



PENYAKIT VIRAL NERVOUS NECROSIS (VNN) DALAM IKAN MARIN DI MALAYSIA



ISBN 978-967-2946-01-4



9 789672 946014

Diterbitkan oleh/Published by
INSTITUT PENYELIDIKAN PERIKANAN

Fisheries Research Institute (FRI)
11960 Batu Maung, Pulau Pinang
Tel: +604-6263925/6
Fax: +604-6262210

Website: <https://fri.dof.gov.my/>
Email: fri_helpdesk@dof.gov.my
Fb: Fisheries Research Institute

Azila Abdullah

Penyakit Viral Nervous Necrosis (VNN)
dalam ikan marin di Malaysia

Azila Abdullah

Bahagian Penyelidikan Kesihatan Ikan Kebangsaan
(NAFiSH)

Institut Penyelidikan Perikanan
Pulau Pinang



Cetakan Pertama 2020

First Print 2020

© Institut Penyelidikan Perikanan (FRI) 2020

Hak Cipta Terpelihara. Tidak dibenarkan mengeluarkan ulang mana-mana bahagian artikel, ilustrasi, dan isi kandungan buku ini dalam apa jua bentuk dan dengan apa jua sama ada cara elektronik, fotokopi, mekanik, rakaman, atau cara lain sebelum mendapat izin daripada Ketua Pengarah Jabatan Perikanan Malaysia. Perundingan tertakluk kepada perkiraan royalti atau honorarium.

All rights reserved. No part of the articles, illustrations and contents of this publication may be reproduced in any form and by any means, electronic, photocopying, mechanical, recording or otherwise without prior permission of the Director General of Fisheries Malaysia. Negotiations are subject to the calculation of royalty or honorarium.

Perpustakaan Negara Malaysia Data Pengkatalogan-dalam-Penerbitan

Diterbitkan oleh/Published by

INSTITUT PENYELIDIKAN PERIKANAN

Fisheries Research Institute (FRI)

11960 Batu Maung, Pulau Pinang

Tel: +604-6263925

Fax: +604-6262210

Website: www.fri.gov.my

Email: helpdesk@fri.gov.my

ISSN:

© 2020

Institut Penyelidikan Perikanan/Fisheries Research Institute

Hak Cipta Terpelihara/All Rights Reserved



Kata Penulis	1
PERUTUSAN PENGARAH KANAN PENYELIDIKAN	2
PENGHARGAAN.....	3
Pengenalan	4
Penyakit Viral Nervous Necrosis	6
Bagaimana penyakit VNN merebak	12
Faktor risiko	13
Diagnosis.....	16
Histology dan histopathology	17
Ujian tisu kultur	18
Ujian molekular RT-PCR dan sequencing	20
Elektron mikroskop.....	21
Pencegahan Penyakit VNN.....	22
Pengurusan Biosekuriti di haceri.....	22
Amalan pengurusan biosekuriti di ladang.....	23
Nyah kuman (<i>disinfection</i>)	24
Pengawalan wabak VNN di ladang ternakan	24
Vaksin	25
GLOSARI.....	31
SENARAI RUJUKAN.....	33





Kata Penulis

Alhamdulillah, dengan limpah kurnia dan berkatNya, buku ini dapat disiapkan dan Berjaya diterbitkan hasil penyelidikan yang dijalankan sejak sekian lama. Buku ini bertujuan memberi pengetahuan dan garis panduan tentang penyakit VNN dalam ikan ternakan terutamanya ikan marin di Malaysia. Maklumat di dalam buku ini adalah gabungan maklumat yang diambil daripada kajian oleh Pihak NaFisH bersama kolaborator, laporan jurnal, dan juga pemerhatian serta laporan rasmi serta tidak rasmi pihak NaFisH khasnya dan DOF amnya.

Penerbitan ini diharapkan akan dapat membantu pihak-pihak yang terlibat dengan penternakan ikan marin, bagi mendapatkan maklumat serta kefahaman tentang penyakit VNN dan seterusnya mengaplikasikan cara-cara pencegahan dan pengawalan yang berkesan untuk ternakan mereka.

Selain itu, buku ini juga boleh digunakan sebagai bahan rujukan berinformatif bagi menambahkan pengetahuan golongan sasaran termasuk kakitangan DOF tentang penyakit VNN seperti pengenalpastian jangkitan virus dan juga kaedah pengesanan yang boleh dilakukan. Selain itu, diterangkan juga berkenaan langkah-langkah pencegahan dan pengawalan yang boleh diambil jika berlaku wabak VNN di kawasan ternakan mereka.

Walaupun manual ini boleh dijadikan rujukan, namun sekiranya terdapat sebarang kesangsian dan pertanyaan tentang penyakit ini, mereka ini boleh menghubungi terus Bahagian Penyelidikan Kesihatan Ikan Kebangsaan (NaFisH). Pihak kami bersedia memberikan kerjasama setakat yang termampu.

Azila Abdullah

Virologist

PERUTUSAN PENGARAH KANAN PENYELIDIKAN



Assalamualaikum dan selamat sejahtera

Setinggi-tinggi kesyukuran saya panjatkan ke hadrat Allah SWT kerana dengan limpah kurnianya saya dapat memberikan sepatah dua kata untuk buku berkenaan penyakit virus ikan yang pertama-tama kalinya pernah diterbitkan oleh Institut Penyelidikan Perikanan (FRIBM), Malaysia.

Secara umumnya, akuakultur yang merupakan salah satu aktiviti penting negara bagi menambahkan koleksi sumber protein manusia, juga mempunyai masalahnya sendiri terutama penyakit. Seperti manusia, ikan yang ditenak secara intensif memudahkan proses jangkitan penyakit berlaku terutamanya dip persekitaran ternakan itu sendiri yang boleh disebabkan oleh pelbagai patogen dari komuniti bakteria, parasit, virus dan juga kulat. Maka penerbitan buku ini hampir melengkapkan bilangan patogen tersebut. Saya mengharapkan agar selepas ini akan ada pelbagai lagi buku berkenaan penyakit virus ikan/udang dapat dihasilkan oleh pihak NaFisH sebagai peneraju di dalam bidang kesihatan ikan bagi DOF khasnya dan Malaysia amnya.

Sekali lagi, saya mengucapkan setinggi tinggi tahniah dan penghargaan kepada penulis buku ini dan semoga buku ini dapat dijadikan panduan serta memberi manfaat kepada golongan sasaran yang dahagakan ilmu berkenaan penyakit virus ikan di Malaysia.

Dr Zainoddin bin Jamari

PKP FRIBM

PENGHARGAAN

Ucapan jutaan terima kasih kepada DOF amnya dan Pengarah kanan Penyelidikan, Dr. Zainoddin Jamari khususnya yang mengizinkan saya menerbitkan buku ini. Ramai yang terlibat bersama sama saya sejak mula saya menjalankan penyelidikan penyakit VNN sehinggalah terhasilnya penerbitan buku yang tidak seberapa ini. Tanpa tunjuk ajar, sokongan dan perbincangan yang berterusan, agak sukar bagi saya mendapatkan maklumat untuk dimasukkan ke dalam buku panduan ini. Setinggi tinggi penghargaan buat 2 orang 'sifu' utama saya iaitu Dr. Siti Zahrah Abdullah dan Dr. Sharifah Syed Hassan, yang menunjukkan jalan di dalam menjalankan penyelidikan penyakit virus ikan sejak saya mula dilantik sebagai penyelidik untuk penyakit virus ikan/udang di Bahagian Penyelidikan Kesihatan Ikan Kebangsaan (NaFisH).

Buat semua kolaborator saya: Prof Zamri Mohd Saad dan Prof. Madya Dr Mohammad Nor Amal Azmai (UPM), Dr. Nur Nazifah Mansur dan Dr. Firdaus Nawawi (IIUM Kuantan), Dr. Julian Ransangan dan Bennie (UMS Sabah), Dr. Sandra Catherine (UMT Trengganu); dan buat rakan rakan di FRI: Hjh. Nik Haiha Nik Yusoff, En Sufian dan Dr. Shaharah (FRITD), Jutaan terima kasih di atas segala kerjasama dan ilmu yang dicurahkan.

Tidak ketinggalan juga buat kakitangan di makmal virology NaFisH yang sentiasa menyokong saya, Puan Zuraidah Roli dan En. Nasrul Moorthy Abdullah, staff di bahagian Histopathology, Ms Oo Mooi Gaik dan Pn. Norazila Jelani, para pembantu penyelidik, Pn Erni Fadzilah Saharuddin dan Munira Murni serta semua pelajar postgraduat dari UPM, UMS dan IIUM, Ahmad Baihaqi, Hazreen Nita Khalid, Atirah Ahmad, Nurshuhada dan Muhammad safwan. Tidak lupa juga buat semua pegawai-pegawai di NaFisH terutamanya Dr. Rimatulhana Ramly, dan juga staff FRITD yang sentiasa mencerikan dan memberi sokongan tidak berbelah bahagi kepada kerja kerja saya selama ini.

Semoga sumbangan saya yang tidak seberapa ini akan diguna pakai dan diterima dengan seikhlas hati oleh semua pihak.

Pengenalan

Akuakultur marin di Malaysia

Dengan corak penurunan dalam sektor Perikanan tangkapan, Malaysia memfokuskan aktiviti akuakultur sebagai pilihan untuk memenuhi keperluan bekalan dan permintaan terhadap sumber protein selain daripada ayam dan babi. Keperluan per kapita penggunaan ikan ialah sebanyak 59 kg pada tahun 2016, antara yang tertinggi di Malaysia (1). Pengeluaran akuakultur keseluruhan adalah dianggarkan sebanyak 0.21 juta tan pada tahun 2018, tidak termasuk rumpai laut. Pengeluaran dari aktiviti akuakultur marin pula ialah sebanyak 55,506 MT manakala air payau ialah 60,617 MT pada tahun yang sama(1). Di antara spesies utama yang ditenak di Malaysia ialah jenahak (*Lutjanus spp.*), siakap (*Lates calcarifer*) dan kerapu (*Epinephelus spp.*) (2) yang menggunakan pelbagai sistem ternakan samada separa intensif sehinggalah kepada sangkar laut dalam. Kerapu adalah antara kumpulan spesies ternakan yang paling banyak ditenak, antaranya ialah kerapu harimau (*E.fuscoguttatus*), kerapu gergasi (*E.lanceolatus*), kerapu tikus (*Cromileptis altivelis*), kerapu malabar (*E.malabaricus*) dan yang terkini ialah kerapu hybrid iaitu kacukan antara *E.lanceolatus* (induk jantan) dan *E.fuscoguttatus* (induk betina). Bawal emas (*Trichinotus blochii*) merupakan salah satu spesies yang mula ditenak di Malaysia pada awal 90'an. Kedua dua spesies kerapu dan bawal emas ini mempunyai permintaan pasaran tempatan dan antarabangsa yang tinggi sehingga kebanyakan ternakan spesies ini akan dieksport ke negara negara seperti China, Hong Kong dan Singapura. Selain daripada dua spesies ini, siakap (*Lates calcarifer*) pula merupakan komoditi utama di mana mendapat permintaan pasaran tempatan yang tinggi.

Pada tahun 2018, pengeluaran benih dan rega ikan air payau/marin daripada haceri kerajaan dan swasta ialah sebanyak 6.3 bilion ekor, walaubagaimanapun, jumlah ini masih belum mencukupi bagi menampung kegunaan akuakultur di Malaysia yang memerlukan sekurang-kurangnya 225 bilion ekor pada tahun 2020 (3). Akibatnya berlaku pengimpotan benih dan telur ikan daripada negara-negara jiran seperti Thailand, Taiwan dan Indonesia (4). Pada masa ini, 60% daripada sumber benih ini masih diimport. Selain benih, induk ikan juga banyak yang diimport dari luar negara, terutamanya oleh penternak yang mengamalkan ternakan pelbagai spesies. Kesemua pengimpotan ini biasanya diikuti dengan kemasukan patogen ke dalam sistem ternakan kita yang selalunya sukar dikesan di pintu masuk negara. Aktiviti akuakultur yang sangat intensif boleh menyebabkan penularan penyakit ikan yang mudah dan cepat melalui patogen yang baru dibawa masuk ini, selain amalan pengurusan yang kurang mapan serta perubahan cuaca yang tidak menentu.

