

第七章 石斑魚病毒性神經壞死症的防疫策略

齊肖琪

國立臺灣大學生命科學系

一、前言

石斑魚是我國很重要的經濟性魚種之一，惟近年來受到神經壞死病毒 (nervous necrosis virus, NNV) 感染，魚苗育成的成功率不到 10%，造成嚴重的產業困境。欲使石斑魚病毒性疾病得到好的控制，必須對病毒的特性及魚免疫力有基本的瞭解，加上健全的養殖環境監控與管理的概念，從這三方面一起改善，才有機會達到安全生產及永續經營的目標。

二、病毒性神經壞死症

病毒性神經壞死症 (viral nervous necrosis, VNN) 已成為全球性很重要的海水養殖魚或半淡鹹水養殖魚類之病毒性疾病 (Munday et al., 2002)。首次發表於日本，後來大量爆發於東南亞各國。此外，東北亞、澳洲、地中海沿岸國家、以色列及伊朗、西歐與北歐沿海國家、北美西岸與加拿大東岸也都有此病例。

VNN 發病期集中於仔魚 (larvae) 及稚魚 (juvenile) 階段，死亡率接近百分之百。台灣養殖的青斑及鞍帶石斑在孵化後 14 – 50 天期間就出現此感染病例。某些種類的成魚也有死亡率出現，例如歐洲鱸魚、鞍帶石斑及大西洋庸鰈等 (Fukuda et

al., 1996; Le Breton et al., 1997)。急性罹病魚的腦及視網膜組織有嚴重空泡化現象，病魚迴旋游泳、體色加深、食慾不振；有些魚苗還會發生體側彎 (Bloch et al., 1991; Boonyaratpalin et al., 1996; Breuil et al., 1991; Glazebrook et al., 1990; Grotmol et al., 1997; Mori et al., 1992; Mori et al., 1991; Yoshikoshi & Inoue, 1990)。

魚類神經壞死病毒屬於野田病毒科 (Nodaviridae) 的魚類病毒屬 (fish nodavirus or β -nodavirus) (Chi et al., 2001; Comps et al., 1996; Mori et al., 1992; Frerichs et al., 1996)，共有四種基因型 (striped jack NNV, tiger puffer NNV, barfin flounder NNV, red-spotted grouper NNV)，其中 RGNNV 基因型多從溫熱帶魚分離出來，寄主魚種也最多。根據四種基因型病毒抗血清交叉中和反應結果，可分成三種血清型：SJNNV 是一種血清型，TPNNV 為另一種血清型，RGNNV 和 BFNNV 則為同一種血清型 (Mori et al., 2003)。至 2010 年，所有從台灣養殖石斑魚分離出來的 NNV 病毒株都是 RGNNV 基因型。

三、病毒傳播途徑

NNV 的傳播途徑包括水平及垂直傳染兩種，其中水平傳染的病毒來源包括帶有病

毒的其他共養魚、遭病毒污染的餌料生物、養殖水及養殖工具。Arimoto 等 (1993) 利用已感染 SJNNV 的日本條紋鱈魚苗與健康魚苗進行共養，結果健康魚苗在共養 6 天後全數死亡，因此，水平傳染是 NNV 傳播的重要方式。

Mushiake 等人 (1994) 檢測種魚的卵巢、血液及產卵，發現種魚在產卵季初期，生殖腺都測不到病毒；但當產卵次數與環境壓力增大時，生殖腺就測到病毒核酸，血液中開始測到 NNV 抗體，所產的卵被檢測到病毒的機率也大幅上升，這些卵孵化為魚苗後，發病比例高且發病時間短，證明垂直傳染的存在。

NNV 的宿主範圍非常廣泛，除了有病癥的養殖魚，在無病癥的養殖魚及野生魚體內也曾測到微量病毒，因此無病癥之帶原魚是散播 NNV 病毒的可能途徑 (Gagne et al., 2004; Gomez et al., 2004; Gomez et al., 2006; Gomez et al., 2008a; Gomez et al., 2008b; Nylund et al., 2008)。除了魚之外，NNV 也會被餌料生物攜帶，如輪蟲 (*Brachionus plicatilis*) 以及豐年蝦 (*Artemia salina*) 中，雖然 NNV 無法在其體內複製，但至少可停留 1 – 2 天，因此可成為傳播 NNV 的載體 (Skirris & Richards, 1998)。從被 NNV 污染魚塢收集而來的餌料生物，檢測得到 NNV 的存在 (Chi et al., 2003)。

