

DIAGNOSA KOI HERPES VIRUS (KHV) DENGAN TEKNIK POLYMERASE CHAIN REACTION PADA IKAN MAS (*Cyprinus carpio*) DENGAN NESTED TIMIDINE KINASE

Hessy Novita dan Isti Koesharyani

Pusat Riset Perikanan Budidaya
Jl. Ragunan 20, Pasar Minggu, Jakarta Selatan 12540
E-mail: *hesta_biotek@yahoo.com*

(Naskah diterima 1 April 2009; Disetujui publikasi: 14 Mei 2009)

ABSTRAK

Kematian massal yang terjadi pada ikan mas dan koi telah dikonfirmasi disebabkan oleh serangan virus. Hasil analisis morfologi menunjukkan virus ini termasuk ke dalam kelompok Herpesviridae sehingga disebut Koi herpes virus (KHV). Deteksi KHV dengan teknik PCR sampai saat ini masih belum ada standarisasi, telah banyak protokol PCR yang dikembangkan dalam mendeteksi KHV. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendeteksi KHV dengan menggunakan metode *nested* PCR Timidine Kinase. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dengan *nested* PCR 10 kali lebih sensitif dari metode *improve Gray Sph* dan 100 kali lebih sensitif dari metode Gilad *et al.* Dengan *nested* Timidine Kinase dapat dikembangkan dalam peningkatan deteksi awal pada diagnosa KHV.

KATA KUNCI: diagnosa, *nested* PCR, koi herpesvirus, timidine kinase, ikan mas

ABSTRACT: *Diagnosing Koi Herpesvirus (KHV) on infected Cyprinus carpio using Polymerase Chain Reaction with nested timidine kinase.*
By: Hessy Novita and Isti Koesharyani

Some cases of mass mortality of common carp have been confirmed to be caused by virus infection. Morphological analysis revealed that this virus belongs to Herpesviridae and thus named as Koi Herpesvirus (KHV). KHV detection by PCR technique has not been standardized yet. However, some PCR have been developed for detection of KHV. The aim of this research was to study the sensitiveness of nested PCR Timidine Kinase for KHV detection. The result of the research showed that nested PCR was 10 times more sensitive than improved Gray Sph method and 100 times more sensitive than Gilad method. Nested Timidine Kinase method can be developed for the improvement of KHV early detection.

KEYWORDS: *diagnosing, PCR nested, Koi Herpesvirus (KHV), timidine kinase, common carp*

PENDAHULUAN

Koi herpes virus (KHV) merupakan virus yang menyebabkan kematian massal pada ikan mas (*Cyprinus carpio*) dan koi (*C. carpio koi*) serta telah dilaporkan mulai terjadi pada awal tahun 1996 di Inggris (Ilouze *et al.*, 2006a),

musim semi tahun 1998 di Israel (Perelberg *et al.*, 2003) dan Korea (Choi *et al.*, 2004) dan menyebar ke Amerika Utara, Eropa, dan Asia Tenggara (Dishon *et al.*, 2005) termasuk Indonesia dengan *outbreak* yang terjadi tahun 2002 (Rukyani, 2002). Di Jepang, wabah penyakit ini terjadi pada Oktober 2003 di

Danau Kasumigura yang merupakan tempat utama produksi budidaya ikan mas (Haramoto *et al.*, 2007), sedangkan di Amerika, isolat virus sudah didapatkan pada tahun 1998 dan wabah penyakit ini sudah menyebabkan kematian pada ikan mas liar di Sungai Chadakoin pada tahun 2004 (Grimmett *et al.*, 2006). Penyakit ini dapat menyerang berbagai ukuran ikan mulai larva hingga induk, biasanya terjadi pada kisaran suhu 18-28°C dan dapat menyebabkan kematian 80-100% (Perelberg *et al.*, 2003; Gilad *et al.*, 2003; Ilouze *et al.*, 2006a). Gejala ikan sakit yang paling sering ditemukan adanya luka pada insang, sisik, ginjal, limfa, jantung, dan sistem gastrointestinal (Ilouze *et al.*, 2006a). Secara visual pada bagian eksternal tubuh, 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 terdapat perubahan pada insang berupa kehilangan lamela (Pikarsky *et al.*, 2004).

