

MODEL PENULARAN KOI HERVES VIRUS PADA IKAN KOI (*Cyprinus carpio koi*) DI INDONESIA

Sri Oetami Madyowati¹, A.Kusyairi¹, Hari Suprpto²

¹Faculty of Agriculture University of Dr. Soetomo Jl. Semolowaru No. 84 Surabaya 60118
Indonesia

²Faculty of Fisheries and Marine Science, University of Airlangga, Jl. Mulyorejo Kampus C
Surabaya 60115 Indonesia

E-mail: oetamimadyowati@yahoo.com

ABSTRACT

Various models of transmission of KHV (through cohabitation, infection through food, water, and maintenance) in koi (Cyprinus carpio koi) shows that the rapid transmission occurs and koi fish will die all the different time periods between the various models of transmission. To model transmission through cohabitation deaths began to occur on day 3, the transmission through infected feed KHV on day 6, the transmission through the water maintaining day-to-2. Koi fish that died showed symptoms similar to positive control was marked by foul on the gills and then will soon die. Of the various models are a fast transmit KHV is transmitted through the water faster maintenance of the fish died on day-2 so that the transmission model is similar to the natural transmission (natural) because water is a fast medium for viral proliferation and spread of KHV .

Kata kunci : *Koi Herpes Virus, Cyprinus carpio koi, penyakit pada koi, metode deteksi KHV, cara penularan KHV.*

PENDAHULUAN

Virus ini pertama kali ditemukan di Israel pada 1998 lalu. Dari sana kemudian menyebar ke berbagai negara termasuk Eropa Utara, Afrika Selatan, Amerika, serta Jepang. Dua negara yang disebut terakhir disinyalir mendapat serangan virus ini melalui hasil impor benih ikan dari negara lain, seperti halnya di Indonesia. Titik masuk virus KHV ke Indonesia diperkirakan berasal dari Hongkong dan Taiwan melalui ikan Koi. Proses seleksi masuknya ikan koi sangat lemah karena petugas hanya memeriksa sampel saja. Selama pengawasan terhadap ikan impor masih lemah, peluang menyebarnya penyakit akan semakin besar. Setelah ikan koi itu berbaur dengan ikan lainnya di Indonesia maka virusnya mulai menyebar. Ikan yang tertular biasanya disimpan di kolam terbuka sehingga memudahkan penyebaran penyakit tersebut.

Penularan KHV yang cepat di dunia karena belum adanya peraturan tentang kesehatan perdagangan ikan koi. Saat ini perdagangan ikan di dunia dibutuhkan sertifikat kesehatan (Hedrick, 1996). Pemeriksaan sebelum pengapalan merupakan metode yang sangat baik untuk mencegah penularan KHV diseluruh dunia. Tetapi hal ini bergantung kepada sensitivitas peralatan dan metode yang digunakan untuk pemeriksaan.

Pertama kali virus ini merebak di Indonesia, yakni di Blitar pada awal 2002 lalu. Pada tahun yang sama di Bandung, tepatnya di Karang Setra, digelar suatu kontes ikan koi dan mendatangkan sejumlah koi ternama dari seluruh pelosok nusantara. Sejumlah peserta dari Blitar ikut bagian dalam kontes tersebut dan menjadi sebuah malapetaka baru bagi dunia perikanan air tawar di Jawa Barat. Banyak petani ikan berusaha menyelamatkan ikannya dari serangan virus ini dengan membawa ikannya menuju perairan yang lebih murni, seperti di Subang. Akibatnya virus ini malah makin menyebar ke mana-mana. Jika menyerang sebuah waduk atau sungai wabah tersebut akan sulit diatasi karena tidak mungkin sebuah waduk harus dikeringkan untuk memangkas siklus hidup virus. Siklus virus berkembang

pada saat perubahan suhu seperti pada perubahan musim kemarau ke hujan. Kondisi itu terjadi karena ikan biasanya akan melemah karena tingkat metabolismenya merendah dan berakibat pada turunnya daya tahan ikan. Virus KHV itu akan terus merebak dan berkembang biak jika ikan dalam keadaan lemah.

