การตรวจหาเชื้อไวรัสเคเอชวีในปลาคาร์พ (*Cyprinus carpio koi*) โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสต่อ ไทมิดีน ไคเนส ยีนส์ (thymidine kinase gene)

DETECTION OF KOI HERPES VIRUS IN KOI (*CYPRINUS CARPIO KOI*) BY THYMIDINE KINASE GENE BASED POLYMERASE CHAIN REACTION

สุรชัย พิกุลแก้ว [1] ทองกร มีแย้ม [2] วรรณา ศิริมานะพงษ์ [3] ศรุดา ติวะนันทกร [4]

[1]สาขาวิชาคลินิกสัตว์บริโภค [2]สาขาวิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข [4]สาขาวิชาพาราคลินิกทางสัตวแพทย์, คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50100. [3]คณะสัตวแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล นครปฐม 73170

บทคัดย่อ

ตรวจหาไทมิดีน ไคเนส ยีนส์ (thymidine kinase gene) ของเชื้อคอยเฮอร์ปีส์ไวรัส(เคเอชวี) จากตัวอย่างเหงือกในปลาคาร์พโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส จำนวนทั้งหมด 50 ตัวอย่าง โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่แสดงอาการทางคลินิกโดยมีรอยโรคที่เหงือก และผิวหนัง หรือมีอัตราการตาย จำนวน 24 ตัวอย่าง และกลุ่มที่ไม่แสดงอาการทางคลินิกจำนวน 26 ตัวอย่าง ผลการศึกษาพบว่าในกลุ่มที่แสดงอาการทางคลินิกตรวจพบไทมิดีน ไคเนส ยีนส์ของเชื้อไวรัสเคเอชวีคิดเป็น 79.17 % (19/24) ส่วนกลุ่มที่ไม่แสดงอาการทางคลินิกตรวจไม่พบไทมิดีน ไคเนส ยีนส์ของเชื้อไวรัสเคเอชวี ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยโรคคอยเฮอร์ปีส์ไวรัส นอกจากการสังเกตอาการทางคลินิกแล้ว การตรวจหาไทมิดีน ไคเนส ยีนส์ของเชื้อคอยเฮอร์ปีส์ไวรัสโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสเป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยในการตรวจวินิจฉัยยืนยันการติดเชื้อได้

Abstract

Detection of thymidine kinase gene of koi herpes virus (KHV) from koi's gill samples by using polymerase chain reaction was performed. The fifty samples were divided into 2 groups including 24 samples of the clinical sign group with the skin and gill lesions and mortality rate and 26 samples of the non-clinical sign group. The result showed that 79.17 % (19/24) of clinical sign group was positive with thymidine kinase gene by using PCR, but the non-clinical sign group was not. Therefore, the detection of thymidine kinase gene of KHV by PCR is the confirmative diagnosis method concurrent with the clinical sign observation.

คำนำ

เชื้อไวรัสเคเอชวี (Koi Herpes Virus ; KHV) แยกได้ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2541 โดยได้ชื่อว่า carp interstitial nephritis and gill necrosis virus (CNGV) ซึ่งเรียกตามลักษณะอาการที่ก่อโรค (Hedrick *et al.,* 2000) แต่ต่อมามาได้เปลี่ยนชื่อเป็นเชื้อ koi herpes virus หรือ KHV โรคคอยเฮอร์ปีส์ไวรัส หรือเคเอชวี เป็นโรคระบาดที่สำคัญในปลาคาร์พ (fancy carp หรือ koi ; *Cyprinus carpio koi*) และปลาไน (common carp ; *Cyprinus carpio*) พบการระบาดรุนแรงครั้งแรกในปี พ.ศ. 2541 ที่ประเทศอิสราเอลและประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งทำให้ปลาที่ติดเชื้อมีอัตราการตายสูงถึง 80 - 100 % โดยเฉพาะในปลาคาร์พอายุน้อยเนื่องจากจะพบเชื้อนี้ก่อโรคเฉพาะในปลาคาร์พ และปลาไนเท่านั้น (Pikarsky *et al.,* 2004) อาการทางคลินิกที่พบ คือ ปลาจะว่ายน้ำผิดปกติ อ่อนแรง (Shapira *et al.,* 2005) เมื่อเปิดเหงือกดูพบเนื้อตายและการบวมของเหงือก (gill filament) ทำให้ปลาแสดงอาการหายใจลำบาก มีเมือกที่ลำตัวจำนวนมาก หรือพบผิวหนังซีดเป็นวงกว้าง และตาลึก (Gilad *et al.,* 2004) รวมถึงพบการติดเชื้อแทรกซ้อนอย่างรุนแรงจากพยาธิภายนอก เชื้อรา และเชื้อแบคทีเรีย (Pikarsky *et al.,* 2004; Shapira *et al.,* 2005; Pikulkaew *et al.,* 2005) และยังพบการบวมของตับและม้าม ความรุนแรงของโรคจะทำให้ปลามีอัตราการตายที่ค่อนข้างสูง (Shapira *et al.,* 2005) โดยอุณหภูมิที่มักมีการระบาดของโรคอยู่ระหว่าง 18 - 26 องศาเซลเซียส (Gilad *et al.,* 2004) แต่จะก่ออาการรุนแรงมากที่อุณหภูมิระหว่าง 22 - 24 องศาเซลเซียส (Shapira *et al.,* 2005)

วิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อเคเอชวี คือ ดูจากอาการทางคลินิก และการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งได้แก่ การศึกษาด้านจุลพยาธิวิทยา การแยกเชื้อไวรัส (viral isolation) โดยใช้ koi fin (KF-1) cell line หรือ KHV cell (Gilad *et al.,* 2003) วิธีทางอณูชีวโมเลกุล เช่น DNA hybridization, วิธี loop-mediated isothermal amplification (Gunimaladevi *et al.,* 2004) หรือวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase chain reaction; PCR) (Gilad *et al*., 2002 ; Gray *et al*., 2002) อวัยวะที่สามารถตรวจพบเชื้อ คือ เหงือก ไต ม้าม รวมถึงสมอง ลำไส้ และตับ แต่มักนิยมใช้เหงือก ไต และม้าม สำหรับในประเทศไทยมีการตรวจพบเชื้อโดยสถาบันสุขภาพสัตว์น้ำจืด กรมประมง ในเดือนมีนาคม 2549 (สถาบันสุขภาพสัตว์น้ำจืด, 2549) และต่อมาได้มีการรายงานเพิ่มเติมของในปลาคาร์พที่ติดโรคนี้ (นันทริกา และคณะ 2548; Pikulkaew *et al.,* 2005) ในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการรักษาโรคเคเอชวีที่ได้ผล แต่มีการศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการใช้ attenuated virus vaccine ในปลาไนที่เพาะเลี้ยงในระบบฟาร์ม (Perelberg *et al*., 2005) รวมทั้งมุ่งเน้นไปที่ระบบการป้องกันโรค หรือการควบคุมการระบาดของโรคที่ถูกวิธี (สถาบันสุขภาพสัตว์น้ำจืด, 2549)

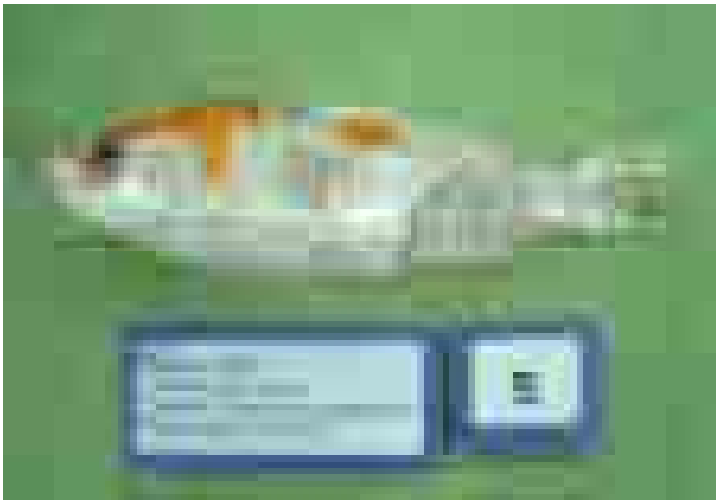
การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวินิจฉัยยืนยันปลาคาร์พที่แสดงอาการทางคลินิก และไม่แสดงอาการทางคลินิก ที่เข้ามารับการตรวจในห้องปฏิบัติการอณูชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสที่จำเพาะต่อ ไทมิดีน ไคเนส ยีนส์