Wabah KHV telah menyebabkan kerugian yang sangat besar pada industri akuakultur mengingat dua jenis ikan yang diserang merupakan komoditas utama ikan konsumsi dan ikan hias. Di Israel, penyakit ini telah menyebar ke 90% budidaya ikan mas di semua bagian negara (Perelberg *et al.*, 2003). Hal serupa juga terjadi di Indonesia, di mana penyebaran penyakit ini telah melintasi hampir semua daerah budidaya ikan mas baik di Pulau Jawa, Sumatera, dan pulau-pulau lain. Kegiatan budidaya yang intensif, pameran ikan koi, dan perdagangan aktif domestik dan internasional yang hampir tidak ada pembatasan dan pemeriksaan atau penerapan program karantina merupakan penyebab penyebaran yang sangat cepat penyakit ini secara global (Gilad *et al.*, 2003; Pikarsky *et al.*, 2004).

KHV memiliki 31 polipeptida virion di mana 12 di antaranya memiliki berat molekul yang sama dengan cyprini herpes virus (CHV) dan 10 virion sama dengan channel catfish virus (CCV) (Gilad *et al.*, 2002). Genom KHV adalah molekul linear dsDNA dengan ukuran sekitar 270-290 kbp dan berbeda dibandingkan dengan herpesvirus lain yang sudah diketahui, di antaranya vaccinia virus (sekitar 185 kbp) dan herpes simplex virus type 1 (sekitar 150 kbp) (Hutoran *et al.*, 2005). Waltzek *et al.* (2005) telah menunjukkan sekuen asam

amino KHV pada gen DNA helicase (GenBank accession no. AY939857), intercapsomeric triplex (GenBank accession no. AY939859), DNA polymerase (GenBank accession no. AY939862) dan major capsid protein (GenBank accession no. AY939864). Tujuan dari penelitian ini adalah mengaplikasikan PCR dengan menggunakan *nested* timidine kinase dalam pengembangan diagnosa KHV dan membandingkannya dengan *single step* yang sering digunakan untuk deteksi KHV di laboratorium.

BAHAN DAN METODE

Ekstraksi DNA KHV

Ikan mas sampel yang terinfeksi KHV yang berasal dari Sukabumi kemudian dilakukan diagnosa dengan PCR. Ekstraksi jaringan insang dilakukan dengan menggunakan *PEQ GOLD Tissue DNA Mini Kit*, jaringan insang ikan ditimbang sebanyak ± 30 mg, dimasukkan ke dalam *tube* yang mengandung bola-bola kecil (*Tube Precellys- Ceramck-kit Lot 013*) yang berfungsi untuk menghancurkan jaringan insang ikan mas, kemudian ditambahkan 400 μ L T-1 *Lysis Buffer (Peg Gold)* dan dimasukkan ke dalam alat *lysis* dan *homogenization* pada kecepatan 6.500 rpm selama 30 detik sebanyak 3x putaran. Sampel didiamkan dalam suhu ruang selama 30-60 menit. Kemudian ditambahkan 25 μ L *proteinase-K* (10 mg/mL) dan diinkubasi pada *waterbath* pada suhu 55-60°C selama 1 jam dan ditambahkan 25 μ L *RNAse* (10 mg/mL), didiamkan dalam suhu ruang selama 5 detik dan ditambahkan 400 μ L *Buffer (Lysis)*, didiamkan lagi selama 5 menit pada suhu 15-37°C kemudian ditambahkan 500 μ L *etanol absolut*, divortex dan dimasukkan ke dalam *HI Bind DNA Column* disentrifugasi pada 1000 rpm selama 1 menit, dan dibuang cairannya. Selanjutnya ditambahkan 600 μ L *wass Buffer DNA* ke dalam *column*, disentrifugasi pada 100 rpm selama 1 menit dan cairannya dibuang (diulang sebanyak 2 kali). Kemudian *column* dikeringkan pada suhu ruang selama 15-20 menit. *Column* dipindahkan ke *mikrotube* baru dan ditambahkan 50 μ L *Elution Buffer* dan didiamkan selama 2-5 menit pada suhu ruang dan disentrifugasi 1.000 rpm selama 1 menit. Kemudian ditambahkan 50 μ L *Elution Buffer*. Selanjutnya dihitung konsentrasi DNA dengan menggunakan *NANO DROP*.