Secara khas penyakit ini sangat menular, namun serangan yang dapat menyebabkan sakit atau kematian hanya terbatas pada ikan koi dan mas. Virus ini menyerang sirip, hati dan limfa ikan, dan ikan yang terkena virus ini biasanya paling lama bertahan hidup dalam dua hari saja. Penyakit ini dapat menyerang berbagai ukuran ikan mulai larva hingga induk, biasanya terjadi pada kisaran suhu 18-28°C dan dapat menyebabkan kemaian 80-100% (Perelberg *et al.*, 2003; Gilad *et al.*, 2003). Pada ikan sakit, paling sering teramati luka pada insang, sisik, ginjal, limfa, jantung, dan sistem gastrointestinal (Ilouze *et al.*, 2006a). Secara visual pada bagian eksternal tubuh, dapat teramati adanya warna sisik yang gelap dan nekrosis insang yang akut (Choi *et al.*, 2004) dan hemoragik pada dasar sirip punggung, sirip dada, dan sirip anus (Grimmett *et al.*, 2006), sedangkan secara histologi dapat teramati adanya perubahan pada insang berupa kehilangan lamela (Pikarsky *et al.*, 2004).

Berdasarkan hasil pemikiran di atas maka penelitian ini bertujuan untuk mencari berbagai macam model penularan KHV (penularan melalui kohabitasi, pakan, dan air pemeliharaan) pada ikan koi. Di antara model tersebut manakah yang mendekati penularan seperti di alam (natural). Jika model penularan KHV pada ikan koi diketahui maka pencegahan penyakit yang disebabkan oleh KHV semakim mudah dilakukan oleh petani ikan.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fakultas Pertanian-Perikanan Universitas Dr. Soetomo Surabaya, Tropical Diseases Center dan Laboratorium Perikanan Universitas Airlangga Surabaya

Isolasi virus

Koi yang terinfeksi KHV diambil bagian insangnya ditimbang seberat 2 gram dan digerus dengan mortar. Kemudian ditambahkan L-15 yang mengandung Fetal bovine serum (FBS) dengan ratio 9:1, dipusingkan pada 2,000 g selama 10 min dan supernatan difilter dengan 0.45µm. Sediaan virus disimpan pada suhu -20°C sampai digunakan.

Pemurnian virus

Pemurnian virus dikerjakan menurut metode Oh (1995) sebagai berikut, insang yang terinfeksi digerus dalam STE buffer (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7.2). Supernatan yang dihasilkan disaring dengan Millipore filter (0.45µm) diencerkan pada STE buffer kemudian disentrifuse pada 4,000 rpm x g selama 20 min, kemudian supernatan dikumpulkan disentrifuse lagi 80,000 rpm x g selama 2 jam. Pellet (endapan) yang didapatkan diencerkan dengan STE buffer dan dipisahkan dengan *no linear sucrose gradient* 10 dan 50 % pada 100,000 rpm x g selama 2 jam. Virus yang didapatkan diencerkan dengan STE buffer dan dianalisa semalam terhadap STE buffer.

Replikasi virus

Terhadap sel satu lapis dilakukan pengamatan untuk mengecek keadaan sel, jika sel sehat kemudian dicuci dengan HBSS untuk mengambil sel yang mati. Kemudian ke dalam sel satu lapis dimasukkan 0.5 ml dari 10^3 KHV diinkubasikan selama 30 menit pada suhu 37°C . Setelah itu ditunggu beberapa menit sambil digoyang untuk meratakan penyerapan virus, kemudian dicuci sebanyak 3 kali dengan HBSS dan akhirnya ditambah dengan MEM hangat dengan suplemen 5% TPB 2% FBS ke dalam sel. Inkubasikan pada suhu 37°C pada CO_2 inkubator, amati setiap hari dan jika CPE telah sempurna ambil tube dan simpan -70°C sampai dipanen.

