

양식 넙치, *Paralichthys olivaceus*에서 분리한 viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)의 항원성 분석

김수미 · 지보영* · 조미영* · 원경미** · 김진우* · 박수일**

국립수산과학원 서해수산연구소, *국립수산과학원 수산생물방역과, **부경대학교 수산생명의학과

Analysis of antigenicity of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) glycoprotein from cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus*

Su Mi Kim, Bo Young Jee*, Mi Young Cho*, Kyoung Mi Won*†, Jin Woo Kim* and Soo Il Park**

West Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research and Development Institute, Incheon 400-420, Korea

*Aquatic Life Disease Control Division, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-705, Korea

**Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

The amino acid sequence of glycoprotein of Korean VHSV isolate (KR'01-1) was analyzed using the DNASTar Protean system. Based on the flexibility, hydrophilicity, antigenic index and surface probability, three regions (Gp1, Gp2 and Gp3) were selected as potential antigenic determinants. Three oligopeptides containing the amino acid sequences of the three regions were synthesized and polyclonal antibodies were raised against them. The activities of the antibodies were analyzed by Western blotting and virus neutralization test. The results showed that antibodies raised against oligopeptides Gp1 and Gp2 neutralized the infectivity of VHSV, suggesting that they can be possible candidates for subunit vaccines against VHS diseases in olive flounder.

Key words : Viral hemorrhagic septicemia virus, Glycoprotein, Oligopeptide antigen

Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)는 무지개송어를 비롯한 담수산 연어과 어류에서 심각한 바이러스성 질병을 야기하는 것으로 잘 알려져 왔으나 최근에 와서 담수 및 해수 어류 모두에 질병을 유발하는 병원체라는 것이 밝혀지고 있다 (Mortensen et al., 1999; Smail, 1999; Kim et al., 2003). 해수 어류에서의 VHSV는 1979년 Atlantic cod *Gadus morhua*에서 첫 보고된 이후 (Jensen et al., 1979), 프랑스의 해수 양식

무지개송어와 turbot 등에서 질병을 야기 (Dale et al., 2009; Schlotfeldt et al., 1991)하였을 뿐만 아니라, whiting *Merlangius merlangus*, Atlantic herring *Clupea harengus* 등 다양한 야생 해수 어류에서 분리되어 해양 환경 중에 바이러스가 존재한다는 것이 입증되었다 (Altuntas and Ogut, 2010; Mortensen et al., 1999). VHSV는 유럽 지역뿐만 아니라 1980년대 후반부터는 북미 지역에서도 빈번히 분리되고 있고 최근에는

†Corresponding Author : Kyoung Mi Won

Tel : +81-51-720-3055 Fax : +81-51-720-3039

E-mail : kmwon@nfrdi.go.kr

우리나라와 일본 연안에서도 분리되고 있어 그 지리적 분포가 광범위한 것으로 확인되고 있다 (Brunson *et al.*, 1989; Kim *et al.*, 2011; Takano *et al.*, 2000; Nishizawa *et al.*, 2006). 일본의 경우, 1999년 와카사만의 어류바이러스 분포조사 중, 야생 넙치에서 처음으로 검출된 후 (Takano *et al.*, 2000), 상품크기의 양식 넙치에서 VHSV에 의한 피해가 보고되었다 (Isshiki *et al.*, 2001). 우리나라 또한 Kim *et al.* (2003)이 양식 넙치에서 처음으로 보고한 이후, 다양한 해산 어류에서 분리되었으며, 양식넙치에서 해마다 지속적인 폐사를 일으키는 병원체로 보고되고 있다 (Kim *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2009).

이와 같이 새롭게 확산되고 있는 VHSV의 감염을 피하기 위해 종묘생산 단계에서 바이러스 free stock을 생산하는 데 노력을 기울이고 있지만 바이러스를 완전히 차단하는 것이 현재로서는 불가능한 것으로 알려지고 있다. 따라서 VHS vaccine에 대한 관심이 높아지면서 killed vaccine, live vaccine, subunit vaccine 및 DNA vaccine (de Kinkelin, 1988; Lorezen and Olesen, 1997)에 관한 연구가 이루어지고 있다. 그러나 현장 적용에서는 de Kinkelin (1998)이 정리한 VHSV vaccine으로서 갖추어야 할 8가지 조건에 모두 부합되는 것은 아직까지 없다. 더욱이 VHSV는 glycoprotein gene의 염기서열에 기초하여 American isolates (Genogroup I), British isolates (Genogroup II), European isolates (Genogroup III)의 3가지 genogroup으로 나누어 지는데 (Benmansour *et al.*, 1997; Stone *et al.*, 1997), 우리나라 양식 넙치에서 분리된 VHSV는 대부분 American isolates (Genogroup I)에 속하는 것으로 알려져 있어 (Kim *et al.*, 2003), 이에 대한 항원 분석이 필수적일 것으로 사료된다.