Kebanyakan penyakit adalah disebabkan oleh mikroorganisma samada parasit, bakteria, virus atau fungus. Di antara organisma ini, virus merupakan organisma terkecil dan berada di dalam persekitaran ikan. Dianggarkan kandungan virus di dalam 1 liter air laut ialah sebanyak 100 bilion yang kebanyakannya mungkin bertukar menjadi berbahaya apabila keadaan mengizinkan (5). Oleh yang demikian, ikan ternakan di Malaysia tidak terkecuali daripada dijangkiti oleh virus samada dari persekitaran ataupun yang dibawa masuk dari tempat lain. Di

antara penyakit virus yang pernah menyerang ikan ikan ternakan di Malaysia ialah seperti di dalam jadual 1 berikut:

Jadual 1: Jenis jenis penyakit virus yang menyerang ternakan akuakultur di Malaysia

Penyakit	Penyebab / patogen	Genus/Family virus	Spesis dijangkiti
Viral nervous necrosis (VNN)	nervous necrosis virus/ red grouper nervous necrosis virus (RGNNV)	Betanodavirus/Nodaviridae	>100 spesis ikan marin dan air tawar
Sleepy grouper disease / grouper iridoviral disease	Taiwan grouper Iridovirus (TGIV), singapore grouper iridovirus (SGIV)	Ranavirus/Iridoviridae	Kerapu
Penyakit Koi herpesvirus (KHV)	Koi Herpesvirus (KHV) / cyprinid herpesvirus 3	Cyprinivirus/Alloherpesviridae	Koi, carp
Lymphocystis disease	Lymphocystivirus disease 1, 2 or 3 (LCDV) *ujian spesifik perlu dijalankan untuk penentuan spesis virus yang lebih tepat	Lymphocystivirus/ Iridoviridae	Ikan akuarium, marin dan air tawar
Red sea bream iridovirus disease (RSIVD)	Red sea bream iridovirus (RSIV)	Megalocytivirus/Iridoviridae	Ikan marin
Megalocytivirus disease	Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV)	Megalocytivirus / Iridoviridae	Ikan air tawar/ air laut
Tilapia lake virus (TiLV)	Tilapia tilapine virus	Orthomyxovirus/orthomyxoviridae	Ikan tilapia

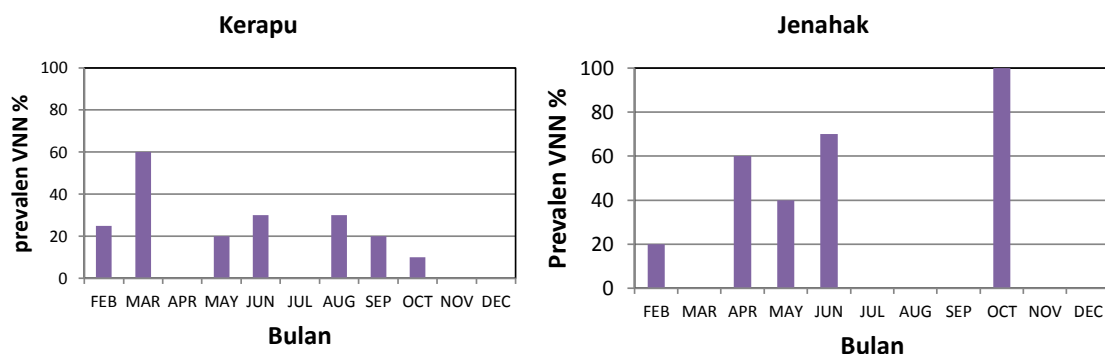
Penyakit 'viral nervous necrosis' atau lebih dikenali sebagai VNN merupakan salah satu penyakit bawaan virus yang telah memberikan impak kepada industri akuakultur marin di Malaysia sejak 20 tahun yang lepas. Kita akan melihat bagaimana impak penyakit VNN ini kepada industri akuakultur dan bagaimanakah cara untuk mengawal atau mencegah penyakit ini.

Penyakit Viral Nervous Necrosis

Status penyakit VNN di Malaysia

Penyakit VNN mula menyerang ikan ternakan sejak 1980an di mana ia memberikan impak yang besar kepada industri akuakultur (6). Selain dinamakan VNN, terdapat beberapa nama lain yang diberikan seperti 'fish encephalitis virus' (FEV) dan 'viral encephalopathy and retinopathy' (VER) (7,8). Sehingga kini, hampir 100 - 120 spesis ternakan termasuk ikan liar serta invertebrate telah dilaporkan dijangkiti oleh virus ini di seluruh dunia (9,10).

Di negara Asean, Taiwan telah melaporkan kes pertama pada tahun 1994 (11) dan Filipina pada 2001(6). Singapura telah berjaya mengasingkan virus ini pada tahun 1990 daripada ikan kerapu, manakala Malaysia hanya melaporkan keujudan virus ini kali pertama pada tahun 2003 melalui pengasingan virus VNN di dalam sel E-11 (12) dan sekali lagi pada 2004 apabila VNN menyerang ikan jenahak (*L.erythropterus*). Kali ini dengan pengesanan melalui teknik reaksi berantai polymerase transkripsi terbalik (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction* atau RT-PCR) (13). Pada awal tahun 2005, terdapat laporan kematian yang tinggi pada anak anak ikan siakap di salah satu haceri kerajaan di mana keputusan RT-PCR adalah positif pada induk ikan siakap ini (pemerhatian sendiri). Selain daripada siakap dan jenahak, beberapa spesis lain juga dijangkiti seperti Aruan tasik (*Rachycentron canadum*), kerapu tikus (*Cromiletilis altivelis*) yang diimport dari Bali dan bawal emas (4,14). Bermula dengan ini, beberapa kajian bersama antara NaFisH dengan institusi pengajian tinggi awam (IPTA) telah dijalankan dengan mendapat bantuan peruntukan daripada dana kerajaan pada ketika itu. Sehubungan itu juga, beberapa laporan dan penemuan baru di dalam penyakit VNN telah didokumenkan terutamanya melalui jurnal berimpak tinggi (4,15,16). Hasil daripada kajian-kajian ini juga menunjukkan bahawa NNV sentiasa ditemui hampir setiap bulan dalam ikan kerapu dan jenahak pada kadar prevalen antara 10-100% (Rajah 1) walaupun ikan tidak menunjukkan sebarang tanda tanda penyakit (17).



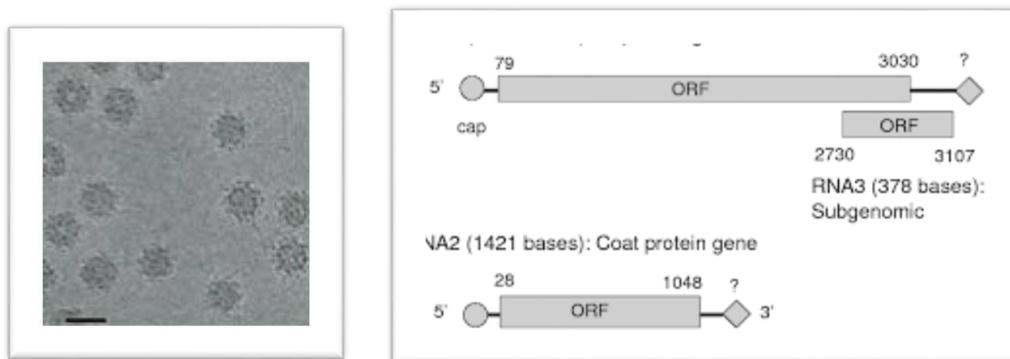
Rajah 1: Prevalen VNN pada ikan kerapu dan jenahak pada setiap bulan

Agan Penyebab

Agan penyebab penyakit ini ialah sejenis virus yang dinamakan sebagai *nervous necrosis virus* (NNV). Virus ini berada di dalam famili *nodaviridae* yang mana di bawah nya terdapat 2 genus

iaitu alphanodavirus dan betanodavirus (<https://talk.ictvonline.org/>). NNV juga kadangkala dirujuk sebagai jangkitan betanodavirus, iaitu genus kepada virus ini (jadual 2). Virus ini berbentuk icosahedral, bersaiz antara 25-30nm dan tidak mempunyai lapisan pelindung atau 'envelope'. Ia adalah virus dari jenis 'positive-single stranded RNA' (ss (+) RNA) yang mempunyai 2 'open reading frame (ORF)'. 'Positive strand' bermakna RNA virus ini dapat menghasilkan amino acidnya sendiri. ssRNA tersebut ialah RNA1 dan RNA2, selain 1 subgenomic RNA yang dinamakan RNA3. RNA1 (3.1kb) merupakan sejenis enzim dari jenis polymerase iaitu RdRp (*RNA dependent RNA polymerase*) yang terlibat semasa proses replikasi virus, RNA2 pula (1.4 kb) ialah sejenis antigenic protein yang digelar 'capsid' yang terlibat di dalam proses jangkitan virus(18,19). RNA3 merupakan sejenis protein tidak berstruktur (*non structural protein*) yang baru dijumpai di dalam virus ini. Ia hanya muncul di dalam sel sel yang dijangkiti oleh NNV dan bukan sebahagian daripada struktur sebenar virus ini (Rajah 2).

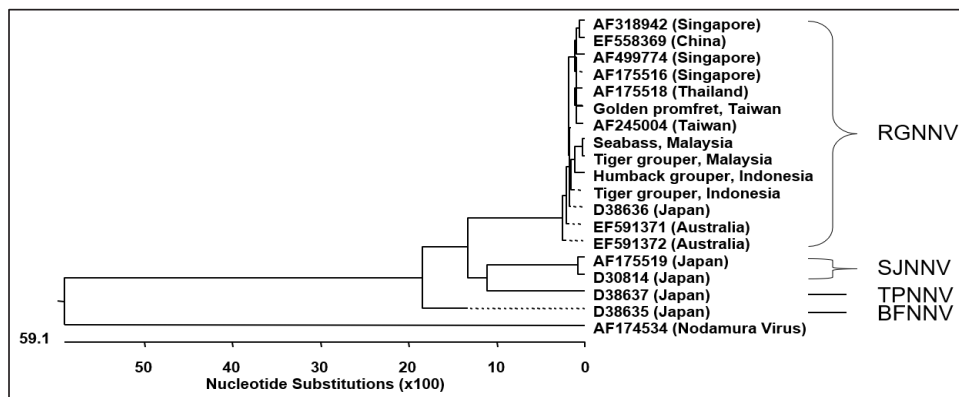
Family nodaviridae amat spesifik di mana genus alphanodavirus hanya menjangkiti serangga dan betanodavirus hanya menjangkiti ikan atau species akuatik. Genus betanodavirus mempunyai beberapa spesis virus iaitu RGNNV (*red spotted grouper nervous necrosis virus*), BFNNV (*barfin flounder NNV*), SJNNV (*striped jack NNV*) dan TPNNV (*tiger puffer NNV*) (Jadual 2). SJNNV dan TPNNV adalah perumah spesifik iaitu terhad kepada ikan stripe jack dan tiger puffer sahaja, manakala RGNNV dan BFNNV boleh menjangkiti pelbagai spesis ikan. RGNNV adalah virus yang boleh didapati di kawasan beriklim panas manakala BFNNV lebih banyak diasingkan dari negara negara beriklim sejuk. Kebanyakan isolat Malaysia adalah termasuk di dalam spesis RGNNV, walaubagaimanapun, berdasarkan kajian kerjasama UMT-NaFisH (2017 – 2019), adalah didapati bahawa terdapat kombinasi nucleotide daripada 2 spesis iaitu RGNNV dan SJNNV yang menunjukkan bahawa kemungkinan NNV di Malaysia adalah bersifat quasispesis. Ini merupakan satu penemuan baru di Malaysia dan kajian lanjut harus dilakukan bagi mengesahkan perkara ini (16).



