonicus</i>	3	1	mackerel-1pV <sup>c</sup>
Greenling	<i>Hexagrammos otakii</i>	6	0	–
Finespotted flounder	<i>Pleuronichthys cornutua</i>	9	0	–
Black rockfish	<i>Sebastes schlegeli</i>	4	0	–
Sea perch	<i>Lateolabrax japonicus</i>	3	0	–
Total		42	3	3

<sup>a</sup>, April 2003 in Pohang; <sup>b</sup>, May 2003 in Busan; <sup>c</sup>, April 2003 in Pohang.

**Table 3.** Nucleotide sequence identities (%) of the partial G gene of Korean VHSV isolates compared with that of known VHSV isolates

Location, Species	Genogroup I		II	III	Korean isolates			
	Makah	Obama25	Sco95	96-43	KVHS'01-1	Mackerel-1pV	Mullet-1pV	Mullet-2pV
Washington, Coho salmon, Makah <sup>a</sup>	-	99.2	84.8	86.2	98.8	98.9	97.0	98.2
Japan, Japanese flounder, Obama25 <sup>b</sup>		-	83.6	84.5	99.1	99.1	97.2	99.7
Scotland, Turbot, Sco95 <sup>c</sup>			-	90.1	84.2	84.9	81.9	83.9
England, Atlantic herring, 96-43 <sup>d</sup>				-	85.8	85.4	83.4	84.0
Korea, Olive flounder KVHS'01-1 <sup>e</sup>					-	99.8	97.5	98.7

Genbank accession number <sup>a</sup>, U28747; <sup>b</sup>, AB060725; <sup>c</sup>, U88056; <sup>d</sup>, AF143862; <sup>e</sup>, AY167587.

sequencing하여 이들 바이러스가 모두 VHSV임을 확인하였다.

본 연구에서 밝힌 3개의 virus isolates에 대한 유전자 염기 배열을 기보고된 VHSV isolates와 비교 분석한 결과는 Table 3과 같다. 고등어 및 송어에서 분리한 3개의 VHSV isolates는 Genogroup I에 속하는 Makah, Obama25 및 KVHS'01-1 isolates와 97% 이상의 높은 상동성을 나타내었다.

## 고 찰

본 연구에서는 우리 나라 동해 및 남해안 인근 해역에서 2003년 2월에서 5월까지 채집한 자연산 어류에 대하여 VHSV의 분포 조사를 실시한 결과 두 어종 (송어, 고등어)으로부터 VHSV를 검출하였고 이들 VHSV isolates는 양식 넙치에서 분리되는 VHSV와 함께 American type의 유전형을 지니고 있음을 알 수 있었다.

Batts *et al.* (1991)에 따르면 북미형 해수 유래

의 VHSV isolate는 EPC cells에 가장 높은 감수성을 보이는 반면 유럽형 해수 어종 유래의 VHSV에는 감수성이 낮아 (Jensen, 1979; Schlotfeldt *et al.*, 1991) 이들 두 바이러스형은 세포 감수성에도 차이를 보인다. 본 연구에서는 EPC cell line을 이용하여 바이러스를 효과적으로 분리할 수 있었고, 이때 고등어 및 송어의 조직 g 당 바이러스 감염가는  $10^2$ ~ $10^4$  TCID<sub>50</sub> 정도인 것으로 조사되었다.

VHSV의 glycoprotein과 nucleoprotein gene sequence에 대한 특성을 여러 strains과 비교 분석한 연구에 따르면 바이러스의 분리 시기나 분리 어종과는 무관하며, 분리된 지역이 VHSV의 유전형과 깊은 관련성이 있음을 알 수 있다 (Benmansour *et al.*, 1997; Stone *et al.*, 1997; Snow *et al.*, 1999; Nishizawa *et al.*, 2002). 아시아 지역에서는 처음으로 VHSV를 분리 보고한 Nishizawa *et al.* (2002)은 일본의 VHSV isolates는 대부분 Obama25 type으로서 Genogroup I (American type)에 속한다고 하였다. 그러나 이들 Obama

type은 Group I의 minor cluster이긴 하지만, American isolates와는 구분되기 때문에 Obama type이 북미 지역에서 유입되었다기 보다는 일본 연안의 native 바이러스일 가능성이 높다고 하였다. Kim *et al.* (2003)은 우리 나라의 양식 넙치에서 질병을 유발하는 VHSV isolates 역시 Genogroup I에 속하지만 일본의 Obama25 type과 가장 가깝다고 하였다 (Kim *et al.*, 2003). 본 연구에서 조사한 3개의 VHSV isolates는 그 분리 어종과는 무관하게 넙치 유래의 그것과 매우 유사하여 바이러스의 분포 및 역학 조사에 대한 기초 자료가 될 것으로 생각된다.

본 연구에서는 9종의 자연산 어종을 대상으로 VHSV 검출 여부를 조사한 결과 chub mackerel *Scomber japonicus*와 striped mullet *Mugil cephalus*에서 바이러스를 검출할 수 있었다. Mackerel에서는 캘리포니아 남부 해역에서 4~8%의 비율로 VHSV가 검출된 바 있지만 (Hedrick *et al.*, 2003), striped mullet으로부터 VHSV가 분리된 것은 처음이다.