본 연구는 우리나라 양식 넙치에 큰 피해를 주고 있는 VHSV에 대한 vaccine 개발을 위해, 효과적이고 경제적인 것으로 알려진 중화항체를 생산할 수 있는 항원결정기(epitope)를 검색하였다. 이에 glycoprotein의 아미노산 서열 중 몇 가지 합성 peptide를 선정하여 항원성 분석을 실시하고 항원 및 항체 이용 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

바이러스 및 Cell line

본 연구에 사용한 VHSV isolates의 분리 유래는 Table 1과 같다. 사용된 7 균주는 선행연구(Kim *et al.*, 2004)의 결과, 2001년 12월부터 2004년 3월까지 경북 동해안 지역 및 경남 남해안 일원에서 채색 혹은 복부 팽만 및 탈장 등의 특징적인 질병 증상을 보이며 폐사하는 넙치에서 분리하여 양식넙치에 대한 병원성 및 genotype (American isolates, genotype I)이 확인된 균주를 사용하였다. 바이러스의 배양은 병어의 조직 마쇄 여과액을 Epithelial papilloma of carp (EPC) cell에 접종한 후 15°C에서 3일간 배양하여 세포 변성효과 (cytopathic effect, CPE)를 확인하였다. 세포 배양액은 10 % Fetal Bovine Serum (FBS), 1 % antibiotic-antimycotic (Gibco BRL)을 첨가한 Eagle's minimum essential medium (EMEM)를 사용하였다. 바이러스의 계대는 low multiplicity of infection (MOI, <0.01)으로 수행하였고 모든 실험에는 3회 이하로 계대한 바이러스액을 사용하였다. 특성 비교를 위한 참조바이러스로는 Hong (2004)의 연구에서 사용된 Infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV)와 Hiram rhabdovirus (HIRRV)를 사용하였다.

Table 1. Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) isolates used in this study

Virus isolate	Date of isolation	Geographic origin	Fish body weight (g)	Water Temp. (°C)
KR'01-1	Dec. 2001	Pohang	12	13
KR'02-1	Mar. 2002	Pohang	28	10
KR'02-2	Jun. 2002	Ulsan	4	17
KR'02-3	Jun. 2002	Busan	55	17
KR'03-1	Mar. 2003	Ulsan	300	10
KR'03-2	Mar. 2003	Namhae	100	10
KR'04-1	Mar. 2004	Jeju	12	15

바이러스의 분리 정제

바이러스의 정제는 Nishizawa et al.(1991)의 방법에 준하였다. 즉, IHNV, HRRV 및 각각의 VHSV isolates를 150 cm² T/C flask에 접종하여 대량 배양하고 세포가 90 % 이상 lysis되었을 때 -75 °C의 초저온으로 세포를 동결하였다. 이를 녹인 다음 4,000 ×g, 30분 동안 원심 분리하여 세포 잔유물을 제거한 후 상징액만을 취하고 여기에 7 % polyethylene glycol (PEG-6,000), 2.3 % NaCl을 첨가하여 4 °C에서 교반하면서 overnight하였다. 이를 20,000×g, 40분 동안 원심 분리하여 얻은 pellet을 소량의 TNE buffer (0.01 M Tris HCl, 0.1 M NaCl, 0.001 M EDTA)에 재현탁한 다음 15 % sucrose cushion 위에 중층하고 4 °C, 115,000×g에서 1시간 동안 초고속 원심 분리하여 바이러스 pellet을 얻었다. 항원 제작에 사용할 VHSV isolate (KR'01-1)는 바이러스 pellet을 다시 TNE buffer에 재현탁하여 20, 35, 50 % sucrose discontinuous gradient상에서 4 °C, 80,000×g로 1시간 30분 동안 원심 분리하여 20과 35 % 경계 지점에 형성된 바이러스 band를 수확하였다. 이를 TNE buffer에 재현탁하여 115,000×g에서 1시간 동안 원심 분리하여 바이러스를 정제하였다. 최종 바이러스 농도는 흡광도 280 nm에서 측정하였다.