Rajah 2 : Bentuk nodavirus di bawah mikroskop electron (Kiri) dan struktur genome NNV menunjukkan 2 jenis ssRNA iaitu RNA1 (RdRp) dan RNA2 (protin capsid), manakala RNA3 adalah terhasil daripada RNA1 (gambar kanan). *Sumber : International committee on taxonomy of Viruses (ICTV)*

Jadual 2: Family, genus dan spesies NNV mengikut serotip dan kesesuaian suhu

Family	Genus	Genotip/spesis	Serotip	Perumah	Suhu optimum
Nodaviridae	Betanodavirus	SJNNV	A	Stripe jack	20-25°C
		TPNNV	B	Tiger puffer	20°C
		BFNNV	C	Ikan iklim sejuk: Atlantic halibut, Cod, Flounders dsb.	15-20°C
		RGNNV	C	Ikan beriklim panas : Siakap asian (Asian sea bass), Kerapu, Siakap eropah (European sea bass) dsb.	25-30°C
	Alphanodavirus	<ul style="list-style-type: none"> • Black beetle virus • Boolarra virus • Flock House virus • Nodamura virus • Pariacoto virus 		Serangga	

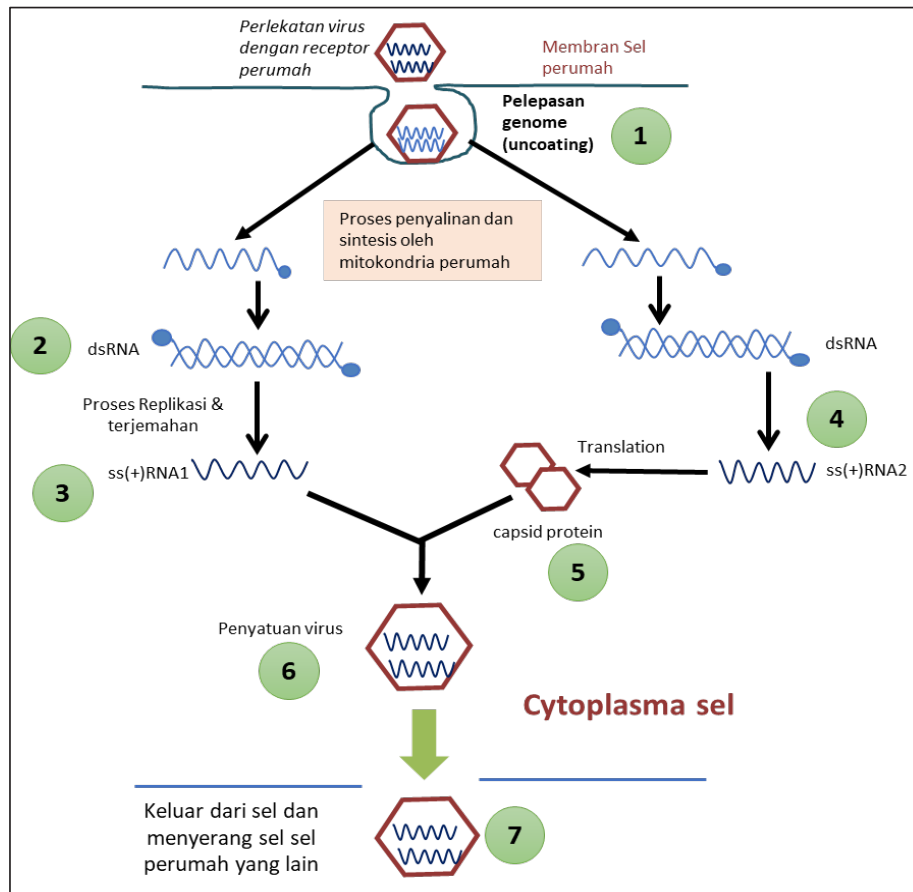


Rajah 3 : Phylogenetic tree menunjukkan bahawa isolat daripada Malaysia berada di dalam kumpulan atau spesies RGNNV

Replikasi virus VNN

Virus akan terus melekat kepada sel sel receptor yang sesuai pada organ otak, jantung dan buah pinggang perumah, di dalam hal ini ialah receptor protein bersaiz 32.5 Kda (20,21). Setelah perlekatan virus ke sel perumah, virus akan melepaskan bahan genetiknya ke dalam sel perumah (*uncoating*) dan meninggalkan kapsid protinnya di luar sel melalui proses yang

dinamakan 'endocytosis'. Genome virus yang dilepaskan ini akan menggunakan mekanisasi sel perumah untuk membiakkan genetiknya sendiri melalui proses yang dikenali sebagai transkripsi (*transcription*) dan penterjemahan (*translation*). Melalui kedua-dua proses ini, lebih banyak ssRNA dan amino acid akan dihasilkan, yang mana kemudiannya akan bercantum bagi membentuk virus yang lengkap atau matang (*packaging*). Kesemua proses ini berlaku di dalam sitoplasma sel perumah. Virus yang telah matang ini kemudiannya akan keluar daripada sel dan menjangkiti sel sel perumah yang lain (Rajah 4).



Rajah 4: Gambaran ringkas proses replikasi betanodavirus. Selepas proses perlekatan virus dengan membrane sel perumah, genome akan dilepaskan daripada protin kapsid virus (1). Kemudian, ribosome perumah akan menterjemah RNA1 virus kepada RdRp, yang kemudiannya akan menyalin (+)RNA1 dan mensintesis (-)RNA1 membentuk dsRNA(2). dsRNA ini digunakan untuk proses replikasi dan penterjemahan genome kepada RNA1 dan RNA2 (3 & 4). Ss(+)RNA2 akan diterjemahkan kepada protin kapsid (5). Ss(+)RNA1 dan ss(+)RNA2 akan menyatu (pakej) membentuk virus yang baru (6). Virus ini akan keluar dari sel dan mula menyerang sel sel perumah yang lain (7). *Rajah adalah ubahsuaian dari Bandin & Souto, 2020.*

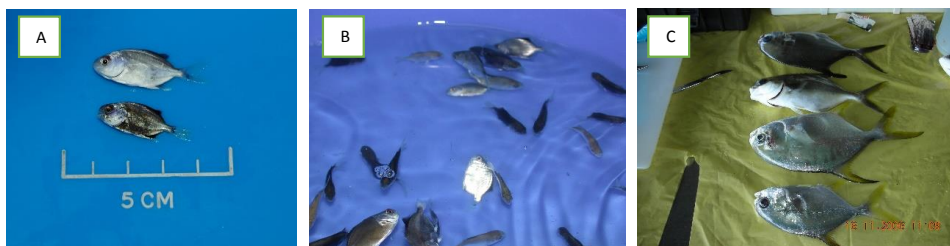
Patogenesis

Virus mungkin memasuki badan ikan melalui sel epitelium (kulit ikan) atau melalui rongga mulut terus ke sel usus (21). Virus seterusnya diedarkan ke organ sasaran melalui darah (viraemia) ataupun diangkut terus ke organ sasaran iaitu otak dan retina mata melalui aliran saraf dan membiak di organ organ tersebut. Proses pembiakan dan pengedaran virus ini akan menyebabkan berlakunya tindak balas imun (*innate immunity*) daripada perumah melalui penghasilan antibody. Tindak balas ini sepatutnya akan memusnahkan dan mengeluarkan virus dari badan perumah, kecuali jika tindak balas ini kurang berkesan, maka kehadiran sel sel inflamasi dan antibody yang tinggi ke organ organ sasaran ini akan mula merosakkan sel sel otak, mata ataupun organ organ lain. Akibatnya, ikan tidak dapat pulih dari serangan virus ini dan mendapat tanda tanda penyakit VNN. Virus ini juga berkeupayaan untuk 'berlindung' di dalam sel sel saraf dan menyimpan virus di organ tersebut, menghasilkan keadaan yang dikenali sebagai '*latent infection*'. Perumah perumah yang selamat dari serangan ini akan menjadi pembawa virus VNN dan menyebarkannya kepada ikan ikan yang lain (22) samada melalui jangkitan melintang (*horizontal transmission*) atau menegak (*vertical transmission*).

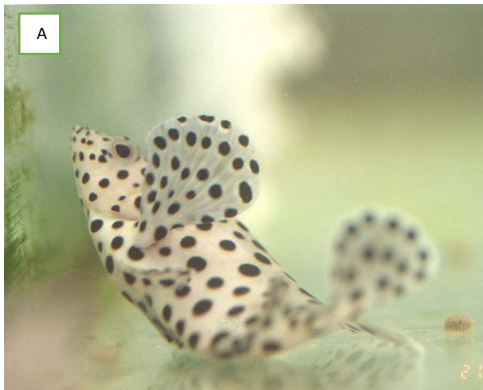
Tanda Tanda Penyakit

VNN akan membiak di dalam sel sel saraf otak dan retina mata ikan. Oleh yang demikian, tanda tanda umum penyakit VNN boleh dikenali melalui perubahan fungsi organ tersebut atau tingkah laku ikan tersebut. Kerosakan sel sel saraf menyebabkan kerap kali ikan yang dijangkiti VNN akan menunjukkan tanda tanda berikut:

- gaya berenang yang tidak normal. Ikan akan berada di dalam posisi mengiring dengan menggunakan siripnya sebagai penahan dan kepala yang sedikit terangkat ke atas. Seseengahnya akan berenang laju ke hadapan dan tidak dapat mengawal pergerakan serta keseimbangan badan dan melanggar dinding tangki, yang mungkin disebabkan mata yang buta. Ikan yang hampir mati pula akan mula berenang secara berpusing pusing sebelum mendiamkan diri dan mati (20).
- badan akan bertukar warna menjadi kehitaman
- kematian yang tinggi pada anak anak ikan (90-100%).
- selaput renang membengkak (*hyperinflation*) dan menunjukkan salur darah yang dipenuhi dengan darah, iaitu satu keadaan dikenali sebagai '*congestion*' .



Rajah 5: Tanda tanda serangan penyakit VNN pada ikan bawal emas. A) warna badan bertukar menjadi hitam dan B) kematian tinggi dan juga gaya renang yang tidak normal dikesan. C) saiz ikan setelah 8 bulan dipindahkan ke sangkar dan menunjukkan tanda tanda serangan oleh bakteria (anak panah) serta kematian harian. Foto : Koleksi AA, 2006.



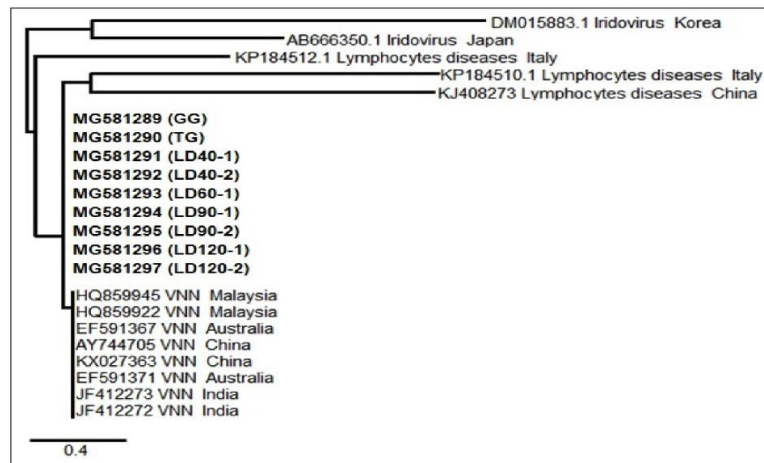
Rajah 6: Tanda-tanda penyakit VNN. A) Hilang keseimbangan badan diperhatikan pada ikan kerapu tikus, B) ikan kerapu yang berenang di dalam keadaan terbalik dan berpusing pusing, dan C) selaput renang yang membesar semasa pemerhatian post mortem dilakukan. Kes B & C ialah kes di mana berlakunya jangkitan bersama VNN dan iridovirus. Foto : Koleksi AA, 2006.