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บข้อมูลทางคลินิก

ตัวอย่างเหงือกของปลาคาร์พ (*Cyprinus carpio koi*) จำนวนทั้งหมด 50 ตัวอย่าง ที่เข้ามารับการตรวจวินิจฉัยในคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยบันทึกอาการทางคลินิก คือ อาการทางผิวหนัง เช่น เกิดการตกเลือด ก้อนหรือปื้นขาว ผิวหนังลอกหลุด ครีบกร่อน อาการทางเหงือก เช่น เหงือกเน่าหรือเนื้อเหงือกตาย (รูปที่ 1 และ 2) และบันทึกอัตราการตาย จากนั้นทำการแยกตัวอย่างเหงือกที่เก็บได้แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่แสดงอาการทางคลินิกในขณะที่ทำการเก็บตัวอย่าง และกลุ่มที่ไม่แสดงอาการทางคลินิกในขณะที่ทำการเก็บตัวอย่าง

รูปที่ 1 แสดงลักษณะแผลหลุมและตกเลือด



รูปที่ 2 แสดงผิวหนังลอกหลุดและครีบกร่อน

2. การเก็บตัวอย่างและการเตรียมสารดีเอ็นเอ (DNA extraction)

ทำการสลบปลาด้วยน้ำมันกานพลูในขนาด 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างโดยวิธีปราศจากเชื้อจากเนื้อเยื่อเหงือกจำนวนไม่น้อยกว่า 10 มิลลิกรัม ในหลอดเก็บตัวอย่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการสกัดสารดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัด Qiamp DNA minikit (Qiagen®) และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

3. วิธีเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสที่จำเพาะต่อ ไทมิดีน ไคเนส ยีนส์ (thymidine kinase gene) **ตามวิธีของ** Bercovier *et al*, 2005

การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชุด ได้แก่ KHV-TKf (5'-GGGTTACCTGTACGAG-3') และ KHV-TKr (5'-CACCCAGTAGATTATGC-3') ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสประกอบด้วย MasterMix™ (Eppendorf) 10 ไมโครลิตร, KHV-TKf และ KHV-TKr อย่างละ 0.2 uM, สารสกัดดีเอ็นเอตัวอย่าง 2.1 ไมโครลิตร และเติมน้ำบริสุทธิ์จนได้ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยผ่านเครื่องหมุนเวียนอุณหภูมิ โดยใช้ 95 °ซ นาน 5 นาที ตามด้วย 35 รอบของ 95 °ซ 30 วินาที, 52 °ซ 30 วินาที และ 72 °ซ 60 วินาที และครั้งสุดท้ายที่ 72 °ซ เป็นเวลา10 นาที

4. การอ่านผลการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม

การอ่านผลการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม โดยจะอ่านจาก 1.5 % Agarose gel electrophoresis ซึ่งย้อมด้วย 0.15% ethidium bromide สังเกตแถบสารพันธุกรรมผ่านแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) เทียบกับกลุ่มควบคุมบวก และ สารที่ใช้เทียบขนาดพันธุกรรม (100 bp DNA ladder) ที่ขนาดประมาณ 409 bp