Amplifikasi DNA KHV

DNA dari jaringan ikan setelah diekstrak dan diketahui konsentrasinya, dilakukan pengujian KHV menggunakan uji PCR. *Step* pertama dari amplifikasi PCR menggunakan *outer primer* timidine kinase (Bercovier *et al.*, 2005) dengan basa *forward*-nya 5'-GGGTTACCTGTACGAG-3' dan *reverse* 5'-CACCCAGTAGATTATGC-3' dengan target *band* 409 bp (*based pairs*). Komposisi reaksi PCR menggunakan *Go Taq-Green Master mix* 2x (Promega) 12,5 µL; *dnase free water* (promega) 8,5 µL; primer *forward* dan primer *reverse* masing-masing 1 µL dan DNA *templat*nya 2 µL. Master mix PCR dan DNA *template* digabung dalam tubes 0,2 mL yang untuk selanjutnya dilakukan uji PCR pada mesin *MJ Research Thermal Cycler* dengan parameter siklusnya: pra-denaturasi 94°C-5 menit, denaturasi 95°C-1 menit, *annealing* 55°C-1 menit, *extension* 72°C-1 menit diulang 40 siklus, *final extension* 72°C-10 menit. PCR produk dianalisis pada gel agarose (1,5% dalam *Tris-acetate EDTA buffer/TAE*) dan didokumentasikan dengan foto polaroid.

Nested PCR

DNA dari hasil amplifikasi pertama PCR yang disebut produk PCR *step-1* sebanyak 2 µL digunakan sebagai *template* untuk *nested* PCR dengan target *band* 384 bp. *Inner primer* Timidine Kinase (*internal forward* dan *internal reverse*) berasal dari CEFAS Weymouth Laboratory dengan urutan basa untuk *internal forward* 5'-CGTCTGGAGGAATACGACG-3' dan urutan basa *internal reverse* 5'-ACCGTACAGCTCGTACTGG-3' (pra-denaturasi 94°C-5 menit, denaturasi 95°C-1 menit, *annealing* 55°C-1 menit, *extension* 72°C-1 menit, sebanyak 30 siklus, (*final extension* 72°C-10 menit).

Analisis Sensitivitas Nested PCR Timidine Kinase

Untuk mengetahui tingkat sensitivitas dari *nested* timidine kinase dilakukan pengenceran dari 10⁰-10⁸ (150 ng/µL sampai 1.5 fg/µL). Dari masing-masing pengenceran sebanyak 2 µL digunakan sebagai DNA *template* untuk *step-1* dan *step-2 nested* PCR timidine kinase. Hasil sensitivitas *nested* timidine kinase dibandingkan dengan metode *single step improve Gray Sph* (Yuasa *et al.*, 2005) pada target *band* 290 bp dan Gilad *et al.* (2002) pada target *band* 484 bp.

HASIL DAN BAHASAN

Ekstraksi DNA

Hasil ekstraksi dari jaringan dengan *Peg GOPLG Tissue DNA Mini Kit* dan pengukuran dengan NANNO DROP diperoleh konsentrasi DNA KHV 156,4 ng/µL diukur pada panjang gelombang 260 nm dan panjang gelombang 280 nm dengan kemurnian 1,91. Kemurnian DNA tersebut dapat dilihat dengan membagi nilai OD₂₆₀ dengan OD₂₈₀. Molekul DNA dikatakan murni jika rasio kedua nilai tersebut berkisar 1,8-2,0. Jika nilai rasio lebih kecil dari 1,8 maka masih ada kontaminasi protein atau phenol di dalam larutan (Sulandari & Syamsul, 2003). Sampel DNA KHV dilihat dari tingkat rasio (1,8-2,0) dapat dikatakan murni karena masih berkisar antara rasio tersebut. Penentuan tingkat kemurnian DNA sangat penting sekali dalam pengujian dengan PCR karena sangat ditentukan dari tingkat kontaminasi protein dalam larutan sehingga akan mempengaruhi hasil ekstraksi DNA.