Bagaimana penyakit VNN merebak

VNN boleh dipindahkan melalui 2 cara:

- Transmisi Menegak (*vertical transmission*)

Jangkitan secara menegak ialah jangkitan yang diturunkan daripada induk ikan kepada anak anak ikan. Kajian yang dijalankan oleh NaFisH bersama dengan FRITD dan UPM pada tahun 2016 -2018 menunjukkan bahawa jika salah satu atau kedua dua induk jantan dan betina adalah positif, kemungkinan untuk anak anak ikan dari induk ini menjadi positif adalah tinggi, sehingga 100% yang boleh dikesan seawal umur anak ikan 5 hari selepas penetasan (5 dph). Ini menunjukkan bahawa status induk sebelum digunakan untuk pembiakan adalah amat penting diketahui bagi mengelakkan transmisi virus dari induk ke anak ikan (15).
- Transmisi Melintang (*horizontal transmission*)
 - apabila ikan ikan yang positif di bawa masuk ke kawasan ternakan yang baru dan menyebarkan virus ini kepada ikan ikan yang lain (23) ataupun berlaku sentuhan antara ikan di bawah pengurusan yang sama.
 - Melalui makanan hidup, ikan baja atau pun pelet.



Rajah 7: Phylogenetic tree daripada kajian yang dilakukan oleh NaFisH & UPM menunjukkan bahawa terdapat perbezaan antara sampel dari satu haceri dengan sampel dari kawasan lain di Malaysia. Ini bermakna berlaku transmisi secara vertical dan/atau horizontal di haceri tersebut apabila tiada kemasukan ikan baru atau NNV dari luar. GG: kerapu kertang ; TG: kerapu harimau; LD: benih dan anak kerapu hibrid pada usia samada 40, 60, 90 and 120 hari selepas menetas (dph). (15)

Faktor risiko

Umur ikan

- Bagi transmisi secara vertical, kajian membuktikan bahawa virus ini boleh dikesan di dalam anak anak ikan yang berumur seawal 5-10 dph. Anak anak ikan ini tidak menunjukkan sebarang tanda penyakit VNN dan kematian, dan virus ini akan terus dikesan sehingga anak anak ikan berusia 180 dph (15) atau berkemungkinan sehingga tamat tempoh pemeliharaan ikan tersebut.
- Kadar kematian adalah lebih tinggi di dalam anak anak ikan di peringkat hacheri (50-100%) berbanding ikan ikan yang ditenak untuk tujuan pembesaran (24).
- Ikan ikan yang bersaiz lebih besar hanya menunjukkan tanda tanda seperti berenang tidak normal dan serangan jangkitan sekunder sahaja dengan kadar kematian harian yang rendah (24).

Status induk

- Induk yang positif akan menyebabkan virus ini diturunkan kepada anak anak ikan walaupun hanya salah satu induk sahaja yang positif (25). Induk yang dikesan positif hanya bersifat pembawa dan kelihatan sihat tanpa sebarang tanda tanda jangkitan.

Kualiti air

- Air ternakan yang kurang berkualiti boleh memberi tekanan kepada ikan di dalam jangkamasa panjang. Daripada kajian yang dijalankan, air yang mempunyai kadar besi dan ammonia yang melebihi nilai dibenarkan akan memberikan perbezaan yang signifikan antara kumpulan induk yang positif dan negatif VNN (15).
- Virus ini juga mudah merebak apabila suhu persekitarannya sesuai. Kadar jangkitannya bergantung kepada suhu air antara 15 – 30°C, mengikut genus. RGNNV amat sesuai membiak pada suhu 25 – 30°C berbanding BFNNV yang membiak pada suhu antara 15-20°C (25). Selain suhu yang sesuai, ikan ikan yang berada di dalam persekitaran kualiti air yang teruk akan menghadapi tekanan dalam jangkamasa panjang akan lebih mudah mendapat penyakit VNN.

Kemasukan ikan baru dan kehadiran ikan liar

- Ikan ikan yang baru masuk selalunya berisiko membawa bersama virus ini di dalam badan mereka. Kematian bawal emas di sebuah hacheri pada tahun 2006 sehingga 60% adalah disebabkan oleh kemasukan anak anak ikan ini daripada Bali (24).
- Selain itu, kehadiran ikan liar yang tidak diketahui statusnya berdekatan dengan kawasan ternakan juga adalah satu risiko. Ini kerana VNN boleh menjangkiti pelbagai spesis ikan ternakan termasuk ikan liar (10,26).

Jenis makanan

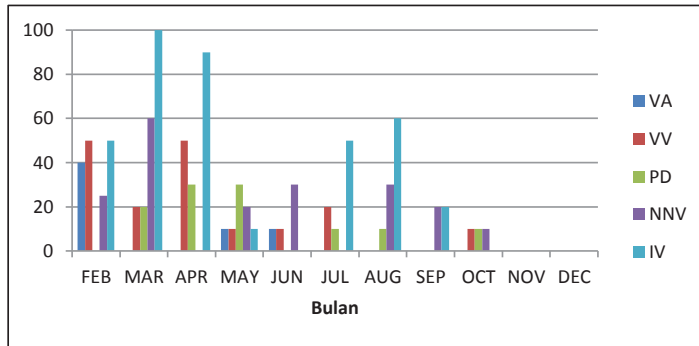
- Jenis dan sumber makanan juga berisiko di dalam menyebarkan NNV kepada ternakan ikan marin, sebagai contoh, ikan baja berkemungkinan membawa virus ini dan menyebabkan jangkitan kepada ternakan memandangkan virus ini telah dikesan di dalam ikan liar (26).



Rajah 8: Ikan ikan segar yang digunakan sebagai makanan ikan ternakan diperolehi dari hasil tangkapan nelayan

Ketahanan badan perumah

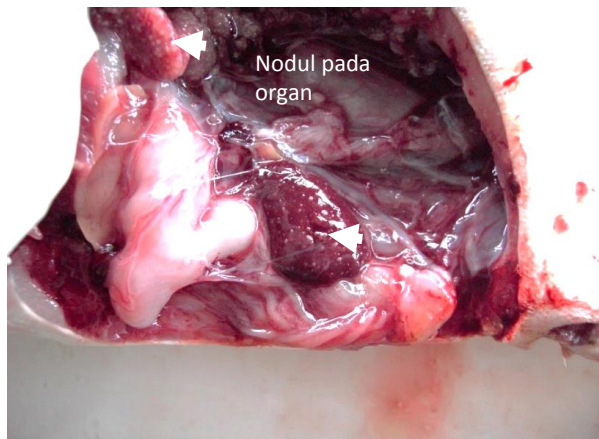
- Jangkitan virus selalunya mengurangkan ketahanan badan ikan melawan serangan patogen. Apabila ikan dijangkiti dengan sejenis virus dan ditambah pula dengan persekitaran yang tidak kondusif, maka patogen lain, samada virus atau bakteria akan mula menyerang. Hal ini berlaku di dalam ikan ikan yang dikaji mempunyai jangkitan bersama dengan VNN, iridovirus dan pelbagai spesis bakteria (Rajah 8)(17).
- Selain itu, virus ini boleh berada di dalam badan ikan dalam tempoh masa yang lama tanpa menunjukkan sebarang tanda penyakit, dan ikan ikan ini hanya mula menunjukkan tanda tanda penyakit apabila ikan berada di dalam keadaan tekanan yang berpanjangan. Kedaan ini telah diperhatikan semasa kes jangkitan VNN pada anak ikan bawal emas pada tahun 2006 apabila ikan ikan yang dibawa untuk saiz pembesaran mula menunjukkan kematian dan tanda penyakit pada kadar yang rendah (kematian 5-10 ekor sehari) serta serangan oleh bakteria (Data: NaffsH). Apabila diuji, ikan ikan ini disahkan positif VNN dan ini menunjukkan bahawa VNN boleh muncul semula daripada ikan yang terselamat pada serangan kali pertama (Rajah 9).



Rajah 9: NNV dikesan bersama dengan patogen yang lain di dalam ikan kerapu sangkar (17)



Rajah 10: Ikan bawal emas yang selamat dari VNN mengalami jangkitan sekunder bakteria setelah 4 bulan di ternak di dalam sangkar. Kelihatan pertumbuhan nodul nodul bulat keputihan pada buah pinggang, limpa serta hati ikan. Foto: Koleksi AA 2006



Diagnosis

Diagnosis penyakit VNN dilakukan berdasarkan:

- Tahap 1 - Tanda tanda klinikal / seperti diterangkan pada para 3.0
- Tahap 2 : Histopathologi
- Tahap 3 : Pengasingan virus di dalam tisu kultur, pengesanan virus melalui teknik molecular, kaedah serology

Tatacara persampelan

Organ yang diambil untuk persampelan penyakit VNN ialah mata dan otak, walaubagaimanapun, sampel sampel dari organ lain juga boleh diambil untuk tujuan perbandingan. Bagi ujian histopathology, sampel ini di potong kepada saiz 1 x 1 cm, dimasukkan ke dalam 10% *buffered formalin* dan diproses secara rutin di makmal NaFisH.

Bagi tujuan pengasingan virus di dalam tisu kultur pula, organ ikan boleh disatukan (pool) antara 5-10 ekor ikan bergantung kepada saiz ikan dan dimasukkan ke dalam media angkutan virus (VTM) terutamanya jika jarak perjalanan sampel dan juga tempoh pemprosesan sampel adalah antara 12 hingga 48 jam. VTM mengandungi 10ml HBSS bersama dengan 2% serum anak lembu (*fetal bovine serum* atau FBS), (Gibco, Thermo Scientific, Massachusetts, USA), 100 µg mL⁻¹ dan 100 IU campuran antibiotik penicillin-streptomycin. Ratio sampel kepada media ialah 1:10, iaitu anggaran 1 g sample di dalam 9 ml media. Sekiranya persampelan dilakukan di makmal, organ organ tersebut hanya diletakkan di dalam ais sebelum diproses pada hari yang sama. Sekurang-kurangnya 10 ekor ikan yang menunjukkan tanda tanda penyakit hendaklah disampel bagi tujuan diagnosis ini, manakala 5-10 ekor lagi yang tidak menunjukkan sebarang tanda penyakit sebagai sampel kawalan. Pengumpulan tisu yang hendak disampel bergantung juga kepada saiz ikan semasa kejadian penyakit. Penyatuan organ sehingga 5-10 ekor ikan selalunya lebih sesuai di lakukan kepada ikan bersaiz kecil. Berikut ialah garis panduan persampelan mengikut OIE.

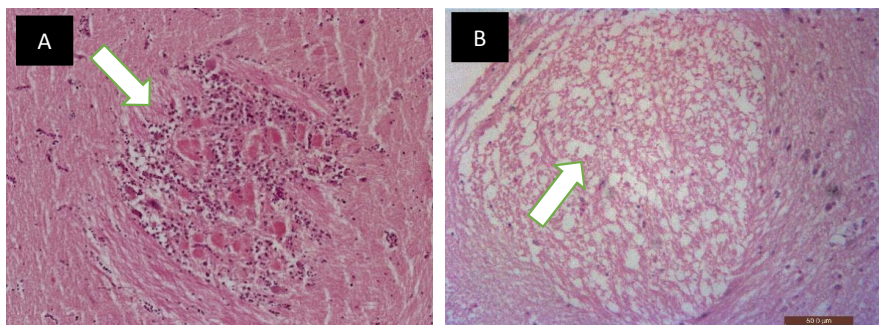
Saiz ikan	Jenis sample
< 4 cm	Keseluruhan ikan (tanpa yolk sac)
4 – 6 cm	Keseluruhan organ dalaman
> 6 cm	Buah pinggang, hati, limpa, otak, jantung dan insang
	Ikan yang telah matang (induk) - Cecair reproduksi, buah pinggang, hati, limpa, otak, jantung dan insang



Rajah 11: Pengutipan sampel cecair reproduktif dari ikan jantan. Koleksi: FRITD, 2020.

