

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Bakalářská práce

**Vnímavost různých druhů ryb ke koi  
herpesviróze (KHV) – přehledová  
studie**

**Autor:** Jakub Kostlán

**Vedoucí bakalářské práce:** MVDr. Veronika Piačková, Ph.D.

**Konzultant bakalářské práce:** Mgr. Aleš Pospíchal

**Studijní program a obor:** Zootechnika, Rybářství

**Forma studia:** prezenční

**Ročník:** 3.

České Budějovice, 2015

#### Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, případně v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných FROV JU. Zveřejnění probíhá elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdávanému textu do této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací na Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Datum: 4. 5. 2015

Podpis studenta

.....

## **Poděkování**

Na tomto místě bych velmi rád poděkoval své vedoucí MVDr. Veronice Piačkové, Ph.D. i konzultantovi Mgr. Aleši Pospíchalovi za poskytnuté rady a cenné připomínky při vypracování této bakalářské práce. Dík patří také mé rodině a všem, kteří mě při psaní této práce podporovali.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta rybářství a ochrany vod

Akademický rok: 2012/2013

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Jakub KOSTLÁN**  
Osobní číslo: **V11B016P**  
Studijní program: **B4103 Zootechnika**  
Studijní obor: **Rybářství**  
Název tématu: **Vnímavost různých druhů ryb ke koi herpesviróze (KHV) -  
přehledová studie**  
Zadávající katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Cílem práce je formou rešerše sumarizovat dostupné informace o vnímavosti různých druhů ryb k nebezpečnému infekčnímu onemocnění - koi herpesviróze.

Metodický postup:

Práce bude spočívat ve studiu vědecké literatury vztahující se k zadanému tématu a v přehledném zpracování doposud publikovaných výsledků výzkumu.

Práce by měla obsahovat charakteristiku původce onemocnění a seznámení s diagnostickými metodami, popis klinických a patologických příznaků, zmínku o rozšíření KHV ve světě a sumarizaci výsledků výzkumu týkajícího se ověřování vnímavosti různých druhů ryb ke koi herpesviróze.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Rozsah pracovní zprávy: **30 - 40 stran**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury: **viz příloha**

Vedoucí bakalářské práce: **MVDr. Veronika Piačková, Ph.D.**  
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický  
Konzultant bakalářské práce: **Ing. Aleš Pospíchal**  
Datum zadání bakalářské práce: **7. prosince 2012**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. dubna 2014**

0.2.   
prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.  
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD  
Zátiší 728/II  
389 25 Vodňany (2)

  
doc. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.  
ředitel

V Českých Budějovicích dne 14. února 2013

## Příloha zadání bakalářské práce

### Seznam odborné literatury:

- Bergman, S. M., Sadowski, J., Kięłpiński, M., Bartłomiejszyk, M., Fichtner, D., Riebe, R., Lenk, M., Kempster, J., 2010. Susceptibility of koi x crucian carp and koi x goldfish hybrids to koi herpesvirus (KHV) and the development of KHV disease (KHVD). *Journal of Fish Diseases*, 33: 267-272.
- Bergman, S. M., Lutze, P., Schütze, H., Fischer, U., Dauber, M., Fichtner, D., Kempster, J. Goldfish (*Carassius auratus auratus*) is a susceptible species for koi herpesvirus (KHV), but not for KHV disease (KHVD). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 2010; 30: 74-83.
- Bergmann, S. M., Stumpf, P., Schütze, H., Fichtner, D., Sadowski, J., Kempster, J., 2007. Similarities and heterogeneity of koi herpes virus (KHV) genome detected in ornamental fish without clinical signs. *Aquaculture*, 272, Suppl. 1: 245.
- El-Matbouli, M., Saleh, M., Soliman, H., 2007. Detection of cyprinid herpesvirus type 3 in goldfish cohabiting with CyHV-3-infected koi carp (*Cyprinus carpio koi*). *The Veterinary Record*, 161: 792-793.
- El-Matbouli, M., Soliman, H. Transmission of cyprinid herpesvirus-3 (CyHV-3) from goldfish to naive common carp by cohabitation. *Res.Vet.Sci.* [published on line; doi:10.1016/j.rvsc.2010.07.008.
- Haenen, O. L. M., Way, K., Bergmann, S. M., Ariel, E. The emergence of koi herpesvirus and its significance to European aquaculture. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 2004; 24: 293-307.
- Hedrick, R. P., Gilad, O., Yun, S. C., McDowell, T. S., Waltzek, T. B., Kelly, G. O., Adkison, M. A. Initial Isolation and Characterization of a Herpes-like Virus (KHV) from Koi and Common Carp. *Bull. Fish. Agen.*, 2005; 2: 1-7.
- Hedrick, R. P., Gilad, O., Yun, S., Spangenberg, J. V. A Herpesvirus Associated with Mass Mortality of Juvenile and Adult Koi, a Strain of Common Carp. *Journal of Aquatic Animal Health* 2000; 12: 44-57.
- Hedrick, R. P., Waltzek, T. B., McDowell, T. S. Susceptibility of koi carp, common carp, goldfish and goldfish x common carp hybrids to cyprinid herpesvirus-2 and herpesvirus-3. *J.Aquat.Anim.Health* 2006; 18: 26-34.
- Kempster, J., Bergmann, S. M., 2007. Detection of koi herpesvirus (KHV) genome in wild and farmed fish from Northern Poland. *Aquaculture*, 272, Suppl. 1: 275.
- Kempster, J., Sadowski, J., Schütze, H., Fischer, U., Dauber, M., Fichtner, D., Panicz, R., Bergmann, S. M., 2009. Koi herpes virus: Do acipenserid restitutions programs pose a threat to carp farms in the disease-free zones? *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 39 (2): 119-126.
- Kielpinski, M., Kempster, J., Panicz, R., Sadowski, J., Schütze, H., Ohlemeyer, S. Bergmann, S. M. Detecton of KHV in Freshwater Mussels and Crustaceans from Ponds with KHV History in Common Carp (*Cyprinus carpio*). *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, 2010; 62: 28-37.
- Noga, E. J., 2010. *Fish Disease: diagnosis and treatment*, 2nd edition. Blackwell Publishing, Iowa, USA, 519 pp.
- Pokorová, D., Veselý, T., Piačková, V., Reschová, S., Hůlová, J. Current knowledge on koi herpesvirus (KHV): a review. *Vet Med - Czech* 2005; 50: 139-147.
- Sadler, J., Marecaux, E., Goodwin, A. E. Detection of koi herpesvirus (CyHV-3) in goldfish, *Carassius auratus* (L.), exposed to infected koi. *Journal of Fish Diseases*, 2008; 31: 71-72.

Svobodová, Z., Kolářová, J., Navrátil, S., Veselý, T., Chloupek, P., Tesarčík, J., Čítek, J., 2007. Nemoci sladkovodních a akvariálních ryb, čtvrté, přepracované vydání. Informatorium, Praha, 264 s.

Taylor, N. G. H., Way, K., Jeffery, k.r., Peeler, E. J., 2010. The role of live fish movements in spreading koi herpesvirus throughout England and Wales. *Journal of Fish Diseases*, 33: 1005-1007.

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	9
<b>2. Historie a rozšíření koi herpesvirózy (Koi Herpes Virus Disease; KHVD)</b> .....	11
2.1. Prvotní vzplanutí a následné rozšíření koi herpesvirózy v Izraeli a Severní Americe .....	11
2.2. Rozšíření koi herpesvirózy v Asii .....	12
2.3. Rozšíření koi herpesvirózy v Evropě .....	13
2.4. Rozšíření koi herpesvirózy v ostatních částech světa .....	14
<b>3. Charakteristika koi herpesviru</b> .....	15
3.1. Obecná charakteristika herpesvirů .....	15
3.2. Klasifikace koi herpesviru.....	16
3.3. Rod <i>Cyprinivirus</i> .....	16
3.3.1. Cyprinid Herpesvirus 1 (CyHV-1) .....	16
3.3.2. Cyprinid Herpesvirus 2 (CyHV-2) .....	17
3.3.3. Anguillid Herpesvirus 1 (AngHV-1).....	17
3.4. Struktura koi herpesviru .....	18
<b>4. Charakteristika koi herpesvirózy (KHVD)</b> .....	19
4.1. Predispoziční faktory a mortalita .....	19
4.2. Přenos viru .....	20
4.3. Přežití viru mimo hostitele .....	21
4.4. Klinické příznaky a histopatologické změny .....	22
4.5. Patogeneze CyHV-3.....	23
<b>5. Vnímavost různých druhů ryb vůči KHVD</b> .....	24
5.1. Vnímavost kapra obecného ( <i>Cyprinus carpio carpio</i> ) a koi kapra ( <i>Cyprinus carpio koi</i> ) a jejich kříženců.....	24



5.2 Přenos koi herpesviru na ostatní vnímavé druhy ryb .....	25
5.3 Přenos CyHV-3 z případných vironosičů na vnímavé druhy ryb .....	28
<b>6. Diagnostika koi herpesvirózy .....</b>	<b>28</b>
6.1 Diferenciální diagnostika .....	28
6.2 Diagnostické metody.....	29
6.2.1 Izolace viru na buněčných kulturách .....	29
6.2.2 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM) .....	32
6.2.3 Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction; PCR).....	32
6.2.4 TaqMan Real-time PCR .....	36
6.2.5 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP).....	37
6.2.6 ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay).....	38
<b>7. Prevence koi herpesvirózy .....</b>	<b>39</b>
7.1 Karanténa .....	39
7.2 Desinfekce.....	39
7.3 Přírozená imunizace ryb.....	40
7.4 Vakcinace .....	40
<b>8. Koi herpesviróza z pohledu legislativy .....</b>	<b>41</b>
<b>9. Závěr .....</b>	<b>43</b>
<b>10. Seznam použité literatury .....</b>	<b>45</b>
<b>11. Seznam zkratk .....</b>	<b>59</b>

## 1. Úvod

Kapr obecný (*Cyprinus carpio* L.) je v České republice od středověku až po současnost nejvíce hospodářsky využívanou rybou. Je oblíbený hlavně kvůli svému vynikajícímu masu a dobré adaptaci na podmínky chovu v rybníčním hospodářství. Statistiky Světové potravinářské a zemědělské organizace (FAO) udávají, že v roce 1991 činila celosvětová produkce kapra obecného 1 018 286 t a v roce 2007 již 3 172 488 t. Největším světovým producentem kapra je Čína, jejíž podíl na celkové produkci je 70 % a díky chovatelům ve východní a jihovýchodní Asii se každoročně celková produkce kapra neustále zvyšuje. V České republice tvoří kapr 86 - 90 % z celkové produkce, to odpovídá 17 - 18 000 t ročně (Duda a kol., 1999).

