

바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스(Viral Hemorrhagic Septicemia Virus) 감염 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 조직별 바이러스 정량분석

장진현, 황성돈¹, 정지민, 권문경, 황지연*

국립수산물품질관리원 수산방역과, ¹국립수산과학원 동해수산연구소 양식산업과

Quantitative analysis of viral hemorrhagic septicemia virus in tissues of infected olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)

Jin Hyeon Jang, Seong Don Hwang¹, Ji Min Jung, Mun-Gyoung Kwon and Jee Youn Hwang*

Aquatic Disease Control Division, National Fishery Products Quality Management Services, Busan 46083, Republic of Korea

¹Aquaculture Industry Division, East Sea Fisheries Research Institute, Gangneung 25435, Republic of Korea

*Corresponding author

Jee Youn Hwang
Tel. 051-720-3040
E-mail. jinihwang@korea.kr

Received: 26 May 2020

First Revised: 7 October 2020

Second Revised: 10 February 2021

Third Revised: 8 March 2021

Revision accepted: 9 March 2021

Abstract: A diagnostic test for viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), which infects more than 80 species of freshwater and marine fish at home and abroad, causing mass mortality, was conducted to provide quantitative data on the amount of virus expression in various tissues of flounder in chronological order. The tissues were collected in chronological order after the intraperitoneal injection of $3.0E + 07$ tissue culture infective dose₅₀ (TCID₅₀) per 0.1 mL per fish of VHSV to randomly selected flounder. As a result of relative quantification through real-time PCR, the highest levels of virus expression were found in the spleen, kidney, gill, and liver on day 5. This study proved that the spleen was an appropriate site for the final diagnosis of VHSV in the early stages of infection and will provide important information for the diagnosis of legal infectious diseases in Korea.

Keywords: real-time PCR, viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), olive flounder, diagnosis

서 론

2019년 통계청 어류양식동향조사 결과에 따라 국내 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 양식 산업은 전체 양식 산업 생산량의 약 51% 이상을 차지하는 중요한 산업이다.

그중 지속적인 바이러스성 질병에 의한 대량 폐사로 양식 산업이 큰 피해를 받고 있다(Park *et al.* 2015; Park *et al.* 2016). 국내 넙치의 대량 폐사를 발생시키는 주요 바이

러스는 viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)로 보고되고 있다. VHSV는 국내외 약 90여 종의 담수 및 해수어류를 감염시키며 세계동물보건기구의 지정질병(World Organization for Animal Health Office International des Epizooties (OIE) notifiable disease)으로 지정되었으며(OIE 2017), 최근에도 다양한 어종에서 감염된 사례가 보고되고 있다(Guðmundsdóttir *et al.* 2019).

국내에서는 2000년대부터 동해안 넙치양식장에서 처음

발병된 이후, 저수온 시기인 겨울에서 봄까지 많은 폐사를 유발하여 경제적 손실을 발생시켰다. 수산생물질병관리법에서도 법정전염병으로 관리하고 있는 질병이다(Kim *et al.* 2003; Skall *et al.* 2005).

VHSV는 Rhabdoviridae과 Novirhabdovirus속에 속하는 RNA 바이러스이며, 바이러스 입자의 크기는 직경 70 nm, 길이 180 nm의 탄환형 모양이다. Whole genome은 약 11,000 bp이며, nucleocapsid protein (N), phosphoprotein (P), matrix protein (M), glycoprotein (G), non-virion protein (NV), polymerase (L) 6개의 유전자를 순서대로 암호화하고 있는 Negative-sense, single-stranded RNA genome 바이러스이다(Trdo *et al.* 2005).