VHSV의 폭넓은 숙주 범위는 다양한 해수 어류에 대한 발병 가능성을 내재하고 있는 것으로 해석되고 있으며 (Stone *et al.*, 1997), 다수의 연구자들은 자연산 해수 어류가 VHSV의 reservoir일 가능성을 주장하고 있다 (Betts and Stone, 2000; Dixon *et al.*, 1997). 본 연구에서는 제한된 시기와 일부 지역의 어종을 대상으로 VHSV의 검출 여부를 조사하였음에도 불구하고 고등어 및 송어와 같은 어종에서 VHSV를 분리할 수 있었으므로 우리 나라 연근해 환경 중에 VHSV가 분포할 가능성이 높다고 생각된다.

## 요 약

해수 환경 중의 VHSV 분포 조사를 위하여, 2003년 2월에서 5월까지 동해 및 남해안 인근 해역에 서식하는 자연산 해수 어류를 채집하였다. 바이러스 분리용 시료는 9종의 해수 어류로서 42개의 시료를 분석하였다. 각 시료의 조직여

과액을 *epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cells에 접종한 결과, 고등어 *Scomber japonicus*와 송어 *Mugil cephalus*에서 바이러스가 분리되었으며 이들 바이러스는 RT-PCR법을 이용하여 VHSV로 동정할 수 있었다. 고등어에서 VHSV가 검출되었다는 기보고는 있지만, 송어에 대해서는 본 연구에서 처음으로 VHSV를 분리하였다. 자연산 어류에서 유래된 세 개의 VHSV isolates에 대한 glycoprotein gene을 분석한 결과, 이들 바이러스는 양식 넙치에서 질병을 유발하는 VHSV isolates와 유사하며 모두 genogroup I (American type)에 속하는 것으로 밝혀졌다.

## 사 사

본 연구는 한국해양수산개발원의 수산특정국제 (20010064)의 연구비 지원에 의하여 수행된 연구결과의 일부임을 밝힙니다.

## 참 고 문 헌

- Batts, W.N., Arakawa, C.K., Bernard, I. and Winton, J.R.: Isolates of viral hemorrhagic septicemia virus from North America and Europe can be detected and distinguished by DNA probes. *Dis. Aquat. Org.*, 17: 67-71, 1993.
- Batts, W.N., Traxler, G.S. and Winton, J.R.: Factor affecting the efficiency of plating for selected fish rhabdovirus. *Proceeding of the Second International Symposium on Virus of Lower Vertebrates*, Corvallis, OR: 17-24, 1991.
- Betts, A.M., and Stone, D.M.: Nucleotide sequence analysis of the entire coding regions of virulent and avirulent strains of viral haemorrhagic septicaemia virus. *Virus Genes*, 20 (3): 259-262, 2000.
- Benmansour, A., Basurco, B., Monnier, A.F.,

- Vende, P., Winton, J.R. and Kinkelin, P.: Sequence variation of the glycoprotein gene identifies three distinct lineages within field isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus, a fish rhabdovirus. *J. Gen. Virol.*, 78: 2837-2846, 1997.
- Brudeseth, B.E. and Evensen, O.: Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) in wild marine fish species in the coastal regions of Norway. *Dis. Aquat. Org.*, 52: 21-28, 2002.
- Brunson, R., True, K. and Yancy, J.: VHS virus isolated at Makah national fish hatchery. *Am. Fish. Soc. Fish Health Sec. Newsl.*, 17: 3-4, 1989.
- Dixon, P.F., Feist, S., Kehoe, E., Parry, L., Stone, D.M. and Way, K.: Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus from Atlantic herring *Clupea harengus* from the English Channel. *Dis. Aquat. Org.*, 30: 81-89, 1997.
- Fijan, N., Sulimanvic, D., Bearzotti, M., Muzinic, D., Zwillnberg, L.O., Chilmoneczk, S., Vautherot, J.F., and de Kinkelin, P.: Some properties of the *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cell line from carp *Cyprinus carpio*. *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)*, 134 E: 207-220, 1983.
- Hedrick, R.P., Batts, W.N., Yun, S., Traxler, G.S., Kaufman, J. and Winton, J.R.: Host and geographic range extensions of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus. *Dis. Aquat. Org.*, 55: 211-220, 2003.
- Hopper, K.: The isolation of VHSV from chinook salmon at Glenwood Springs, Orcas Island, Washington. *Newsl. AM. Fish Soc. Fish Health Sect.*, 17: 1, 1989.
- Isshiki, I., Nishizawa, T., Kobayashi, T., Nagano, T. and Miyazaki, T.: An outbreak of VHSV (viral haemorrhagic septicemia) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. *Dis. Aquat. Org.*, 47: 87-99, 2001.
- Jensen, N.J., Bloch, B. and Laesen, J.L.: The ulcus-syndrom in cod (*Gadus morhua*) III. A preliminary virological report. *Nord. Vet. Med.*, 31, 436-442, 1979.
- Kim, S., Lee, J., Hong, M., Park, H. and Park, S.: Genetic relationship of the VHSV (Viral Hemorrhagic Septicemia Virus) isolated from cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea. *J. Fish Pathol.*, 16(1): 1-12, 2003.
- King, J.A., Snow, M., Smail, D.A. and Raynard, R.S.: Distribution of viral haemorrhagic septicaemia virus in wild fish species of the North Sea, north east Atlantic Ocean and Irish Sea. *Dis. Aquat. Org.*, 47: 81-86, 2001.
- Lannan, C.N., Winton, J.R. and Fryer, J.L.: Fish cell line: establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. *In Vitro*, 20: 671-676, 1984.
- Lee, N., Kang, H., Choi, H., Chun, S., Park, N. and Huh M.: Histopathology of a rhabdoviral disease of farmed flounder, *Paralichthys olivaceous*. *J. Fish Pathol.*, 15: 1-7, 2002.
- Meier, W., Schmitt, M. and Wahli, T.: Viral hemorrhagic septicemia (VHS) of nonsalmonids. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 4: 359-373, 1994.
- Meyers, T.R., Short, S. and Lipson, K.: Isolation of North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) associated with epizootic mortality in two new host species of Alaska marine fish. *Dis. Aquat. Org.*, 38: 81-86, 1999.
- Meyers, T.R., Short, S., Lipson, K., Batts, W.N., Winton, J.R., Wilcock, J. and Brown, E.: Association of viral haemorrhagic septicemia virus with epizootic haemorrhages of