Jedním ze základních limitujících faktorů úspěšného chovu je dobrý zdravotní stav ryb. Jen zdravá, odolná ryba se dobře rozmnožuje, dává životaschopný plůdek, plně využívá přirozenou potravu i předkládané krmivo a v co nejkratším čase dosahuje požadované tržní velikosti (Svobodová a kol., 2007). Příčina vzniku nemoci může být neinfekčního, nebo infekčního charakteru. Neinfekčním narušením zdravotního stavu ryb rozumíme např. mechanické poškození ryb nebo znečištění vodního prostředí. Infekční choroby rozdělujeme na virové, bakteriální, plísňové a parazitární.

Jednou z nejzávažnějších chorob virového původu, způsobující masivní ztráty v chovech kapra a koi kapra, je koi herpesviróza (Koi Herpes Virus Disease; KHVD). Bylo zjištěno, že původcem tohoto onemocnění je virus nazývaný Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3). Vznik onemocnění je závislý především na teplotě vody, optimální teplota pro rozvoj tohoto onemocnění je okolo 23 °C. K prvnímu vzplanutí nemoci způsobené virem CyHV-3 došlo v Izraeli v roce 1998. Do roku 2000 se nemoc rozšířila do 90 % farem v Izraeli (Perelberg a kol., 2003). Krátce po vzplanutí v Izraeli se nákaza objevila i v USA a od té doby se rozšířila do mnoha zemí Asie i Evropy. V současnosti je koi herpesviróza kromě Jižní Ameriky, Austrálie a Severní Afriky rozšířena po celém světě.

Cílem této práce je formou literárního přehledu sumarizovat dostupné informace o vnímavosti různých druhů ryb k nebezpečnému infekčnímu onemocnění - koi herpesviróze. Nedílnou součástí práce je také charakteristika původce onemocnění, seznámení s používanými diagnostickými metodami, popis klinických a

patologických příznaků a informace o epizootologické situaci v chovech ryb ve světě.

## **2. Historie a rozšíření koi herpesvirózy (Koi Herpes Virus Disease; KHVD)**

### **2.1. Prvotní vzplanutí a následné rozšíření koi herpesvirózy v Izraeli a Severní Americe**

První zpráva o onemocnění způsobujícím hromadný úhyn kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.) a koi kapra (*Cyprinus carpio koi*) v Izraeli byla předložena na 9. Mezinárodní konferenci Evropské asociace rybích patologů (European Association of Fish Diseases; EAFF) na ostrově Rhodos v roce 1999 (Ariav a kol., 1999). K prvnímu vzplanutí nákazy v chovech kapra došlo u Severozápadního pobřeží Izraele na začátku května 1998. V následujících třech letech se objevovala další ohniska nákazy, vždy na jaře a na podzim při teplotě vody v rozmezí 22 - 26 °C. Do roku 2000 se nemoc rozšířila do 90 % farem v Izraeli (Perelberg a kol., 2003).

Koncem roku 1998 bylo podle Graye a kol. (2002) zaznamenáno vzplanutí neznámé nákazy také u koi kaprů v USA krátce poté, co se ryby vrátily z mezinárodní výstavy koi kaprů v New Yorku. Stejní autoři uvádí, že během roku 1999 byla hlášena další dvě ohniska nákazy ve státě Kalifornie (Ventura a Los Angeles).

Vzorky tkáně z prvního amerického ohniska a z Izraele byly zaslány na University of California, School of Veterinary Medicine, Davis, USA. Vědeckému týmu prof. Hedricka se podařilo na buněčné linii, připravené z epidermálních buněk ploutve koi kapra, KF - 1 (koi fin 1), ze vzorků tkání nemocných ryb izolovat neznámý virus (Hedrick a kol., 2000). Vzhledem k morfologickým znakům typickým pro herpesviry byl zařazen do čeledi Herpesviridae (Pokorová a kol., 2005). Analýza vzorků také ukázala, že izoláty z USA a Izraele byly identické, ale virus se lišil od běžně se vyskytujícího kapřího herpesviru 1 (CyHV-1) (Gilad a kol., 2002).

Díky hostitelské specifitě a morfologické podobnosti s řádem Herpesvirales byl původce nákazy nazván koi herpesvirem (KHV).

V průběhu roku 2004, díky konvenčním metodám PCR, použitým k vyšetření vzorků z jater, sleziny a ledvin odebraných z případů vysoké mortality koi kapra v New Yorku, bylo potvrzeno, že ryby byly infikovány KHV (Grimmett a kol., 2006). Michiganský odbor přírodních zdrojů (Michigan Department of Natural Resources) uvádí, že na severu středozápadního regionu USA, u hranic s Kanadou, došlo také k masivnímu úhynu kapra způsobenému KHV (Outdoorhub, 2015).

V letech 2007 a 2008 došlo k hromadným úhynům populace divokého kapra ve dvou oblastech Kanady. První úhyn nastal na jaře v regionu Ontario (jezero Kawartha), kde uhynulo přes 12 000 kaprů. V létě 2008 byl hlášen hromadný úhyn v Manitobě a znovu v regionu Ontario (Garver a kol., 2010).

## **2.2 Rozšíření koi herpesvirózy v Asii**

Mimo již zmiňované první propuknutí KHV v Izraeli roku 1998 a následné rozšíření nákazy do 90 % chovů kapra (Perelberg a kol., 2003), byl virus hlášen v chovech koi kapra v Hong Kongu v roce 2001, v chovech kapra obecného v Indonésii a v chovech koi kapra na Tchaj-wanu v roce 2002 (Haenen a Hedrick, 2006). V Číně byl virus poprvé objeven v importu koi kapra v roce 2002 (Liu a kol., 2002). V Japonsku se virus vyskytl v chovu kapra obecného v roce 2003, v Thajsku a Singapuru v chovech koi kapra v roce 2005 (Haenen a Hedrick, 2006; Lio - Po, 2007).

K prvnímu případu úhynu způsobeného KHV v Indonésii došlo na východě ostrova Jáva v oblasti Blitaruna v březnu 2002. Do této lokality byly v lednu 2002 vysazeny ryby z Číny a Hong Kongu. Následující měsíc došlo k druhému vzplanutí nákazy v obsádce kapra obecného na západě Jávy. V květnu byl virem zasažen kapr obecný v klecových chovech v přehradě Cirata. Do roku 2006 se nemoc rozšířila do dalších indonéských kapřích farem a způsobila až 95% úhyn (Sunarto a kol., 2005).

Na rozdíl od autorů, kteří zmiňují výskyt KHV v chovu kapra obecného v Japonsku v roce 2003 (Haenen a Hedrick, 2006; Lio - Po, 2007), Amita a kol. (2002) uvádí, že v Japonsku došlo k detekci KHV u koi kaprů již v roce 2001. Následně byly odebrány vzorky ryb z 20 farem, analyzovány pomocí PCR a shledány KHV negativní (Amita a kol., 2002). V říjnu 2003 byla KHVD poprvé zaznamenána v prefektuře Ibaraki (Sano a kol., 2004). V průběhu dalších dvou měsíců se nemoc rozšířila celkem do 23 japonských prefektur a bylo zaznamenáno na 1200 tun uhynulých ryb (Kimiya, 2004). Nová legislativa od roku 2003 oficiálně zakázala přesun kapra obecného a koi kapra z infikovaných oblastí Japonska (Yamada, 2004). V dalších letech však přesto došlo k masivnímu rozšíření a na jaře 2006 byl KHV zjištěn u 45 ze 47 japonských prefektur (Hara a kol., 2006).

V Thajsku byla KHVD poprvé diagnostikována v březnu 2005 u chovatele koi kaprů. Bylo zjištěno, že se ryby o pár dní dříve účastnily výstavy v Bangkoku.

Virus se však dále nerozšiřoval (Tandavanitj a kol., 2005). V Singapuru byla KHVD zjištěna ve dvou ohniscích v roce 2006 (Musa a kol., 2005). Další izolace viru byly zaznamenány v Myanmaru, Kambodži, Laosu, Filipínách, Malajsii (Lio - Po a kol., 2009).

### **2.3. Rozšíření koi herpesvirózy v Evropě**

První podezření na onemocnění vyvolané koi herpesvirem v Evropě pochází z chovů koi kaprů v Německu z let 1997 a 1998 (Bretzinger a kol., 1999; Hoffmann, 2000). Žaberní tkáň postižených ryb byla vyšetřena transmisí elektronovou mikroskopií a v jádře a cytoplazmě respiračních epitelových buněk byly pozorovány herpesvirové částice. Po izolaci z nemocných německých koi kaprů byl virus předběžně klasifikován jako herpesvirus (Neukirch a Kunz, 2001).