N 유전자와 G 유전자의 염기서열 분석을 통해 계통분석학적으로 4개의 유전자형(I-IV)으로 나누어지며, 이러한 유전자형은 지리적분포에 따라 구분된다(Einer-Jensen *et al.* 2004; Skall *et al.* 2005). Genotype I은 주로 유럽의 담수와 해수에서 분리되었으며, Ia-Ie까지의 서브그룹을 가진다. Genotype II는 발트해 및 핀란드에서 발견된 집단이며(Einer-Jensen *et al.* 2004; Gadd *et al.* 2011), Genotype III는 북대서양 및 북해에서 발견되었다(Einer-Jensen *et al.* 2004; Duesund *et al.* 2010). 그리고 Genotype IV는 세 개의 서브그룹으로 나누어지며, Genotype IVa는 한국을 비롯한 동북아시아 지역 및 동북태평양 지역의 해양환경에서 발견되었으며(Bernard *et al.* 1992; Traxler *et al.* 1999; Hedrick *et al.* 2003; Lee *et al.* 2007; Ahn *et al.* 2013; Garver *et al.* 2013), Genotype IVb는 북아메리카 오대호의 담수 지역에서 발견되었다(Elsayed *et al.* 2006; Thompson *et al.* 2011). 그리고, Genotype IVc는 캐나다 동해안 하구환경에서 발견되었다(Gagné *et al.* 2007; Pierce *et al.* 2012).

VHSV 진단 방법은 OIE에 지정한 VHS 국제표준진단법에 따라 세포배양법, 면역혈청학적 진단과 Real-time PCR, RT-PCR 및 염기서열 분석을 이용한 분자생물학적 진단을 실시하고 있으며(Ariel *et al.* 2001; Soliman *et al.* 2006; Garver *et al.* 2011; Jonstrup *et al.* 2013; OIE 2017), 국내에서도 VHS를 「수산생물질병관리법」 제10조 제1항·제3항·제6항에 따라 수산생물 병성감정 실시방법에 필요한 세부사항을 규정한 수산생물 병성감정지침서에 의거한 분자생물학적 분석을 통해 신장과 비장의 핵산을 이용하여 확진진단을 실시하고 있다.

이러한 국내외 분자생물학적 진단법에 따르면 시료채

취를 위한 최적 기관 및 조직으로 신장을 포함한 내장기관을 채취하여 정밀검사를 진행하고 있으나(Mackaym 2004; Bland *et al.* 2012; Jonstrup *et al.* 2013; Kim *et al.* 2014), 넙치의 바이러스 감염 후 각 조직별 바이러스의 정량적 분석은 아직 밝혀진 것이 없다.

이번 연구에서는 정량적 분석이 가능한 real time PCR 기기를 이용하여, 수산생물전염병의 방역조치 대상인 VHSV 감염 넙치의 다양한 조직(아가미, 간, 신장, 비장, 근육)에서 VHSV를 정량분석하여, 신속 정확한 질병진단 및 방역체계 확립에 대한 기초자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

1. 바이러스 배양

넙치에서 분리된 VHSV (ADC-VHS2014-5)을 사용하였다. 사용된 어류주화세포는 Epithelioma papulosumcyprini (EPC) cell line (ATCC NO. CRL-2872)에 10% fetal bovine serum (FBS)를 첨가한 Minimal essential medium (MEM; Invitrogen, CA), 1% antibiotic-antimycotic (Gibco BRL, USA)를 사용하여 20°C에서 배양하였다(Winton 2007; Hwang *et al.* 2017). Tissue culture infective dose₅₀ (TCID₅₀)은 Reed and Muench (1938)법에 따라 96-well plate에 EPC cell line을 1×10^4 cells well⁻¹로 분주하고 24시간 후 10 fold로 단계희석한 VHSV 배양액을 100 μ L씩 접종하고, 2% FBS를 첨가한 MEM 배지를 첨가한 후, 15°C에서 7일간 세포변성효과(Cytopathic effects; CPE)를 관찰하여 TCID₅₀을 측정하였다.

2. VHSV 넙치 인위 감염 실험 및 시료 채취

VHS 감염 이력이 없는 건강한 넙치(평균 체장 18.7 cm, 평균 체중 50.42 g)를 선별하여 인위 감염실험을 진행하였다. 넙치는 300 L 용량의 실험용 수조 22개에 10미씩 옮겨, 실험 수온 13°C에 적응할 수 있도록 1주 동안 순차적으로 온도를 낮추었으며, 실험기간 동안 13°C를 유지하였다. VHSV 병원성 실험은 실험구 넙치 200미에 3.0E+07 TCID₅₀ per 0.1 mL per fish로 복강 주사하였다. 대조구 넙치 20미는 1×Phosphate buffered saline (PBS) (Gibco, USA) 0.1 mL을 복강 주사하였다. 폐사율은 실험구 수조 2