Peptide 선정 및 합성

선행 연구(Kim et al., 2003)에서 밝힌 넙치 유래 VHSV (KR'01-1)의 glycoprotein gene (GenBank Accession number, AY167587)을 기초로 추정 아미노산 서열을 분석하고, DNASTAR (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) 프로그램을 이용하여 친수성 (hydrophilicity) 및 항원성 (antigenic index)이 높고, 단백질 3차 구조상 표면에 노출되어 있을 가능성 (surface probability)이 높다고 분석되는 3개의 peptide를 Table 2와 같이 선정하였다. 선정된 peptide sequence를 Fmoc법을 이용하여 고상법으로 주문·합성 (Peptron, Korea)하였다. Peptide를 합성한 후, 항체 제작을 위해 필요한 carrier 단백질로서 keyhole limpet hemocyanin (KLH)을 결합시켜 항체 제작에 사용하였다.

Table 2. Synthetic peptides corresponding to amino acid sequence of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) glycoprotein (G-protein)

Peptide name	Peptide sequence	Position on the VHSV G (KR'01-1)
VHSV Gp1	CPHEFEDTNKGLVS-NH ₂	66-77
VHSV Gp2	CTHYKTPKTVSIDL-NH ₂	164-177
VHSV Gp3	CGIPMQQFSRSQMV	495-507

항체의 제작

순수 분리한 VHSV (KR'01-1) 및 합성 peptide (Gp1, Gp2, Gp3)에 대한 polyclonal 항체는 약 1.5 kg되는 New Zealand white rabbit를 사용하여 제작하였다. 면역에 사용한 항원 단백질의 양은 순수 분리한 바이러스와 합성 peptide를 각각 200 μg씩 사용하였으며 첫 번째 면역은 Freund's complete adjuvant (FCA)와 유화시킨 후 피하 주사하였고 두 번째 이후부터는

Freund's incomplete adjuvant (FIA)와 유화시킨 것으로 면역하였다. 이와 같은 방법을 사용하여 2주 간격으로 3회 주사한 후 전채혈하여 혈청을 분리하고 -80 °C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

중화항체 시험 (Neutralization test)

바이러스 중화시험은 Okamoto et al. (1983)의 방법에 따랐다. 약술하면, 제작한 4가지 anti-VHSV rabbit Ab (KR'01-1, Gp1, Gp2, Gp3)를 FBS가 첨가되지 않은 MEM으로 2배 단계 희석한 다음 96 well plate에 50 μ l씩 넣고, 10^2 TCID₅₀ 50 μ l⁻¹의 농도로 희석시킨 VHSV isolates, IHNV, HIRRV를 항혈청이 첨가된 plate에 50 μ l씩 첨가하여 실온에서 1시간 동안 흔들면서 반응시켰다. 96 well plate에 단층 배양된 EPC cell line에 well 당 100 μ l씩 접종하고 18 °C에서 14일간 배양하면서 CPE를 관찰하였다. 항혈청의 중화역가 (ND)는 10^2 TCID₅₀ well⁻¹의 바이러스를 중화시키는 항혈청의 종말 희석 배수의 역수로부터 구하였다.

SDS-PAGE Electrophoresis

단백질의 전기 영동은 Laemmli (1970)의 방법에 따랐다. 농축 정제한 VHSV isolates 및 IHNV와 HIRRV를 5×SDS sample buffer (SDS, Tris, glycerol, 2-mercaptoethanol)와 혼합한 후 5분 동안 boiling하고 10,000 ×g에서 10초 동안 원심 분리한 다음 12 % polyacrylamide gel에 loading하여 60 mA에서 1시간 동안 전기 영동하였다.