四、病毒在宿主體內的散布途徑

Nguyen 等 (1996) 檢測病毒進入病魚體內各組織的順序，一開始出現病變的部位

是泳鰾上方的脊髓，然後至腦部，最後抵視網膜。檢測自然感染的魚苗，則最先發現表皮細胞有病毒訊號，因此推測病毒可由表皮經皮下的感覺或運動神經細胞進入體內。另外，在大西洋比目魚苗的病理研究中，NNV 病毒首先在後腦以及小腸前段被發現，然後散布至其他臟器，顯示 NNV 也可經由消化道感染宿主 (Grotmol et al., 1999)。

NNV 在病魚體內之分布，依魚種不同而有差異。有些魚種只在神經組織發現 NNV (Comps et al., 1996; Nguyen et al., 1996)；在嚴重感染 NNV 的石斑魚魚苗體中，除了神經組織，其他器官及血液中可偵測到 NNV 的存在，因此推測，病毒是經由血液循環造成全身系統性感染 (Chi et al., 2001)。

五、診斷方法

目前最常使用的檢測方法包括：(1) 檢測病毒抗體或病毒蛋白的 Enzyme linked immunosorbant assay (ELISA) (Mushiake et al., 1992; Shieh & Chi, 2005)；(2) 檢測病毒蛋白的快速檢測試劑 (one-step diagnosis kit) (Chi and Chiou, 2006)；(3) 檢測病毒核酸的 RT-PCR 及 nested PCR 方法 (Nishizawa et al., 1994)；(4) 以細胞株檢測並分離具感染力之病毒顆粒 (Chi et al., 1999; Lai et al., 2001b)。這些方法中，以 RT-PCR 配合 nested PCR 的靈敏度最高，可檢測出微量病毒的存在。若是考慮簡便與快速，則為 one-step diagnosis kit，30 分鐘內就能完成檢驗，專一性夠但靈敏度無法達到 nested PCR 的標準。所以當 one-step kit 結果是陽性時，表示一定有

NNV 感染，但結果是陰性時，則要進一步做 nested PCR 的再確認。

六、防疫策略

病毒性疾病尚無藥物可用來醫治病魚，所以要靠好的防疫策略與生產管理。當環境緊迫變大、病原含量變多或毒性變強、加上宿主魚種的免疫力降低時，就很容易爆發疫情。做好養殖場的環境管理，阻斷病原傳染的途徑，提高宿主魚種的免疫力，才能降低疫情爆發的機率。

NNV 會經由帶原種魚傳染至魚卵，然後至孵化苗，發病魚苗又會立刻污染孵化場的環境，因此 NNV 的防疫工作要從種魚做起。Mushiake 等指出，降低條紋鯪種魚在生殖季節所承受的壓力，減少同一生殖季之產卵次數，並篩選無帶原種魚進行產卵，以降低魚苗罹患神經壞死症的機會 (Mushiake et al., 1994)。Breuil 等 (2000) 在海水鱸魚，Watanabe 等 (2000) 在比目魚 (barfin flounder) 也都建議剔除魚群中生殖腺有 NNV 抗原或血液中有 NNV 抗體之種魚作為防疫策略。

石斑魚自卵孵化到寸苗前的這段期間，對 NNV 的感受性非常高，很容易受感染並發病死亡，但這階段魚苗的免疫系統還沒有很成熟，無法及時產生很好的免疫力來抵抗疾病，因此，降低環境遭受病原污染是第一要務。建議卵孵化及寸苗前的蓄養都在室內池進行。NNV 在無宿主可感染的海水中，病毒的穩定度不佳，經過幾天就會自然崩解，所以用蓄養過的海水來孵苗或養魚都將更安

全。自外海灣抽進來的海水都帶有很多病原菌，一定先經過蓄水池的靜置以及沙濾，再行 UV、臭氧或電解海水消毒法處理後使用。徹底執行養殖設備與工具的消毒與操作人員的衛生管理，避免魚具在不同池之間共用，工具用畢後要洗淨消毒，但要注意不同種類消毒藥劑的有效消毒劑量及不影響養殖魚存活的安全劑量，並先測試不同藥劑在不同水溫或鹽度下有無不良變化。養殖場的工作人員要常洗手及清洗消毒所穿的工作靴子。建議所有的缸子或桶子在用之前及之後，都要用稀釋過的漂白水消毒。撈網或刷子可用臭氧水或電解水浸泡消毒，或用漂白水浸泡消毒 30 分鐘。在養殖不同批的魚或者孵化不同批的魚卵之前，場所的再次清潔、乾燥及消毒，皆有助於提供有效保護 (Munday & Nakai, 1997；Yoshimizu 2009)。