개의 넙치 20미를 16일간 조사하였다. VHSV 정량실험은 실험구 수조 18개의 넙치 180미를 시간경과에 따라 0시간, 6시간, 12시간, 1일, 2일, 3일, 5일, 7일에 각각의 수조에서 임의로 3미씩 선택하여 아가미, 간, 신장, 비장, 근육 시료를 채취하였다. RNA isolation은 조직 마쇄액 100 μ L를 RNA isolation kit AccuPrep[®] Universal RNA Extraction Kit (Cat.K-3140; Bioneer, Korea)와 DNase treatment RNase-Free-DNase Set (Cat.79254; Qiagen, Germany)를 사용하여, RNA 50 μ L를 얻었다.

cDNA 합성은 RNA isolation 후 얻은 RNA concentration 1 μ g에 RT Rxn 20 μ L/rxn RT premix AccuPower[®] Rocketscript[™] Cycle RT Premix (Cat.K-2201; Bioneer, Korea)와

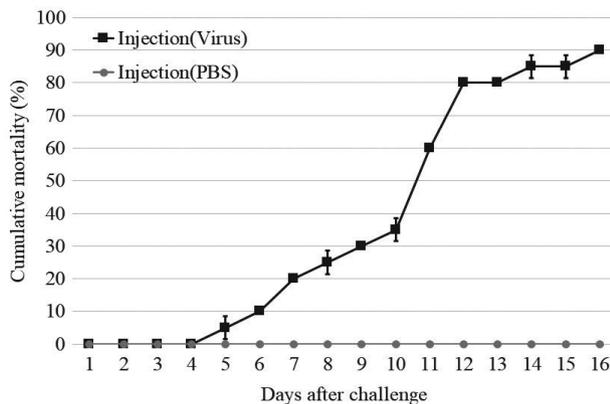


Fig. 1. Mortality of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Cumulative mortality of *P. olivaceus* that were injected intraperitoneally with $3.0E + 07$ TCID₅₀ per 0.1 mL per fish of VHSV (■) or PBS (●).

Primer Oligo dT (20 mer)를 사용하여 RT condition (37°C 30 sec, 48°C 4 min, 55°C 30 sec) \times 12 cycles, 95°C 10 min에서 PCR machine은 MyGenie[™] 96 Gradient Thermal Block (Cat.A-2040-1; Bioneer, Korea)을 사용하여 합성하였다. 합성된 시료를 -70°C에서 보관하였다.

3. Real-time PCR (Relative quantification)

Real-time PCR은 VHSV 유전자와 넙치의 Reference 유전자인 EF1a 유전자를 비교하여 상대정량하였다. 실험에 사용된 Primer로 VHSV (GenBank accession number Z93412.2)를 표적으로 하는 Forward primer: 5'-ATG-AGG-CAG-GTG-TCG-GAG-G-3'; Reverse primer: 5'-TGT-AGT-AGG-ACT-CTC-CCA-GCA-TCC-3'를 사용하였으며, *Paralichthys olivaceus* Reference gene인 EF1a (Genbank accession number AB915949)을 표적으로 하는 Forward primer: 5'-CAT-GGT-CGT-GAC-CIT-CGC-TC-3'; Reverse primer: 5'-CTC-GGG-CAT-AGA-CTC-GTG-GT-3'을 사용하였다.

실험에 사용된 시료는 합성된 Template cDNA 10 μ L와 PCR Premix AccuPower[®] 2X GreenStar Master Mix (Cat. K-6253; Bioneer, Korea)를 혼합하여 사용하였으며, Real-time PCR 기계는 Exicycler[™] 96 Real-Time Quantitative Thermal Block (Cat.A-2060; Bioneer, Korea)을 사용하였다. PCR 조건은 다음과 같이 Step 1: 95°C 10 min, Step 2: (95°C 15 sec, 60°C 1 min) \times 45 cycles scan⁻¹, Step 3: 65°C 5 min,