Western blotting

순수 분리한 바이러스를 SDS-PAGE 상에서 전기

영동한 후 transfer buffer (25mM Tris, pH 8.3, 20 mM Glycine, 20 % Methanol)를 사용하여 60 mA에서 2시간 동안 반응시켜 gel에 있는 단백질 band를 nitrocellulose (NC) paper에 transfer하였다. NC paper를 Tris-buffered saline and tween 20 (TTBS; 2.423 g Tris, 8.006 g NaCl, 0.1 % Tween 20 to 1 L, pH 7.6)로 세척한 다음 3 % BSA-TTBS 용액으로 1시간 동안 blocking하고 제작한 1차 항체를 TTBS로 1/500배 희석하여 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. NC paper를 TTBS로 washing한 다음 1,000배 희석한 2차 항체인 goat anti-rabbit immunoglobulin (IG) conjugated with alkaline phosphatase (Sigma)에 넣고 실온에서 1시간 30분 동안 반응시켰다. 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetazolium (BCIP/NBT) phosphatase substrate (Sigma)를 첨가하여, 상온에서 발색시킨 후 증류수로 washing하여 반응을 중지시켰다.

결 과

바이러스의 구조 단백질 구성

바이러스의 구조 단백질을 분석하기 위하여 농축 정제한 바이러스를 불연속 12 % SDS-PAGE로 전기 영동하여 나타난 band를 standard marker protein (Fermentas)과 비교해 본 결과는 Fig. 1과 같다. 분자량 약 70, 41, 28, 24 kDa 부근에 major band가 관찰되었으며, 이는 각각 G, N, M1, M2 protein의 분자량에 해당하였다 (lane 1~7). 넓치에서 분리한 virus isolates는 모두 동일한 protein pattern을 보였으나, reference virus인 HIRRV와 IHNV는 protein pattern이 상이하였다 (lane, IHNV and HIRRV).

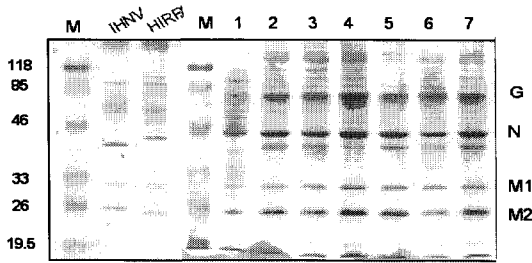


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel (12 %) electrophoresis pattern of the structural protein of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) isolates. The proteins were stained with coomassie brilliant blue R-250. G, glycoprotein (70kDa); N, nucleocapsid protein (41kDa); M1, polymerase-associated protein (28kDa); M2, matrix protein (24kDa). Lane M, size marker, IHNV; purified IHNV, HIRR; purified HIRRV, 1~7; purified VHSV isolates respectively KR'01-1, KR'02-1, KR'02-2, KR'02-3, KR'03-1, KR'03-2, KR'04-1.

Western blotting

제작한 polyclonal rabbit antibody의 VHSV 결합 특이성을 확인하기 위하여 western blotting을 실시한 결과는 Fig. 2와 같다. Anti-whole VHSV (KR'01-1) Ab는 시험 대상 VHSV isolates와는 특이적으로 반응하여 동일한 pattern의 G, N 및 M1에 해당하는 protein profile을 보였으나 (A, lane 1~7), IHNV나 HIRRV의 구조단백질은 인식하지 않는 것으로 나타났다(A, lane I and H). Gp1, Gp2, Gp3의 합성 peptide에 대한 Ab역시 시험 대상 VHSV isolates와는 특이적으로 반응하여 G protein의 분자량과 일치하는 곳에 특이 band를 형성하였다 (B, C and D, lane 1~7). 이에 반해 이들 합성 peptide 항체가 IHNV나 HIRRV와 특이 결합하는 반응은 확인할 수 없었다 (Fig. 2- B, C, D).