幼苗在飼養期間要定期取樣做病毒的檢測與監控。若孵化場出現 VNN 疫情，在出現病癥的早期，立即撈出有病癥的魚苗，增加換水量，降低水溫，各池所使用的工具務必一池一套，如此可以緩和疫情。若疫情控制不住，魚苗發生大量死亡情形時，一定消毒死亡魚隻、魚池及所有工具，切忌將死亡魚苗及池水直接排放於環境中而造成更大養殖區域被病毒污染，如此可減少疫情重複爆發的機會 (Chi et al., 2003)。

石斑魚幼苗各階段需要的不同的餌料生物，最好有可信任的、穩定的來源，確保無 NNV 污染後使用。魚苗長的快，長的好，魚苗的免疫系統就會發育的好，免疫後才能有更好的免疫反應，所以要補充石斑魚幼苗各階段所需要的營養成分，並可使用益生菌

幫助幼苗建立好的消化道腸菌叢，再於適當時機施予口服或浸泡式疫苗，來提高魚苗抗 NNV 的能力。

七、NNV 疫苗及其免疫方法

硬骨魚的免疫系統由免疫器官、免疫細胞以及體液免疫因子所組成。硬骨魚在胚胎中期或孵化成幼苗時，雖已有淋巴器官之形成，但尚未具有免疫能力，須待周邊的表皮細胞、樹突狀細胞以及纖維母細胞發育完全後，才有成熟的後天免疫反應 (Lam et al., 2004)。不同種類的石斑魚苗，其免疫系統發育的時程不完全相同，以瑪拉巴石斑為例，淋巴細胞在孵化後 19 天才出現 (Lin et al, 2008)。

有關 NNV 疫苗的研究，Tanaka 等 (2001) 使用大腸桿菌 (*E. coli*) 表現系統，表現出完整的 SJNNV 的鞘蛋白質，經由肌肉注射免疫後，魚體的中和抗體增高，攻毒試驗後的死亡率明顯降低。Húsgarð 等 (2001) 利用 SJNNV T2 片段表現重組鞘蛋白質，經腹腔注射免疫大西洋比目魚 (Atlantic halibut)，可引起專一性的抗體反應，並有效降低 NNV 攻毒後之死亡率。Sommerset 等 (2001) 利用 *E. coli* 系統分別建構了大西洋比目魚 AHNNV 病毒株及條紋鱸的 SJNNV 病毒株兩種重組蛋白質疫苗。Lin 等 (2001) 用石斑魚 NNV 病毒株製備重組疫苗，以腹腔注射方式免疫石斑魚，中和抗體於第一次免疫後第 4 週開始上升。Liu 等 (2006) 及以原核系統、Thiery 等 (2006) 以真核系統，分別表現 NNV 鞘蛋白似病毒

顆粒 (virus like particle, VLP)，以 VLP 免疫石斑魚及金目鱸，可誘發高中和抗體力價，Thiery 等 (2006) 以金目鱸幼魚進行免疫與活體攻毒測試，結果相對活存率 (RPS) 高達 89%。以上這些試驗皆以幼魚進行，並沒有在早期魚苗階段進行。

(一) 石斑魚幼苗的免疫策略

一般常用的疫苗免疫方式包括注射、口服及浸泡，幼魚及成魚可用注射式免疫，NNV 在幼苗期引起的感染率與死亡率最高，但該時期魚苗只能以浸泡或口服方式來免疫。Lin 等 (2007) 發展出以餌料生物包埋口服疫苗的平台系統，將表現病毒抗原的大腸桿菌，用福馬林殺菌後餵食豐年蝦，藉由豐年蝦的攝食來提高體內病毒抗原濃度，同時減少病毒抗原被魚苗腸胃道酵素破壞。餵食八分苗兩天，每次間隔 12 小時，免疫後一週進行攻毒，結果疫苗組的相對活存率 (RPS) 為 63.6%，證明免疫有效。然而，口服式疫苗要考慮投餵時每隻魚是否都攝入足夠的疫苗量，還要和餌料生物混合後再行餵食，步驟較複雜。