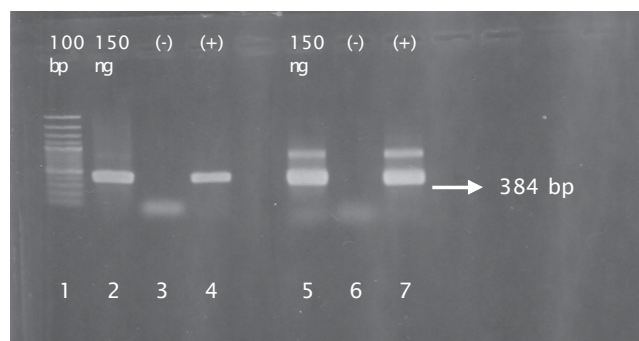
Amplifikasi dan Nested PCR Timidine Kinase

Metode deteksi KHV dengan metode *single step improve Gray Sph* (Yuasa *et al.*, 2005; Gilad *et al.*, 2002; dan Bercovier *et al.*, 2005) telah banyak digunakan sedangkan untuk pengembangan deteksi KHV dengan *double step* atau *nested* belum banyak dikembangkan. Hasil amplifikasi KHV dengan *Step-1* dan *Nested* PCR dapat dilihat pada Gambar 1.

KHV memiliki dua gen yang belum pernah didapatkan pada genome anggota herpesviridae, yaitu: thymidylate kinase (TmkP), serine protease inhibitor (Ilouze *et al.*, 2006a), dan menghasilkan empat gen pengkode protein yang sama dengan yang diekspresikan oleh virus pox, yaitu: thymidylate kinase (TmkP), ribonucleotide reductase (RNR), thymidine kinase (TK) dan B22R-like gene (Ilouze *et al.*, 2006b). Sekuen TK telah diisolasi dan dikembangkan untuk analisis PCR dan dapat mengamplifikasi fragmen *template* DNA KHV pada 409 bp dan tidak dapat mengamplifikasi fragmen *template* CCV, CHV ataupun galur sel KF-1 (Bercovier *et al.*, 2005).

Sensitivitas Nested Timidine Kinase

Nested PCR yang digunakan untuk meningkatkan sensitivitas deteksi KHV lebih spesifik jika dibandingkan dengan *single step*.



Gambar 1. *Nested* PCR timidine kinase pada amplicon 384 bp. Lane 1: DNA Ladder 100 bp; Lane 2: DNA KHV step-1 timidine kinase; Lane 3: kontrol negatif; Lane 4: kontrol positif; Lane 5: *nested* timidine kinase; Lane 6: kontrol negatif; lane 7: kontrol positif

Figure 1. *Timidine kinase nested PCR with 384 bp amplicon*. Lane 1: DNA ladder 100 bp; Lane 2: DNA KHV step-1 timidine kinase; Lane 3: negative control; Lane 4: positive control; Lane 5: timidine kinase; Lane 6: negative control; Lane 7: positive control

Sensitivitas dalam pendeteksian suatu patogen sangat penting sekali sebagai awal diagnosa infeksi dari patogen terutama KHV. Sensitivitas uji PCR sangat tergantung pada beberapa faktor yaitu komposisi primer, struktur dan homologi target molekul (Yin. Zeng, 2005).

Deteksi DNA KHV dengan *nested*, sensitivitasnya sampai pengenceran 10^7 pada konsentrasi 1,5 fg/ μ L di mana 10 kali lebih sensitif dibandingkan dengan *improve Gray Sph* (Yuasa *et al.*, 2005) dan 100 kali lebih

sensitif dari Gilad *et al.* (2002) dan Bercovier *et al.* (2005) (pada Gambar 2 & 3 dan Tabel 1). Pengembangan *nested* PCR dalam mendeteksi KHV dengan konsentrasi dan komposisi DNA *template* sangat mempengaruhi efisiensi *nested* PCR. Dengan mengukur konsentrasi DNA untuk *nested* PCR dapat menunjukkan sensitivitas deteksi yang tinggi untuk KHV.