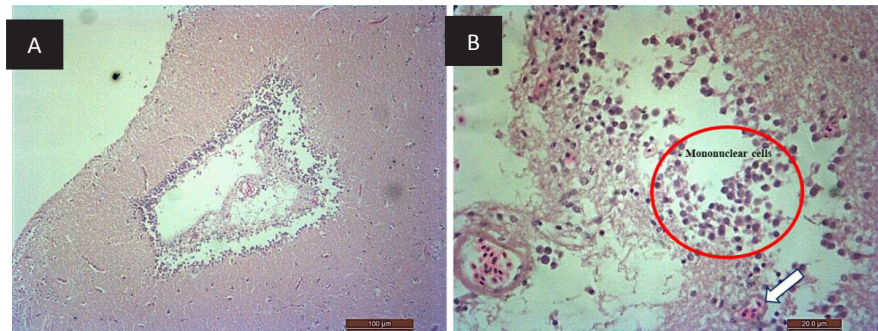
Histology dan histopathology

- Histology ialah kajian berkenaan tisu dan strukturnya di bawah mikroskop manakala histopathology pula ialah pemeriksaan mikroskopik tisu bagi melihat perubahan tisu pada ikan yang berpenyakit.
- Histopathology merupakan satu ujian yang dibuat bagi menyokong diagnosis awal penyakit. Ujian ini selalunya amat berguna apabila patogen tidak dapat diasingkan daripada organ ikan yang berpenyakit. Kehadiran sel sel yang dikenali sebagai '*mononuclear sel*' dan kenampakan keadaan di kenali sebagai '*perivascular cuffing*' di dalam organ memberikan tanda bahawa kemungkinan besar ikan tersebut dijangkiti oleh virus (Rajah 12), manakala kehadiran sel sel neutrophils, menandakan jangkitan bakteria telah berlaku.
- Bagi jangkitan NNV, jika melihat perubahan sel yang dikenali sebagai vakuol (*vacuolation*) pada mata dan otak ikan, ini menandakan bahawa ikan tersebut kemungkinan besar telah dijangkiti oleh VNN (Rajah 11). '*Vacuolation*' ini merupakan satu lesi yang spesifik untuk VNN (*pathognomonic lesion*). Perubahan lain yang boleh diperhatikan juga ialah pendarahan dan pengumpulan darah (*congestion*) di organ seperti buah pinggang, hati atau limpa.
- Bagaimana kerosakan sel ini terjadi? Kajian menunjukkan bahawa virus ini boleh diedar samada melalui salur darah atau saluran saraf. Virus yang bergerak melalui darah akan disaring (*infiltration*) di bahagian otak dan mata ikan, dan mula menyerang sel sel receptor pada organ organ tersebut. Selain otak dan mata, NNV juga berkemungkinan memberi kesan kepada organ yang lain seperti buah pinggang (Rajah 13).



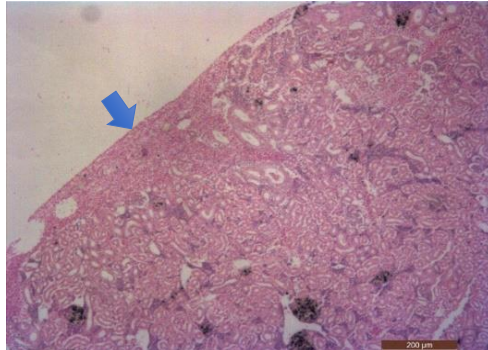
Rajah 12

- A) 'Focal encephalitis' dikesan di dalam otak ikan menunjukkan sel sel saraf dipenuhi dengan sel mononuclear dan makrofaj, berkemungkinan besar dijangkiti oleh VNN. HE x200.
- B) Pembentukan 'vakuol' atau ruang ruang kosong yang dikesan di dalam otak ikan. HE x100. Foto koleksi AA & Zamri MS, 2016.



Rajah 13

- A) Potongan otak menunjukkan kehadiran edema yang teruk (extensive oedema) dan 'perivascular cuffing'. HE x50
- B) Penyaringan (infiltration) mononuclear sel dan 'perivascular cuffing'. HE x200.
- Foto : Koleksi AA & Zamri MS, 2016.



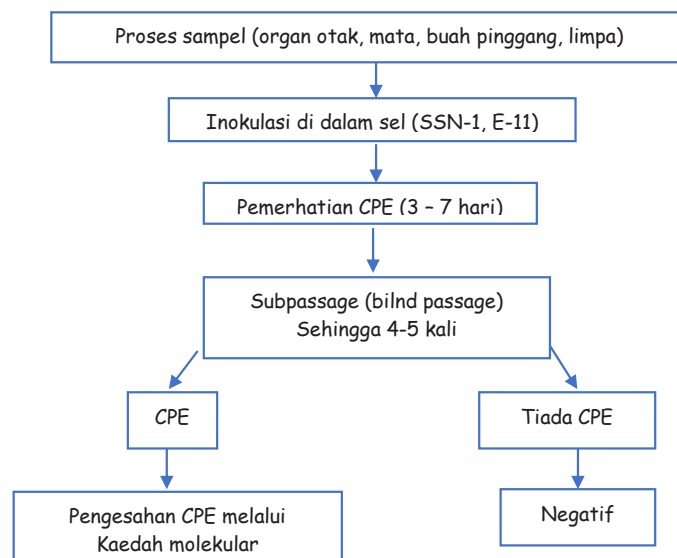
Rajah 14: Pendarahan teruk pada buah pinggang (*extensive subcapsular haemorrhage*) dilihat pada ikan jenahak. HE x50. Foto koleksi AA 2016

Ujian tisu kultur

Bagi mengasingkan virus, sel yang hidup diperlukan bagi membolehkan virus mereplikasi. Oleh kerana sifat virus yang terlalu spesifik, maka pengasingan virus hanya boleh dilakukan di dalam sel yang sesuai dan spesifik (*susceptible*) iaitu mempunyai keupayaan untuk membiakkan virus tersebut. Tisu kultur yang digunakan untuk pengasingan NNV ialah SSN-1 dan klonnya iaitu E-11. Sel sel ini adalah dari jenis sel fibroblast yang dihasilkan daripada anak ikan haruan (*snakehead fish*). Sel ini boleh dibeli daripada ATCC (*American type culture collection*) atau ECACC (*European Collection of Authenticated Cell Cultures*). Di NaFisH, selain sel kultur SSN-1 dan E-11, virus ini juga boleh diasingkan dari sel BF-2 (*Blue gill fry cells*), SSB (sel otak dari ikan siakap, AVA

Singapore) dan sel BB (*brown bullhead cells*), walaubagaimanapun, titer virus (TCID₅₀) adalah berbeza untuk setiap sel ini.

Sel sel yang telah diinokulasi akan diperhatikan dalam tempoh tertentu bagi mengesan perubahan tisu yang dikenali sebagai *cytopathic effect* (CPE). Pembentukan CPE di dalam setiap jenis sel, setiap jenis virus dan suhu serta tempoh inkubasi adalah berbeza-beza. Untuk NNV, sel sel ini akan diinkubasi di dalam suhu 25°C dan pemerhatian dilakukan setiap hari sehingga CPE terbentuk. Jika tiada CPE diperhatikan, maka proses '*blind passage*' akan dilakukan sehingga 4-5 kali sebelum pengesahan ujian (Rajah 14).



Rajah 15: Carta aliran kerja bagi diagnosis penyakit VNN di makmal Virology NaFisH

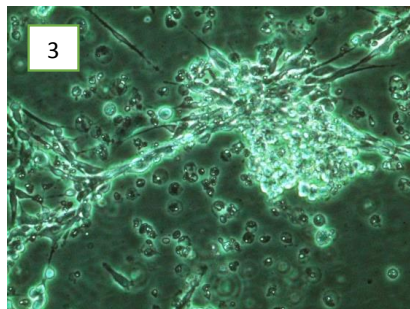
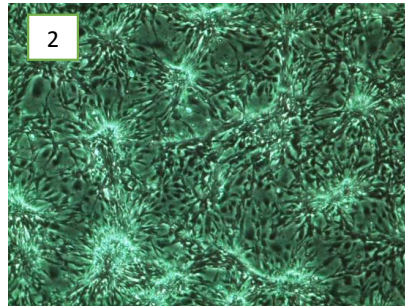
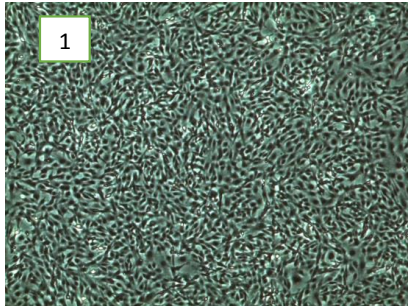
- Pemprosesan sampel

Otak, mata, buah pinggang dan limpa dikumpulkan dalam 10ml media HBSS yang ditambah dengan 2% FBS, 100 µg mL⁻¹ dan 100 IU penicillin-streptomycin. Sampel di kisar dengan mortar yang steril dan telah disejukkan terlebih dahulu. Sampel yang telah hancur akan dicampurkan dengan media tadi dan diempar pada 5000 rpm selama 15 minit. Lapisan atas emparan iaitu supernatan ditapis menggunakan penapis berserat 0.45 µm (Sartorius). Supernatan yang ditapis disimpan di dalam -80°C untuk kegunaan seterusnya.
- Inokulasi sampel

100 – 200µl sampel yang ditapis tadi akan diinokulasikan di dalam plate tisu kultur yang mempunyai 24 lubang (24 well plate) dan di inkubasi selama 1 jam pada suhu 25°C. Kemudiannya, 800 – 900ul media L-15 yang steril dan dicampur dengan 2% FBS juga 1% antibiotic penicillin-streptomycin ditambah ke dalam setiap well tersebut, dan diinkubasikan lagi pada suhu yang sama untuk tempoh 3-7 hari. Pemerhatian CPE dilakukan setiap hari dan '*blind passage*' akan dilakukan selepas tempoh 7 hari sebanyak 3-4 kali sebelum kehadiran CPE tersebut disahkan.

➤ Cytopathic effect (CPE)

CPE ialah perubahan sel kultur daripada normal kepada tidak normal dan akan dikenali apabila sel yang diinokulasi dengan sampel dibandingkan dengan sel kawalan. CPE boleh disebabkan oleh beberapa faktor seperti toksisiti, jangkitan virus ataupun kontaminasi oleh bakteria. Sel sel yang disyaki CPE akan mengalami perubahan bentuk seperti sel membentuk vacuole, sel menjadi besar (*giant cell*), necrosis ataupun piknotik dan juga kematian sel (Rajah 15).



Rajah 16: Cytopathic effect (CPE) yang diperhatikan di dalam sel kultur E-11 yang diinokulasikan dengan virus VNN. 1) Sel E-11 (normal); 2) CPE pada hari ke-4 (15%), sel sel mula menjadi besar (*giant cells*); 3) CPE pada hari ke-7 (80-85%), dapat dilihat sel mula tanggal dari permukaan dan seterusnya mati. Foto: Hazreen Nita Mohd Khalid (2019).

Ujian molekular RT-PCR dan sequencing

- Reaksi Polimerase Berantai atau **Polymerase Chain Reaction (PCR)** ialah satu kaedah moden yang cepat, spesifik dan sensitif yang digunakan untuk menguji kehadiran genome patogen secara molekular. PCR digunakan untuk kesemua DNA virus manakala Reaksi Berantai Polymerase Transkripsi Terbalik atau **Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)** perlu digunakan untuk RNA virus. PCR boleh dibahagikan kepada 2 jenis iaitu i) Secara konvensional dan ii) masa sebenar atau 'Real time'. PCR konvensional hanya memberikan keputusan kualitatif sahaja manakala *real time* PCR akan memberikan keputusan yang kuantitatif, di mana kita dapat menganggarkan kepekatan virus yang diasingkan daripada ikan yang telah dijangkiti. Secara tidak langsung, tahap keterukan jangkitan dapat di ketahui. Pengesanan VNN adalah melalui ujian RT-PCR memandangkan ianya sejenis RNA virus. Secara amnya, ujian ini mempunyai 3 langkah utama iaitu :
- Pengasingan genom virus : Ekstraksi RNA

NNV ialah sejenis RNA virus, maka RNA diekstrak di makmal NaFisH menggunakan kit ekstraksi RNA iaitu 'Viral RNA/DNA gen spin kit' atau Trizol. Walau bagaimanapun, terdapat pelbagai jenis kit di pasaran yang boleh digunakan untuk proses ekstraksi ini dan memberikan keputusan yang hampir sama (Azila 2018, tidak diterbitkan).