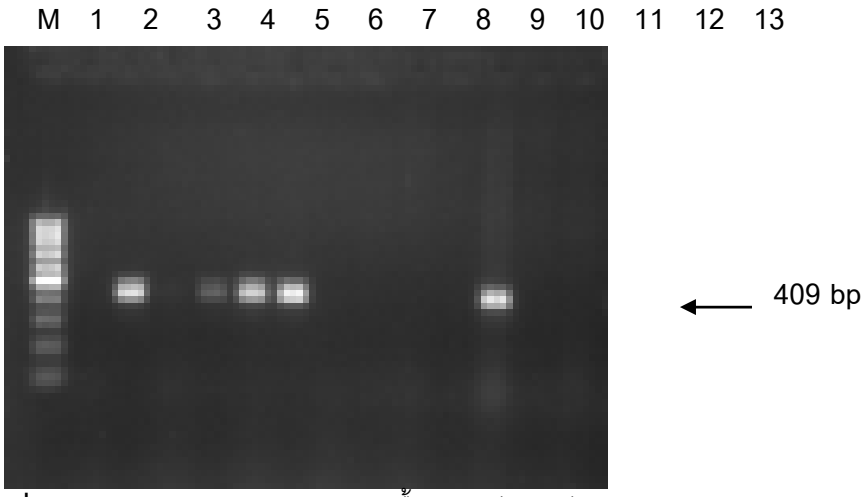
ผลการวิจัย

กลุ่มที่แสดงอาการ

ตัวอย่างเหงือกที่ให้ผลบวกโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสที่จำเพาะต่อ ไทมิดีน ไคเนส ยีนส์ (รูปที่ 3) พบว่ามีเฉพาะในกลุ่มที่แสดงอาการทางคลินิกเท่านั้น โดยคิดเป็น 79.17 % จากทั้งหมด 24 ตัวอย่าง ส่วนกลุ่มที่ไม่แสดงอาการทางคลินิกขณะที่ทำการเก็บตัวอย่างเหงือกไปตรวจจะไม่พบผลบวกต่อไทมิดีน ไคเนส ยีนส์ เลย (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนตัวอย่างปลาคาร์พเหงือกที่ตรวจด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสที่จำเพาะต่อไทมิดีน ไคเนส ยีนส์

กลุ่ม	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างผลบวก (ร้อยละ)	จำนวนตัวอย่างผลลบ (ร้อยละ)
แสดงอาการทางคลินิก	24	19 (79.17 %)	5 (20.83 %)
ไม่แสดงอาการทางคลินิก	26	-	26 (100 %)



รูปที่ 1 : แสดงตัวอย่างผลการตรวจหาเชื้อเคเอชวีโดยวิธี PCR

แถว M : 100 bp DNA marker (Fermentas),แถว 1 : negative control (น้ำกลั่น), แถว 2 : positive control,

แถว 3 - 11 : ตัวอย่างจากปลาคาร์พที่แสดงอาการทางคลินิก และ

แถว 12 - 13 : ตัวอย่างจากปลาคาร์พที่ไม่แสดงอาการทางคลินิก

วิจารณ์

การตรวจหาเชื้อไวรัสเคเอชวีในเหงือกของปลาคาร์พ โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสที่จำเพาะต่อไทมิดีน ไคเนส ยีนส์ ตามวิธีของ Bercovier *et al.* (2005) จำนวนทั้งหมด 50 ตัวอย่าง พบว่าในกลุ่มที่แสดงอาการทางคลินิกจำนวน 24 ตัวอย่าง ให้ผลบวกจำนวน 19 ตัวอย่าง หรือคิดเป็น 79.17 % แต่อีก 20.83 % ให้ผลลบต่อไทมิดีน ไคเนส ยีนส์ ปลาที่ติดเชื้อไวรัสเคเอชวีจะมีอาการทางคลินิกที่สำคัญคือ มีอัตราการตายสูงมากกว่า 50 % พบการติดเชื้อพยาธิภายนอก เช่น ปลิงใส เห็บระฆัง และเชื้อราชนิด *Sapolegnia* sp. ที่ผิวหนังและเหงือก พบการตกเลือดที่ผิวหนังอย่างรุนแรง เหงือกกร่อน ร่วมกับการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน ทำให้ปลาตายจำนวนมาก (Hedrick *et al*., 2000 ; Perelberg *et al*., 2005; Pikulkaew *et al*., 2005) แต่ในกลุ่มที่แสดงอาการทางคลินิกแต่ให้ผลลบต่อวิธี PCR เป็นไปได้ว่าเชื้อไวรัสเคเอชวีอาจจะไม่ใช่สาเหตุของการป่วยเนื่องจากการติดเชื้ออื่นๆ เช่น เชื้อไวรัส spring viremia of carp (SVC) หรือโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่เหงือก ก็สามารถก่อให้เกิดอาการคล้ายคลึงกับโรคเคเอชวีได้ (Hartman *et al.*) ดังนั้นการวินิจฉัยโรคเคเอชวีโดยสังเกตอาการทางคลินิกเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอต่อการวินิจฉัยโรคได้ จึงควรมีเทคนิคในการตรวจวินิจฉัยโรคที่มีความจำเพาะสูงเพื่อช่วยในการยืนยัน ได้แก่ วิธีการเพาะแยกเชื้อไวรัส ซึ่งถือว่าเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสโดยทั่วไป (Pikarsky *et al*., 2004) แต่เนื่องจากเป็นวิธีที่ต้องใช้เวลาในการวินิจฉัยค่อนข้างนาน จึงมีผู้พัฒนาวิธีการวินิจฉัยโรคโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส ซึ่ง เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมเนื่องจากมีความแม่นยำสูงและรวดเร็ว

สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสเคเอชวีนั้น ได้มีการพัฒนามาอย่างต่อเนื่อง เช่น Gilad *et al.* (2002) และ Gray *et al.* (2002) แต่วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสของ Gilad *et al.* และ Gray *et al.* นั้นจะมีความไวและจำเพาะน้อย เนื่องจากชุดไพรเมอร์ที่ถูกเลือกมานั้นเป็นลำดับของสายพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเคเอชวีในยีนส่วนที่ไม่สามารถระบุหน้าที่ได้แน่ชัด ซึ่งยีนเหล่านี้จะเกิดการผ่าเหล่าได้ง่ายกว่าการเลือกชุดไพรเมอร์จากลำดับของสายพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเคเอชวีของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อความรุนแรงของโรคหรือยีนส่วนที่เป็นโครงสร้างหลัก ซึ่งการผ่าเหล่าของเชื้อไวรัสนั้นจะส่งผลให้คุณภาพของการตรวจวินิจฉัยโรคลดลงได้ (Bercovier *et al.*, 2005) ซึ่งในปี 2005 Bercovier *et al.* ได้พัฒนาวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสขึ้นโดยได้เลือกชุดไพรเมอร์จากลำดับของสายพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเคเอชวีของยีนที่ชื่อว่า ไทมิดีน ไคเนส ยีนส์ ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อความรุนแรงของโรค โดยได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีวินิจฉัย ได้แก่ การสังเกตอาการทางคลินิก, ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสที่คิดค้นโดย Gilad *et al.* (2002), Gray *et al.* (2002) และการเพาะแยกเชื้อไวรัส ผลการศึกษาพบว่า วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสที่จำเพาะต่อไทมิดีน ไคเนส ยีนส์ มีความไวเทียบเท่ากับวิธีการเพาะแยกเชื้อ สามารถตรวจวินิจฉัยได้ถึงแม้จะมีปริมาณเชื้ออยู่เพียง 30 อนุภาคไวรัส หรือเท่ากับดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสเคเอชวีเพียง 10 เฟนโตกรัมเท่านั้น

จากการศึกษาครั้งนี้ ไม่สามารถตรวจพบไทมิดีน ไคเนส ยีนส์ ในตัวอย่างจากปลากลุ่มที่ไม่แสดงอาการทางคลินิกเลย แต่อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดว่าไม่มีการติดเชื้อในปลา เนื่องจากปลาที่เคยติดเชื้อหรือแสดงอาการ แต่สามารถหายได้เป็นปกตินั้นก็ไม่สามารถตรวจพบเชื้อจากเหงือกเช่นกัน (ข้อมูลไม่ได้แสดง) ซึ่งเป็นสิ่งที่ควรทำการศึกษาเพิ่มเติม ดังนั้นจากากรศึกษาครั้งนี้พบว่าโรคเคเอชวีในปลาคาร์พ ปลามักจะแสดงความผิดปกติที่ผิวหนังและเหงือกรวมทั้งมีการติดเชื้อแทรกซ้อนหลายชนิด อย่างไรก็ตามรอยโรคดังกล่าวเพียงอย่างเดียวไม่สามารถใช้เป็นการวินิจฉัยโรคเคเอชวีได้ ควรวินิจฉัยยืนยันโดยเทคนิคที่มีความจำเพาะต่อเชื้อสูง เช่น วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสเพื่อตรวจหาไทมิดีน ไคเนส ยีนส์ ของเชื้อไวรัสเคเอชวี การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา และอิมมูนโนฮิสโตเคมี หรือการเพาะแยกเชื้อไวรัส ควบคู่ไปเพื่อความแม่นยำในการวินิจฉัยโรค