- the skin in Pacific herring *Clupea harengus Pallasii* from Prince William Sound and Kodiak Island, Alaska USA. Dis. Aquat. Org., 19: 27-37, 1994.
- Meyers, T.R., Sullivan, J., Emmengger, E., Follet, E., Short, S., Batt, W.N. and Winton, J.R.: Identification of viral hemorrhagic septicemia virus isolated from Pacific cod *Gadus macrocephalus* in Prince William Sound, Alaska, USA. Dis. Aquat. Org., 12: 167-175, 1992.
- Meyers, T.R., and Winton, J.R.: Viral hemorrhagic septicemia in North America. Ann. Rev. Fish Dis., 5: 3-24, 1995.
- Miller, T., Rapp, J., Wastlhuber, U., Hoffmann, R.W., and Enzmann, P.J.: Rapid and sensitive transcriptase polymerase chain reaction based detection and differential diagnosis of fish pathogenic rhabdoviruses in organ samples and cultured cells. Dis. Aquat. Org., 34: 13-20, 1998.
- Mortensen, H.F., Heuer, O.E., Lorenzen, N., Otte, L. and Olesen, N.J.: Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild marine fish species in the Baltic Sea, Kattegat, Skagerrak and the North Sea. Virus Res., 63: 95-106, 1999.
- Nishizawa, T., Iida, H., Takano, R., Isshiki, T., Nakajima, K. and Muroga, K.: Genetic relatedness among Japanese, American and European isolates of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) based on partial G and P genes. Dis. Aquat. Org., 48: 143-148, 2002.
- Schlotfeldt, H.J., Ahne, W., Vestergard-Jorgensen, P.E. and Glende, W.: Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia in turbot (*Scophthalmus maximus*) a natural outbreak. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 11: 105-107, 1991.
- Smail, D.A.: Viral haemorrhagic septicaemia. In: Fish disease and disorders, vol. 3, Viral, bacterial and fungal infections. Wood, P.T.K., Bruno, D.W. (ed), CABI Publishing, New York, pp. 123-147, 1999.
- Snow, M., Cunningham, C.O., Melvin, W.T. and Kurath, G.: Analysis of the nucleoprotein gene identifies distinct lineages of viral haemorrhagic septicaemia virus within the European marine environment. Virus Res., 63: 35-44, 1999.
- Stone, D.M., Way, K. and Dixon, P.F.: Nucleotide sequence of the glycoprotein gene of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) viruses from different geographical areas: a link between VHS in farmed fish species and viruses isolated from North Sea cod (*Gadus morhua* L.). J. Gen. Virol., 78: 1319-1326, 1997.
- Takano, R., Nishizawa, T., Arimoto, M. and Muroga, K.: Isolation of viral hemorrhagic septicemia (VHSV) from wild Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 20: 186-193, 2000.
- Takano, R., Nishizawa, T., Arimoto, M. and Muroga, K.: Isolation of viruses from wild Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish Pathol., 36: 153-160, 2001.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J.: Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing, positions specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res., 22: 4673-4680, 1994.
- Watanabe, L., Pakingking, R., Iida, H., Nishzawa, T., Iida, Y., Arimoto, M. and Muroga, K.: Isolation of aquabirnavirus and viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from wild

marine fishes. *Fish Pathol.*, 37: 189-191,  
2002.

---

Manuscript Received : October 18, 2003

Revision Accepted : February 10, 2004

Responsible Editorial Member : Myung-Joo Oh  
(Yosu Univ.)