จีโนไทป์ของ cyprinid herpesvirus type-3 ที่พบในเขตกรุงเทพมหานครในปี 2552

ทินรัตน์ ศรีสุวรรณ์* ตวงทอง ปัจฉิมะศิริ สุพรรษา ทางดี

cyprinid herpesvirus type-3 (CyHV3; koi herpesvirus, KHV) เป็นไวรัสที่ก่อโรคระบาดรุนแรงในปลาไนและปลาคาร์พโดยเฉพาะในลูกปลาวัยอ่อน ซึ่งส่งผลกระทบต่อการเคลื่อนย้ายและขนส่งปลาเพื่อการค้าระหว่างประเทศ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาจีโนไทป์ของเชื้อ CyHV3 ที่พบในเขตกรุงเทพมหานครในปี 2552 ผลการตรวจปลาคาร์พจำนวน 33 ตัวอย่างจากแหล่งเลี้ยงปลา 33 แหล่งด้วยวิธี PCR พบ CyHV3 จำนวน 8 ตัวอย่าง และจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี duplex PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าเชื้อทั้ง 8 ตัวอย่างเป็นชนิด CyHV3-J (Japanese genotype) โดยไม่พบชนิด CyHV3-U (American genotype) หรือ CyHV3-I (Israeli genotype) ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้เป็นข้อมูลเชิงระบาดวิทยาเบื้องต้นที่สำคัญ ที่อาจใช้ในการสืบย้อนถึงแหล่งที่มาหรือต้นตอของเชื้อดังกล่าวได้ นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ในการวางแผนป้องกันและควบคุมการเคลื่อนย้ายปลาคาร์พ เพื่อการนำเข้าและส่งออกต่อไป

คำสำคัญ ปลาคาร์พ, CyHV3, KHV

บทนำ

cyprinid herpesvirus type-3 (CyHV3; koi herpesvirus, KHV) เป็นเชื้อไวรัสที่ก่อโรคเคเอชวี (koi herpesvirus disease, KHVD) ซึ่งเป็นโรคระบาดรุนแรงในปลาไน (*Cyprinus carpio*) รวมทั้งปลาคาร์พสายพันธุ์ต่างๆ โรคนี้พบได้ในหลายประเทศทั่วโลก ทั้งในปลาที่เลี้ยงไว้เพื่อการค้าและปลาที่จับจากแหล่งน้ำธรรมชาติ (OIE, 2009a, b) อาการของปลาที่ติดเชื้อ ได้แก่ ไตอักเสบ เนื้อเยื่อเหงือกตายและลอกหลุด และปริมาณเมือกบริเวณลำตัวมากผิดปกติ อัตราการป่วยและอัตราการตายอาจสูงถึง 100% เชื้อ CyHV3 สามารถแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็วระหว่างการขนส่งปลาเพื่อการค้า รวมทั้งการนำปลาคาร์พสวยงามไปจัดแสดงตามสถานที่ต่างๆ (Haenen *et al*., 2004) นอกจากนี้ยังพบว่าปลาที่มีสุขภาพปกติอาจมีการติดเชื้อแบบแอบแฝงได้ โดยภาวะการติดเชื้อแอบแฝงดังกล่าวขึ้นกับอุณหภูมิของน้ำที่ปลาอาศัยอยู่ (Gilad *et al*., 2003; St-Hilaire *et al*., 2005) กล่าวคือ ที่อุณหภูมิของน้ำต่ำกว่า 16°C หรือสูงกว่า 28°C ปลาที่ติดเชื้อมักไม่แสดงอาการใดๆ แต่มีเชื้อไวรัสหลบซ่อนอยู่ และเชื้ออาจถูกกระตุ้นให้มีชีวิตได้อีกครั้งหากอุณหภูมิของน้ำเหมาะสม (16°C – 28°C) การป้องกันและควบคุมโรคจึงจำเป็นต้องใช้การวินิจฉัยเพื่อคัดแยกปลาที่เป็นพาหะของเชื้อโดยใช้วิธีทดสอบที่มีความไวสูงร่วมกับหลีกเลี่ยงการนำปลาใหม่ที่ไม่ทราบสถานภาพของโรคมาขังร่วมกับปลาที่มีอยู่เดิม วิธีวินิจฉัยพื้นฐานที่ใช้กันทั่วไปคือการทดสอบหาแอนติบอดีหรือแอนติเจนของเชื้อ CyHV3 โดยใช้หลักการ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) อย่างไรก็ตามพบว่าวิธีดังกล่าวใช้ไม่ได้ผลกรณีปลาที่ติดเชื้อมีระดับแอนติบอดีต่ำมาก นอกจากนี้วิธี ELISA ยังไม่สามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างการติดเชื้อตามธรรมชาติ