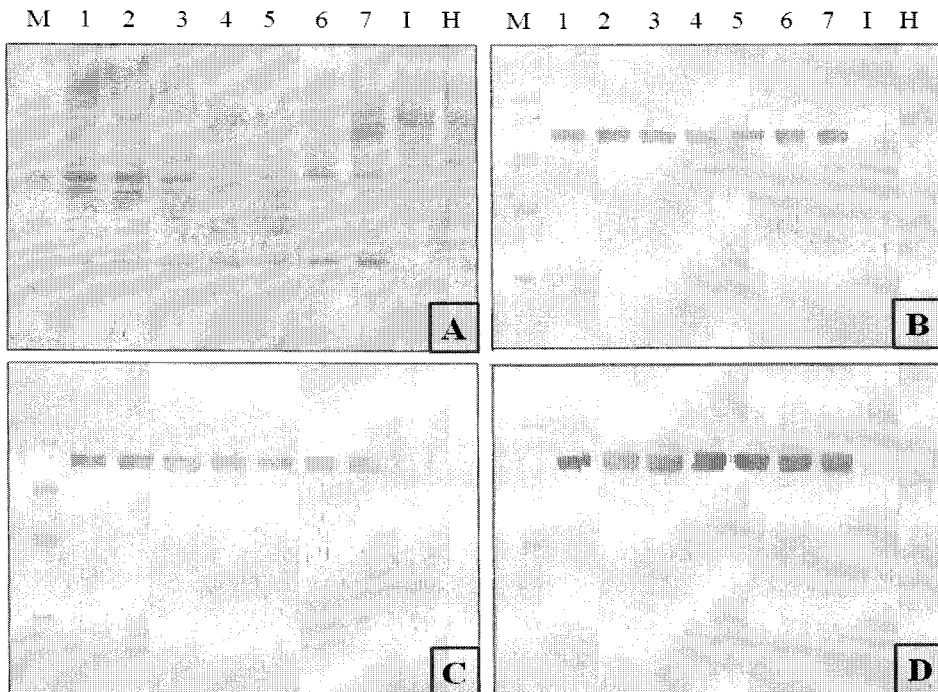


Fig. 2. Western blot pattern of the structural protein of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) isolated from olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. A, Western blotting with anti-VHSV (KR'01-1) sera; B, anti-sera with synthetic oligopeptide Gp1; C, anti-sera with synthetic oligopeptide Gp2; D, anti-sera with synthetic oligopeptide Gp3. Lane M, molecular weight marker; 1~7, VHSV isolates; I, IHNV; H, HIRRV.

중화항체시험

제작한 4개의 polyclonal rabbit antibody가 중화 항체로서 작용할 수 있는지의 여부를 neutralization titer로 확인한 결과는 Table 3에 나타내었다. Anti-whole VHSV (KR'01-1) Ab는 시험 대상 VHSV isolates에 대하여 중화 반응이 일어났으며 이때 중화 항체가는 1:160~1:320으로 나타났다. 그러나 IHNV와 HIRRV과는 교차 반응을 나타내지 않았다. Anti-VHSV Gp1, Gp2는 1:80의 중화 항체가를 나타내었지만 Gp3에 대한 항체는 중화 항체로서의 역할을 확인할 수 없었다.

Table 3. Neutralization tests of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) isolated from olive flounder, *Paralichthys olivaceus* with anti-VHSV (KR'01-1) sera and anti-three synthetic peptide (Gp1, Gp2, Gp3) sera

Virus isolate	Virus titer ^a	Neutralization titer of antiserum ^b			
		VHSV-KR'01-1	Gp1	Gp2	Gp3
VHSV KR'01-1	2.55	320	80	80	<40
KR'02-1	2.80	320	80	80	<40
KR'02-2	3.30	160	80	80	<40
KR'02-3	2.55	320	80	80	<40
KR'03-1	2.55	320	80	80	<40
KR'03-2	2.05	320	80	80	<40
KR'04-1	2.05	160	80	80	<40
IHNV	2.80	<80	<40	<40	<40
HIRRV	3.05	<40	<40	<40	<40

^a, Log₁₀ TCID₅₀ well⁻¹.

^b, Reciprocal of maximum dilution of antiserum to neutralize 2.0 log₁₀ TCID₅₀ of virus.