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ

ทุนสนับสนุนการวิจัยจากชมรมคนรักปลาคาร์พแห่งประเทศไทย (KOI FAN CLUB. NET) และผู้มีพระคุณในชนรมทุกท่าน

สถานที่ในการทำวิจัยจากคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

รวมทั้งเจ้าของปลาคาร์พทุกท่านที่ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดีในการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

นันทริกา ชันซื่อ จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์. 2548. การสำรวจโรคเคเอชวีของปลาคาร์พในเขตกรุงเทพฯและปริมณฑล ระหว่างเดือนมีนาคมถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ.2548. สัตวแพทยสาร. 56.(3): 13 - 21.

สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด. 2549. โรคไวรัสเคเอชวี. เอกสารเผยแพร่ความรู้. สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 12 หน้า.

Bercovier H, Fishman Y, Nahary R, Sinai S, Zlotkin A, Eyngor M, Gilad O, Eldar A, Hedrick RP. 2005. Cloning of the koi herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis. BMC Microbiol. ~~~~~ 5 - 13.

Gilad, O., Yun, S., Andree, K. B., Adkison, M. A., Zlotkin, A., Bercovier, H., Eldar, A., and Hedrick, R. P. 2002. Initial characteristics of koi herpesvirus and development of polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio koi*. Dis. Aquat. Org. 48 : 101-108.

Gilad, O., Yun, S., Adkison, M. A., Way, K., Willits, N. H., Bercovier, H., and Hedrick, R. P. 2003. Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi. J. Gen. Viro. 84 : 2661-2668.

Gilad O., Yun S., Zagmutt-Vergara F. J., Leutenegger C. M., Bercovier H., Hedrick R. P. 2004. Concentrations of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio koi* as assessed by real-time TaqMan PCR. Dis. Aquat. Org. 60 : 179-187.

Gray, W. L., Mullis, L., LaPatra, S. E., Groff, J. M., and Goodwin, A. 2002. Detection of koi herpesvirus DNA in tissues of infected fish. J. Fish. Dis. 25 : 171-178.

Gunimaladevi, I., Kono, T., Venugopal, M. N., and Sakai, M. 2004. Detection of koi herpesvirus in common carp, *Cyprinus carpio* L., by loop-mediated isothermal amplification. J. Fish. Dis. 27 : 583-589.

Hartman, K.H., Yanong, R.P.E., Petty, B.D, Francis-Floyd, R. and Riggs, A.C. Koi Herpes Virus (KHV) Disease. IFAS extension. University of Fiorida. (available from: http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/VM/VM11300.pdf#search=%22koi%20herpes%20diagnosis%20pdf%22)

Hedrick, R. P., Gilad, O., Yun, S., and Spangenberg, J. V. 2000. A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. J. Aqut. Anim. Health. 12 : 44–57.

Perelberg, A., Ronen, A., Hutoran, M., Smith, Y., and Kotler, M. 2005. Protection of cultured *Cyprinus carpio* against a lethal viral disease by an attenuated virus vaccine. Vaccine. 23 : 3396-3403.

Pikarsky, E., Ronen, A., Abramowitz, J., Levavi-Sivan, B., Hutoran, M., Shapira, Y., Steinitz, M., Perelberg, A., Soffer, D., and Kotler, M. 2004. Pathogenesis of acute viral disease induced in fish by carp interstitial nephritis and gill necrosis virus. J. of Virol. 78(17) : 9544 –9551.

Pikulkaew, S., Banlunara, W., Meeyam, T., and Khattiya R. 2005. The detection of koi herpesvirus (KHV) in *Cyprinus carpio koi* in Chiang Mai, Thailand. Proceeding of the 1st Scientific Meeting of the Asian Zoo & Wildlife Medicine 2005 : Collaboration on Conservation Medicine for Zoo and Wildlife in Asia; 2005 Oct 28-30. Bangkok : College of Veterinary Medicine, Kasetsart University.

Shapira, Y., Magen, Y., Zak, T., Kotler, M., Hulata, G., and Levavi-Sivan, B. 2005. Differential resistance to koi herpes virus (KHV) / carp interstitial nephritis and gill necrosis virus (CNGV) among common carp (*Cyprinus carpio* L.) strains and crossbreds. Aquaculture. 245 : 1–11.