- Penggandaan RNA virus : *Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) Teknik ini ialah di mana RNA virus yang spesifik akan digandakan sebanyak mungkin bagi mengesan kehadiran virus tersebut di dalam sampel. Ujian ini menggunakan premix yang khusus iaitu 'MyTaq one step RT-PCR kit' (Bioline, Massachusetts, USA), ataupun kit-kit lain yang bersesuaian yang mudah di dapati di pasaran. Bagi menggandakan RNA virus tersebut, satu jujukan atau rangkaian nuklik asid yang digelar primer perlu dibangunkan, yang akan mengenali jujukan virus NNV sahaja dan bukan jujukan genome organisma yang lain. Bagi pengesanan VNN di NaFisH, Sebanyak 4 jenis Primer rujukan digunakan iaitu i) F2 (5'- CGTGTCAGTCATGTGTCGCT-3') and R3 (5'-CGAGTCAACACGGGTGAAGA-3') (Nishizawa et al., 1994) bagi langkah PCR yang pertama; ii) RGNNV-F (5'-CAGCGAAACCAGCCTGCAGG-3') and RGNNV-R (5'-ACCTGAGGAGACTACCGCTC-3') (de la Peña et al., 2008) bagi langkah PCR ke-2 (*nested*).
- Pemerhatian keputusan : Elektrophoresis Elektrophoresis ialah satu cara bagi mengalirkan tenaga elektrik dan seterusnya memisahkan molekul molekul RNA yang telah di gandakan melalui RT-PCR tadi. Setelah PCR dijalankan antara 2-4 jam, keputusan akan di baca melalui gel electrophoresis ini di mana keputusan sampel yang positif VNN akan memberikan band pada saiz 280 bp.
- Pengesahan virus: Jujukan (Sequencing) Ujian ini ialah sebagai pengesahan lanjutan kepada teknik RT-PCR tadi di mana produk PCR yang dihasilkan di atas seterusnya akan di tulenkan dan dihantar untuk proses jujukan. Melalui teknik ini, identiti virus boleh disahkan setelah data jujukan tersebut di analisis menggunakan alat atau software iaitu 'Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool' (BLAST) yang boleh dimuat turun daripada laman web NCBI atau 'National Centre for Biotechnology Information'.
- Ketepatan ujian RT-PCR ini bergantung kepada keupayaannya untuk mengesan RNA dalam jumlah yang amat sedikit (*sensitivity*) dan penggunaan primers yang spesifik (*specificity*). Disebabkan ciri sensitiviti dan specificiti nya yang agak tinggi, maka ia boleh membawa kepada keputusan yang palsu iaitu samada '*false positive*' atau '*false negative*'. Oleh yang demikian, diagnosis penyakit VNN akan bergantung juga kepada ujian tisu kultur dan histology, selain teknik RT-PCR secara konvensional yang menjadi rutin diagnosis penyakit VNN di makmal NaFisH.

Elektron mikroskop

- Penggunaan mikroskop electron bagi tujuan diagnosis jarang dilakukan kecuali bagi penyakit yang disebabkan oleh patogen yang tidak di ketahui, atau bagi penyakit penyakit baru muncul. Melalui ujian ini, bentuk dan struktur sesuatu patogen itu dapat dikaji dan seterusnya barulah pengasingan ataupun pengenalpastian patogen boleh dilakukan.

Pencegahan Penyakit VNN

VNN telah bertapak di dalam persekitaran akuakultur di Malaysia sejak 20 tahun lepas, hasilnya sekarang pemusnahan keseluruhan (*total destructions*) VNN dari sistem ternakan adalah amat sukar dilakukan. Virus ini juga dapat bertahan pada pH dan suhu yang tertentu untuk satu tempoh masa yang lama. Disebabkan sifatnya yang menggunakan sel perumah untuk membiak, maka tiada rawatan yang boleh dilakukan untuk penyakit ini. Langkah-langkah pencegahan dan pengawalan selalunya agak sukar dilakukan tanpa melibatkan kos yang mahal dan pengurusan yang efektif seperti biosekuriti tahap maksimum, selain bergantung kepada sistem ternakan, di mana ternakan secara terbuka seperti sangkar laut adalah lebih rumit berbanding haceri. Di bawah ini disenaraikan beberapa langkah pencegahan dan pengawalan yang boleh di amalkan oleh penternak.

Pengurusan Biosekuriti di haceri

- Induk
 - Induk induk ternakan hendaklah di saring secara berkala bagi memastikan mereka tidak membawa virus ini di dalam badan mereka. Jenis sampel yang boleh di ambil ialah cecair reproduktif daripada ikan jantan dan betina. Saringan hendaklah dilakukan pada ketika induk hendak dikawinkan samada secara semulajadi atau persenyawaan tiruan. Berdasarkan kajian yang telah dijalankan, didapati induk yang diuji positif, tidak semestinya juga positif pada ujian berikutnya. Oleh yang demikian, bagi induk bernilai tinggi, agak sukar bagi pengurusan haceri untuk memusnahkan induk sebegini. Maka saringan sebaik sahaja sebelum ikan dikawinkan adalah disarankan. Selain itu, induk induk sebaiknya di simpan secara berasingan bagi mengurangkan kontaminasi silang, walaubagaimanapun pekara ini adalah kurang praktikal kecuali bagi haceri yang mempunyai modal yang tinggi, di samping bergantung kepada spesis ternakan. Induk yang baru masuk juga perlulah disaring sebelum dicampurkan dengan induk yang lama bagi tujuan pembenihan.
- Persempadanan Kawasan
 - Kawasan haceri sebaiknya dibahagikan mengikut sektor dan mempunyai personel dan peralatan yang khusus dan tidak berkongsi satu sama lain. Ini adalah penting bagi mengelakkan kontaminasi silang antara sektor.
- Telur
 - Telur telur ikan yang dihasilkan boleh dirawat terlebih dahulu bagi mencegah penularan virus ini. Proses disinfeksi telur dengan iodine pada kadar 10 ppm bukan sahaja dapat mengurangkan kadar jangkitan oleh NNV tetapi juga patogen patogen yang lain.
- Anak ikan
 - Anak anak ikan yang baru menetas dan berumur seawal 5 hari boleh mendapat virus ini melalui transmisi vertical iaitu daripada induk dan anak, maka penyaringan virus perlu juga dilakukan secara berkala bagi memastikan mereka bebas daripada VNN.

Anak anak ikan yang positif sepatutnya terus dimusnahkan, dan ini akan mengurangkan kerugian akibat penyakit VNN di kemudian hari.

- Jenis Makanan
Tumbesaran ikan marin seperti kerapu amat bergantung kepada makanan hidup. Pemberian ikan baja merupakan satu amalan tradisi di dalam penternakan ikan marin di Malaysia. Ikan ikan baja ini diperolehi daripada pelbagai sumber dan tempat. Pemberian ikan baja bagaimanapun mempunyai risiko transmisi virus VNN yang agak tinggi, ini kerana virus ini boleh menjangkiti pelbagai spesis pada suhu persekitaran yang berbeza. Maka sebaiknya pemberian ikan baja di ketahui puncanya serta haruslah berkualiti selain melakukan penyaringan dari semasa ke semasa untuk memastikan ikan baja bebas VNN.
- Kualiti air
Kualiti air boleh diambil secara berkala bagi tujuan saringan. Ini kerana kualiti air yang kurang baik dalam jangkamasa yang lama boleh memberi kesan stress kepada ikan dan seterusnya menyebabkan serangan VNN pada induk atau anak anak ikan.
- Pengurusan sumber air ternakan
Pengurusan sumber air untuk ternakan merupakan satu elemen terpenting di dalam memastikan persekitaran ternakan bebas daripada serangan VNN, mahupun patogen patogen yang lain. Pengurusan sumber air ternakan perlulah seoptima mungkin mengikut kaedah biosekuriti. Sumber air hendaklah diketahui puncanya dan ditapis atau dinyahkuman daripada sebarang jenis patogen terutamanya virus VNN ini. Antara perkara yang boleh dilakukan ialah dengan mempunyai sistem penapisan yang berkesan, penggunaan UV atau ubat nyahkuman yang sesuai seperti klorin bagi membunuh patogen sebelum dialirkan ke dalam sistem ternakan. Disebabkan saiz virus yang amat kecil, maka dikhuatiri penggunaan penapis yang biasa tidak mencukupi bagi menghalang kemasukan virus ini ke haceri.

Amalan pengurusan biosekuriti di ladang

- Kadar stok
Hendaklah mengikut piawai atau dikurangkan mengikut kadar tertentu bagi mengurangkan tekanan pada ikan
- Kualiti air
Pastikan kualiti air adalah ditahap terbaik dan mengetahui sumber air masuk. Air ternakan masuk dan keluar perlu dirawat terlebih dahulu.
- Kebersihan
Tahap kebersihan premis, peralatan ternakan, kenderaan dan pekerja hendaklah di tahap optimum bagi memastikan kontaminasi silang tidak berlaku.
- Menyediakan tempat kuarantin
Kemasukan ikan baru hendaklah dikuarantin terlebih dahulu untuk tempoh sekurang-kurangnya 2 minggu. Selain itu, ikan ikan baru ini hendaklah diketahui sumbernya dan mempunyai sijil kesihatan. Bagi kepastian, saringan juga boleh dilakukan keika di dalam tempoh kuarantin. Selain itu, ikan ikan yang sakit juga perlu

dikuarantin di tempat yang khas bagi tujuan rawatan dan mengurangkan kadar perebakan penyakit.

Nyah kuman (*disinfection*)

VNN virus dapat bertahan lama pada pH antara 3-7 untuk selama 6 minggu dan melebihi 24 jam pada pH 2-11. Berdasarkan variasi pada genus, virus ini juga dapat bertahan pada suhu yang ekstrim iaitu 25°C untuk sebulan dan 15°C dalam jangkamasa yang lebih lama. Di antara cara-cara membunuh virus ini di dalam premis ternakan ialah:

- Pemusnahan pada suhu 60°C atau lebih untuk selama 30 minit
 - Penggunaan 50 ppm chlorine (*hypochlorite*) atau iodine selama 10 minit pada suhu 20°C
 - Penggunaan lampu ultraviolet (UV)
- Maklumat lengkap tentang cara penggunaan dan bahan nyahkuman yang sesuai boleh diperolehi daripada laman sesawang *World Organisation of Animal Health* (OIE), *Aquatic Animal Health Code (2009), Chapter 4.3*.

Pengawalan wabak VNN di ladang ternakan

- Ikan-ikan yang sakit/tidak sihat hendaklah segera diasingkan dari kawasan ternakan dan ikan yang mati perlu dimusnahkan dengan cara ditanam atau dibakar.
- Awasi kualiti air persekitaran ternakan— pH, oksigen terlarut, suhu, salinity, termasuk perubahan warna air (plankton bloom) dan kekuatan arus/ombak. Data kualiti air hendaklah diambil sekurang-kurangnya 2 kali sehari, awal pagi atau malam dan tengahari atau petang ketika berlakunya wabak.
- Gunakan peralatan yang bersih dan berasingan untuk menguruskan atau memindahkan ikan yang sihat dan yang berpenyakit. Tindakan ini bagi mengelakkan jangkitan silang.
- Nyah kuman peralatan-peralatan dan permukaan kerja menggunakan: 5% sodium hypochlorite pada kadar 200mg/L atau formalin pada kadar 2000 mg/L, untuk selama 15 minit.
- Berikan multivitamin atau sekurang-kurangnya Vitamin C kepada ikan-ikan yang masih sihat atau yang masih berselera makan bagi meningkatkan daya pertahanan badan melawan penyakit.
- JANGAN atau kurangkan penggunaan antibiotik seminima mungkin. Antibiotik digunakan hanya jika ada keperluan iaitu di mana terdapat luka-luka pada badan/sirip ikan yang disebabkan oleh serangan bakteria sekunder. Penggunaan antibiotik tidak berkesan di dalam kes-kes serangan virus.
- JANGAN masukkan ikan baru ketika kejadian perebakan penyakit bagi menghindarkan kehilangan/kerugian yang lebih besar. Jika ada, ikan-ikan yang baru masuk hendaklah dikuarantinkan terlebih dahulu.