Model penularan

Dilakukan dengan berbagai macam cara untuk mengetahui model penularan KHV pada koi. Untuk memastikan penularan tersebut penyuntikan dengan KHV pada koi dilakukan sebagai kontrol positif (ikan disuntik dengan dosis 0,1 ml crude virus/ekor). Model penularan meliputi infeksi lewat :

1. Kohabitasi, ikan yang positif terkena KHV ditempelkan selama 1 menit dengan ikan koi yang sehat.
2. Pakan, pemberian pakan pelet yang telah dicampur dengan crude virus KHV yang diperoleh dari permunian virus (5gram pelet + 0,1 ml crude virus + 2 ml aquades) untuk sekali pemberian pakan. Pakan diberikan 2 kali sehari.
3. Melalui air pemeliharaan, dengan memasukkan potongan daging ikan koi yang positif terinfeksi KHV ($\pm 0,5$ gram)

Ikan tersebut akan dipelihara selama 14 hari sesudah terjadi kontak antara ikan sakit (kohabitasi), diberi pakan terkontaminasi KHV, atau penularan lewat air pemeliharaan yang juga terkontaminasi KHV. Kemudian setiap hari diamati kematiannya, untuk memastikan apakah ikan mati akibat infeksi KHV atau tidak dilakukan analisis PCR. Di antara berbagai macam model/metode penularan di atas manakah yang paling cepat menularkan KHV pada ikan koi dan mendekati penularan seperti di alam (natural). Adapun langkah kerja dalam metode PCR adalah sebagai berikut :

Sampel ikan

Sampel ikan diambil dari ikan yang mati selama perlakuan dengan menunjukkan gejala klinis terkena KHV seperti pada organ insang terdapat bintik-bintik putih atau kulit melepuh (luka). Kemudian dibedah dan diambil insangnya seberat 50 mg.

Ekstraksi DNA

Insang koi diambil 50 mg digerus dalam appendorf 2 ml. Lalu ditambah 1 ml DNA ekstraktion kit (DNAzol, tri reagent), kemudian dikocok dan inkubasi selama 5 menit pada suhu kamar. Selanjutnya disentrifuse pada 14000 rpm selama 10 menit dan supernatan dipindah ke appendorf baru. Supernatan diencerkan dengan menambahkan 0,5 ml alkohol 100% dan dikocok, setelah itu disentrifuge 10000 rpm selama 5 menit. Supernatan dipisahkan dari endapan kemudian ditambah 1 ml alkohol 90% pada endapan, kocok lalu sentrifuge pada 10000 rpm selama 5 menit (diulang sebanyak 3 kali). Pellet didiamkan pada suhu kamar selama 5-10 menit. Kemudian ditambah 5-200 μl Nuclease Free Water (ddH₂O) dan siap digunakan untuk amplifikasi.

Amplifikasi DNA

Memasukkan dalam appendorf 1 butir Master mix (d NTP, *Tag polimerase*, MgCl_2) lalu primer 1 μl , ddH₂O 23 μl , dan DNA template 1 μl hasil ekstraksi. Dihomogenase, lalu dimasukkan ke dalam *thermocycler* untuk melakukan amplifikasi DNA

Pemisahan produk PCR dengan Unit Elektroforesis Gel

Persiapan agarosa dengan memasang tangki elektroforesis, lalu tambahkan agar di dalam tangki elektroforesis, kemudian dimasukkan TAE encer ke dalam tangki elektroforesis. Ambil loading buffer sebanyak 2 µl di atas parafilm. Ambil marker sebanyak 1µl. Ambil sampel produk PCR masing-masing sebanyak 10 µl. Campur marker dengan loading dye, lalu masukkan ke dalam sumur (1). Campur sampel produk PCR dan loading buffer di atas parafilm, lalu masukkan ke dalam sumur (2). Campur kontrol positif dan loading buffer di atas parafilm, lalu masukkan ke dalam sumur (3). Campur kontrol negatif dan loading buffer di atas parafilm, lalu masukkan ke dalam sumur. Kemudian lakukan elektroforesis dengan voltase sebesar 120 volt selama 20 menit. Setelah selesai angkat gel agarosa, lalu rendam ke dalam EtBr selama 10 menit dan bilas dengan aquades.