Ve Velké Británii byla poprvé zaznamenána ohniska virové nákazy koi kaprů v letech 1999 a 2000. Klinické příznaky onemocnění byly podobné s příznaky, které byly pozorovány v Izraeli, USA a Německu (Walster, 1999; Walster, 2000). Na desáté mezinárodní konferenci EAAP v Dublinu Way a kol. (2001) jako první uvedli izolaci KHV z koi kaprů ve Velké Británii. Virus byl izolován z ryb importovaných z Izraele a studie prokázaly velkou podobnost s izoláty z Izraele a USA v roce 1998. Nicméně Denham (2003) uvádí nálezy KHV ve Velké Británii i z roku 1996, podobně tak i „Centrum vědy pro životní prostředí, rybolov a akvakulturu“ (CEFAS) uvádí pozitivní nález KHV DNA v retrospektivní analýze histologického materiálu z roku 1996, pocházejícího z recirkulačního systému (lokalita hrabství Derby, Anglie) (Way a kol., 2004), o čemž se zmiňují i Haenen a kol. (2004). Další izolace KHV proběhly ve Velké Británii z koi kaprů dovezených z USA, Izraele a Malajsie (Way a kol., 2001). V roce 2003 byl KHV poprvé zjištěn v britských volných vodách, kde došlo k hromadnému úhynu kapra (Denham, 2003; Way a Dixon, 2007). Nadcházející detekce KHV byly provedeny v menším počtu v letech 2004 a 2005. V roce 2006 byla hlášena a potvrzena ohniska nálezů na 23 místech v jižní Anglii (Way a Dixon, 2007).

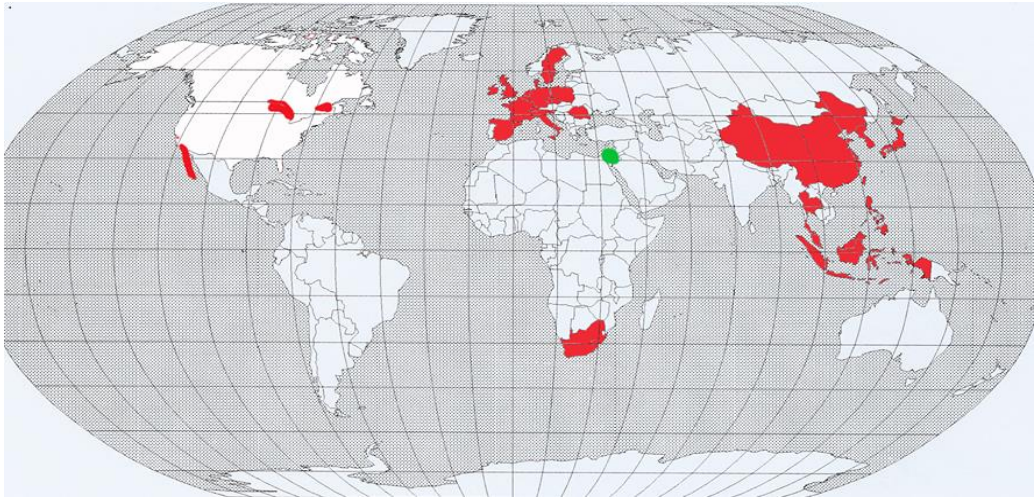
Podle Pokorové a kol. (2005) bylo první ohnisko nákazy na evropském kontinentu potvrzeno v Belgii roku 1999 a časem došlo k rozšíření i do dalších evropských zemí. Roku 2002 byl virus oficiálně potvrzen ve Velké Británii, Dánsku, Německu a Nizozemí, dále roku 2003 ve Francii, Rakousku, Itálii, Lucembursku a

Švýcarsku. V létě roku 2004 došlo k několika vzplanutím v Polsku (Antychowicz a kol., 2005; Bergmann a kol., 2006). Dva případy KHVD (Koi Herpes Virus Disease) byly hlášeny z Irska v letech 2005 a 2007. Oba se týkaly dovezených koi kaprů (McCleary a kol., 2011).

První nepřímý kontakt s KHV na území České republiky byl roku 2000, kdy izraelští výzkumníci požádali Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech o poskytnutí zmraženého spermatu amurského Sazana, pro ověření možnosti využití této formy kapra k produkci hybridů, kteří jsou rezistentní vůči KHV (Piačková a kol., 2015). První záchyt KHV na území České republiky v roce 2004 byl zjištěn u ryb bez zjevných klinických příznaků, na základě vyšetření pomocí PCR (Pokorová a kol., 2005). V letech 2005 a 2006 byly v rámci řešení grantového projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum MZe ČR „Ochrana chovů kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.) před onemocněním způsobeným koiherpesvirem (KHV)“, odebrány vzorky tkání ze 138 ryb (kaprů a koi kaprů) ze 13 farem a současně na žádost majitelů pro potvrzení bezinfekčnosti za účelem dovozu a vývozu ryb bylo vyšetřeno celkem 66 koi kaprů. Vyšetřením metodou PCR byla zjištěna přítomnost viru v 5 lokalitách (Pokorová a kol., 2007). Od roku 2008 bylo v České republice zachyceno minimum případů přítomnosti KHV, z toho polovina případů byla zjištěna u ryb bez klinických příznaků díky pravidelnému monitoringu Státní veterinární správy České republiky (Pokorová a kol., 2013). Novotný a kol. (2010) popisují případ úhynu koi kaprů v zahradním jezírku v ČR. Infekce byla tehdy pravděpodobně zavlečena dovozem koi kaprů z Thajska a byla doprovázena vysokou mortalitou. Na základě klinického pozorování a histopatologického vyšetření vzniklo podezření na KHVD. Diagnóza byla potvrzena pomocí metody PCR.

## **2.4. Rozšíření koi herpesvirózy v ostatních částech světa**

V současné době jsou KHV prosté pouze Jižní Amerika, Austrálie a Severní Afrika. Otázkou je, do jaké míry se v těchto oblastech vyšetřuje a zda nepřítomnost KHV není jen domnělá. Celosvětové rapidní rozšíření viru způsobily mezinárodní obchody a výstavy kapra obecného a jeho okrasných forem (Rakus a kol., 2013). Rozšíření KHV ve světě do roku 2015 je znázorněno na obrázku č. 1.



Obr. 1. Rozšíření KHV ve světě do roku 2015. První vzplanutí (Izrael) označeno zeleně, území, která byla dosud zasažena virem KHV označena červeně (obrázek: J. Kostlán).

### **3. Charakteristika koi herpesviru**

#### **3.1. Obecná charakteristika herpesvirů**

Herpesviry jsou specifické hostitelské patogeny, které se běžně vyskytují u obratlovců. Většina herpetických infekcí není na první pohled zřejmá, nebo způsobuje v přírodních podmínkách jen mírná onemocnění. V hostiteli, který má oslabenou imunitu, či v prostředí, které je příznivé pro přenos viru na hostitele, jsou však tyto viry vysoce patogenní (Hanson a kol., 2011). Herpesviry mají poměrně složitý virion, složený z velkého počtu proteinů uspořádaných do tří výrazných struktur: kapsidu, vrstvy proteinů (tegumentu) a obalu. Genom herpesvirů je tvořen lineární dvouvláknovou molekulou DNA. Velikosti genomů se pohybují od 125 kbp (tisíc párů bazí) do 290 kbp (Carter a Saunders, 2013). Herpesviry mají vyvinutý složitý mechanismus k tomu, aby byly schopny dlouho přetrvávat v hostiteli (Hanson a kol., 2011). Dosud byly sekvenovány genomy více než 48 různých herpetických virů včetně tří virů infikující ryby (Davison, 1992; Aoki a kol., 2007; Van Beurden a kol., 2010), dvou virů infikujících žáby (Davison a kol., 2006) a viru, který infikuje ústřice (Davison a kol., 2005).



## 3.2. Klasifikace koi herpesviru

Po první izolaci viru ze vzorků pocházejících z Izraele a USA byl virus vzhledem k morfologickým znakům typickým pro herpesviry zařazen do čeledi Herpesviridae a nazván koi herpesvirem (KHV) (Hedrick a kol., 2000). Stejného virového původce izolovali Ronen a kol. (2003) a virus byl na základě patologických změn, které způsoboval, označen jako „virus kapří nefritidy a žaberní nekrózy“ (Carp interstitial Nephritis and Gill necrosis Virus; CNGV). Sekvenční analýza části genomu ukázala, že KHV je úzce spjat s *Cyprinid herpesvirus 1* (CyHV-1) a *Cyprinid herpesvirus 2* (CyHV-2) a vzdáleně příbuzný s *Ictalurid herpesvirus 1* (IcHV-1) a *Ranid herpesvirus 1* (RaHV-1) (Waltzek a kol., 2005). Od roku 2009 byl KHV zařazen do řádu Herpesvirales. Tento řád zahrnuje tři čeledi: Herpesviridae, Alloherpesviridae a Malacoherpesviridae. Čeleď Herpesviridae zahrnuje herpesviry způsobující onemocnění plazů, ptáků a savců (včetně člověka). Do čeledi Malacoherpesviridae zahrnujeme v podstatě jediného zástupce, který vyvolává onemocnění ústřic (Doszpoly a kol., 2011). Samotný virus KHV pak patří do čeledi Alloherpesviridae. Čeleď Alloherpesviridae je nově vytvořená samostatná čeleď, sdružující infekční herpesviry ryb a obojživelníků (Waltzek a kol., 2005). Čeleď je rozdělena do 4 rodů - *Cyprinivirus*, *Ictalurivirus*, *Salmonivirus* a *Batrachovirus* (Davison a kol., 2013). Rod *Cyprinivirus* obsahuje nejen dva viry infikující kapra obecného a koi kapra (virus kapřích neštovic - CyHV-1 a koi herpesvirus - CyHV-3), ale také virus napadající karase zlatého (CyHV-2) a virus napadající sladkovodní úhoře (AngHV-1) (Waltzek a kol., 2005).