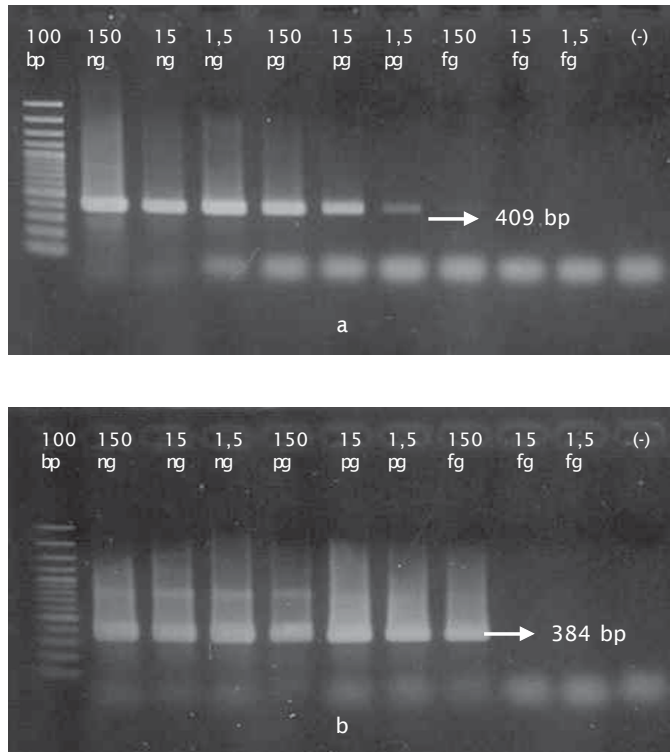
Sistem deteksi ini dapat digunakan untuk menduga ikan yang terinfeksi KHV dengan atau tanpa gejala. Sistem *nested* PCR yang

Tabel 1. Hasil perbandingan sensitivitas *nested* timidine kinase dengan *improved Gray Sph* (Yuasa *et al.*, 2005; Gilad *et al.*, 2002)

Tabel 1. *Comparison result of sensitiveness of nested timidine kinase and Gray Sph* (Yuasa *et al.*, 2005; Gilad *et al.*, 2002)

Konsentrasi DNA DNA Concentrate	Jumlah DNA Amount of DNA	TK1- 409 bp	TK2- 384 bp	Gray 290 bp	Gillad 484 bp
DNA KHV 10^0	156.4 ng/ μ L	+	+	+	+
DNA KHV 10^{-1}	15 ng/ μ L	+	+	+	+
DNA KHV 10^{-2}	1.5 ng/ μ L	+	+	+	+
DNA KHV 10^{-3}	150 pg/ μ L	+	+	+	+
DNA KHV 10^{-4}	15 pg/ μ L	+	+	+	+
DNA KHV 10^{-5}	1,5 pg/ μ L	+	+	+	+
DNA KHV 10^{-6}	150 fg/ μ L	+	+	+	+
DNA KHV 10^{-7}	15 fg/ μ L	+	+	+	+
DNA KHV 10^{-8}	1.5 fg/ μ L	+	+	+	+
Negatif kontrol	-	-	-	-	-

Keterangan: ng/ μ L = nanogram/mikroliter; Pg/ μ L = picogram/mikroliter; Fg/ μ L = femtogram/mikroliter



Gambar 2. Analisis sensitivitas *nested* PCR timidine kinase pada amplicon 384 bp. (a) step-1 timidine kinase (409 bp); (b) *nested* timidine kinase