Pengamatan hasil PCR

Setelah dielektroforesis, gel agarosa diamati hasilnya dengan menggunakan UV Transilluminator. Lalu didokumentasikan menggunakan kamera polaroid.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Pada percobaan yang dilakukan pada ikan koi diketahui bahwa penularan cepat terjadi dan ikan koi akan mati semua dengan jangka waktu yang berbeda antara berbagai macam model penularan. Ikan koi yang mati menunjukkan gejala yang sama dengan kontrol positif ialah busuk pada insang dan kemudian akan segera mati.

Penularan melalui kohabitasi

Pada hasil penularan melalui kohabitasi, ikan yang mati mulai hari ke-3 sebanyak 3 ekor, hari ke-4 sebanyak 3 ekor dan pada hari ke-5 ikan mati semua (Tabel 4)

Tabel 1. Patogenesis dari KHV terhadap ikan koi dengan kohabitasi. Suhu rata-rata air pada waktu penelitian adalah 25°C.

Model Penularan dengan Kohabitasi	Berat ikan (g)	Panjang ikan (cm)	Mati/tested
Hari ke-3	5,2	6,5	3/10
Hari ke-4	5,1	5,6	3/10
Hari ke-5	5,5	5,6	4/10

Penularan melalui infeksi lewat pakan

Model penularan KHV terhadap ikan koi melalui infeksi lewat pakan, ikan mulai mati pada hari ke-6 sebanyak 2 ekor, hari ke-7 sebanyak 2 ekor, hari ke-8 sebanyak 3 ekor dan pada hari ke-11 ikan mati 100% (Tabel 5)

Tabel 2. Patogenesis dari KHV terhadap ikan koi dengan pakan yang diinfeksi dengan KHV. Suhu rata-rata air pada waktu penelitian adalah 25°C.

Model Penularan dengan Pakan	Berat ikan (g)	Panjang ikan (cm)	Mati/tested
Hari ke-6	5,2	6,0	2/10
Hari ke-7	5,0	5,6	2/10

Hari ke-8	5,1	5,5	3/10
Hari ke-10	5,0	5,5	2/10
Hari ke-11	5,2	6,1	1/10

Penularan melalui air pemeliharaan

Penularan KHV melalui media air pemeliharaan ikan mulai menunjukkan kematian pada hari ke-2 sebanyak 3 ekor, hari ke-3 sebanyak 3 ekor, hari ke-4 sebanyak 3 ekor, dan ikan mati semua pada hari ke-5 (Tabel 6)

Tabel 3. Patogenesis dari KHV terhadap ikan koi melalui air pemeliharaan. Potongan daging ikan koi yang positif terinfeksi KHV (\pm 0,5 gram) dimasukkan ke dalam akuarium yang berisi ikan koi. Suhu rata-rata air pada waktu penelitian adalah 25°C.

Model Penularan Melalui air Pemeliharaan	Berat ikan (g)	Panjang ikan (cm)	Mati/tested
Hari ke-2	5,9	6,2	3/10
Hari ke-3	5,4	5,5	3/10
Hari ke-4	5,2	5,6	3/10
Hari ke-5	5,5	6,1	1/10