고 찰

전 세계적으로 VHSV에 의한 피해가 확산됨에 따라, VHSV의 감염을 피하기 위해 종묘생산 단계에서

바이러스 free stock을 생산하는 데 노력을 기울이고 있지만 바이러스를 완전히 차단하는 것이 현재로서는 불가능한 것으로 알려지고 있다. 따라서, VHSV의 확산을 최소화하고 바이러스 감염에 의한 피해를 최소화하기 위한 연구에 세계 각국의 관심이 집중되고 있다. VHS는 1~3×10³ μW s⁻¹ cm⁻²의 UV radiation 처리에도 불활화되며 chlorine, hypochlorite, iodophore 등과 같은 소독제에도 비교적 효과적인 것으로 알려져 있다 (Yoshimizu *et al.*, 1986). 유전 육종 프로그램이 송어 양식 산업에 상당히 긍정적인 효과 나타내고 있다는 분석도 있다 (Smail, 1999). 또한 Poly(I:C)를 면역한 Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*에 VHSV를 인위감염시킨 후 100% 생존했다는 보고도 있다 (Takami *et al.*, 2010). 현재 VHS에 대한 vaccine 연구는 killed vaccine, live vaccine, subunit vaccine 및 DNA vaccine (de Kinkelin, 1988; Lorezen and Olesen, 1997) 등 다양하게 이루어지고 있으며, 여러 연구자들이 보다 효율적인 vaccine 개발을 위한 VHSV의 구조 단백질 분석에 관한 보고를 하였다.

VHSV는 5개의 구조 단백질로 이루어져 있는데 RNA dependent RNA polymerase (L), transmembrane envelope glycoprotein (G), nucleocapsid protein (N), matrix proteins M1과 M2이며 이외에도 감염 세포에서만 발현되는 non-virion protein (NV)이 있는데 그 기능은 아직 밝혀지지 않고 있다 (Schuetze *et al.*, 1996; Kurath *et al.*, 1997). VHSV에 대한 구조 단백질의 분자량은 연구자나 분리 어종에 따라 분자량이 약간씩 차이가 있지만 (Wagner, 1988; Coll, 1995), 각각의 구조 단백질에 대한 분자량은 38~41 kDa (N), 21.5~25 kDa (M1), 19 kDa (M2), 72~80 kDa (G) 그리고 157~190 kDa (L) 가량인 것으로 알려져 있다 (Lenoir and de Kinkelin, 1975; McAllister and Wangner, 1975). 본 연구에서는 넙치에서 분리되는

VHSV isolates의 구조 단백질 전기영동상을 조사한 결과 L protein에 대해서는 12 % SDS상에서 명확한 위치를 찾기 어려웠고 G, N, M1 및 M2는 각각 약 70, 41, 28 및 24 kDa 정도인 것으로 확인되었으며 넙치에서 분리한 VHSV isolates 간에는 차이가 없어 모두 동일한 profiles임을 확인할 수 있었다.

VHSV의 G protein은 rabies virus (Gaudin et al., 1992)에서와 마찬가지로 3개의 monomer가 비공유 결합되어 있는 trimer 구조를 이루고 있으며 전체 바이러스 단백질의 10 % 이하를 차지하지만 바이러스 입자의 표면으로 돌출되어 있는 유일한 구조 단백질이므로 항원으로서 인지되는 단백질로 알려져 있다 (Bernard et al., 1985). VHSV 감염에 대한 trout의 체액성 면역학적 반응에 대하여 지난 수십 년간 연구가 진행되어 왔음에도 불구하고 아직도 많은 부분이 연구의 대상으로 남아있다 (Lorenzen et al., 1999; Perez et al., 1998). 예를 들어 질병의 방위에 직접적으로 관여하는 항체를 생성하는 바이러스의 구조나 G protein epitope에 대해서는 아직 명확하지 않으며 in vitro에서 VHSV를 중화할 수 있는 항체가 in vivo상에서의 protection과 반드시 일치하는 것은 아니어서 때로는 비중화 monoclonal antibody (MAb)가 VHSV에 대한 수동면역에 직접적으로 관여하는 경우 (Lorenzen et al., 1999)도 있고, trout에서 높은 중화 항체를 보인 것이 linear epitope와는 낮게 반응하거나 반응하지 않는 경우 (Fernandez-Alonso et al., 1999)도 있었다. 본 연구에서는 중화 항체를 생산하기 위하여 whole virus 뿐만 아니라 G protein의 단편 구조인 합성 peptide를 항체 제작에 사용하였다. 본 연구에서 제작한 polyclonal VHSV whole antisera뿐만 아니라 합성 peptide에서도 중화 항체가를 확인할 수 있었으나 이것이 실제로 넙치의 VHSV에 대한 protection에 관여할지에 대해서는 추가적인 실험이 필요할 것이다.