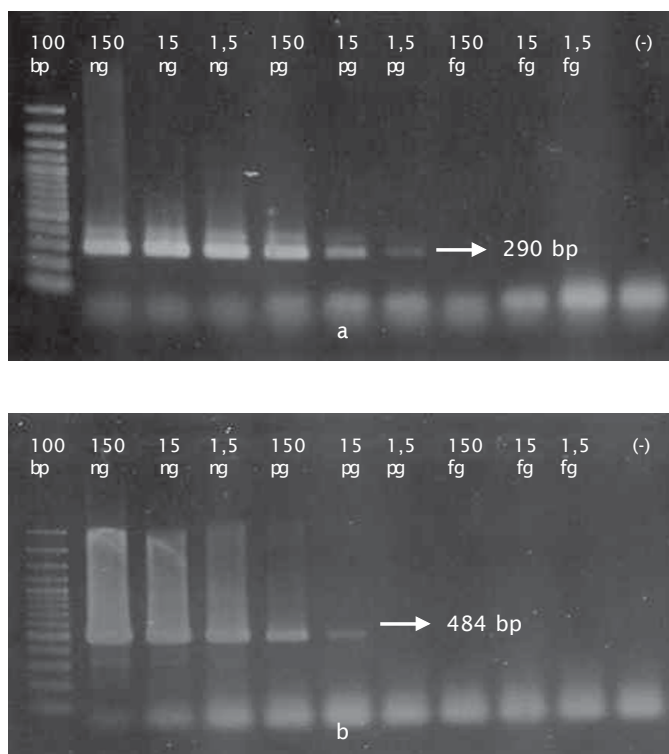
Figure 2. *Nested PCR sensitivity analysis of timidine kinase with 384 bp amplicon. (a) timidine kinase step-1 (409); (b) nested timidine kinase*

menggunakan primer spesifik pada tahap PCR akan menghasilkan spesifisitas dan sensitifitas untuk amplifikasi diagnosa KHV.

Virus KHV pada ikan koi dan ikan mas telah menjadi ancaman serius bagi usaha budi daya ikan koi dan ikan mas. Penyakit ini menyebabkan kerugian yang sangat besar di seluruh dunia seperti di Indonesia dengan total kerugian 5,5 milyar US\$, di Jepang diperkirakan 1,5-2,5 milyar \$ dan di Israel setiap tahun kerugian mencapai 3 milyar \$ (AFS-FHS, 2004; Waltzek & Hendrick, 2004). Dalam hal ini kerugian akibat kematian yang disebabkan oleh penyakit ini mempunyai dampak negatif bagi perdagangan internasional ikan koi, dengan hasil penjualan yang rendah dan pembatalan pameran-pameran ikan koi (Waltzek & Hendrick, 2004). Berdasarkan alasan kematian yang tinggi dalam waktu yang relatif cepat maka, deteksi cepat dengan sensitivitas tinggi untuk

pencegahan lebih lanjut akibat *outbreak* dan untuk perlindungan usaha budidaya ikan mas dan ikan koi sangat diperlukan. Teknik molekuler PCR menawarkan metode cepat dan sensitivitas untuk diagnosa penyakit yang bisa mengatasi kesulitan dari metode diagnosa biasa. Uji PCR melewati pemisahan fragmen DNA virus dan tidak dibutuhkan untuk pengambilan partikel virus untuk isolasi pada kultur sel. (Koutna *et al.*, 2003). Uji PCR memudahkan diagnosa dengan visualisasi langsung dari *band* spesifik pada agar yang sudah *distaining* dengan *ethidium bromide* yang lebih mudah dan cepat daripada pengujian mikroskopik dari bagian jaringan.

Sampai saat sekarang analisa yang dilakukan di laboratorium masih menggunakan protokol *step-1* PCR untuk diagnosa KHV (Gilad *et al.*, 2002; Gray *et al.*, 2002). Berdasarkan pengalaman diagnosa KHV pada ikan mas dan koi menggunakan hasil uji *step-1* PCR sering



Gambar 3. Perbandingan *nested* PCR timidine kinase pada amplicon 384 bp. dengan (a) *improve Gray Sph* (Yuasa *et al.*, 2005) target molekul 290 bp; (b) Gilad *et al.* (2002) target band 484 bp

Figure 3. Comparison of timidine kinase of *nested* PCR in 384 bp. (a) *improved Gray Sph* (Yuasa *et al.*, 2005) molecular target 290 bp; (b) Gilad *et al.* (2002) with band target 484 bp

menghasilkan negatif palsu, setelah diujikan lagi dengan *nested* PCR hasilnya positif. Oleh karena itu perlu peningkatan sensitivitas uji PCR, terutama untuk deteksi virus tanpa gejala pada ikan *carrier* KHV.