Pembahasan

Penularan melalui kohabitasi

Penularan melalui kohabitasi ikan mulai mati pada hari ke-3 (tiga hari setelah post infeksi) dan pada hari ke-5 sudah mati semua. Kematian ini diduga karena ikan langsung bersinggungan dengan ikan yang terinfeksi KHV, selain itu pada dasarnya ikan koi sangat sensitif terhadap infeksi KHV. Pada saat bersinggungan dengan ikan yang sehat KHV menemukan kembali inang yang baru sehingga dalam waktu 3 hari ikan sehat yang terinfeksi KHV akan mati karena pada dasarnya KHV dapat bertahan hidup jika ada inang tetapi jika tidak segera dapat inang ia akan mati. KHV dapat ditularkan khususnya pada ikan mas dan goldfish dengan bersentuhan dengan ikan yang luka dan goresan epitelium secara kohabitasi (Sonstegard and Sonstegard, 1987). Luka karena KHV akan terlihat setelah 60 hari pada suhu 10°C. KHV juga dapat ditularkan secara injeksi peritoneal dengan kultur sel yang terinfeksi virus (Sano *et al.*, 1985). Jika ikan yang disuntik dengan KHV dipelihara pada suhu 15°C maka luka akan kelihatan sekitar 5 bulan sesudah penyuntikan. Penularan KHV yang cepat di dunia karena belum adanya peraturan tentang kesehatan perdagangan ikan koi. Saat ini perdagangan ikan di dunia dibutuhkan sertifikat kesehatan (Hedrick, 1996). Pemeriksaan sebelum pengapalan merupakan metode yang sangat baik untuk mencegah penularan KHV di seluruh dunia. Tetapi hal ini bergantung pada sensitivitas peralatan dan metode yang digunakan untuk pemeriksaan. KHV saat ini bias diisolasi dengan menggunakan kultur sel KF-1 yang membutuhkan 7-10 hari inkubasi pada suhu 20°C (Hedrick *et al.*, 2000). Metode ini sangat efektif untuk mendeteksi virus pada waktu terjadi kematian tetapi tidak untuk *carrier fish* yang diyakini bertanggung jawab untuk penyebaran KHV. Setelah perlakuan kohabitasi selama 5 hari dengan ikan sakit pada kisaran temperatur 23-25°C yang memungkinkan penyakit menular (Perelberg *et al.*, 2003).

Penularan melalui infeksi lewat pakan

Penularan melalui infeksi lewat pakan tidak berakibat fatal bagi ikan, karena kandungan virus pada pakan tidak banyak dan kemungkinan banyak virus akan cepat mati. KHV lemah karena ada kemungkinan pakan yang diinfeksi tidak langsung dimakan. Selain itu, kemungkinan

pada beberapa kasus, virus tidak segera mendapatkan inang sehingga akan cepat mati. Virus merupakan agensia infeksi non-seluler dan hanya dapat melakukan multiplikasi dalam sel inang. Virus menggunakan sel inang sepenuhnya untuk reproduksi karena virus tidak memiliki organela. Untuk dapat bertahan di lingkungan, virus harus mampu berpindah dari inang satu ke lainnya, menginfeksi dan replikasi pada inang yang sesuai (Hoole *et al.*, 2001).

Kebanyakan ikan koi diberi makan dengan pakan buatan (pellet) dan jarang sekali diberi pakan alami, memang bagi sebagian orang koi adalah ikan hias yang cantik sehingga layak untuk dinikmati keindahannya. Warna koi dapat dipertegas dengan pemberian pakan tertentu, walaupun setiap jenis koi mempunyai pola dan warna dasar yang berbeda. Tidak jarang pula pada masyarakat tertentu corak warna diyakini membawa keberuntungan, sehingga membuat harga koi sangat mahal.