본 연구에서 제작한 VHSV peptide Gp1과 Gp2에 대한 항체는 western blot에서 VHSV G protein을 특이적으로 검출하는 것으로 조사되었으므로 바이러스 검출용 항원 및 항체로 활용 가능성이 높으며, 중화항체로서의 역할을 추가 분석할 충분한 가치가 있을 것으로 생각한다.

요 약

우리나라 양식 넙치에서 분리한 VHSV (KR'01-1)의 glycoprotein 아미노산 배열을 기초로 단백질 전환 구조상 유연성, 친수성 및 항원성이 높고, 표면에 노출되어 있을 가능성 (surface probability)이 높다고 분석되는 3개의 peptide (Gp1, Gp2, Gp3)를 선정하였다. 정제된 바이러스 입자 및 3개의 합성 peptide에 대한 polyclonal 항체를 제작하여 항원성 분석을 실시한 결과, 합성 peptide로 제작한 모든 항혈청은 Western blotting 결과 VHSV의 구조단백질과 특이적으로 결합하는 나타났으며, 이 가운데 Gp1 및 Gp2 합성 peptide에 대한 항혈청은 양식 넙치에서 분리한 VHSV를 중화시키는 것으로 나타나, peptide-based antigen의 이용 가능성을 제시하였다.

감사의 글

본 연구는 국립수산물과학원 (수산동물전염병 방역 및 검역체계구축, RP-2011-AQ-055)의 지원에 의해 운영되었습니다.

참고문헌

Altuntas, C. and Ogut, H.: Monthly occurrence and prevalence of viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV)

- in whiting *Merlangius merlangus*. Dis. Aquat. Org., 88: 107-113, 2010.
- 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.
- 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.
- Bernard, J., Le Berre, M.B. and de Kinkelin, P.: Viral haemorrhagic septicaemia in rainbow trout: attempt to relate interferon production, antibody synthesis and structure of the virus with mechanism of virulence. Ann. Inst. Pasteur. Virol., 136: 13-26, 1985.
- Coll, J. M.: The glycoprotein G of rhabdoviruses. Arch. Virol. 140: 827-851, 1995.
- Dale, O.B., Ørpetveit, I., Lyngstad, T.M., Kahns, S., Skall, H.F., Olesen, N.J. and Dannevig, B.H.: Outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in seawater-farmed rainbow trout in Norway caused by VHS virus Genotype III. Dis. Aquat. Org., 85: 93-103, 2009.
- de Kinkelin, P.: Vaccination against viral haemorrhagic septicaemia. In: Ellis, A.E. (ed) Fish vaccination. Academic Press, London, pp. 172-192, 1988.
- Dorson, M. and Chevassus, B.: Etude de la receptivite d'hybrides triploides truite arc-en-ciel x saumon coho a la necrose pancreatique infectieuse et a la septicemie hemorrhagique virale. Bulltin Francais de Pisciculture, 296: 29-34, 1985.
- Fernandez-Alonso, M., Lorenzo, G., Perez, L., Bullido, R., Estepa, A., Lorenzen, N. and Coll, J.M.: Mapping of linear antibody epitopes of the glycoprotein of VHSV a salmonid rhabdovirus. Dis. Aquat. Org., 34: 167-176, 1999.
- Gaudin, Y., Ruigrok, R.W.H., Tuffereau, C., Knossow, M. and Flamand, A.: Rabies virus glycoprotein is a trimer. Virology, 187: 627-632, 1992.
- Horlyck, V., Møllergaard, S., Dalsgaard, I. and Vetergaard-Jørgensen, P.E.: Occurrence of VHS in Danish maricultured rainbow trout. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 4: 11-13, 1984.
- Hong, M.S.: Rhabdovirus isolated from the fry of snakehead fish, *Ophicephalus argus*. Master thesis, Pukyong National University, Korea. 2004.
- 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.M. and Park, S.I.: Detection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in wild marine fishes in the coastal region of Korea. J. Fish Pathol., 17: 1-10, 2004.
- Kim, S.M., Lee, J.I., Hong, M.J., Park, H.S. and Park, S.I.: Genetic relationship of the VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) isolated from cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea. J. Fish Pathol., 16: 1-12, 2003.
- Kim, W.S., Kim, S.R., Kim, D.W., 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 haemorrhagic septicaemia virus) infection in farmed olive flounder *Paralichthys olivaceus*