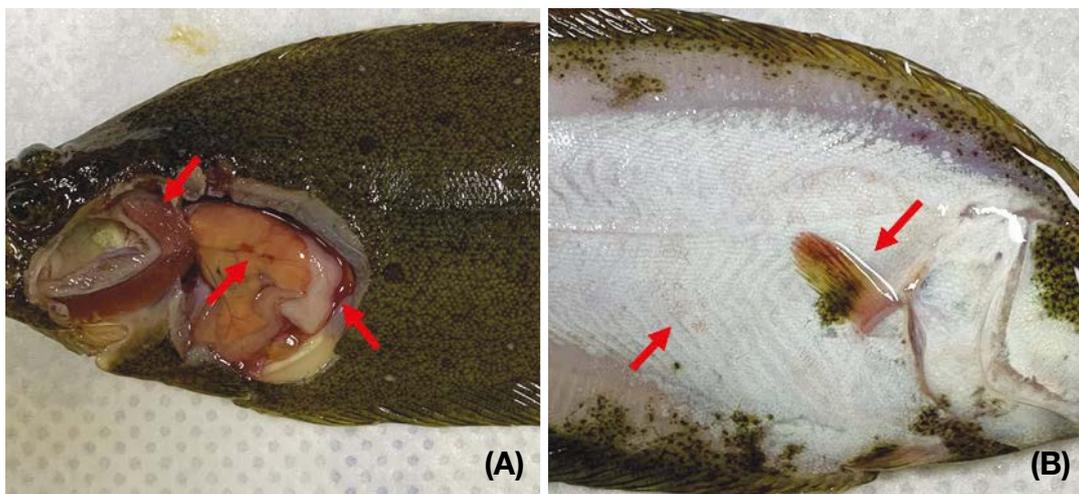


Fig. 2. Symptoms in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). (A) Pale coloration of the gills, accumulation of ascetic fluid, and a severely congested liver. (B) Redness of the fin and skin.