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ ถนนพหลโยธิน เกษตรกลาง แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

* ผู้รับผิดชอบ โทร. 0-2579-8908 ถึง 14 โทรสาร 0-2579-8918 ถึง 19 E-mail: thinnarats@dld.go.th

กับการทำวัคซีนด้วยไวรัสเชื้อเป็น (Perelberg *et al*., 2008) ด้วยเหตุนี้จึงมีการพัฒนาการตรวจวิเคราะห์หา DNA ของไวรัสซึ่งเป็นวิธีที่มีความจำเพาะและความไวสูงมาโดยตลอด

เชื้อ CyHV3 เป็นไวรัสที่มี DNA สายคู่ (double-stranded DNA) จัดอยู่ใน family *Alloherpesviridae* order *Herpesvirales* โดย genome มีความยาวประมาณ 295 Kbp ซึ่งยาวที่สุดในบรรดาไวรัสทั้งหมดที่อยู่ใน order เดียวกัน (Aoki *et al*., 2007; Hutoran *et al*., 2005) การวิเคราะห์หา DNA ของไวรัสชนิดนี้สามารถทำได้หลายวิธี อาทิ conventional polymerase chain reaction (PCR), nested PCR, real-time PCR และ loop-mediated isothermal amplification (El-Matbouli and Soliman, 2007; Gilad *et al*., 2002, 2004; Gunimaladevi *et al*., 2004; Soliman and El-Matbouli, 2005) ทั้งนี้พบว่าวิธี conventional PCR เช่น การวิเคราะห์หา thymidine kinase (*tk*) gene เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูงและอาจใช้ทดสอบปลาที่เป็นพาหะของโรคได้ (Bercovier *et al*., 2005) วิธีต่างๆ เหล่านี้สามารถใช้จำแนกเชื้อ CyHV3 ออกจากเชื้อ CyHV1 (โรค carp pox) และ CyHV2 (โรค hematopoietic necrosis ในปลาทอง) แต่ไม่สามารถใช้จำแนก genotypes ต่างๆ ของ CyHV3 เนื่องจาก genotypes ของไวรัสชนิดนี้คล้ายคลึงกันมาก ดังเห็นได้จากผลการศึกษาเปรียบเทียบ complete genomes ซึ่งได้จากประเทศญี่ปุ่น (CyHV3-J) สหรัฐอเมริกา (CyHV3-U) และอิสราเอล (CyHV3-I) ที่พบว่าคล้ายคลึงกันมากกว่า 99% (Aoki *et al*., 2007) อย่างไรก็ตามพบว่ามีส่วนของ genome สั้นๆ ที่สามารถใช้จำแนกจีโนไทป์ของเชื้อไวรัสได้ ซึ่งมีอย่างน้อย 3 จีโนไทป์ ได้แก่ CyHV3-J, CyHV3-I และ CyHV3-U (Aoki *et al*., 2007; Bigarre *et al*., 2009) การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์จีโนไทป์ของ CyHV3 ที่พบในเขตกรุงเทพมหานครระหว่างปี 2552 ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้เป็นข้อมูลเชิงระบาดวิทยาเบื้องต้นที่สำคัญ ที่อาจใช้ในการสืบย้อนถึงแหล่งที่มาหรือต้นตอของเชื้อดังกล่าวได้ นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ในการวางแผนป้องกันและควบคุมการเคลื่อนย้ายปลาคาร์พทั้งเพื่อการนำเข้าและส่งออกต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างปลา