- in Korea. *Aquaculture*, 296: 165-168, 2009.
- Kim, W.S., Jung, S.J., Kim J.O., Kim, D.W., Kim, J.H. and Oh, M.J.: Genetic positioning of Korean viral hemorrhagic septicemia virus (VHS) from cultured and wild marine fishes. *J. Fish Pathol.*, 24: 1-9, 2011.
- Kurath, G., Higman, K.H. and Bjorklund, H.V.: Distribution and variation of NV genes in fish rhabdoviruses. *J. Gen. Virol.*, 78: 113-117, 1997.
- Lorenzen, N., Olesen, N.J. and Koch, C.: Immunity to VHS virus in rainbow trout. *Aquaculture*, 172: 41-61, 1999.
- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
- Lorenzen, N. and Olesen, N.J.: Immunization with viral antigen: Viral haemorrhagic septicemia. In: *Fish Vaccinology*. Gudding R.A., Lillehaug, P.J., Midtlyng, F. Brown (ed.), Dev. Biol. Stand. Basel, Karger, 9: 201-209, 1997.
- Mortensen, H.F., Heuer, O.E., Lorenzen, N., Otte, L. and Olesen, N.J.: Isolation of viral haemorrhagic septicemia 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., Yoshimizu, M., Winton, J.R. and Kimura, T.: Comparison of genome size and synthesis of structural proteins of hiram rhabdovirus, infectious hematopoietic necrosis virus, and viral hemorrhagic septicemia virus, *Fish Pathol.*, 26: 77-81, 1991.
- Nishizawa, T., Save, H., Isidan, H., Ustunag, C., Iwamoto, H. and Yoshimizu, M.: Genotyping and pathogenicity of viral hemorrhagic septicemia virus from freeliving turbot (*Psetta maxima*) in a Turkish coastal area of the Black Sea. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 2373-2378, 2006.
- Okamoto, N., Sano, T., Hedrick, R.P. and Fryer, J.L.: Antigenic relationship of selected strains of infectious pancreatic necrosis virus and European eel virus. *J. Fish Dis.*, 6: 19-25, 1983.
- Ord, W.M., Be Berre, M. and de Kinkelin, P.: Viral hemorrhagic septicemia: comparative susceptibility of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and hybrids (*S. gairdneri*×*Onchorhynchus kisutch*) to experimental infection. *J. Fish Res. Board Can.*, 33: 1205-1208, 1976.
- Perez, L., Estepa, A. and Coll, J.M.: Purification of the glycoprotein G from viral haemorrhagic septicemia virus, a fish rhabdovirus, by lectine affinity chromatography. *J. Virol. Meth.*, 76: 1-8, 1998.
- Smail, D.A.: Viral haemorrhagic septicemia. In: *Fish disease and disorders*, vol. 3, Viral, bacterial and fungal infections. P. T. K. Wood, D. W. Bruno (ed), CABI Publishing, New York, pp. 123-147, 1999.
- Schlotfeldt, H.J., Ahne, W., Vestergard-Jorgensen, P.E. and Glende, W.: Occurrence of viral haemorrhagic septicemia in turbot (*Scophthalmus maximus*) a natural outbreak. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 11: 105-107, 1991.
- Schuetze, H., Enzmann, P.J., Mundt, E. and Mettenleiter, T.C.: Identification of the non-virion (NV) protein of fish rhabdoviruses viral haemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus. *J. Gen. Virol.*, 77: 1259-1263, 1996.
- 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.

Takami, I, Kwon, S.R., Nishizawa, T. and Yoshimizu, M.: Protection of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* from viral hemorrhagic septicemia (VHS) by Poly(I:C) immunization. Dis. Aquat. Org., 89: 109-115, 2010.

Takano, R., Nishizawa, T., Arimoto, M. and Muroga, K.:

Isolation of viral haemorrhagic septicemia (VHSV) from wild Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 20: 186-193, 2000.

Yoshimizu, M., Takizawa, H. and Kimura, T.: UV susceptibility of some fish pathogenic viruses. Fish Pathol., 21: 47-52, 1986.

Manuscript Received : July 21, 2011

Revised : August 12, 2011

Accepted : August 16, 2011