Pengembangan *nested* PCR menggunakan primer spesifik eksternal dan internal dengan timidine kinase dengan spesifisitasnya dapat mengurangi hasil positif palsu atau negatif palsu karena primer internal yang digunakan dalam amplifikasi *step* ke-2 berperan sebagai internal kontrol dengan memperkuat produk dari amplifikasi awal (Porter-Jordon *et al.*, 1990).

Metodologi PCR oleh Gilad *et al.* (2002) dan Gray *et al.* (2002) yang menggunakan design primer dari sekuens fragmen DNA restriksi berada pada daerah tidak pengkode (*non coding regions*) dari virus DNA. Sekuens ini

mungkin tidak cocok dengan strain KHV sehingga hasilnya tidak terdeteksi (Haenen *et al.*, 2004). Sensitivitas yang tinggi dari *nested* timidine kinase yang menggunakan primer design dari gen timidine kinase dari genom KHV, sehingga sekuens ini akan cocok dengan strain KHV, yang mampu mendeteksi lebih tinggi dari sekuens lain yang berada pada daerah tidak pengkode (*non coding regions*). *Nested* PCR timidine kinase dapat mendeteksi virus DNA KHV pada sampel ikan mas dan ikan koi yang diagnosa sebelumnya yang dapat dikatakan ikan dengan serangan infeksi ringan hasilnya negatif menggunakan PCR yang dilakukan oleh Gilad *et al.* (2002). Metode ini dapat digunakan sebagai *screening test* untuk ikan mas atau *import* ikan koi untuk pencegahan introduksi dan penyebaran KHV.

KESIMPULAN

Dengan pengembangan *nested* timidine kinase untuk deteksi cepat, spesifik, dan sensitif pada KHV dapat digunakan secara luas untuk aplikasi metode deteksi KHV dan pencegahan awal KHV pada ikan yang menunjukkan gejala infeksi maupun yang tanpa gejala serta ikan *carrier* KHV dan juga dapat digunakan untuk program dalam manajemen kesehatan ikan.

SARAN

Metode *nested* ini dapat digunakan untuk deteksi rutin dalam monitoring penyakit ikan yang disebabkan oleh KHV.