ปลาคาร์พถูกส่งมาที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ (สสช.) เมื่อปี พ.ศ. 2552 ซึ่งเป็นของฟาร์มปลาคาร์พและบ้านพักคนทั่วไปในเขตกรุงเทพมหานครจำนวน 33 ราย ปลาคาร์พที่เลี้ยงไว้เริ่มแสดงอาการหลังนำปลาใหม่เข้ามาเลี้ยงรวมกัน มีอาการกินอาหารลดลง ไม่ค่อยว่ายน้ำ มีเมือกมาก บางตัวมีแผลเนื้อตายบริเวณลำตัวและเหงือก อัตราการป่วยและอัตราการตายสูงประมาณ 80-90% สำหรับตัวอย่างควบคุมผลบวก (positive control) ได้รับความอนุเคราะห์จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การพิสูจน์เชื้อด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

นำเนื้อเยื่อเหงือกของปลาคาร์พมาสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัด QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ผู้ผลิตแนะนำ จากนั้นใช้ Bercovier TK primers (sense: 5'-GGG-TTA-CCT-GTA-CGA-G-3' และ antisense: 5'-CAC-CCA-GTA-GAT-TAT-GC-3') เพื่อเพิ่มจำนวน thymidine kinase gene (409 bp) (Bercovier *et al*., 2005) สารผสมในปฏิกิริยาประกอบด้วย DNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อปลา 3 µl, illustra puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare, USA) จำนวน 1 bead [1 bead ประกอบด้วย illustra puReTaq DNA polymerase 2.5 units และ dNTP อย่างละ 200 µM ใน 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$], sense และ antisense primers อย่างละ 300 nM และเติมน้ำบริสุทธิ์สำหรับงาน molecular biology เพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายที่ 25 µl ทำ PCR โดยใช้ PCR profile ดังนี้ 95°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำ initial denaturation ตามด้วย 40 รอบของ 95°C 30 วินาที 55°C 30 วินาที และ 72°C 1 นาที เพื่อเพิ่มจำนวน DNA จากนั้นทำ final extension ที่ 72°C นาน 7 นาที นำ PCR product ที่ได้ไปแยกขนาด DNA ด้วยเครื่อง electrophoresis ชนิดแนวนอน โดยใช้ 2% agarose gel แล้วจึงแช่ agarose gel ในสารละลาย ethidium bromide (EtBr, 0.3 ng/l) นาน 15 นาที จากนั้นจึงนำไปอ่านและบันทึกผลบนเครื่อง UV transilluminator

การจำแนกจีโนไทป์ของ CyHV3 ด้วยวิธี duplex polymerase chain reaction (duplex PCR)

ทำ duplex PCR ตามวิธีของ Bigarre *et al.* (2009) โดยใช้ primers จำนวน 2 คู่ กล่าวคือ ใช้ primers คู่แรก (PVP53: 5'-CTA-CTC-AGG-AGC-CAT-CAT-CG-3' และ PVP54: 5'-AGG-ACT-TGG-TAG-GTG-CCT-CC-3') เพื่อ localize Marker I ของ CyHV3 genome (PCR product ยาว 168 bp กรณีเป็น CyHV3-J หรือ 130 bp กรณีเป็น CyHV3-I และ CyHV3-U) และใช้ primers คู่ที่สอง (PVP55: 5'-GCT-CAT-TTT-AGC-GCT-TCT-GTG-3' และ PVP56: 5'-CGC-TGC-CTA-CCC-AAT-TCG-CT-3') เพื่อ localize Marker II ของ CyHV3 genome (PCR product ยาว 352 bp กรณีเป็น CyHV3-J หรือ 278 bp กรณีเป็น CyHV3-I และ CyHV3-U) สารผสมในปฏิกิริยาประกอบด้วย DNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อปลา 3 µl, illustra puReTaq Ready-To-Go PCR Beads จำนวน 1 bead, primers ทั้งสองคู่อย่างละ 300 nM และเติมน้ำบริสุทธิ์สำหรับงาน molecular biology เพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายที่ 25 µl ทำ PCR โดยใช้ PCR profile เช่นเดียวกับที่กล่าวข้างต้น แล้วนำ PCR products ที่ได้ไปแยกขนาด DNA ด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้ 2.5% agarose gel แล้วจึงแช่ agarose gel ในสารละลาย EtBr (0.3 ng/l) นาน 15 นาที จากนั้นจึงนำไปอ่านและบันทึกผลบนเครื่อง UV transilluminator