雖然石斑魚苗自孵化後 19 天可以免疫，但免疫系統成熟度以及免疫效果在孵化後 40 – 45 天的七、八分苗階段會更好，此階段免疫所引起保護效果可以維持的時間更長。Kai 等 (2008) 針對石斑魚八分幼苗，研發了浸泡式免疫策略，將去活化後之 NNV 疫苗病毒，以 10^6 TICD₅₀/mL 濃度浸泡魚苗 20 分鐘，30 天後以 10^5 TICD₅₀/mL 病毒劑量浸泡攻毒，結果免疫魚的相對活存率高達 83%，且保護效果可達 3 個月。免疫後 3 個月的青斑，已過了 NNV 最易感染或致死的

階段，對鞍帶石斑而言，魚苗大小也長到可用注射法來進行追加免疫。追加免疫可引發更長效性的保護，之後便可移至下游亞成魚或成魚養殖場進行室外池蓄養。Yamashita 等 (2005) 曾利用去活化的 RGNNV 注射免疫七帶石斑 (*Epinephelus septemfasciatus*) 幼魚，免疫後 10 天出現中和抗體，攻毒後的相對活存率 (RPS) 為 67%，免疫魚移至箱網養殖後的相對活存率為 85%。

(二) 石斑魚種魚的免疫策略

石斑魚要經過很多培育年才能成為種魚，有些種類的石斑魚種魚體型很大，所以在戶外蓄養，又種魚必須達到一定的養殖密度才有交配行為發生，因此要篩選一定數量之無病毒帶原種魚進行繁殖，對養殖戶而言不易遵行；且對碩大體型之種魚做定期病毒篩檢，過程非常耗人力也增加種魚緊迫。絕大多數種魚是群養在戶外，水源、下雜魚飼料、鳥糞等等都可能將病毒帶入，因此很難預料所飼養的種魚何時會感染到 NNV。雖然用某些化學藥劑或是臭氧處理過的養殖水可以有效消毒某些魚類的魚卵，但每一魚種的魚卵對化學消毒法的耐受度是不同的，要兼顧有效消毒與魚卵孵化率需要經過很長的測試過程，且不一定對每種石斑魚卵都能適用。

有鑑於此，本實驗室先進行了石斑魚成魚的疫苗接種，並採血測 NNV 抗體的中和力價變化，石斑魚成魚因免疫系統已成熟，接種疫苗後產生高力價的中和抗體，追加免疫後，高抗體力價至少可以維持 3－6 個月，足夠涵蓋石斑魚的產卵季。本實驗室與種魚養殖戶進行合作，於繁殖季節前 1 個月

進行疫苗接種，然後追蹤整季實驗組與對照組之魚卵，用 RT-PCR 及 Nested PCR 檢測魚卵 NNV 的帶原比例，結果負對照組種魚，在生殖季後期所產的卵有測到 NNV 帶原，但接種疫苗組的種魚，整個生殖季所產的卵皆無病毒帶原，顯示以免疫種魚來阻斷垂直感染是有效的。這項防疫策略，並不需要淘汰帶原魚，也不需要建很大的室內種魚養殖場來保護種魚免於病毒感染，對養殖戶來說可行性高 (Kai et al., 2009)。因為 1 個月足以讓種魚體內專一性的抗體量達到高峰，這些抗體又可以有效地中和掉帶原魚體內的 NNV 病毒，因此我們建議，除了降低種魚催熟與產卵次數以降低其緊迫度外，每年在生殖季節前一個月即對所有種魚進行 NNV 疫苗接種，等產卵季開始，可用 RT-PCR 的檢驗方式檢驗每批魚卵，確認卵沒有帶原 NNV，再販售給下游的孵化場，以阻斷 NNV 的垂直傳染。

(三) 雞蛋抗體的被動免疫

近年來有利用抗 NNV 的多源抗體或雞蛋抗體 (Ig Y) 來中和魚卵表面的 NNV。Lai 等 (2001a, 2003) 發展出可抗 YGNNV 的老鼠單源抗體，並構築攜帶單源抗體基因的載體，將其表現在魚細胞株，證實可在魚類細胞株中產生抗 NNV 病毒的單源抗體，大幅降低單源抗體生產的成本，至於單源抗體如何有效地應用在石斑魚苗 NNV 的防疫中，則仍在研發中。高雄大學王俊順副教授利用抗 NNV 的雞蛋抗體混在飼料中餵食魚苗，證實餵食後的魚苗體內可以測到抗 NNV 的 IgY，魚苗活存率也提高，因此證明有被動免疫效果。IgY 很適用在免疫系統尚未成熟