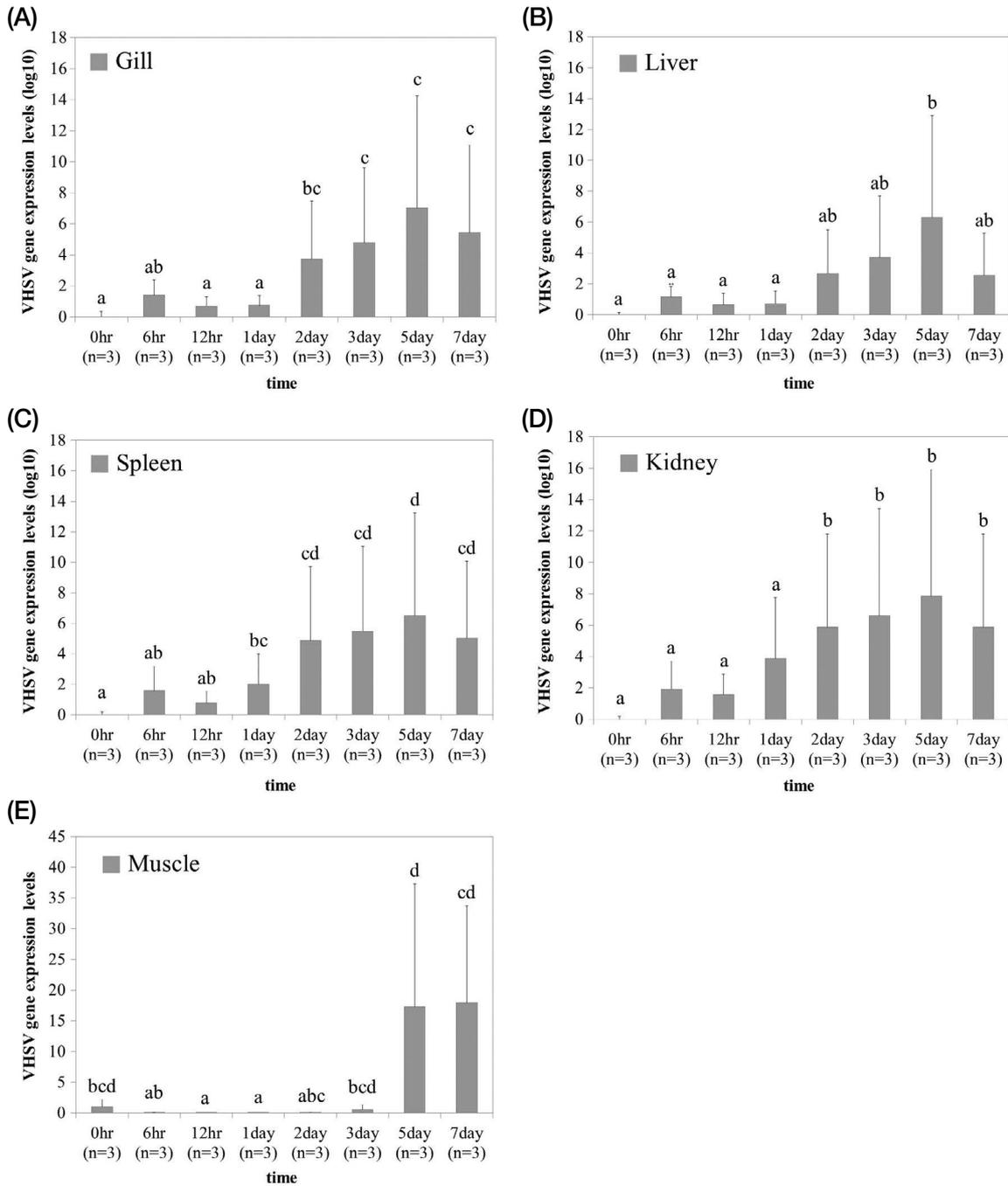


Fig. 3. Tissue distribution of VHSV by qPCR analysis. Total RNA was isolated from various *P. olivaceus* tissues. (A) Gill, (B) liver, (C) spleen, (D) kidney, and (E) muscle. VHSV normalized to EF1a rRNA expression. The mean \pm standard deviation ($n=3$) is shown. The values of the columns with different superscripts (a-d) were significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range tests.

Step 4: melting curve analysis 65°C~95°C (1°C sec⁻¹)으로 설정하였다.

Real time PCR을 통해 얻은 RAW 데이터를 분석하기 위한 방법으로 Exicycler analysis를 사용하였다. 분석된 Ct값

을 상대정량법인 2-ddCt 방법을 이용하여 fold change를 계산하여 log값으로 환산하였다(Livak *et al.* 2001). 분석된 결과들은 SPSS 프로그램(SPSS, Chicago, IL, USA)을 사용하여 통계적으로 분석되었으며, One-way analysis of variance

(ANOVA) test에서 사후검정은 Duncan test를 통해 실시하였다($p < 0.05$).

결과 및 고찰

국내 넙치 양식 산업 생산량은 전체 양식 산업 생산량의 약 51% 이상을 차지하는 중요한 산업으로 성장하였다. 하지만 지속적인 바이러스성 질병에 의한 대량 폐사로 양식 산업이 큰 피해를 받고 있음에도 아직 VHSV 질병발생 예방 및 치료에 대한 조직별 바이러스 정량 분석에 대한 연구는 부족한 상황이다. 이에 본 연구에서는 수산생물전염병의 방역조치 대상인 VHSV 감염 넙치를 real time PCR 법을 이용하여 다양한 조직(아가미, 간, 신장, 비장, 근육)에서의 VHSV를 정량분석하여, 신속 정확한 질병 진단 및 방역체계 확립에 대한 기초자료로 활용하고자 하였다.

ADH-VHS2014-5 ($3.0E + 07$ TCID₅₀ per 0.1 mL per fish)을 복강 주사한 결과, ADC-VHS2104-5 바이러스 시험구에서 공격실험 5일차부터 16일차 동안에 90%의 누적 폐사율이 관찰되었다(Fig. 1). Hwang *et al.* (2017)은 국내 넙치 유래 VHSV를 사용하여 넙치 치어에 대한 병원성을 조사한 결과 ADH-VHS2014-5을 복강 주사하여 90%의 누적 폐사율이 관찰되었다고 보고하였다. 본 연구에서는 $3.0E + 07$ TCID₅₀ per 0.1 mL per fish 농도로 감염 실험을 실시했음에도 90%의 누적 폐사율이 관찰되었는데, 바이러스 배양 후에도 VHSV IVa (ADH-VHS2014-5)는 여전히 넙치에서 높은 폐사율을 가지는 고병원성 바이러스의 특성을 유지하는 것으로 나타났다. Fig. 2A, B는 공격실험 5일차 넙치의 사진이며, 개체에 따라 조금의 차이가 있으나 VHSV 감염의 주요증상인 지느러미 발적, 근육출혈 및 복부팽만 등의 외부증상을 나타냈으며, 내부증상으로 복수 및 장기 출혈이 육안으로 관찰되었다(Fig. 2A, B).