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำ PCR products ที่ได้จาก duplex PCR มาแยกขนาด DNA ด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้ 2.5% agarose gel ตัด gel ที่มี PCR product แต่ละชนิดมาล้างด้วยชุดสกัด NucleoSpin Extract II (Macheney-Nagel, Germany) ตามวิธีที่ผู้ผลิตแนะนำ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI3130 version 3.1 (Hitachi, Japan) ทั้งสองทิศทาง กล่าวคือ ใช้ primers PVP53 และ PVP54 สำหรับ PCR product จาก Marker I ของ CyHV3 genome และใช้ primers PVP55 และ PVP56 สำหรับ PCR product จาก Marker II ของ CyHV3 genome จากนั้นนำ sequence ที่ได้มาทำการเรียงลำดับเบสโดยใช้โปรแกรม Sci Ed Central Software (Scientific and Education Software, USA) นอกจากนี้ยังวิเคราะห์ sequence ที่ได้ด้วยโปรแกรม BLAST (NCBI, 2010) (CyHV2-J, CyHV3-U และ CyHV3-I GenBank: AP008984, DQ657948 และ DQ177346 ตามลำดับ)

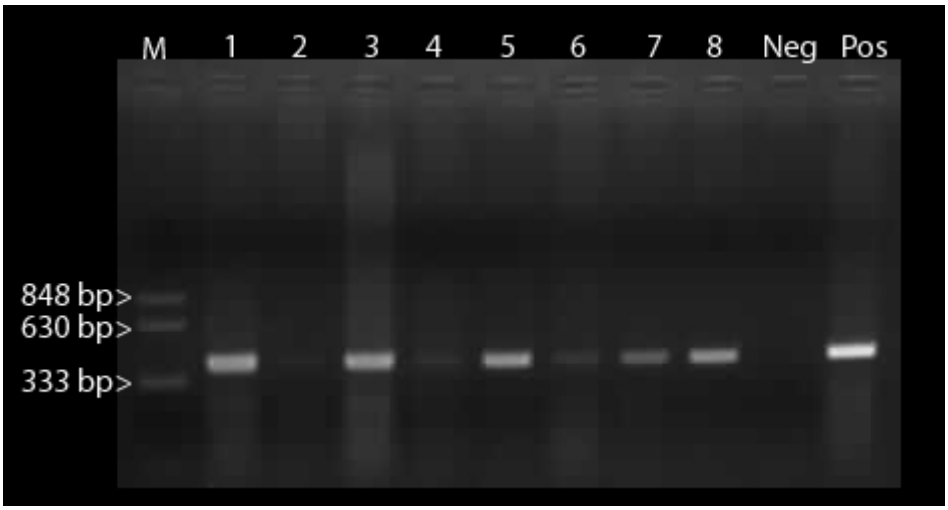
ผลและวิจารณ์

ผลการตรวจปลาคาร์พจำนวน 33 ตัวอย่างด้วยวิธี PCR พบมีเชื้อ CyHV3 8 ตัวอย่าง กล่าวคือ ได้ PCR product ที่มีความยาวประมาณ 409 bp โดยใช้ Bercovier TK primers (รูปที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับที่ Bercovier *et al.