Většina herpesvirů ryb a obojživelníků, seskupujících se do čeledi Alloherpesviridae, je vzdáleně příbuzná s herpesviry plazů, ptáků a savců, patřícími do čeledi Herpesviridae. (Doszpoly a kol., 2011).

## 3.3 Rod *Cyprinivirus*

### 3.3.1 *Cyprinid Herpesvirus 1* (CyHV-1)

Virus CyHV-1, někdy označovaný jako virus kapřích neštovic, způsobuje nezhoubné papilomatózní epiteliální léze u kapra obecného a jeho okrasných forem. Virus kapřích neštovic byl nalezen u ryb ve většině evropských zemí, v USA, Izraeli, Rusku a v některých asijských oblastech (Čína, Japonsko, Korea, Malajsie). Nádory nalezené na kůži ryb jsou bílé až šedé a mohou pokrýt velké plochy povrchu těla,

včetně hlavy a ploutví. U juvenilních stadií kapra se mohou objevit klinické příznaky, které jsou podobné příznakům koi herpesvirózy, může také dojít ke zvětšení dutiny tělní, k výskytu hemoragií na břicho a skřelích a k tmavé pigmentaci kůže (Plumb a Hanson, 2011). Dospělé infikované ryby nevykazují klinické příznaky typické pro KHVD. Onemocnění většinou probíhá chronicky, je sezónní a herpetické léze se obvykle rozvíjejí při teplotách nižších než 15 °C. Se zvýšenou teplotou léze ustupují (Palmeiro a Weber, 2010). Sano a kol. (1993) prokázali přítomnost CyHV-1 v nervových a podkožních tkáních po odeznění nemoci, což naznačuje latenci viru vysvětlující opakování lézí.

### **3.3.2. Cyprinid Herpesvirus 2 (CyHV-2)**

Tento virus způsobuje nekrózu krvetvorné tkáně u karase zlatého, *Carassius auratus*. Infikované ryby neprojevují příznaky typické pro koi herpesvirózu, s výjimkou apatie a bledých žaber. V dutině tělní bylo makroskopicky patrné odbarvení ledvin a sleziny, mikroskopicky nekrotická ložiska v hematopoetické tkáni, slezinné dřeni, pankreatu a v podslizniční vrstvě střeva (Jung a Miyazaki, 1995; Groff a kol., 1998). Ohniska nákazy se objevují v závislosti na teplotě vody a byla zaznamenána v rozmezí 15 - 25 °C. Mortalita ryb se pohybuje mezi 50 až 100 % nakažené populace (Groff a kol., 1998). Rychlá detekce CyHV-2 se obvykle provádí pomocí PCR (Goodwin a kol., 2006; Waltzek a kol., 2009).

### **3.3.3. Anguillid Herpesvirus 1 (AngHV-1)**

Tento virus patří spolu s CyHV-1, CyHV-2 a CyHV-3 do rodu *Cyprinivirus*, přestože způsobuje onemocnění v populacích úhořů žijících ve volných vodách (Sano a kol., 1990; Haenen a kol., 2002). Van Beurden a kol. (2010) sekvenovali kompletní genom viru a potvrdili jeho příslušnost k čeledi Alloherpesviridae. Fylogenetické studie ukázaly, že AngHV-1 úzce souvisí s kapřími herpesviry, ačkoliv infikuje úhoře a nikoliv kaprovité druhy ryb (Van Beurden a kol., 2010). Z toho důvodu Mezinárodní výbor pro taxonomii virů (ICTV) přiřadil AngHV-1 k rodu *Cyprinivirus*. AngHV-1 byl izolován z farmového chovu úhoře říčního (*Anguilla anguilla*) a japonského úhoře (*Anguilla japonica*) v Japonsku (Sano a kol., 1990). Dále byl AngHV-1 izolován z úhoře japonského v Taiwanu (Ueno a kol., 1992) a z úhoře říčního v mnoha evropských zemích (Davidse a kol., 1999; Haenen a

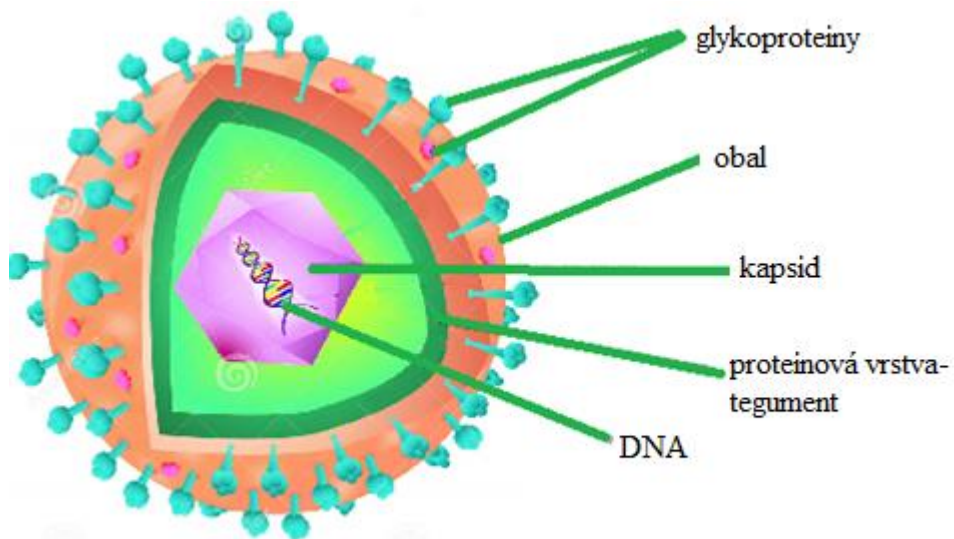
kol., 2002; Van Ginneken a kol., 2004; Jakob a kol., 2009). Virus byl také nalezen v divokých populacích úhoře v Holandsku (Van Ginneken a kol., 2004) a v Německu (Jakob a kol., 2009). Ačkoliv se klinické příznaky mezi jednotlivými ohnisky mohou lišit, nejčastějšími příznaky jsou apatie, krváceniny na kůži, ploutvích a žábřácích, překrvení žaberního epitelu a světlá játra. Mortalita úhořů se pohybuje v rozmezí 1 - 10 %. Diagnóza se určuje pomocí izolace viru na buněčných kulturách (Sano a kol., 1990; Haenen a kol., 2002), nebo pomocí PCR (Rijsewijk a kol., 2005). Přestože mortalita není příliš vysoká, kontrola ohnisek nákazy může být obtížná v důsledku přítomnosti viru v divokých populacích úhoře. Virus má schopnost setrvat latentní i ve zjevně zdravých rybách (Van Nieuwstadt a kol., 2001).

### **3.4. Struktura koi herpesviru**

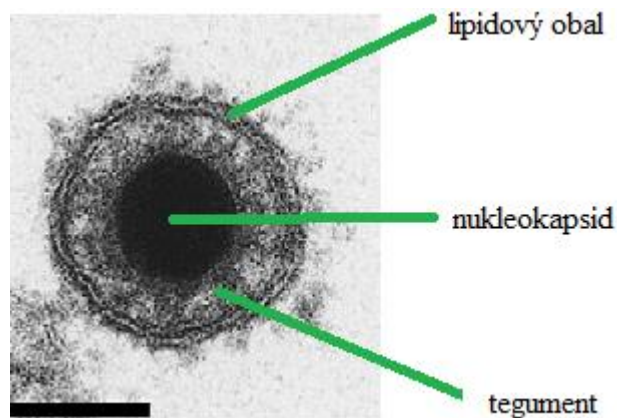
Zralé viriony s vnějším fosfolipidovým obalem pocházejícím z hostitelské buňky dodávají virionu celkový průměr 170 - 230 nm. Hlavní složkou obalu virionu je dvouvrstvý lipoprotein (Carter a Saunders, 2013). Podle Miyazakiho a kol. (2008) závisí průměr virionu na infikovaném typu buněk.

Vnitřní část virionu je složena z vnitřního kapsidu s ikosahedrální symetrií, o průměru 100 až 110 nm (Carter a Saunders., 2013). Schématickou strukturu virionu herpesviru zobrazuje obrázek č. 2.

Genom CyHV-3 je lineární dvouvláknová molekula DNA o velikosti 295 kbp (Aoki a kol., 2007), někteří autoři uvádí velikost genomu 277 kbp (Ronen a kol., 2003). Jedná se tedy o největší genom ze všech dosud sekvenovaných herpesvirů (Aoki a kol., 2007). Podle Cartera a Saunderse (2013) se genom skládá z lipidového obalu a nukleokapsidu, které jsou oddělené proteinovým matrixem nazývaným tegument (obrázek č. 3).



Obr. 2. Struktura virionu herpesviru (podle Dreamstime, 2015; překlad popisků: J. Kostlán).



Obr. 3. Virion CyHV-3, měřítko: 100 nm (podle Mettenleiter a kol., 2009, překlad popisků: J. Kostlán).

## 4. Charakteristika koi herpesvirózy (KHVD)

### 4.1 Predispoziční faktory a mortalita

Důležitými faktory prostředí, které obecně ovlivňují vznik a závažnost virové infekce, jsou teplota, míra virulence viru, věk a kondice ryb, hustota obsádky a

stresové faktory, jako jsou přeprava ryb, manipulace, či výtěr (Le Morvan a kol., 1998; Ilouze a kol., 2010).