시간에 따른 어체 내 바이러스 변화량을 Real-time PCR 상대정량 분석을 위해, 수온 13°C 환경에서 ADC-VHS2014-5 ($3.0E + 07$ TCID₅₀ per 0.1 mL per fish)을 넙치 치어에 복강 주사하여 0시간, 6시간, 12시간, 1일, 2일, 3일, 5일, 7일 시간순서로 무작위 선별된 넙치개체의 아가미, 간, 신장, 비장, 근육을 샘플링하여 RNA isolation 후 cDNA 합성하여 N-gene의 부분적인 서열과 house-keeping gene 인 EF1a-gene 대한 real-time PCR을 통해 Ct값을 측정하

였다. Exicycler analysis 프로그램을 통해 측정된 Ct값은 상대정량법인 2-ddCt 방법을 이용하여 fold change를 분석하였다. 분석결과, 4개의 조직(아가미, 간, 신장, 비장)에서 복강주사 후 2일차부터 VHSV 발현량이 증가하기 시작하여, 5일차에 비장 (7.84 ± 8.07 Fold charge (log10)), 아가미 (7.02 ± 7.22 Fold charge (log10)), 신장 (6.51 ± 6.73 Fold charge (log10)), 그리고 간 (6.33 ± 6.56 Fold charge (log10)) 조직의 Fold charge가 정점에 이른 후 감소하는 패턴이 나타났다. 반면 근육 조직에서의 VHSV 발현패턴은 복강주사 후 5일차에 17.3 ± 20.0 Fold charge로 증가한 후, 유지되는 패턴이 나타났다(Fig. 3).

Kim *et al.* (2014)은 FYeosu05 ($1.0E + 5.8$ TCID₅₀ per 0.1 mL per fish)를 넙치의 근육에 주사한 후 1, 3, 5, 7, 14, 21 일째 각 개체의 신장과 비장 조직을 pooling된 샘플을 TICD₅₀ 및 real time PCR 절대 정량결과를 비교 분석하였다. TICD₅₀ 및 절대 정량결과 모두 3일차에 바이러스 발현량이 급격히 증가하여 7일차까지 유지된 후 14일차부터 실험이 종료되는 21일차까지 바이러스 발현량이 감소하는 패턴이 나타났다.

Kim *et al.* (2020)은 수온 20°C 환경에서 VHSV ($1.0E + 6.0$ plaque forming unit (PFU) per 1 mL per fish)를 넙치 치어에 복강 주사하여, 0일, 3일, 7일째 10개의 조직(아가미, 뇌, 비장, 간, 두신, 신장, 식도, 위, 장, 근육)을 절대 정량하였다. 그 결과, 3일차부터 7일차까지 VHSV 발현량이 급격히 증가하는 패턴이 나타났으며, 7일차 비장, 근육, 아가미, 근육조직에서 VHSV 발현량 증가폭이 높게 나타났다.

본 연구의 결과는 Kim *et al.* (2014)과 Kim *et al.* (2020)이 보고한 결과들과는 다르게 5일차에서 VHSV 발현량이 가장 높았다. 근육조직에서 VHSV 발현량을 비교하였을 때, 본 실험결과에서는 미미한 수준의 VHSV 발현량이 관찰되었으나, Kim *et al.* (2020)이 보고한 결과에서는 7일차의 VHSV 발현량이 비장, 아가미 다음으로 높게 발현되는 것으로 나타났다. 이렇게 상반되게 나타난 이유는 VHSV 분리주, 실험기간, 수온, 실험어의 로트 및 분석방법의 차이와 관련이 있을 것으로 추정되며, 향후 다양한 조건을 고려한 감염 실험검토가 필요하다.

이번 연구결과, VHSV 감수성 어종인 넙치의 분자생물학적 진단분석의 적정조직으로 사용되는 비장과 신장 중에서 비장조직이 VHSV 진단분석의 적정시료로 사용되는 것에 문제가 없음을 시사한다. 반면 근육 조직은 본 연구

의 결과와 Kim *et al.* (2020)의 결과가 상반되어 확정진단을 위한 적정조직으로 사용되기엔 부적절해 보이며, 추가적인 검토가 필요할 것으로 보인다.