* (2005) ได้รายงานไว้ นอกจากนี้ผลการศึกษายังสามารถจำแนกความรุนแรงของการติดเชื้อได้ กล่าวคือ จากปลาคาร์พที่นำมาทดสอบจำนวน 8 ตัวอย่าง แบ่งเป็นปลาที่ติดเชื้อ CyHV3 ขั้นรุนแรง 5 ตัว เพราะแสดง PCR products ชัดเจน (ตัวอย่างที่ 1, 3, 5, 7, 8; รูปที่ 1) และมีปลาติดเชื้อเล็กน้อย 3 ตัว เพราะแสดง PCR products ไม่ชัดเจน (ตัวอย่างที่ 2, 4, 6; รูปที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ระบุว่า Bercovier TK primers สามารถใช้ทดสอบปลาที่ติดเชื้อเล็กน้อยหรือปลาที่เป็นพาหะของโรคได้ อย่างไรก็ตามควรใช้ nested PCR เนื่องจากเป็นวิธีทดสอบที่มีความไวสูงกว่า (Bercovier *et al.*, 2005; OIE, 2009a, b)

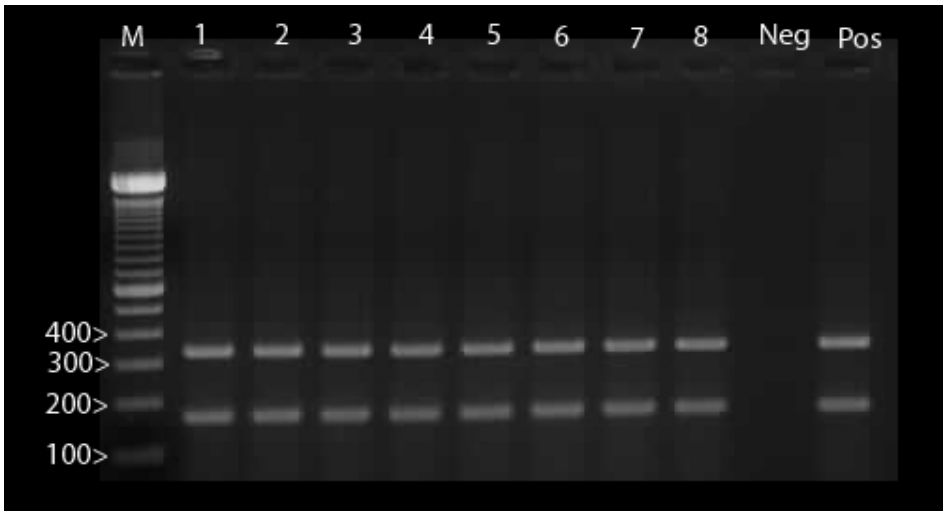
ทำ duplex PCR โดยใช้ primers จำเพาะ 2 คู่ ตามวิธีของ Bigarre *et al.* (2009) เพื่อศึกษาจำแนกจีโนไทป์ของเชื้อ CyHV3 พบว่าเชื้อทั้ง 8 isolates อยู่ในจีโนไทป์ CyHV3-J (Japanese genotype) กล่าวคือ ได้ PCR products 2 ชนิดมีความยาวประมาณ 168 bp และ 352 bp (รูปที่ 2) วิธี duplex PCR ดังกล่าวจึงเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็วที่สามารถใช้แยกจีโนไทป์ของ CyHV3 ได้ อย่างไรก็ตามได้ทำการวิเคราะห์ PCR products ที่ได้เพื่อยืนยันโดยใช้โปรแกรม BLAST (NCBI, 2010) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีเหมือนกันกับ CyHV-J มาก โดยมีค่า maximum identity เท่ากับ 100% สำหรับ sequences จาก Marker I และ Marker II ของ CyHV3 genome (รูปที่ 3 และ 4 ตามลำดับ)