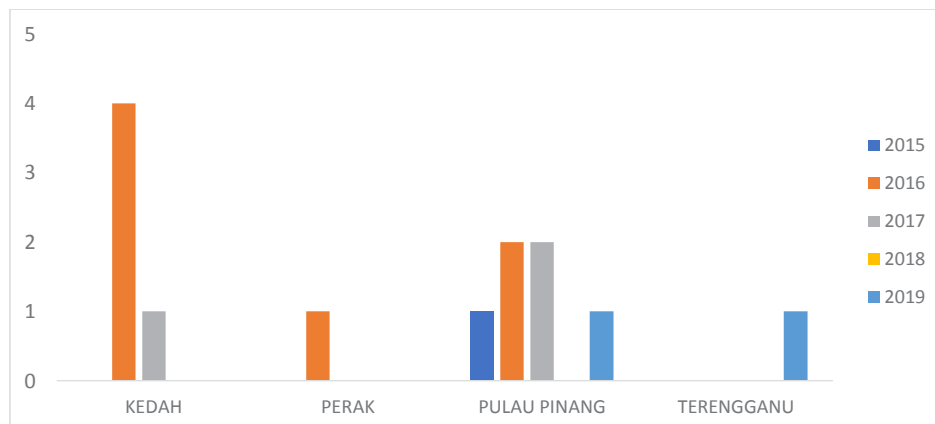
Vaksin

Penggunaan vaksin bagi mencegah penyakit bawaan virus di dalam akuakultur terhad kepada industri salmon selain vaksin bagi penyakit KHV dan iridovirus (27). Di Malaysia, vaksin bagi mencegah penyakit samada bakteria atau virus masih terlalu kurang atau tiada langsung. Vaksin melawan penyakit VNN kebanyakannya masih di peringkat kajian oleh negara negara seperti Thailand, Indonesia, Filipina, termasuk Malaysia, namun vaksin komersil untuk VNN masih belum lagi tersedia. Walaubagaimanapun, sebuah syarikat pengeluar vaksin terkemuka iaitu PHARMAQ telah berjaya mengkomersilkan vaksin untuk VNN yang dinamakan 'ALPHA JECT micro 1 noda' untuk negara negara Eropah pada tahun 2014 (2). Vaksin suntikan ini adalah dalam bentuk emulsi dos mikro dari virus RGNNV yang tidak aktif dan disuntik ke dalam ikan siakap eropah (European seabass) di mana ia dapat memberikan perlindungan yang berkesan dalam jangkamasa yang panjang.

Bagi menghasilkan vaksin yang berkesan untuk VNN, adalah satu keperluan untuk para penyelidik mengkaji dan memahami interaksi antara perumah dengan patogen (*host-patogen interaction*), bagaimana ia merosakkan perumah (patogenesis), tahap keterukan jangkitan, saiz dan umur ikan, transmisi virus dan sebagainya. Seperti yang diketahui, VNN menyerang anak anak ikan berumur seawal 5 hari dan menyebabkan kematian yang tinggi, maka penghasilan vaksin untuk penyakit ini perlu disesuaikan penggunaannya dengan saiz anak ikan ini. Penggunaan kaedah suntikan adalah tidak praktikal jika kita mahu mendapatkan benih benih ikan yang produktif dan berkualiti tinggi. Penggunaan kaedah suntikan mungkin lebih sesuai untuk ikan yang bersaiz lebih besar seperti induk ikan, walaubagaimanapun, ikan di peringkat tumbesaran jarang menghadapi masalah kematian yang tinggi. Sehubungan dengan ini, pemberian vaksin melalui makanan adalah lebih bersesuaian. Disebabkan pelbagai faktor ini, vaksin untuk VNN yang masih di peringkat kajian dan di dalam pelbagai bentuk seperti vaksin yang dilemahkan (*inactivated virus*), rekombinan, partikel menyerupai virus (*Virus like particle/VLP*) dan vaksin DNA telah menunjukkan tahap keberkesanan yang pelbagai (28). Sehingga vaksin untuk VNN boleh didapati di Malaysia, maka pengawalan dan pencegahan penyakit ini hanyalah melalui pengurusan biosekuriti yang optima.

Lampiran





Carta menunjukkan kes kes VNN yang masih di terima oleh pihak NaFisH pada setiap tahun yang banyak melibatkan negeri negeri Kedah, Perak, Pulau Pinang dan Trengganu. Kemempat empat negeri ini merupakan antara pengeluar utama ikan marin di Malaysia. Oleh kerana VNN tidak lagi tersenarai di dalam OIE, dijangkakan masih banyak kes di kawasan haceri mahupun sangkar yang tidak dilaporkan. Data: NaFisH 2011-2019.

PROTOCOL RT-PCR TECHNIQUE MENGGUNAKAN one-step RT-PCR MyTaq Kit

Penyediaan master mix untuk RT-PCR

Komponen Kit	Vol per sample (µl)	X bil. samples diuji
MyTaq One step Mix	12.5	
Ribosafe Inhibitor	0.5	
RT-enzyme	0.25	
Primer F2 (10µM)	1	
Primer R3 (10µM)	1	
DEPC Water	6.75	
+ RNA template	3 µl	

Set thermocycler (1)

Cycles	Temperature	Time	Notes
1	45°C	20 min	Reverse transcription
1	95°C	1 min	Polymerase activation
40	95°C	10 s	Denaturation
	60°C	10 s	Annealing
	72°C	30 s	Extension
	4°C	∞	

Penyediaan master mix untuk PCR

Komponen kit	Vol per sample (µl)	X bil. Samples diuji
MyTaq Mix 2x	12.5	
Primer RG-F (10µM)	1	
Primer RG-R (10µM)	1	
DEPC Water	8.5	
+ CDNA	2µl	

Set thermocycler (2)

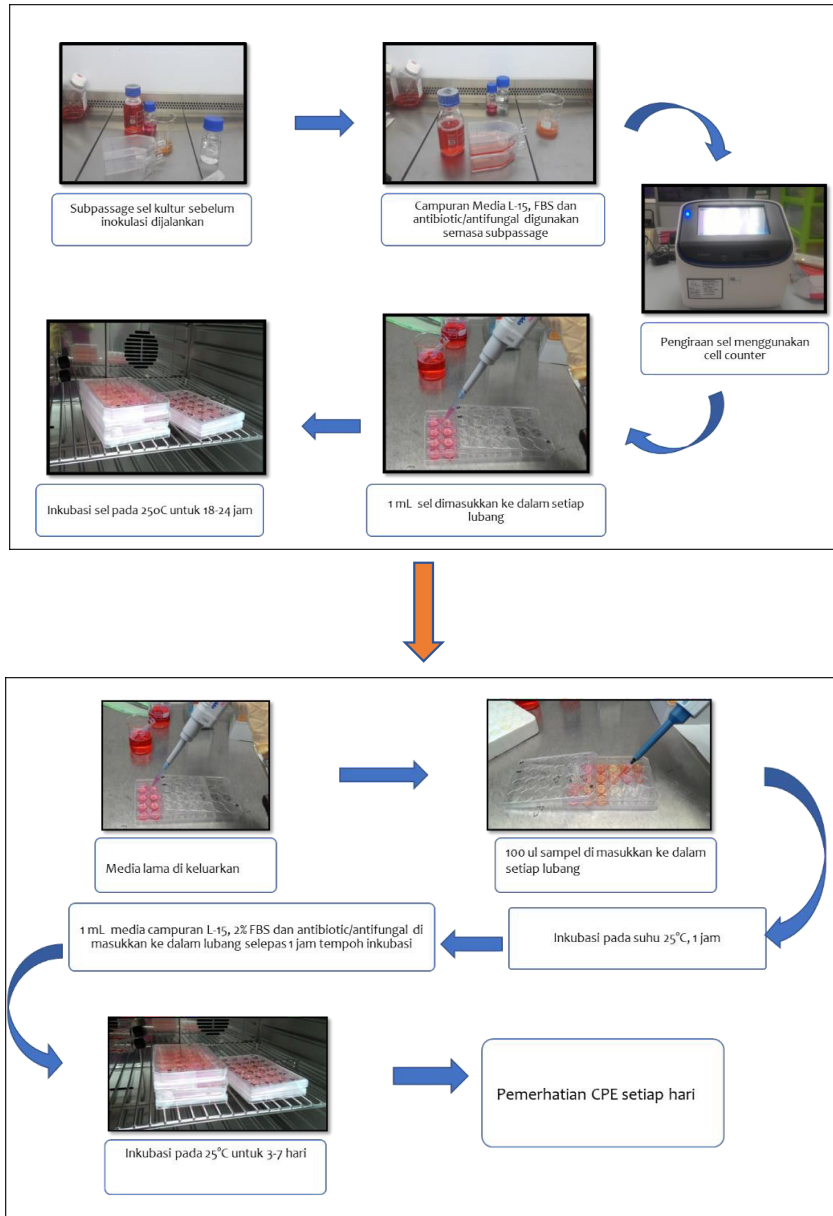
Step	Temperature	Time	Cycles
Initial Denaturation	95°C	1 min	1
Denaturation	95°C	15 s	35x
Annealing	58°C	15 s	
Extension	72°C	10 s	
	4°C	∞	

Prosedur gel elektroforesis

1. 1.5% agarose gel + LB buffer + Redsafe
2. Panaskan di dalam microwave untuk 2 menit
3. Tuangkan gel yang sedikit sejuk ke dalam acuan gel
4. Titikkan 8-10ul sampel dengan 2 μ loading dye dan pipetkan ke dalam lubang gel
5. Pipetkan juga 5 μ l, 100bp DNA ladder di dalam lubang kawalan
6. Jalankan elektroforesis pada 100 Volt selama 30 menit, dan lihat keputusan dengan alat gel image

GAMBARAJAH PROSES PROSES INOKULASI SAMPEL.

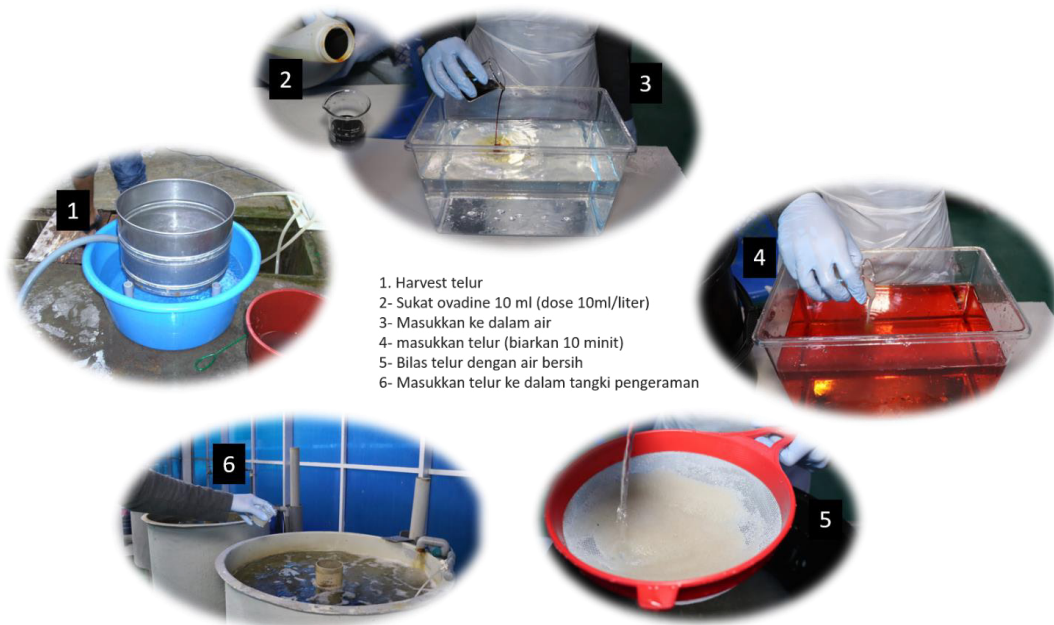
Foto : Koleksi Makmal Virology NaFish



PROSES NYAH KUMAN TELUR IKAN

Teknik ini diamalkan di Pusat Penyelidikan dan Pengeluaran Ikan Laut (FRITD).