V případě KHV je hlavním činitelem ovlivňujícím šíření viru a rozvoj onemocnění teplota vody (Gilad a kol., 2003). Vznik onemocnění byl zaznamenán při teplotě vody mezi 16 a 25 °C (Haenen a kol., 2004; Hedrick a kol., 2000; Perelberg a kol., 2003; Sano a kol., 2004). Minimální teplota pro šíření viru je 13 °C (Gilad a kol., 2004), přičemž maximální teplota vody pro průnik viru do organismu ryb je 28 °C. Vyšší teploty nebo teploty pod 13 °C infekci brzdí (Gilad a kol., 2004; Ilouze a kol., 2010). Nejkritičtější období pro vypuknutí infekce KHV je jaro, kdy jsou imunitní reakce hostitele potlačeny (Hedrick a kol., 2000). Experimentální studie navíc prokázaly, že jarní a letní mortalita způsobená koi herpesvirózou může být vyvolána přesunem ryb, které byly dříve v kontaktu s virovou infekcí z chladných vod (teplotně nevhodných pro šíření viru – pod 13 °C) do vod teplejších (okolo 23 °C). Tím dojde k opětovnému vyvolání onemocnění následovanému mortalitou napadených jedinců během 7 až 12 dní (Gilad a kol., 2003).

Morbidity (nemocnost, neboli % ryb vykazujících klinické příznaky onemocnění) populací postižených KHV může být podle Bretzinger a kol. (1999) až 100 % a mortalita 70 - 80 %. Hedrick a kol. (2000) uvádí, že mortalita infikovaných ryb dosahuje 80 - 100 %. Také sekundární bakteriální, či parazitární infekce, které se u ryb nakažených KHV běžně vyskytují, mohou ovlivnit celkovou mortalitu (Haenen a kol., 2004).

## **4.2. Přenos viru**

Virus se přenáší horizontálně přímým kontaktem mezi infikovanými a vnímavými jedinci a stykem s kontaminovaným prostředím. K horizontálnímu přenosu infekce dochází buď přímo, nebo nepřímo. Přímý přenos viru probíhá při kontaktu s kůží již infikovaných ryb (El-Matbouli a Soliman, 2011, Kempter a kol., 2012). K přímému přenosu může také dojít při kanibalistickém chování kaprů (Michel a kol., 2010; Fournier a kol., 2012). Nepřímo je virus přenášen rybími výkaly, planktonem, vodními bezobratlými, rybožravými ptáky (mohou přenášet virus přenesením infikovaných ryb z jedné lokality do druhé) a vodou, která je hlavním abiotickým přenašečem (Dishon a kol., 2005; Minamoto a kol., 2011; Ilouze a kol., 2010). Virové částice se uvolňují do okolí z epiteliálních buněk žaber

(Pikarsky a kol., 2004). Vzhledem k tomu, že virus byl detekován i ve výkalech nemocných ryb (Dishon a kol., 2005), lze předpokládat, že k jeho replikaci dochází i v epitelálních buňkách střeva. Vertikální přenos, tj. přenos infekce z rodičů na potomstvo nelze vyloučit, avšak zatím možnost tohoto způsobu přenosu nebyla potvrzena (Rakus a kol., 2013).

### **4.3 Přežití viru mimo hostitele**

Podle Perelberg a kol. (2003) KHV aktivně přetrvává ve vodě po dobu 4 hodin při teplotě 23 – 25 °C. Delší období infekčnosti viru by záviselo na složení vody (Shimizu a kol., 2006). Stejní autoři uvádí, že virus v přirozeném vodním prostředí ztrácí infekčnost do 3 dnů. Haramoto a kol. (2005) zjišťovali během ledna až března roku 2004 přítomnost viru v říční vodě (řeka Tamagawa). Z odebraných 48 vzorků byla zjištěna přítomnost viru pouze ve dvou případech. V květnu roku 2004 byla ve třech oblastech řeky Tamagawa (Japonsko) zaznamenána ohniska nákazy KHV, v nichž uhynulo 8 000 kaprů. Pozitivní výsledky ze vzorků vody tedy prokázaly přítomnost DNA KHV minimálně 4 měsíce před zjištěním ohnisek, při teplotě 9 - 11 °C.

Kasai a kol. (2005) potvrdili, že přežití viru ve vodním prostředí je nepřímo závislé na teplotě. Jednoduše řečeno, čím nižší je teplota, tím delší je přežití viru. Shimizu a kol. (2006) studovali rozdíl v délce přežívání virulentního viru v neošetřené a v autoklávované říční vodě. V neošetřené vodě byla zaznamenána významná redukce titru koi herpesviru během tří dnů, zatímco v téže říční vodě, která byla před inokulací viru sterilizována v autoklávu, byla infektivita viru zachována déle než sedm dní. Tuto skutečnost vysvětlují přítomností „anti-KHV“ bakterií v říční vodě.

Viry se množí pouze uvnitř živé vnímavé buňky hostitele. Kromě kůže a žaber se virus KHV množí také v buňkách střevní sliznice a je vylučován společně s fecés (Gilad a kol., 2004). Faktory prostředí rozhodují o dalším osudu viru ve vodě. Navázání na pevnou látku jej může chránit před působením degradačních enzymů i před UV zářením. To umožňuje nejen prostou perzistenci viru v sedimentech, ale také jeho akumulaci v bentických organismech, které se poté mohou stát významným zdrojem virové infekce (Matsui a kol., 2008). Stejní autoři uvádí, že virus KHV přežívá v sedimentu ve vyšších koncentracích, než ve vodě. To znamená, že

sediment působí jako potenciální rezervoár pro KHV v přírodních sladkovodních ekosystémech.

#### 4.4 Klinické příznaky a histopatologické změny

Hedrick a kol. (2000) uvádí první příznaky onemocnění při permissivní teplotě (23 °C) po 2 - 7 dnech po infekci, při nižších teplotách je inkubační doba 7 - 21 dní (Haenen a kol., 2004). Nakažené ryby jsou apatické, leží na dně nádrže se složenou hřbetní ploutví a nepřijímají potravu. V rybnících se infikované ryby shromažďují v blízkosti přítoku vody nebo nedaleko břehů, kde vyhledávají kyslíkatější zóny. Nekróza žaber, nepravidelné zbarvení kůže a zvýšená sekrece hlenu se projevují od 3. dpi (Rakus a kol., 2013). V závislosti na fázi infekce vykazuje kůže různé klinické příznaky, jako je např. hyperemie, zejména u bázi ploutví a na bříše. Bledé, nepravidelné skvrny na kůži jsou spojeny s vylučováním slizu v počáteční fázi infekce. V pozdější fázi infekce se projevuje hyperplazie buněk respiračního epitelu a nedostatek kožního slizu. Dochází také ke zkrabatění povrchu kůže a vznikají herpetické léze. Lze rovněž pozorovat eroze na ploutvích a bilaterální enoftalmus (zapadlé oči). Některé ryby vykazují v posledním stadiu infekce neurologické příznaky, ztrácejí rovnováhu a jsou dezorientovány (Hedrick a kol., 2000; Haenen a kol., 2004; Perelberg a kol., 2003). Postižené ryby trpí před úhynem poruchami plavání, změnou barvy, či zvýšenou respirační frekvencí (Gray a kol., 2002). Projevují se také otoky, bledé skvrnité žábry a kožní léze (Oh a kol., 2001). Typické vnější příznaky pozorované na nemocných rybách znázorňuje obrázek č. 4.



Obr. 4. Klinické příznaky KHVD u kapra obecného - (A) zvýšená produkce hlenu, enoftalmus, (B) krváceniny na kůži, (C) nekróza žaber (podle Gotesman a kol., 2013).

Nejvýraznější histopatologické změny jsou pozorovány na žábřácích. Zahrnují erozi primárních lamel, fúzi (spojení) sekundárních lamel a adhezi (slepení) žaberních filament (Perelberg a kol., 2003; Pikarsky a kol., 2004). Žábry také vykazují hyperplazii, hypertrofii, nebo nukleární degeneraci žaberního epitelu a překrvení krevních cév v žaberním oblouku (Miyazaki a kol., 2008; Pikarsky a kol., 2004). Lze pozorovat záněty a nekrózy žaber vyúsťující až v úplnou ztrátu lamel (Ouyang a kol., 2013; Pikarsky a kol., 2004). Postiženy jsou také hematopoetické buňky v kraniální ledvině (Miyazaki a kol., 2008). Slabé peritubulární zánětlivé infiltráty jsou evidentní v kaudální ledvině na začátku 2. dpi a časem se množí. To je doprovázeno přetížením krevních cév a degenerací tubulárního epitelu nefronů (Pikarsky a kol., 2004). Ve slezině jsou nejvíce postiženy splenocyty (slezinné buňky). V některých případech je velké množství odumřelých splenocytů doprovázeno krvácením do parenchymu sleziny. V játrech jsou nejvíce postiženy hepatocyty (Miyazaki a kol., 2008). V jaterním parenchymu jsou pozorovány mírné zánětlivé infiltráty. V mozku byly pozorovány meningeální a parameningeální záněty (Pikarsky a kol., 2004). Analýza rybího mozku ukázala překrvení kapilár a malých žil a dále rozpad nervových vláken v prodloužené míše (Miyazaki a kol., 2008). V kůži infikovaných ryb se o 50 % snížil počet pohárkových buněk produkujících hlen (Adamek a kol., 2013).

#### **4.5 Patogeneze CyHV-3**

Hlavní vstupní branou viru byly podle prvních zjištění žábry (Dishon a kol., 2005; Gilad a kol., 2004; Pikarsky a kol., 2004). Novější experimentální studie s použitím bioluminiscenčního systému *in vivo* prokázaly, že hlavním vstupem viru do organismu ryby je kůže (Costes a kol., 2009). Odstranění kožního hleny a epidermální léze usnadňují vstup viru do organismu hostitele (Raj a kol., 2011). Po počáteční replikaci se virus šíří do vnitřních tkání již 24 hodin po infekci (Gilad a kol., 2004). Replikace probíhá zejména v žábřácích, kůži a ve střevě. Replikace ve stěně střevní je zdrojem vylučování viru do vody spolu s výkaly (Dishon a kol., 2005). Nedávno byla prokázána infekce CyHV-3 alimentární cestou přes pharyngeální periodontální sliznici použitím krmných granulí kontaminovaných virem (Fournier a kol., 2012). Virus se také může replikovat v ledvinách, slezině a játrech (Pikarsky a kol., 2004).