เชื้อ CyHV3 แพร่กระจายไปยังภูมิภาคต่างๆ อย่างรวดเร็วในช่วงเวลาไม่นาน (OIE, 2009a, b) อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อที่พบตามภูมิภาคต่างๆ เป็นเชื้อสเตรนเดียวกันแต่เป็น variants ที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย (Aoki *et al.*, 2007) จึงมีความจำเป็นต้องใช้ molecular

markers ที่เหมาะสมเพื่อวิเคราะห์ variants เหล่านี้ ผลการศึกษาครั้งนี้ทำให้สรุปได้ว่าในเขตกรุงเทพมหานครมีเชื้อ CyHV3 อย่างน้อย 1 จีโน-ไทป์แพร่กระจายอยู่คือ CyHV3-J ข้อมูลนี้เป็นข้อมูลเชิงระบาดวิทยาที่สำคัญ เพราะสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการสืบย้อนไปถึงแหล่งกำเนิดของเชื้อ CyHV3 ที่พบในเขตกรุงเทพมหานครได้ อย่างไรก็ดีก็มีความเป็นไปได้สูงที่จะมี CyHV3 จีโนไทป์อื่นในเขตดังกล่าว ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษารวมรวมข้อมูลเพิ่มเติมต่อไป โดยคาดว่าสาเหตุที่มีเชื้อ CyHV3 แพร่กระจายอยู่มากอาจเป็นผลจากการเคลื่อนย้ายปลาคาร์พอย่างมากภายในเขตกรุงเทพมหานครนั่นเอง การป้องกันและควบคุมโรคเคเอชวีที่ได้ผลดีที่สุดจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำการตรวจคัดแยกปลาคาร์พก่อนการเคลื่อนย้ายทั้งการนำเข้าและส่งออก โดยใช้วิธี PCR ซึ่งมีความไวของการทดสอบสูงร่วมกับการทำลายปลาที่ติดเชื้อโดยเฉพาะกลุ่มปลาที่ติดเชื้อแบบแอบแฝงและไม่แสดงอาการ เพื่อเป็นการป้องกันไม่ให้โรคแพร่กระจายไปยังบริเวณอื่นอีกต่อไป



รูปที่ 1 PCR ของ CyHV3 จากเนื้อเยื่อปลาคาร์พ 8 ตัวอย่าง โดยใช้ Bercovier TK primers (Bercovier *et al*., 2005) แสดง PCR product 409 bp หลังการทำ electrophoresis บน 2% agarose gel และแช่ใน EtBr (0.3 ng/l)



รูปที่ 2 Duplex PCR ของ CyHV3 ตามวิธีของ Bigarre *et al*. (2009) แสดง PCR products ที่มีความยาวประมาณ 168 bp และ 352 bp บ่งชี้ว่าทั้ง 8 isolates อยู่ในจีโนไทป์ CyHV-J (Japanese genotype)

```
CyHV3-J        1 ctactcaggagccatcatcggcaacctcaaccccggcagcctcaaccccggcagcctcaa
BKK2009        1 ctactcaggagccatcatcggcaacctcaaccccggcagcctcaaccccggcagcctcaa
CyHV3-U        1 ctactcaggagccatcatcggcaa---------------cctcaaccccggcagcctcaa
CyHV3-I        1 ctactcaggagccatcatcggcaa---------------cctcaaccccggcagcctcaa

CyHV3-J       61 cttcaccttcagaatcttcaacggtatggatgatagagtcggagtcgtccacgatggtga
BKK2009       61 cttcaccttcagaatcttcaacggtatggatgatagagtcggagtcgtccacgatggtga
CyHV3-U       46 cttcaccttcagaatcttcaacggtatggatgatagagtcg------------------
CyHV3-I       46 cttcaccttcagaatcttcaacggtatggatgatagagtcg------------------

CyHV3-J      121 cacccgagacaaccacctcggcaccttcggaggcacctaccaagtcct
BKK2009      121 cacccgagacaaccacctcggcaccttcggaggcacctaccaagtcct
CyHV3-U       87 ----cgagacaaccacctcggcaccttcggaggcacctaccaagtcct
CyHV3-I       87 ----cgagacaaccacctcggcaccttcggaggcacctaccaagtcct
```