Foto : Koleksi FRITD, 2020



GLOSARI

Antibiotik – sejenis bahan yang dihasilkan oleh bakteria atau fungus, yang dapat memusnahkan atau menghalang tumbesaran mikroorganisma yang lain (bakteria, fungus atau virus)

Bakteria – kumpulan mikroorganisma hidup yang mempunyai satu sel dan tiada membrane

BF-2 bluegill fry cells – nama sejenis tisu kultur berasal dari ikan bluegill

Blind passage – pembahagian sel sel yang dilakukan walaupun tanpa pengesanan CPE

Congestion – pengumpulan darah di dalam organ

CPE cytopathic effect – kesan sitopatik iatu perubahan sel yang berlaku di dalam tisu kultur

Diagnosis – penyiasatan atau analisis sebab atau sifat sesuatu keadaan, situasi, atau masalah berkaitan penyakit termasuk keupayaan mengenalpasti penyakit dari tanda dan gejala

DNA – deoxyribonucleic acid

dsRNA double stranded ribonucleic acid

E-11 – nama tisu kultur yang diklonkan daripada sel SSN-1 yang berasal dari tisu ikan haruan

Edema – pengumpulan cecair berlebihan di dalam rongga badan atau tisu

Elektroforesis – pergerakan zarah bermuatan di dalam gel melalui medan elektrik

Filogenetik – sejarah evolusi sesuatu organisma

Fungus – kumpulan organisma yang menghasilkan spora

Genus – kumpulan organisma yang hamper sama dengan keluarga (family) tetapi berbeza sedikit dengan spesis

Giant cells – pembentukan sel yang bersaiz lebih besar dari normal

Histologi – kajian berkenaan tisu organisma

Histopatologi – kajian berkenaan perubahan tisu yang berlaku apabila terdapat serangan penyakit/jangkitan pathogen

Inokulasi – proses menyuntik sampel ke dalam tisu kultur untuk tujuan pengasingan virus

Invertebrata – haiwan tanpa tulang belakang (contoh serangga)

Mikroorganisma – organisma bersaiz kecil seperti bakteria, virus, parasite dan fungus

Mononuclear cells – kumpulan sel darah yang mempunyai satu nucleus berbentuk bulat

Nekropsi – bedah siasat

Nekrosis – kematian sebahagian atau keseluruhan sel atau organ

Nodul – merujuk kepada ketumbuhan atau kehadiran struktur berbentuk bulat pada permukaan tisu atau organ

Non structural protin – protin tidak berstruktur yang terdapat di dalam virus tetapi bukan sebahagian daripada partikel virus

Nukleotid – sebatian yang terdiri daripada nukleosida yang dihubungkan dengan kumpulan fosfat. Nukleotida membentuk unit struktur asas asid nuklik seperti DNA

ORF open reading frame – urutan nukleotid terdiri daripada kodon permulaan dan kodon berhenti yang boleh di transkrip

Pathognomonic – ciri ciri spesifik sesuatu penyakit

Patogen – mikroorganisma penyebab penyakit

PCR polymerase chain reaction – sejenis Teknik molecular yang cepat bagi mengesan kehadiran nuklik asid yang dicari

Pelindung virus /virus envelope – lapisan paling luar yang terdapat pada sesetengah virus yang melindungi genetic virus tersebut

Penjujukan – satu Teknik atau proses bagi mengenalpasti susunan 4 asas nuklik asid iaitu adenine (A), guanine (G), cytosine (C) dan thymine (T)

Perivascular cuffing – struktur yang terbentuk daripada pengumpulan sel di sekeliling pembuluh darah

Piknotik – nucleus sel yang telah mati

Polymerase – sejenis enzim yang mensistesis rantai panjang polimer atau asid nuklik

Prevalen – kadar kekerapan sesuatu penyakit dalam jangkamasa tertentu

Protein antigenik - protin yang boleh merangsang pengeluaran antibody perumah

Quasispesis – struktur populasi virus dengan sebilangan besar genom mempunyai variasi tertentu. Quasispesis dihasilkan dari kadar mutasi yang tinggi yang berlaku secara berterusan semasa proses replikasi dan pemilihan genetic virus.

RdRP RNA dependent RNA polymerase – sejenis enzim yang menjadi pemangkin semasa proses replikasi RNA dari template RNA

Rekombinan vaksin – vaksin yang dihasilkan dari teknologi rekombinan

Replikasi virus – proses pembiakan virus

RNA asid ribonucleic

RT-PCR reverse transcriptase polymerase chain reaction – reaksi berantai polymerase transkripsi terbalik ialah sejenis kaedah yang digunakan untuk mengesan RNA virus

SSN-1 - sejenis tisu kultur yang berasal dari ikan haruan- sel ini telah diklon menjadi sel E-11

ssRNA single stranded ribonucleic acid

Steril – sucihama

subgenomic RNA – RNA yang lebih kecil yang terhasil daripada genome virus yang asal

TCID₅₀ median tissue culture infective dose – kaedah yang digunakan untuk menilai titer virus di mana 50% sel yang dijangkiti akan menunjukkan kesan CPE

Tisu kultur – sel yang berasal dari tisu yang hidup dan dibiakkan di dalam media tiruan

Transmisi melintang – penyebaran agen penyakit melalui sentuhan atau persekitaran

Transmisi menegak – pemyebaran agen penyakit dari induk ke progeni

Vakuol – pembentukan struktur sel berbentuk bulat dan kosong

Virus – mikroorganisma terkecil dan membiak di dalam sel

VLP Virus like particle – adalah molekul yang menyerupai virus, tetapi tidak berjangkit kerana tidak mengandungi bahan genetic virus.

VTM Viral transport media – media yang digunakan untuk mengangkut virus terutamanya apabila persampelan dilakukan di luar makmal. Media ini penting bagi memastikan virus masih hidup sehingga proses isolasi dijalankan.

SENARAI RUJUKAN

1. FAO. Fishery and Aquaculture Country Profile: Malaysia [Internet]. 2019. [cited 2020 Mar 6]. Available from: <http://www.fao.org/fishery/facp/MYS/en#CountrySector-Overview>
2. Hazreen-Nita M, Azila A, Mukai Y, Firdaus-Nawi M, Nur-Nazifah M. A review of betanodavirus vaccination as preventive strategy to viral nervous necrosis (VNN) disease in grouper. *Aquaculture International*. 2019.
3. Statistik Perikanan Jilid 1 [Internet]. Jabatan Perikanan Malaysia. 2018. Available from: [https://www.dof.gov.my/dof2/resources/user_29/Documents/Perangkaan Perikanan/2018 Jilid 1/7.jadual_benih_2018_.pdf](https://www.dof.gov.my/dof2/resources/user_29/Documents/Perangkaan%20Perikanan/2018%20Jilid%201/7.jadual_benih_2018_.pdf)
4. Ransangan J, Manin BO, Lal TMM, Sade A, Azila A. Betanodavirus Infection in Marine Fish Aquaculture in Malaysia. 2013;1(December 2009):10–5.
5. Joshua S. Weitz and Steven W. Wilhelm. An Ocean of Viruses. Jun 30, 2013 [Internet]. Available from: <https://www.the-scientist.com/features/an-ocean-of-viruses-39112>
6. Maeno Y, De la Peña LD, Cruz-Lacierda ER. Nodavirus infection in hatchery-reared orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*: First record of viral nervous necrosis in the Philippines. *Fish Pathol*. 2002;
7. K Y, K I. Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish , *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel). *J Fish Dis*. 1990;13:69–77.
8. Doan Q, Vandeputte M, Chatain B, Morin T, Allal F. Viral encephalopathy and retinopathy in aquaculture: a review. Vol. 40, *Journal of Fish Diseases*. 2017. p. 717–42.
9. Costa JZ, Thompson KD. Understanding the interaction between Betanodavirus and its host for the development of prophylactic measures for viral encephalopathy and retinopathy. *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. 2016;53(June):35–49. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.033>
10. Munday BL, Kwang J, Moody N. Betanodavirus infections of teleost fish: A review. Vol. 25, *Journal of Fish Diseases*. 2002. p. 127–42.
11. Chi SC, Shieh JR, Lin SJ. Genetic and antigenic analysis of betanodaviruses isolated from aquatic organisms in Taiwan. *Dis Aquat Organ*. 2003;
12. Chuah TT, Kua BC. Diagnosis of Viral Nervous Necrosis in humpback grouper fry by cell culture techniques and histology. Kota Bharu, Kelantan;
13. Nishizawa T, Toshihiro KM, Iwao N, Muroga K. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). 1994;l:103–7.
14. Chu KB, Abdullah A, Abdullah SZ, Ramly AB. A case study on the Mortality of cobia (*Rachycentron canadum*) cultured in traditional cages. *Trop Life Sci Res*. 2013;24(2):77–84.
15. Ahmad AK, Noor M, Amal A, Saad MZ. Prevalence , Risk Factors and Transmission of Nervous Necrosis Virus in A Hatchery Producing Hybrid Grouper (*Epinephelus lanceolatus* × *Epinephelus fuscoguttatus*) Fry. 2019;42(1):125–38.
16. Ariff N, Abdullah A, Azmai MNA, Musa N, Zainathan SC. Risk factors associated with viral

- nervous necrosis in hybrid groupers in Malaysia and the high similarity of its causative agent nervous necrosis virus to reassortant red-spotted grouper nervous necrosis virus/striped jack nervous necrosis virus strains. *Vet World*. 2019;12(8):1723–1284.
17. Abdullah A, Ramli R, Ridzuan MSM, Murni M, Hashim S, Sudirwan F, et al. The presence of Vibrionaceae, Betanodavirus and Iridovirus in marine cage-cultured fish: Role of fish size, water physicochemical parameters and relationships among the pathogens. *Aquac Reports*. 2017;7:57–65.
 18. Kim JO, Kim JO, Oh MJ. Development of a Recombinant Protein Vaccine Based on Cell-Free Protein Synthesis for Sevenband Grouper *Epinephelus septemfasciatus* Against Viral Nervous Necrosis. *JMicrobiolBiotechnol*. 2015;25(10):1761–7.
 19. Panagiota S, Nausika R, Tzokas K, Batargias C, Tsiamis G. crossm Near-Complete Genome Sequence of a Fish Nervous Necrosis Virus Isolated from a Clinical Disease Outbreak in Farm-Reared. Vol. 6, American Society For Microbiology. 2018.
 20. Putri RR, Yanuhar U, H AMS. Perubahan Struktur Jaringan Mata dan Otak pada Larva Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) yang Terinfeksi Viral Nervous Necrosis (VNN) dengan Pemeriksaan Scanning Elecktron Microscope. *MSPi Student J*. 2013;1(1):1–10.
 21. Yanuhar U. The Function of Receptor Protein Humpback Grouper *Cromileptes altivelis* in Expression and Proliferation of CD4 and CD8 cells in Defence Immunity of Viral Nervous Necrotic Infection. *Int J Biosci Biochem Bioinforma*. 2011;1(2):119–24.
 22. P.T.K.Woo, D.W.Bruno. Fish diseases and disorders. Volume 3: viral, bacterial and fungal infections [Internet]. Woo PTK, Bruno DW, editors. Vol. 3. Wallingford: Cabi; 2011. Available from: <http://www.cabi.org/CABeBooks/default.aspx?site=107&page=45&LoadModule=PDFHier&BookID=554>
 23. Manin BO, Ransangan J. Experimental evidence of horizontal transmission of Betanodavirus in hatchery-produced Asian seabass, Lates calcarifer and brown-marbled grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* fingerling. *Aquaculture*. 2011;321:157–65.
 24. Azila A, Musa CUC, Abdullah SZ, Saharudin EF. Infection progress of VNN in *T. blochii* cultured in deep sea cages. In: *Proceeding of the 1st International Congress on Aquatic Animal Health Management and disease 27th - 28th January, Tehran, Iran. 2009.*
 25. OIE. Pathogen Information [Internet]. 2013. p. 4–6. Available from: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Internationa_Standard_Setting/docs/pdf/A_TiLV_disease_card.pdf
 26. Gomez DK, Baeck GW, Kim JH, Choresca CH, Park SC. Molecular detection of betanodavirus in wild marine fish populations in Korea. *J Vet Diagn Invest*. 2008;20:38–44.
 27. Dhar AK, Manna SK, Thomas Allnutt FC. Viral vaccines for farmed finfish. *Indian J Virol*. 2014;25(1):1–17.
 28. Patel S, Nerland AH. Vaccination against Diseases caused by betanodavirus. In: Gudding, Roar, Lillehaug Atle EO, editor. *Fish Vaccination*. Wiley Blackwell; 2014. p. 341–51.