Zástupci čeledi Herpesviridae se vyznačují dvěma odlišnými fázemi biologického cyklu: lytickou replikací a latencí. Lytická replikace je spojena s produkcí virových částic, latence spočívá v zachování virového genomu. Po reaktivaci je latence vystřídána lytickou replikací. Latence u čeledě Alloherpesviridae doposud nebyla přesvědčivě prokázána (Ilouze a kol., 2010). Zvyšující se počet důkazů podporuje existenci latence v pozdějších fázích infekce. Podle Gilada a kol. (2004) byla DNA CyHV-3 zjištěna v mozku ryb, které přežily primární infekci a nevykazovaly klinické příznaky, až 1 rok po infekci. Uchii a kol. (2009) uvádí, že CyHV-3 přetrvával v divokých populacích kapra obecného 2 roky po odeznění prvotního vzplanutí. Virová DNA v žábrách byla zjištěna u ryb bez příznaků onemocnění, které přežily 100 dní primární infekce a byly udržovány při teplotě 20 °C (Bergmann a Kempter, 2011). Nedávné studie prokázaly přítomnost viru v bílých krvinkách a jiných tkáních (mozek), kde virus zůstává ve velmi malém počtu kopií a může být reaktivován vhodnou (permissivní) teplotou (Eide a kol., 2011; Xu a kol., 2013). Podle St-Hilaire a kol. (2005) a Eide a kol. (2011) teplota vody reguluje přechod mezi latencí a lytickou replikací a umožňuje viru přetrvávat v hostitelské populaci během roku i za nepříznivých teplot.

## **5. Vnímavost různých druhů ryb vůči KHVD**

### **5.1 Vnímavost kapra obecného (*Cyprinus carpio carpio*) a koi kapra (*Cyprinus carpio koi*) a jejich kříženců**

Mezi druhy ryb vnímavé ke KHVD zařazuje světová organizace pro zdraví zvířat (World Organisation for Animal Health; OIE) pouze kapra obecného, kapra koi a jejich křížence. Hedrick a kol. (2006) zaznamenali přirozenou vnímavost vůči KHVD jen u kapra obecného a jeho barevné variety kapra koi. Tyto ryby jsou vnímavé ke KHVD již od juvenilních stádií (Rakus a kol., 2013). Perelberg a kol. (2003) uvádí vyšší procento vnímavosti u mladších věkových kategorií, než u adultních jedinců. U larválních stádií kapra obecného a koi kapra doposud nebyla potvrzena vnímavost vůči KHVD (Ito a kol., 2007). Ronsmans a kol. (2014) však pomocí luminiscenční metody prokázali přítomnost viru u embryonálního i larválního stádia.

Izraelští výzkumníci se v prvních letech vzplanutí koi herpesvirózy na farmách, zabývajících se chovem koi kapra a konzumního kapra, pokoušeli zjistit, zda by

nebylo možné snížit mortalitu obsádek vysazováním odolnějších plemen a kříženců. Pro první testování odolnosti bylo vybráno domestikované izraelské plemeno kapra Dor - 70 (D) a plemeno Našice (N), dovezené v minulosti z bývalé Jugoslávie. Tato plemena byla křížena navzájem a také každé jednotlivě s Amurským sazanem (AS), k čemuž bylo použito zmražené sperma AS, které bylo poskytnuto Výzkumným ústavem rybářským a hydrobiologickým ve Vodňanech. Přežití čistých plemen dosahovalo 28 % u Dor - 70 a pouze 9 % u plemene Našice. Kříženci se Sazanem vykazovali průkazně vyšší přežití: D x AS 64 % a N x AS 69 % přežití (Shapira a kol., 2005). Podobná studie, ale s větším počtem plemen a kříženců, byla o několik let později provedena v České republice. Do experimentálních infekcí byla zařazena plemena a produkční hybridy kapra obecného, běžně používaní v rybníční akvakultuře ČR. I v této práci byl prokázán pozitivní vliv Amurského sazana (dříve *Cyprinus carpio haematopterus*, nyní *Cyprinus rubrofuscus*) na odolnost ryb, neboť plemena a kříženci, kteří měli ve svém rodokmenu Amurského sazana, vykazovali ve většině případů vyšší přežití, než plemena a meziplenní hybridy, kteří byli odvozeni pouze od evropského kapra (*Cyprinus carpio carpio*) (Piačková a kol., 2013). K podobným závěrům došli i britští a maďarští výzkumníci, kteří v rámci mezinárodního projektu EUROCARP testovali odolnost vůči KHVD maďarských plemen kapra a jejich kříženců s divokými kapry pocházejícími z povodí řek Amur a Dunaj (Dixon a kol., 2009).

Experimentální infekce kříženců kapra obecného a koi kapra s jinými druhy kaprovitých ryb prokázaly největší vnímavost vůči KHVD u kříženců koi kapra a karase obecného (kumulativní mortalita 90 %). Menší vnímavost vůči KHVD prokázali kříženci koi kapra a karase zlatého (kumulativní mortalita 35 %) (Bergmann a kol., 2010c). Nejvyšší přežití měli kříženci mezi kaprem obecným a karasem zlatým (kumulativní mortalita 5 %) (Hedrick a kol., 2006).

## **5.2 Přenos koi herpesviru na ostatní vnímavé druhy ryb**

Mnoho experimentálních studií bylo zaměřeno na ověřování možnosti přenosu KHV na další kaprovité druhy ryb. Přednostně byly infikovány druhy ryb přicházející v akvakultuře do reálného styku s kaprem obecným či kaprem koi (Bergmann a kol., 2010a).

První informaci o vnímavosti druhů ryb uvádí Perelberg a kol. (2003), kde byla zkoumána vnímavost druhů ryb z 30 kapřích farem. Přenos KHV kohabitací s ostatními druhy byla prokázána u 72 % kapra obecného po 8 dnech působení viru. Výsledky této studie prokázaly větší vnímavost potěru kapra (mortalita 85 %) ve věku 1 - 3 měsíce o hmotnosti 2,5 - 6 g, než u starších ryb nad 1 rok a hmotnosti 230 g (mortalita 56 %). U ostatních zkoumaných druhů, jako jsou amur bílý, tolstolobik bílý, a karas zlatý, vnímavost ke KHV v této studii nebyla prokázána.

Přítomnost virové DNA pomocí PCR byla prokázána u karase zlatého, který jevil i klinické příznaky onemocnění (Bergmann a kol., 2010a). Bergmann a kol. (2009) uvádí výskyt virové DNA také u závojnky „lví hlava“ a závojnky „shubunkin“. V dalších experimentálních studiích byla zjištěna přítomnost DNA koi herpesviru v tkáních amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*), jelce jesena (*Leuciscus idus*) (Bergmann a kol., 2009), jelce proudníka (*Leuciscus leuciscus*), plotice obecné (*Rutilus rutilus*), hrouzka obecného (*Gobio gobio*), cejna velkého (*Abramis brama*) (Kempter a Bergmann., 2007; Kempter a kol., 2012; Fabian a kol., 2013), dále lína obecného (*Tinca tinca*) (Kempter a kol., 2012; Radosavljević a kol., 2012), slunky obecné (*Leucaspis delineatus*), parmy obecné (*Barbus barbus*), ostroretky stěhovavé (*Chondrostoma nasus*), podoustve říční (*Vimba vimba*), karase obecného (*Carassius carassius*) (Kempter a Bergmann., 2007; Kempter a kol., 2012), tolstolobika bílého (*Hypophthalmichthys molitrix*) (Kempter a kol., 2012; Radosavljević a kol., 2012) a perlína ostrobřichého (*Scardinius erythrophthalmus*) (Fabian a kol., 2013).

Kempter a kol. (2012) a Radosavljević a kol. (2012) dále uvádějí nálezy virové DNA u jelce tlouště (*Leuciscus cephalus*), karase stříbřitého (*Carassius gibelio*) a ježdíka obecného (*Gymnocephalus cernuus*).

Závěry experimentálních testů zaměřených na nekaprovité druhy ryb prokázaly, že DNA KHV je možno najít u vranky obecné (*Cotus gobio*), sekavce písečného (*Cobitis taenia*) (Kempter a kol., 2012), štiky obecné (*Esox lucius*), okouna říčního (*Perca fluviatilis*) (Kempter a kol., 2012; Fabian a kol., 2013), sumečka amerického (*Ameiurus nebulosus*), koljušky tříostné (*Gasterosteus aculeatus*) a candáta obecného (*Sander lucioperca*) (Fabian a kol., 2013).

Z jeseterovitých ryb byla DNA viru prokázána u jesetera atlantského (*Acipenser oxyrhynchus*) a u jesetera ruského (*Acipenser gueldenstaedti*), který podle Kempter a kol. (2009) vykazoval i klinické příznaky onemocnění. Z akvariálních ryb byl CyHV-

3 detekován u krunýřovce (*Ancistrus sp.*) (Bergmann a kol., 2009). U sumce velkého (*Silurus glanis*) virová DNA ani příznaky KHVD nebyly prokázány (Kempter a Bergman, 2007). Výsledky testování přítomnosti virové DNA zjištěné jednotlivými autory jsou pro přehlednost uvedeny v tabulce č. 1.