รูปที่ 3 Alignment บริเวณ Marker I ของ CyHV3 ที่พบในเขตกรุงเทพมหานครในปี 2552

```
CyHV3-J        1 gctcattttagcgcttctgtgaccattaacactctgttagtgcaactaagtaaatgaaca
BKK2009        1 ---------------------------------------gtgc-actaagt-aatgaaca
CyHV3-U        1 gctcattttagcgcttctgtgaccattaacactctgttagtgcaactaagcaa-------
CyHV3-I        1 gctcattttagcgcttctgtgaccattaacactctgttagtgcaactaagcaa-------

CyHV3-J       61 gaaagaaagctcagaagtgagatgggccagaagcacgacaagtaccagggcgccgatctc
BKK2009       20 gaaagaaagctcagaagtgagatgggccagaagcacgacaagtaccagggcgccgatctc
CyHV3-U       54 ------------------------------------------------------------
CyHV3-I       54 ------------------------------------------------------------

CyHV3-J      121 gaggtcgatgaacagaaagaaagctcagaagtgagatgggccagaagcacgacaagtacc
BKK2009       80 gaggtcgatgaa-------------cagaagtgagatgggccagaagcacgacaagtacc
CyHV3-U       54 -------atgaacagaaagaaagctcagaagtgagatgggccagaagcacgacaagtacc
CyHV3-I       54 -------atgaacagaaagaaagctcagaagtgagatgggccagaagcacgacaagtacc

CyHV3-J      181 agggcgccgatctcgagatcaacgacctcgagatcaacgtacctatcagcttcatgactc
BKK2009      127 agggcgccgatctcgagatcaacgacctcgagatcaacgtacctatcagcttcatgactc
CyHV3-U      107 agggcgccgatctcgagatcaacgacctcgagatcaacgtacctatcagcttcatgactc
CyHV3-I      107 agggcgccgatctcgagatcaacgacctcgagatcaacgtacctatcagcttcatgactc

CyHV3-J      241 ccgaacagattgcggcggctgtgggtagaaacggacaggccgtcttcaccttcgacgcca
BKK2009      187 ccgaacagattgcggcggctgtgggtagaaacggacaggccgtcttcaccttcgacgcca
CyHV3-U      167 ccgaacagatcgcggcggctgtgggtagaaacggacaggccgtcttcaccttcgacgcca
CyHV3-I      167 ccgaacagatcgcggcggctgtgggtagaaacggacaggccgtcttcaccttcgacgcca

CyHV3-J      301 agagaagtcgacataaggtcaacaggcggcggagcgaattgggtaggcagcg
BKK2009      247 agagaagtcgac--------------------------------------
CyHV3-U      227 agagaagtcgacataaggtcaacaggcggcggagcgaattgggtaggcagcg
CyHV3-I      227 agagaagtcgacataaggtcaacaggcggcggagcgaattgggtaggcagcg
```

รูปที่ 4 Alignment บริเวณ Marker II ของ CyHV3 ที่พบในเขตกรุงเทพมหานครในปี 2552

เอกสารอ้างอิง

Aoki, T., Hirono., I., Kurokawa, K., Fukada, H., Nahary, R., Eldar, A., Davison, A.J., Waltzek, T.B., Bercovier, H. and Hedrick, R.P. 2007. Genome sequence of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide. J. Virol. 81: 5058–5065.

Bercovier, H., Fishman, Y., Nahary, R., Sinai, S. Zlotkin, A., Eyngor, M., Gilad, O., Eldar, A. and Hedrick, R.P. 2005. Cloning of the koi herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis. BMC Microbiol. 5:1–9.

Bigarre, L., Baud, M., Cabon, J., Antychowicz, J., Bergmann, S.M., Engelsma, M., Pozet, F., Reichert, M. and Castric, J. 2009. Differentiation between cyprinid herpervirus

type-3 lineages using duplex PCR. J. Virol. Methods 158: 51–57.