的初期石斑魚苗；另外，主動浸泡免疫後的八分苗也需要 2－3 週自身抗體才會達到高峰，才有足夠的保護作用，在這 2－3 週的保護空窗期，亦可考慮用 IgY 來補強。

目前石斑魚孵化場都在魚苗長至七或八分時賣給下游養殖場，販售及搬運過程對魚苗都是緊迫，因此原本看似健康的八分苗，到了下游養殖戶的池子後，沒幾天就發病，其中的責任歸屬難以釐清，魚苗可能原本就輕微帶原，也可能在搬運過程受到 NNV 污染，也可能進了新池子後才受到感染，因此建議，購入八分苗後可先餵 1－2 週 IgY，讓魚苗穩定。被動免疫的缺點是一旦停止餵食 IgY，幾天後魚體內的 IgY 量就會下降，就失去保護效果，所以若要達到長效性的保護效果，用疫苗來引發主動免疫仍有其必要。

八、益生菌的應用

養殖魚的體表與消化道，若有正常的細菌相，則有助於提高魚體對病原的免疫反應或抗病原菌的能力。已有報告指出，很多自環境水體或魚消化道分離出的細菌具有抗病毒能力 (Yoshimizu et al., 1986; Yoshimizu and Ezura, 1999)。但魚在消毒過的水體中孵化及飼養時，所建立的體表或消化道的細菌相是不正常的，因此在孵化苗階段，添加具有抗病毒能力的正常細菌於餌料生物中，再餵食魚苗，則能在魚苗消化道中建立這些菌叢，而提高魚苗抗病毒能力，但這些餌料生物，包括豐年蝦及輪蟲，必須自孵卵階段就在消毒過的海水中進行，然後才能使用

(Yoshimizu, 2009)。Chi (2007) 自石斑魚消化道中分離到具有抗 NNV 之細菌，已完成體外定性測試及活體餵食試驗，證實經由四週餵食可大幅降低 NNV 攻毒試驗中魚苗的死亡率，但如何讓這類細菌在剛開口魚苗消化道中形成長駐菌或是強勢菌叢，則仍待研究。有些益生菌雖然沒有直接抗 NNV 的效果，但對於改善水質有很好的效果，施用於密集蓄養的石斑魚苗池，間接有助於魚苗的成長，提高魚苗的活存率，因此也是防疫策略中重要的一環。

九、尚可努力的方向

自然界中的生物環環相扣，當養殖池水達到生態平衡時，就能讓所有其中的動植物、藻類或微生物都得到最大的生存利益。現今對台灣每一海域不同深度海水所存在的藻類，浮游生物，微生物的組成，以及各種生物的特性，所知仍然有限。若能進一步研究，組合使用有益魚類生存或水質改善的藻類或微生物，則可促成養殖水體的生態穩定度，增進石斑魚苗或幼魚的活存率。石斑魚苗未來也可試用蓄養好的藻水來取代殺菌海水，在養殖區設立幾個池子，儲存抽入的海水，放入合宜的藻類及微生物，等其中的生態達到平衡後，再移至孵化池使用。

石斑魚因為肉食性魚種，在孵化後即開始投餵大量活餌，如輪蟲 (rotifer)、橈角類 (copepod) 及下雜魚等，此階段容易攝入帶有病毒之餌料生物；且石斑魚類殘食性高，易吞食虛弱的帶病魚隻；再加上養殖戶之間進排水位置相鄰等種種原因，都造成近年來

NNV 疫情重覆發生。農委會現在正積極協助研發單位及生技公司將各類石斑魚病原菌的疫苗證照化，好讓國內外的石斑魚養殖業者有疫苗可以購買與使用；政府有關單位也開始列預算整頓臨海地區的海水抽放水管。在政府這些努力之外，還需要養殖業者形成共識與約束力，一起遵守先經合格消毒養殖水後才排放，這樣持續實施，才能使南台灣의 NNV 疫區範圍漸漸縮減。此外，如何規範並獎勵運魚車及其用具在每一趟使用前都先有效消毒，如何鼓勵研究單位開發培養乾淨橈角類等活餌的養殖系統，如何開發台灣以外產銷的國際管道，讓台灣每年都有穩定的、大量的、無特定病原的魚苗可以外銷，這一切都還有待業界、學界與政府一起努力！