Penularan melalui air pemeliharaan

Penularan KHV melalui air pemeliharaan kematiannya mulai pada hari ke-2 dan pada hari ke-5 mati semua. Kematiannya berlangsung cepat karena melalui air virus berkembang biak dengan cepat dan menyebar dengan cepat pula. Kemudian KHV akan menginfeksi ikan koi yang sehat melalui seluruh permukaan tubuh yang kontak langsung dengan air, insang, mulut sehingga akan mengakibatkan kematian. Jika KHV mempunyai masa hidup yang lama dalam air akan mudah mencari inang yang baru. KHV akan lemah jika tidak ada inang, KHV eksis di luar tubuh inang hanya 4 jam. Koi yang terserang KHV menyebabkan kematian yang cepat, ikan akan mati dalam 24-48 jam. Ronen (2003) melaporkan jika ikan berada pada suhu 22°C akan mati dalam 15 hari sesudah infeksi, ditandai dengan luka serius pada insang yang menyebabkan kematian yang tinggi. Ikan tidak bisa bernapas karena kerusakan insang, selain kematian oleh infeksi virus, kematian yang tinggi juga disebabkan oleh kekurangan oksigen. Kekurangan oksigen menjadi faktor yang dapat mempertinggi kematian ikan koi dan dari berbagai model penularan, ternyata menunjukkan bahwa model penularan melalui air pemeliharaan ini mirip dengan penularan alami (natural) dan ikan cepat sekali mati. Karena kolam koi bukanlah kolam yang dalam dan koi hidup tidak jauh dari permukaan air sehingga sebenarnya koi dan mas selalu mendapat suplai oksigen yang banyak. Infeksi koi oleh KHV jika dilihat dari luar ditandai oleh pendarahan pada insang, terbenamnya mata, luka pada kulit. Jika dilihat dengan mikroskop luka tersebut penuh dengan bakteri dan berbagai parasit sedangkan tanda dalam adalah adesi pada rongga perut dan kerusakan organ dalam (Hedric *et al.*, 2000; OATA 2001) Ikan yang terserang berwarna pucat dan berubah warna pada insang dan kulit, juga terjadi pada organ internal. Pengamatan mikroskopi pada liver, limpa dan ginjal menunjukkan nekrosis pada sel parenkima dan debris pada macrofage (Hedrick *et al.*, 2000). Inklusi intranuklear mungkin terdapat pada sel yang terinfeksi dan virion yang khas untuk infeksi herpesvirus terdapat pada KHV.

Jika dilihat dari hasil penularan melalui air pemeliharaan, ternyata model ini mirip dengan penularan alami (natural) dan ikan cepat sekali mati. Model penularan lain kematiannya tidak secepat penularan melalui air pemeliharaan, dan KHV ini hanya menular dengan cepat di ikan koi saja.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari berbagai model penularan yang cepat menularkan KHV adalah penularan melalui air pemeliharaan, yaitu ikan lebih cepat mati pada hari ke-2 sehingga model penularan ini mirip dengan penularan alami (natural) karena air merupakan media yang cepat untuk berkembang biakan dan penyebaran virus KHV. Model penularan lain kematiannya tidak secepat penularan melalui air pemeliharaan dan KHV ini hanya menular dengan cepat di ikan koi saja.

Dengan mengetahui model penularan maka perlu ekstra hati-hati jika membawa bibit ikan dari satu daerah ke daerah lain dan jika ikan tersebut sudah terserang KHV maka harus segera diisolasi dengan cara menutup aliran air sesegera mungkin, ikan segera dipanen dan

dimusnahkan serta tidak melakukan jual beli ikan dari daerah yang terinfeksi ke daerah yang masih bebas.

UCAPAN TERIMA KASIH

Artikel ini merupakan hasil penelitian Hibah Penelitian Multi Tahun Ditjen Dikti (Hibah Pekerti Tahun ke II) sehingga penulis menyampaikan terima kasih kepada pengelola DIPA Ditjen Dikti yang telah membiayai semua penelitian ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Prof. DR. Ir. Hari Suprpto, M.Agr. sebagai Ketua Tim Peneliti Mitra (TPM) yang telah banyak membantu sehingga penelitian ini dapat terlaksana, serta saran dan kritik dalam penulisan artikel.