DAFTAR ACUAN

- AFS-FHS (American Fisheries Society-Fish Health Section). 2004. Standard procedures for aquatic animal health inspections. *FHS blue book: suggested procedures for the detection and identification of certain finfish and shellfish pathogens*. AFS-FHS, Bethesda, MD, 2: 1-20.
- Bercovier, H., Fishman, Y., Nahary, R., Sinai, S., Zlotkin, A., Eyngor, M., Gilad, O., Eldar, A., & Hendrick, R.P. 2005. Cloning of Koi Herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis. *BMC Microbiology*, (5): 13 pp.
- Choi, D.L., Sohn, S.G., Bang, J.D., Do, J.W., & Park, M.S. 2004. Ultrastructural identification of a herpes-like virus infection in common carp *Cyprinus carpio* in Korea. *Diseases of Aquatic Organisms*, 61: 165-168.
- Dishon, A., Perelberg, A., Bishara, J.B., Ilouze, M., Davidovich, M., Shlomit Werker, & Kotler, M. 2005. Detection of carp interstitial Nephritis and gill necrosis virus in fish droppings. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11): 7,285-7,291.
- Gilad, O., Yun, S., Andree, K.B. Adkison, M.A., Zlotkin, A., Bercovier, H., Eldar, A., & Hedrick, R.P. 2002. Initial characterization of koi herpesvirus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio* koi. *Diseases of Aquatic Organisms*, 48 : 101-108.
- Gilad, O., Yun, S., Adkison, M.A., Way, K., Willits, N.H., Bercovier, H., 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. *Journal of General Virology*, 84: 2,661-2,668.
- Gray, W., Mullis, L., Lapatra, S., Groff, J., & Goodwin, A. 2002. Detection of Koi herpesvirus in tissue of infected fish. *J. Fish Dis.*, 25: 171-178.
- Grimmett, S., Wang, G.J.V., Getchell, R.G., Johnson, D.J., & Bowser, P.L. 2006. An unusual Koi Herpesvirus associated with a mortality event of common carp *Cyprinus carpio* in New York State, USA. *Journal of Diseases*, 42(3): 658-662.
- Haenen, O.L.M., Way, K., Bergmann, S.M., & Ariel, E. 2004. The emergence of koi herpesvirus and its significance to european aquaculture. *Bull Eur Assoc Fish Pathol.*, 24: 293-307.
- Haramoto, E., Kitajima, M., Katayama, H., & Ohgaki, S. 2007. Detection of Koi Herpesvirus in river water in Japan. *Journal of Fish Diseases*, 30: 59-61.
- Hutoran, M., Ronen, A., Perelberg, A., Ilouze, M., Dishon, A., Bejerano, I., Chen, N., & Kotler, M. 2005. Description of an as yet unclassified DNA virus from diseased *Cyprinus carpio* species. *Journal of Virology*, 79: 1,983-1,991.
- Ilouze, M., Dishon, A., & Kotler, M. 2006a. Characterization of novel virus causing a lethal disease in carp and koi. *Microbiology and Molecular Reviews*, p. 147-156.
- Ilouze, M., Dishon, A., Kahan, T., & Kotler, M. 2006b. Cyprinid herpes virus-3 (CyHV-3) bear genes of Genetically distant large DNA viruses. *FEBS (Federation of European Biochemical Societies) Letter* 586. Published by Elsevier, p. 4,473-4,478.
- Koutna, M., Vesely, T., Psikal, I., & Hulova, J. 2003. Identification of spring viraemia of carp virus (SVCV) by combined RT-PCR and nested PCR. *Dis Aqua Org.*, 55: 229-235.
- Perelberg, A., Smirnov, M., Hutoran, M., Diamant, A., Bejerano, Y., & Kotler, M. 2003. Epidemiological Description of A New Viral Disease Afflicting Cultured *Cyprinus Carpio* in Israel. *The Israeli Journal of Aquaculture*, 55(1): 5-12.
- Pikarsky, E., Ronen, A., Abramowitz, J., Levavitsan, B., Hutoran, M., Shapira, Y., Steinitz, M., Perelberg, A., Soffer, D., & Kotler, M.. 2004. Pathogenesis of acute viral disease induced in fish by carp interstitial nephritis and gill necrosis virus. *J. Virol.*, 78: 9,544-9,551.

- Porter-Jordon, K., Rosenberg, E.L., & Keiser, J.F. 1990. Nested polymerase chain reaction assay for the detection of cryptomegalovirus overcome false-positives caused by contamination with fragmented DNA. *J. Med Virol.*, 2: 85-91.
- Rukyani, A. 2002. Koi Herpesvirus in Indonesia: suspicion. Report of KHV epidemic to OIE. www.oie.int.
- Sulandari, S. & Syamsul, M.A.Z. 2003. Panduan Praktis Laboratorium DNA. Bidang Zoologi. Pusat Penelitian Biologi. LIPI. ISBN: 979-579-050-1, p. 73-76.
- Waltzek, T.B., Kelley, G.O., Stone, D.M., Way, K., Hanson, L., Fukuda, H., Hirono, I., Aoki, T., Davison, A.J., & Hendrick, R.P. 2005. Koi Herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family Herpesviridae. *J. Gen. Virol.*, 86: 1,659-1,667.
- Waltzek, T.B., & Hendrik, R.P. 2004. *Koi herpesvirus update 2004*. California veterinarian, July-August 2004. California Veterinary Medical Association, Davis, CA.
- Yin Zeng, Q., Hansson, P., & Ruwong, X. 2005. Specific and sensitive detection of the conifer pathogen *Gremmeniella abietina* by nested PCR. *BMC Microbiology*, 5(65): 1-9.
- Yuasa, Sano, K.M., Kurita, J., Ito, T., & Iida, T. 2005. Improvement of a PCR method with the *Sph* I-5 primer set for the detection of Koi Herpesvirus (KHV). *Fish Pathology*, 40(1): 37-39.