El-Matbouli, M. and Soliman, H. 2007. Detection of cyprinid herpesvirus-3 (CyHV3) DNA in infected fish tissues by nested polymerase chain reaction. Dis. Aquat. Org. 78: 23–28.

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. Virol. 84: 2661–2667.

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 a polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio* koi. Dis. Aquat. Org. 48: 101–108.

Gilad, O., Yun, S., Zagmutt-Vergara, F.J., Leutenegger, C.M., Bercovier, H. and Hendrick, 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.

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.

Haenen, O.L.M., Way, K., Bergman, S.M. and Ariel, E. 2004. The emergence of koi herpesvirus and its significance to European aquaculture. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 24: 293–307.

Hutoran, M., Ronen, A., Perelberg, A., Ilouze, M., Dishon, A., Bejerono, I., Chen, N. and Kotler, M. 2005. Description of an as yet unclassified DNA virus from diseased *Cyprinus carpio* species. J. Virol. 79: 1983-1991.

NCBI. 2010. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). U.S. National Center for Biotechnology Information (NCBI). [Online]. Available: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

OIE. 2009a. Aquatic animal health code. Aquatic Animals Commission, OIE (World Organisation for Animal Health), Paris. [Online]. Available: http://www.oie.int/eng/normes/fcode/en_sommaire.htm.

OIE. 2009b. Manual of diagnostic tests for aquatic animals. Aquatic Animals Commission, OIE (World Organisation for Animal Health), Paris. [Online]. Available: http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_summry.htm.

Perelberg, A., Ilouze, M., Kotler, M. And Steinitz, M. 2008. Antibody response and resistance of *Cyprinus carpio* immunized with cyprinid herpesvirus 3 (CyHV3). Vaccine 26: 3750–3756.

Soliman, H. and El-Matbouli, M. 2005. An inexpensive and rapid diagnostic method of koi herpesvirus (KHV) infection by loop-mediated isothermal amplification. Virol. J. 2: 83.

St-Hilaire, S., Beevers, N., Way, K., Le Deuff, R.M., Martin, P. and Joiner, C. 2005. Reactivation of koi herpesvirus infections in common carp *Cyprinus carpio*. Dis. Aquat. Org. 67: 15–23.

Differentiation of cyprinid herpesvirus type-3 genotypes collected from Bangkok, Thailand in 2009

Thinnarat Srisuvan* Tuangthong Patchimasiri Supansa Tangdee

National Institute of Animal Health, Department of Livestock Development, Pahonyothin Road, Kasetklang, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

*Corresponding author Tel.: (66) 2579-8908 to 14, Fax: (66) 2579-8918 to 19, E-mail: thinnarats@dld.go.th

Cyprinid herpesvirus type-3 (CyHV3), previously known as koi herpesvirus (KHV) causes a contagious disease affecting common carp and its ornamental varieties, koi carp (both *Cyprinus carpio*). Despite its rapid global distribution, CyHV3 has displayed a single virus strain with minor polymorphism residing among various genotypes. Therefore, highly sensitive methods, such as detection of molecular markers, have long been needed to trace these close variants. The present study is aimed at differentiating CyHV3 genotypes collected from Bangkok, Thailand, in 2009. Of 33 samples from carp-producing farms as well as residences which were submitted for routine diagnosis, 8 samples were found to contain CyHV3 using a combination of various PCR-based methods. Further analysis using 2 molecular markers to distinguish genetic variations revealed that all of these 8 isolates belonged to a so-called CyHV3-J, Japanese genotype. A perfect identity was also found among their sequences when compared to that of CyHV3-J by DNA analysis. The information obtained from this study has improved our knowledge on present distribution of this emerging virus in the Bangkok area, and should be useful for the epidemiological study regarding diversification of CyHV3 in the future.

Keywords : CyHV3, KHV, koi carp