본 연구에서 수행된 VHSV 감염 넙치의 다양한 조직(아가미, 간, 신장, 비장, 근육)에서 VHSV를 정량분석을 하여, 국내에서 발생하는 법정전염병인 VHSV 진단 및 방역체계 확립에 대한 자료로 이용 가능할 것이다.

적 요

국내외에서 80여 종이 넘는 담수 및 해산어류를 감염시켜 대량폐사를 발생시키는 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스(VHSV) 진단검사를 위해 넙치의 여러 조직의 바이러스 발현량에 대한 정량적 데이터를 시간순서에 따라 분석하였다. 무작위 선별된 넙치에 3.0E+07 TCID₅₀ per 0.1 mL per fish의 VHSV를 복강 주사하여 시간순서(0시간, 6시간, 12시간, 1일, 2일, 3일, 5일, 7일)에 따라 조직(아가미, 간, 신장, 비장, 근육)을 채취하였다. Real-time PCR 법을 통해 상대 정량한 결과 5일차 아가미, 간, 신장, 비장에서 바이러스의 발현량이 가장 높게 나타났다. 이번 연구를 통해 감염 초기단계에서 비장이 VHSV 확정진단을 위한 적정조직임을 입증하였으며, 국내 법정전염병 진단에 중요한 정보를 제공할 것이다.

사 사

이 논문은 2021년도 국립수산물품질관리원 수산생물방역기술 개발 및 프로그램 운영(R2021071)의 지원으로 수행된 연구입니다.

REFERENCES

- Ahn SJ, MY Cho, BY Jee and MA Park. 2013. Phylogenetic analysis of Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus (VHSV) isolates from Asia. *J. Fish Pathol.* 26:149-161.
- Ariel E and NJ Olesen. 2001. Assessment of a commercial kit collection for diagnosis of the fish viruses: IHNV, IPNV, SVCV and VHSV. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 21:6-11.
- Bernard J, M Bremont and JR Winton. 1992. Nucleocapsid gene sequence of a North-American isolate of viral hemorrhagic septicemia virus, a fish Rhabdovirus. *J. Gen. Virol.* 73:1011-1014.
- Bland F, M Snow, KA Garver and I Matejusova. 2012. Genotype-specific Taqman assays for the detection and rapid characterization of European strains of viral haemorrhagic septicaemia virus. *J. Virol. Methods* 187:209-214.
- Duesund H, S Nylund, K Watanabe, KF Ottem and A Nylund. 2010. Characterization of a VHS virus genotype III isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at a marine site on the west coast of Norway. *Virol. J.* 7:19.
- Einer-Jensen K, P Ahrens, R Forsberg and N Lorenzen. 2004. Evolution of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicaemia virus. *J. Gen. Virol.* 85:1167-1179.
- Elsayed E, M Falsal, M Thomas, G Whelan, W Satts and J Winton. 2006. Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus from muskellunge, *Esox masquinongy*, in lake St. Clair, Michigan, USA reveals a new sublineage of the North American genotype. *J. Fish Dis.* 29:611-619.
- Gadd T, M Jakava-Viljanen, H Tapiovaara, P Koski and L Sihvonen. 2011. Epidemiological aspects of viral haemorrhagic septicaemia virus genotype II isolated from Baltic herring, *Clupea harengus membras* L. *J. Fish Dis.* 34:517-529.
- Gagné N, AM MacKinnon, L Boston, B Souter, M Cook-Versloot, S Griffiths and G Olivier. 2007. Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus from mummichog, stickleback, striped bass and brown trout in eastern Canada. *J. Fish Dis.* 30:213-223.
- Garver KA, LM Hawley, CA McClure, T Schroeder, S Aldous, F Doig, M Snow, S Edes, C Baynes and J Richard. 2011. Development and validation of a reverse transcription quantitative PCR for universal detection of viral hemorrhagic septicemia virus. *Dis. Aquat. Org.* 95:97-112.
- Guðmundsdóttir S, N Vendramin, A Cuenca, H Sigurðardóttir, A Kristmundsson, TM Iburg and NJ Olesen. 2019. Outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) in Iceland caused by VHS virus genotype IV. *J. Fish Dis.* 42:47-62.
- Hedrick RP, WN Batts, S Yun, GS Traxler, J Kaufman and JR Winton. 2003. Host and geographic range extensions of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus. *Dis. Aquat. Org.* 55:211-220.
- Hwang JY, JH Jang, DJ Kim, MG Kwon, JS Seo, SD Hwang and MH Son. 2017. Detection of specific antibodies against viral hemorrhagic septicemia virus in infected olive flounder *Paralichthys olivaceus* using enzyme-linked immunosorbent assay. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.* 50:547-552.
- Jonstrup SP, S Kahns, HF Skall, TS Boutrup and NJ Olesen. 2013. Development and validation of a novel Taqman-based real-