十、參考文獻

1. Arimoto, M., Mori, K., Nakai, T., Muroga, K. and I. Furusawa (1993) Pathogenicity of the causative agent of viral nervous necrosis disease in striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch and Schneider). J. Fish Dis., 16: 461-469.
2. Bloch, B., K. Gravningen and J. L. Larsen (1991) Encephalomyelitis among turbot associated with a picornavirus-like agent. Dis. Aquat. Organ., 10: 65-70.
3. Boonyaratpalin, S., K. Supamattaya, J. Kasornchandra and R. W. Hoffman (1996) Picorna-like virus associated with mortality and a spongiosis encephalopathy in grouper *Epinephelus malabaricus*. Dis. Aquat. Organ., 26: 75-80.
4. Breuil, G., J. R. Bonami, J. F. Pepin and Y. Pichot (1991) Viral infection (picorna-like virus) associated with mass mortalities in hatchery-reared sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and juveniles. Aquaculture, 97: 109-116.
5. Breuil, G., J. F. Pepin, J. Castric, C. Fauvel and R. Thiery (2000) Detection of serum antibodies against nodavirus in wild and farmed adult sea bass: Application to the screening of broodstock in sea bass hatcheries. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 20: 95-100.
6. Chi, S. C. (2007) Screening and characterization of Bacteria with anti-betanodavirus activity from grouper (*Epinephelus* sp.) intestine. 13th International Conference of the EAFP, September 17-22, Grado, Italy.
7. Chi, S. C., W. W. Hu and B. J. Lo (1999) Establishment and characterization of a continuous cell line (GF-1) derived from grouper, *Epinephelus coioides* (Hamilton): a cell line susceptible to grouper nervous necrosis virus (GNNV). J. Fish Dis., 22: 173-182.
8. Chi, S. C., B. J. Lo and S. C. Lin (2001) Characterization of grouper nervous necrosis virus (GNNV). J. Fish Dis., 24: 3-13.
9. Chi, S. C., J. R. Shieh and S. J. Lin (2003) Genetic and antigenic analysis of betanodaviruses isolated from aquatic organisms in Taiwan. Dis. Aquat. Organ., 55: 221-228.
10. Chi, S. C. and Chiou (2006) Development of one-step diagnosis kit for fish nodavirus. 4th International Veterinary Vaccines and Diagnostics Conference, 2006/6/25-29, Oslo, Norway.
11. Comps, M., M. Trindade and C. Delsert (1996) Investigation of fish encephalitis viruses (FEV) expression in marine fishes using DIG-labelled probes. Aquaculture, 143: 113-121.
12. Frerichs, G. N., H. D. Rodger and Z. Peric (1996) Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. J. Virol., 77: 2067-2071.
13. Fukuda, Y., H. D. Nguyen, M. Furuhashi and T. Nakai (1996) Mass mortality of cultured sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, associated with viral nervous necrosis. Fish Pathol., 31: 165-170.
14. Gagne, N., S. C. Johnson, M. Cook-Versloot, A. M. MacKinnon and G. Olivier (2004) Molecular detection and characterization of nodavirus in several marine fish species from the northeastern Atlantic. Dis. Aquat. Organ., 62: 181-189.
15. Glazebrook, J. S., Heasman, M. P. & de Beer, S. W. (1990) Picornalike viral particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch). J. Fish Dis., 13: 245-249.
16. Gomez, D. K., Baeck, G. W., Kim, J. H., Choresca, C. H. and Park, S. C. (2008a) Genetic analysis of betanodaviruses in subclinically infected aquarium fish and invertebrates. Current Microbiology, 56:

- 499-504.
17. Gomez, D. K., G. W. Baeck, J. H. Kim, C. H. Choresca and S. C. Park (2008b) Molecular detection of betanodaviruses from apparently healthy wild marine invertebrates. *J. Invertebr Pathol.*, 97: 197-202.
 18. Gomez, D. K., D. J. Lim, G. W. Baeck, H. J. Youn, N. S. Shin, H. Y. Youn, C. Y. Hwang, J. H. Park and S. C. Park (2006) Detection of betanodaviruses in apparently healthy aquarium fishes and invertebrates. *J. Vet. Sci.*, 7: 369-374.
 19. Gomez, D. K., J. Sato, K. Mushiake, T. Isshiki, Y. Okinaka and T. Nakai (2004) PCR-based detection of betanodaviruses from cultured and wild marine fish with no clinical signs. *J. Fish Dis.*, 27: 603-608.
 20. Grotmol, S., O. Bergh and G. K. Totland (1999) Transmission of viral encephalopathy and retinopathy (VER) to yolk-sac larvae of the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*: occurrence of nodavirus in various organs and a possible route of infection. *Dis. Aquat. Organ.*, 36: 95-106.
 21. Husgaro, S., S. Grotmol, B. K. Hjeltne, O. M. Rodseth and E. Biering (2001) Immune response to a recombinant capsid protein of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in turbot *Scophthalmus maximus* and Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*, and evaluation of a vaccine against SJNNV. *Dis. Aquat. Organ.*, 45: 33-44.
 22. Kai, Y. H. and S. C. Chi (2008) Efficacies of inactivated vaccines against betanodavirus in grouper larvae (*Epinephelus coioides*) by bath immunization. *Vaccine*, 26: 1450-1457.
 23. Kai, Y. H., H. M. Su, K. T. Tai and S. C. Chi (2009) Vaccination of grouper broodfish (*Epinephelus tukula*) reduces the risk of vertical transmission by nervous necrosis virus. *Vaccine*.
 24. Lai, Y. S., H. C. Chiu, S. Murali, I. C. Guo, S. C. Chen, K. Fang and C. Y. Chang (2001a) In vitro neutralization by monoclonal antibodies against yellow grouper nervous necrosis virus (YGNNV) and immunolocalization of virus infection in yellow grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis.*, 24: 237-244.
 25. Lai, Y. S., J. A. C. John, C. H. Lin, I. C. Guo, S. C. Chen, K. Fang and C. Y. Chang (2003) Establishment of cell lines from a tropical grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel), and their susceptibility to grouper irido- and nodaviruses. *J. Fish Dis.*, 26: 31-42.
 26. Lai, Y. S., S. Murali, H. C. Chiu, H. Y. Ju, Y. S. Lin, S. C. Chen, I. C. Guo, K. Fang and C. Y. Chang (2001b) Propagation of yellow grouper nervous necrosis virus (YGNNV) in a new nodavirus-susceptible cell line from yellow grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel), brain tissue. *J. Fish Dis.*, 24: 299-309.
 27. Lam, S. H., H. L. Chua, Z. Gong, T. J. Lam and Y. M. Sin (2004) Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study. *Developmental and Comparative Immunology*, 28(1): 9-28.
 28. Le Breton, A., L. Grisez, J. Sweetman and F. Ollevier (1997) Viral nervous necrosis (VNN) associated with mass mortalities in caged-reared sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *J. Fish Dis.*, 20: 145-151.
 29. Lin, C. C., J. H. Y. Lin, M. S. Chen and H. L. Yang (2007) An oral nervous necrosis virus vaccine that induces protective immunity in larvae of grouper (*Epinephelus coioides*). *Aquaculture*, 268: 265-273.
 30. Lin, C. S., M. W. Lu, L. Tang, W. T. Liu, C. B. Chao, C. J. Lin, N. K. Krishna, J. E. Johnson and A. Schneemann (2001) Characterization of virus-like particles assembled in a recombinant baculovirus system expressing the capsid protein of a fish nodavirus. *Virology*, 290: 50-58.
 31. Lin, J. H. Y., H. T. Lin, C. Lopez, T. Y. Chen, M. S. Chen and H. L. Yang (2008) A comparison of the expression of immunity-related rag 1 and ikaros genes with histogenesis of the thymus in *Epinephelus malabaricus* (Bloch & Schneider). *Aquaculture Research*, 39: 252-262.
 32. Liu, W. T., C. H. Hsu, C. Y. Chang, H. H. Chen and C. S. Lin (2006) Immune response against grouper nervous necrosis virus by vaccination of virus-like particles. *Vaccine*, 24: 6282-6287.
 33. Mori, K., T. Mangyoku, T. Iwamoto, M. Arimoto, S. Tanaka and T. Nakai (2003) Serological relationships among genotypic variants of betanodavirus. *Dis. Aquat. Organ.*, 57: 19-26.
 34. Mori, K., T. Nakai, K. Muroga, M. Arimoto, K. Mushiake and I. Furusawa (1992) Properties of a new virus belonging to nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. *Virology*, 187: 368-371.
 35. Mori, K., T. Nakai, M. Nagahara, K. Muroga, T. Mekuchi and T. Kanno (1991) A viral disease in hatchery-reared larvae and juveniles of redspotted grouper. *Fish Pathol.*, 26: 209-210.
 36. Munday, B. L., J. Kwang and N. Moody (2002) Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *J. Fish Dis.*, 25: 127-142.
 37. Munday, B. L. and T. Nakai (1997) Nodaviruses