DAFTAR PUSTAKA

- Anders K, and H Moller. (1985). Spawning papillomatosis of smelt *Osmerus eperlanus* L from the Elbe estuary. *Journal Fish Disease*. 8: 233-235.
- Ahne W, HV Bjorklund, S Essbauer, N Fijan, G Kurath, JR Winton. (2002). *Spring viremia of carp (SVC) Diseases of Aquatic Organism*. 52: 261-272.
- Body A, F Loeffrig, C Charlier, A Collard. (2000). Isolation of virus-like particles from koi *Cyprinus carpio koi* suffering gill necrosis. *Bull. European Association Fish Pathology*. 20: 87-88.
- Bretzinger A, T Fischer-Scherl, M.Oumouna, R Hoffman, U Truyen. (1999). Mass mortality in koi *Cyprinus carpio koi* associated with gill and skin disease. *Bull. European Association Fish Pathology*. 19: 182-185.
- Fijan N. (1999). *Spring viremia of carp and other viral disease of warm water fish*. In : Woo PTK, Bruno DW (eds) *Fish Disease and disorders*. Vol.3 CAB International Oxon 177-244.
- Gilad O, S Yun, K B Andree, M A Adkison, A.Zlotkin, H Berkovier, A Eldar and R P Hedrick. (2002). Initial characteristic of koi herpesvirus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi *Cyprinus carpio koi*. *Journal Disease Aquatic Organism*. 48: 101-108.
- Gilad O, S Yun, K B Andree, M A Adkison, K Way, NH Willitz, H Berkovier, and R P Hedrick. (2003). Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus and effect of the temperature on mortality of experimentally infected koi. *Journal of General Virology*. 84: 2661-2668.
- Gray, ML, L Mulis, SE Patra, JM Groff, A Goodwin. (2002). Detection of koi herpesvirus DNA in tissue of infected fish. *Journal of Fish Disease*. 25: 171-178.
- Hedrick RP, O Gilad, S Yun, J V Spangenberg, G D Marty, R W Nordhausen, and 3 others. (2000). A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. *Journal Aquatic Anim Health*. 12: 44-57.
- Hines RS, GW Wohlfarth, R Moav and G Hulata. (1974). Genetic differences in susceptibility to two diseases among strain of the common carp. *Aquaculture*. 3: 187-197.
- Nigrelli RF. (1952). *Virus and tumor in fishes*. Ann.N.Y.Acad.Sci 54, 1076-1092.
- Neukirch M, K Bottcher and S Bunajirakkul. (1999). Isolation of virus from koi with altered gill. *Bull.European Association Fish Pathology*. 19: 221-224.
- Pererlberg A, M Smirnov, M Hutoran, Y Bejerano and M Kotler. (2003). Epidemiological description of a new viral disease afflicting cultured *Cyprinus carpio* in Israel. *Israeli Journal of Aquaculture*. 55 (1): 5-12.
- Pikarsky E, A Ronen, J Abramowitz, B Levavi-Sivan, M Hutoran, Y Shapira, M Steinitz, A Perelberg, D Soffer and M Kotler. (2004). Pathogenesis of acute viral disease in

- fish by carp interstitial nephritis and gill necrosis virus. *Journal of Virology*. 78: 9544-9551.
- Pokorova D, T Vesely, V Piackova, S Reschova dan J Hulova. (2005). *Current knowledge on koi herpesvirus (KHV) ; a review*. *Vet. Med-Czech*. 50 (4): 139-147.
- Sano T, H Fukuda, M Furukawa. (1985a). Herpesvirus cyprini : biological and oncogenic properties. *Journal Fish Pathol*. 20: 381-388.
- Sano T, H Fukuda, M Furukawa, H Hosoya and Y Moriya. (1985b). *A herpesvirus isolated from carp papilloma in Japan*. In; *Fish and Shellfish Pathology*. Ed By A.E.Ellis. Academic Press London. 307-311.
- Schlumberger HG, and B.Lucke. (1948). *Tumor of fishes, amphibians and reptiles*. *Cancers Res*. 8: 657-754.
- Sonstegard R A and K S Sonstegard. (1987). Herpesvirus associated epidermal hyperplasia in fish (carp). In : *Proceeding of an International Symposium Oncogenesis and Herpesvirus*. Eds. By G. de The, W.Henle and F.Rapp. International Agency Res. Cancers-Sci. Publication. 24: 863-868.