Tab. 1. Přehled kaprovitých i nekaprovitých druhů ryb seřazených v abecedním pořádku, přítomnost KHV v DNA a případná mortalita a klinické příznaky u daného druhu ryby zasaženého tímto virem.

druh	DNA	mortalita	Klinické příznaky	autor
amur bílý	netestováno	ne	ne	Perelberg a kol. (2003)
	ano	ano	ne	Bergmann a kol. (2009)
jelec jesen	ano	ne	ne	Bergmann a kol. (2009)
jelec proudník	ano	ne	ne	Kempter a Bergmann (2007)
jeseter atlantský	ano	ne	ne	Kempter a kol. (2009)
jeseter ruský	ano	ne	ano	Kempter a kol. (2009)
karas obecný	ano	ne	ne	Radosavljević a kol. (2012)
karas zlatý	netestováno	ne	ne	Perelberg a kol. (2003)
	ano	ne	ne	Sadler a kol. (2008)
	ano	ne	ano	Bergmann a kol. (2010a)
lín obecný	ne	ne	ano	Radosavljević a kol. (2012)
podoustev nosák	ano	ne	ne	Kempter a Bergmann (2007)
tlamoun nilský	netestováno	ne	ne	Perelberg a kol., (2003)
tolstolobik bílý	netestováno	ne	ne	Perelberg a kol. (2003)
	ano	ne	ne	Radosavljević a kol. (2012)
silver perch ( <i>Bidyanus bidyanus</i> )	netestováno	ne	ano	Perelberg et al. (2003)

### 5.3 Přenos CyHV-3 z případných vironosičů na vnímavé druhy ryb

Přítomnost virové DNA ve tkáních „nevnímavých“ druhů ryb vyvolává spekulace o možné roli těchto ryb jako rezervoárů a přenašečů nákazy. Bylo provedeno a publikováno několik studií zabývajících se možností infekce vnímavých druhů ryb kohabitací s potenciálními vironosiči (Piačková, ústní sdělení).

Schopnost přenosu CyHV-3 na vnímavé ryby byla prokázána u lína obecného (Kempter a kol., 2012; Fabian a kol., 2013) a u karase zlatého (Bergmann a kol., 2010a; El-Matbouli a Soliman, 2011; Radosavljević a kol., 2012). Mezi další kaprovité druhy, u kterých byl prokázán přenos CyHV-3, patří amur bílý, tolstolobik bílý, cejn velký, podoustev říční (Kempter a kol., 2012), hrouzek obecný a perlín ostrobřichý (Fabian a kol., 2013).

Z ostatních druhů byl přenos viru na vnímavé ryby prokázán u ježdíka obecného (Kempter a kol., 2012) a štiky obecné (Fabian a kol., 2013). Rakus a kol. (2013) uvádí ve své publikaci druhy ryb, které doposud nebyly testovány na možnost přenosu viru na vnímavé druhy. Mezi zmíněné druhy patří parma obecná, vranka obecná, slunka obecná, ostroretka stěhovavá, jelec jesen, jelec tloušť, karas obecný, jeseter ruský, jeseter atlantský, sekavec písečný a krunýřovec.

## 6. Diagnostika koi herpesvirózy

### 6.1 Diferenciální diagnostika

Na základě posouzení epizootologické situace, průběhu onemocnění, klinických příznaků a typických patologických změn lze vyslovit podezření na onemocnění ryb koi herpesvirózou (Svobodová a kol., 2007). Diferenciálně diagnosticky je však třeba vyloučit další onemocnění kaprovitých ryb, která mohou mít podobné klinické příznaky a patologické změny. V případě nekroz žaberní tkáně by se mohlo jednat například o **branchiomykózu** (původcem je plíseň *Branchiomyces sanguinis* nebo *B. demigrans*), **sanguinikolózu** (původcem je krevní motolice *Sanquinicola inermis*), eventuálně **masivní invazi ektoparazitů** na žábrách (např. zástupci jednorodých motolic z rodu *Gyrodactylus*). Tato onemocnění by bylo možno potvrdit nebo vyloučit mikroskopickým vyšetřením kompresního preparátu žaberní tkáně (Piačková, ústní sdělení).

Kromě parazitárních infekcí by mohla přicházet v úvahu také toxická nekróza žaber, která vzniká v důsledku zvýšené koncentrace amoniaku v krvi ryb. Amoniak je odpadním produktem dusíkatého metabolismu ryb a je vylučován z krve do vody přes žaberní ústrojí. Pokud je jeho vylučování z nějakého důvodu omezeno (vysoké pH, náhlý pokles koncentrace O<sub>2</sub>, poškození žaber, náhlý pokles teploty vody), stoupá koncentrace amoniaku v krevní plazmě a může dojít k autointoxikaci amoniakem, jejímž důsledkem jsou nekrotické změny na žábrách (Svobodová a kol., 2007).

Podobné klinické příznaky a patologické změny se objevují také u kaprů nakažených kapřím edema-virem (Carp Edema Virus; CEV). Tento patogen se objevil v Evropě teprve v posledních několika letech a tu a tam způsobuje u kaprů onemocnění velmi podobné koi herpesviróze (nekrózy žaber, enoftalmus, úhyny), pouze s tím rozdílem, že k jeho propuknutí dochází při nižších teplotách vody (13 - 23 °C), (Haenen a kol., 2013). Toto onemocnění by bylo možno vyloučit pouze virologickým vyšetřením.

## **6.2 Diagnostické metody**

Diagnostika virových nemocí se opírá o několik metod, které se podle svého principu dají rozdělit do dvou skupin: 1) přímý průkaz původce, tj. detekce viru nebo jeho nukleové kyseliny, a 2) nepřímý průkaz původce, tj. průkaz specifických protilátek (Piačková, ústní sdělení). K tomu, aby byla diagnóza koi herpesvirózy potvrzena, je nezbytný přímý průkaz původce (Svobodová a kol., 2007). Do první skupiny diagnostických metod lze v případě koi herpesvirózy zařadit izolaci viru na buněčných liniích, s následným průkazem přítomnosti virových částic elektronovou mikroskopií a v posledních desetiletích také celou skupinu molekulárně biologických metod založených na průkazu specifického úseku virového genomu. Do druhé skupiny patří imunologické metody založené na průkazu specifických protilátek v krevním séru ryb (Piačková, ústní sdělení).

### **6.2.1 Izolace viru na buněčných kulturách**

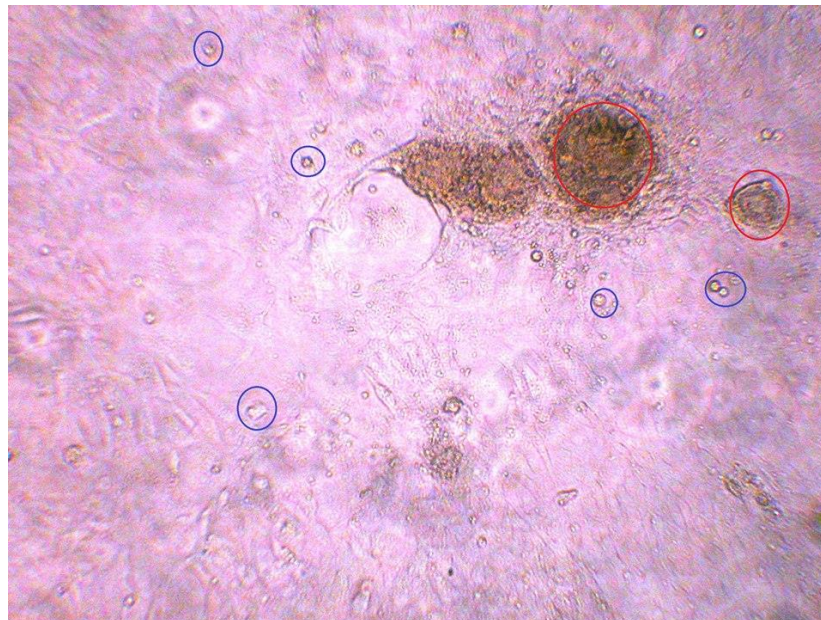
Buněčné kultury jsou tvořeny izolovanými buňkami, které se pěstují v plochých skleněných, nebo plastových lahvích, které se nazývají kultivační nádoby. Jako zdroj živin pro růst buněk slouží kultivační médium poskytující buňkám optimální prostředí. Kultivační médium se přidává do kultivačních nádob a pravidelně se musí

vyměňovat za nové. Růst buněk na stěně kultivační nádoby lze pozorovat pomocí inverzního mikroskopu (Kočárek a kol., 2006).

Působení virů v hostitelských organismech je možno zjednodušeně popsat tak, že virus pronikne do buňky, ve svůj prospěch zvrátí její fyziologické funkce a zahubí ji. Při rozpadu buňky se pak uvolní nově vytvořené virové částice. Stejný proces lze sledovat i v buněčné kultuře infikované virem. Důsledkem působení viru na hostitelskou buňku je zde tzv. cytopatický efekt (CPE). V buněčné kultuře se může projevit zakulacením, nebo vakuolizací buněk. V buněčném monolayeru (jednořadá vrstva buněk), na stěně kultivační nádoby vznikají plaky, tj. místa, kde došlo k cytopatickému efektu a tedy k rozpadu buněk. Kvantifikace plaků v buněčné kultuře, tzv. plaková titrace, je metoda sloužící ke stanovování množství virových částic ve vzorku. Výsledná koncentrace virových částic je vyjádřena počtem plakovitých jednotek (PFU – „plaque forming units“) na 1 ml virové suspenze (Strouhalová, 2011).