- time RT-PCR assay suitable for demonstrating freedom from viral haemorrhagic septicaemia virus. *J. Fish Dis.* 36:9–23.
- Kim HS, KW Baek, EJ Ko, NT Luan, Y Lim, HJ Roh and HJ Cha. 2020. Genome based quantification of VHSV in multiple organs of infected olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) using real-time PCR. *Genes Genom.* 42:773–777.
- Kim JO, WS Kim, SW Kim, HJ Han, J Kim, M Park and MJ Oh. 2014. Development and application of quantitative detection method for viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) genotype IVa. *Viruses* 6:2204–2213.
- Kim SM, JI Lee, MJ Hong, HS Park and SI Park. 2003. Genetic relationship of the VHSV (Viral hemorrhagic septicemia virus) isolated from cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea. *J. Fish Pathol.* 16:1–12.
- Lee WL, HM Yun, SR Kim, SJ Jung and MJ Oh. 2007. Detection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from marine fish in the South Western Coastal Area and East China Sea. *J. Fish Pathol.* 20:201–209.
- Livak KJ and TD Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25:402–408.
- Mackay IM. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* 10:190–212.
- OIE. 2017. Viral Haemorrhagic Septicaemia. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. World Organization for Animal Health. Paris, France. Retrieved from <http://www.oie.int/international-standard-setting/aquatic-manual/access-online> on Nov. 2.
- Park HK, LJ Jun, SM Kim, M Park, MY Cho, SD Hwang and JB Jeong. 2016. Monitoring of VHS and RSIVD in cultured *Paralichthys olivaceus* of Jeju in 2015. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.* 49:176–183.
- Park HK, SM Kim, DW Lee, LJ Jun and JB Jeong. 2015. Monitoring of VHS and RSIVD in cultured *Paralichthys olivaceus* of Jeju in 2014. *J. Fish. Mar. Sci. Edu.* 27:879–889.
- Pierce LR and CA Stepien. 2012. Evolution and biogeography of an emerging quasispecies: Diversity patterns of the fish Viral Hemorrhagic Septicemia virus (VHSV). *Mol. Phylogenet. Evol.* 63:327–341.
- Reed LJ and H Muench. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* 27:493–497.
- Skall HF, NJ Olesen and S Møllergaard. 2005. Viral haemorrhagic septicaemia virus in marine fish and its implications for fish farming - a review. *J. Fish Dis.* 28:509–529.
- Soliman H and M El-Matbouli. 2006. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for rapid detection of viral hemorrhagic septicaemia virus (VHS). *Vet. Microbiol.* 114:205–213.
- Thompson TM, WN Batts, M Faisal, P Bowser, JW Casey, K Phillips and G Kurath. 2011. Emergence of viral hemorrhagic septicemia virus in the North American Great Lakes region is associated with low viral genetic diversity. *Dis. Aquat. Org.* 96:29–43.
- Traxler GS, D Kieser and J Richard. 1999. Mass mortality of pilchard and herring associated with viral hemorrhagic septicemia virus in British Columbia, Canada. *FHS Newsl.* 27:4–5.
- Trdo N, A Benmansour, C Calisher, RG Dietzgen, RX Fang, AO Jackson, G Kurath, S Nadin-Davis, RB Tesh and PJ Walker. 2005. Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press. Cambridge, MA. pp. 623–644.
- Winton J, G Kurath and W Batts. 2007. Detection of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus. No. 2007–3055. United States Geological Survey. Reston, VA.