- as pathogens in larval and juvenile marine finfish. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 13: 375-381.
38. Mushiake, K., M. Arimoto, T. Furusawa, I. Furusawa, T. Nakai and K. Muroga (1992) Detection of antibodies against striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) from brood stocks of striped jack. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58: 2235-2235.
 39. Mushiake, K., T. Nishizawa, T. Nakai, I. Furusawa and K. Muroga (1994) Control of VNN in striped jack – selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain-reaction (PCR). *Fish Pathol.*, 29: 177-182.
 40. Nguyen, H. D., T. Nakai and K. Muroga (1996) Progression of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) infection in naturally and experimentally infected striped jack *Pseudocaranx dentex* larvae. *Dis. Aquat. Organ.*, 24: 99-105.
 41. Nishizawa, T., K. Mori, T. Nakai, I. Furusawa and K. Muroga (1994) Polymerase chain reaction amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Dis. Aquat. Organ.*, 18: 103-107.
 42. Nylund, A., E. Karlsbakk, S. Nylund, T. E. Isaksen, M. Karlsen, K. Korsnes, S. Handeland, R. Martinsen, T. Mork Pedersen and K. F. Ottem (2008) New clade of betanodaviruses detected in wild and farmed cod (*Gadus morhua*) in Norway. *Arch Virol.*, 153: 541-547.
 43. Shieh, J. R. and S. C. Chi (2005) Production of monoclonal antibodies against grouper nervous necrosis virus (GNNV) and development of an antigen capture ELISA. *Dis. Aquat. Organ.*, 63: 53-60.
 44. Skliris, G. P. and R. H. Richards (1998) Assessment of the susceptibility of the brine shrimp *Artemia salina* and rotifer *Brachionus plicatilis* to experimental nodavirus infections. *Aquaculture*, 169: 133-141.
 45. Sommerset, I., S. Husgaard and A. H. Nerland (2001) Development of vaccines against nodavirus affecting Atlantic Halbut (*Hippoglossus hippoglossus*). Tenth International Conference of European Association of Fish Pathologists, 9-14 September, Dublin.
 46. Tanaka, S., K. Mori, M. Arimoto, T. Iwamoto and T. Nakai (2001) Protective immunity of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, against experimental viral nervous necrosis. *J. Fish Dis.*, 24: 15-22.
 47. Thiery, R., J. Cozien, J. Cabon, F. Lamour, M. Baud and A. Schneemann (2006) Induction of a protective immune response against viral nervous necrosis in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* by using betanodavirus virus-like particles. *J. Virol.*, 80: 10201-10207.
 48. Watanabe, K., T. Nishizawa and M. Yoshimizu (2000) Selection of brood stock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. *Dis. Aquat. Organ.*, 41: 219-223.
 49. Yoshikoshi, K. and K. Inoue (1990) Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis.*, 13: 69-77.
 50. Yoshimizu, M. and Y. Ezura (1999) Biological control of fish viral diseases by anti-viral substance producing bacteria. *Microb Environ*, 14: 269-275.
 51. Yoshimizu, M., H. Takizawa, Y. Kamei and T. Kimura (1986) Interaction between fish pathogenic viruses and microorganisms in fish rearing water: survival and inactivation of infectious pancreatic necrosis virus and *Onchirhynchus masou* virus in rearing water. *Fish Pathol.*, 21: 223-231.
 52. Yoshimizu, M. (2009) Control strategy for viral disease of salmonid fish, flounders and shrimp at hatchery and seed production facility in Japan. *Fish Pathol.*, 44(1): 9-13.