Izolace viru z tkání infikovaných ryb na buněčných kulturách byla první metodou využívanou pro detekci koi herpesviru (Hedrick a kol., 2000; Ronen a kol., 2003). Pro kultivaci koi herpesviru byla využívána nově vytvořená buněčná linie z ploutví koi kapra (koi fin 1; KF-1). Během růstu KF-1 buněk, které byly inkubovány při teplotě 25 °C, byla provedena inokulace virem při teplotě 20 °C. Kultivace proběhla v minimálním esenciálním médiu (MEM) s Earlovou solí, doplněném 10% fetálním bovinním sérem (FBS), 50 IU penicilinu /ml, 50 µg streptomycinu a 2 mM L-glutaminu. Virus byl izolován z žaber, sleziny, ledviny, střeva a jater ryb s příznaky typickými pro KHVD. Částečný cytopatický efekt (CPE) byl na buněčných liniích zřejmý 7 - 10 dní po inokulaci, úplný CPE byl pozorován 14 dnů po inokulaci (Hedrick a kol., 2000). Virus se podařilo vykultivovat při teplotách 15 - 25 °C, ale optimální růst KHV proběhl při 23 °C (Hedrick a kol., 2000). Virus byl v buněčné kultuře detekován i při 10 °C a 14 °C po 7 a 14 dnech, ale jen těsně nad detekčním limitem. Žádný důkaz o růstu viru nebyl nalezen při teplotě 30 °C a 37 °C (Gilad a kol., 2003). Koi herpesvirus lze úspěšně kultivovat jen na omezeném počtu buněčných linií. Používají se k tomu standardní buněčné linie pocházející z kapřího mozku (Cyprinus Carpio Brain; CCB), buněčné linie z tkání žaber kapra (Cyprinus Carpio Gill; CCG) a buněčné linie z ploutve kapra (Neukirch a kol., 1999). Podle Gilad a kol. (2002) není tato metoda považována za spolehlivou pro detekci KHV ze žaber v důsledku častých bakteriálních kontaminací žaberní tkáně. Izolace koi

herpesviru na buněčných liniích není vždy úspěšná, proto negativní výsledky kultivace nejsou z hlediska diagnostiky považovány za signifikantní. Obrázek č. 5 znázorňuje počáteční cytopatický efekt na CCB linii.



Obr. 5. Počáteční cytopatický efekt CCB linie - modře; buněčná rezidua, která se na tkáňovou kulturu dostala při inokulaci virem, nebo jsou to anomální přerostlé CCB buňky - červeně, (foto: Aleš Pospíchal).

Oh a kol. (2001) kultivovali KHV z ledvin a sleziny uhynulých ryb na různých buněčných liniích - CHSE (Chinook Salmon Embryo), FHM (Fathead minnow), EPC (Epitelioma Papulosum Cyprini) a RTG - 2 (Rainbow Trout Gonad - pohlavní žlázy pstruha duhového). CPE byl pozorován pouze na buněčné linii FHM 3 - 5 dnů po inokulaci. Buňky vykazující CPE, byly zkoumány pomocí elektronové mikroskopie. V ultra tenkých řezech infikovaných FHM buněk byly detekovány viru podobné částice (Pokorová a kol., 2005).

Neukirch a Kunz (2001) kultivovali směsné vzorky sleziny, jater a ledvin na buněčných liniích CCB, CCG (Cyprinus Carpio Gill - z kapřích žaber), CAF-2 (Carp Fin - z kapřích ploutví) a EPC. Cytopatický efekt byl pozorován v CCB a CAF-2 buněčných liniích 8 až 9 dní po inokulaci. V CCG a EPC buněčných liniích byl částečný CPE pozorován 10 až 11 dnů po inokulaci.



Podle Hutoran a kol. (2005) byl vývoj CPE v CCB buňkách charakterizovaný zakulacováním a poté odlupováním buněk, zřejmý 5 dnů po inokulaci tkáňového homogenátu. V CCG buňkách se CPE vyvinul šestý den po infekci a v EPC buňkách byla první syncytia (soubuní) detekována po 11 dnech od naočkování, naopak žádný cytopatický efekt nebyl pozorován u FHM a CHSE buněk.

### **6.2.2 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)**

TEM je elektronový mikroskop umožňující pozorování tenkých preparátů do tloušťky 100 nanometrů při vysokém rozlišení. Detekce virových částic transmisní elektronovou mikroskopií se nejeví jako spolehlivá diagnostická metoda a lze ji pokládat pouze za doplňkovou. Nejlepších výsledků detekce KHV pomocí TEM je dosaženo při odběru vzorků různých stádií infekce postižené populace kapra obecného (OIE, 2012).

### **6.2.3 Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction; PCR)**

PCR byla vynalezena v roce 1985 Kary B. Mullisem. Touto metodou lze rychle a vysoce selektivně namnožit určitou nukleotidovou sekvenci v jakékoliv DNA (Hulák, 2008). Základem pro PCR je využití DNA - polymerázy pro opakované kopírování templátové molekuly DNA. Princip spočívá v replikaci nukleových kyselin, tedy ve tvorbě kopií DNA, ve kterých je genetická informace přenesena z jedné molekuly do jiné molekuly stejného typu (Alberts a kol., 2006). Podstatou PCR je pravidelně se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5' → 3' prostřednictvím DNA polymerázy. Daný úsek nukleotidové sekvence je vymezen spojením dvou primerů vážících se na protilehlé řetězce DNA tak, aby jejich 3' - konce směřovaly k sobě (Šmarda a kol., 2005). Po přidání DNA polymerázy a nukleotidů následně probíhá syntéza nových vláken (Tellier a kol., 2003). K syntéze nového vlákna DNA se nejčastěji používá termostabilní Taq DNA polymeráza bakterie *Thermus aquaticus*, která odolává vysokým teplotám (Šmarda a kol., 2005). PCR se provádí v zařízení zvaném termocykler (obrázek č. 6). Toto zařízení je vyrobeno tak, aby dokázalo během několika vteřin zvýšit či snížit teplotu o několik desítek stupňů Celsia. Během PCR dochází k cyklickému opakování tří fází: i) denaturace, ii) připojení primerů a iii) syntéza nových řetězců DNA (Alberts a kol., 2006).



Obr. 6. Termocykler, který je pro PCR nezbytný (Foto: Aleš Pospíchal).

Při denaturaci se DNA v průběhu 20 - 30 vteřin zahřívá na teplotu 94 - 98 °C. Díky vysoké teplotě dochází k roztržení vodíkových můstků v molekule DNA a k rozvolnění dvoušroubovice (Tellier a kol., 2003). Ve druhé fázi se teplota sníží na 50 - 65 °C, což umožňuje nasednutí primerů na určitá místa DNA. Poté se naváže DNA polymeráza na dvouvláknové úseky DNA - primer (Alberts a kol., 2006), čímž dochází ke třetí fázi, a to syntéze DNA. Teplota je závislá na použité DNA polymeráze. Nejpoužívanější Taq polymeráza má optimální teplotu aktivity 75 - 80 °C. V této fázi dochází k samotné syntéze DNA. Komplementární vlákno DNA přirůstá k původní molekule DNA ve směru od 5' konce ke 3' konci (Tellier a kol., 2003). Obvykle se pro namnožení používá 20 - 30 cyklů, přičemž se v každém cyklu množství molekul oproti předcházejícímu cyklu zdvojnásobí (Šmarda a kol., 2005).

V současnosti se pro diagnostiku KHV používají metody založené na stanovení genu thymidin kinázy CyHV-3 v konvenční jednokolové (obrázek č. 7), nebo dvoukolové (nested) PCR (obrázek č. 8). Výsledný produkt PCR může být vizualizován pomocí elektroforézy v gelu. Tyto PCR slouží ke kvalitativnímu stanovení přítomnosti deoxyribonukleové kyseliny (DNA) koi herpesviru ve vyšetřovaných vzorcích rybích tkání. Tato PCR (konvenční či nested) využívá primery navržené na část genu, který kóduje enzym thymidin kinázu (TK), jenž CyHV-3 sdílí i s ostatními zástupci čeledi Alloherpesviridae (CyHV-1 a CyHV-2) a

s nimiž je CyHV-3 geneticky příbuzný (Ilouze a kol., 2006; Bergmann a kol., 2010c).

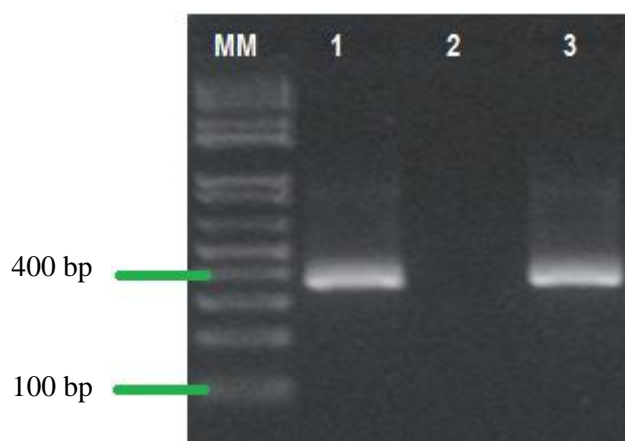
Primery pro detekci KHV byly publikovány těmito autory: Gilad a kol. (2002), Gray a kol. (2002), Hutoran a kol. (2005), Yuasa a kol. (2005), Bercovier a kol. (2005) a Bergmann a kol. (2006). Citlivost PCR s využitím různých primerů se může lišit, což dokazuje studie Bergmanna a kol. (2010a), viz tabulka č. 3. Jako „zlatý střed“ se osvědčilo použití primerů navržených na sekvenci genu thimidinkinázy od Bercoviera a kol. (2005), které jsou doporučovány a zmiňovány v manuálu společnosti CEFAS (The Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science) z r. 2007, který je základem pro metodiky PCR využívané referenčními laboratořemi jednotlivých států EU. Tyto primery byly navíc modifikovány D. Stonem (zmíněno v protokolu pro diagnostiku CyHV-3 distribuovanou CEFASem) vnitřní sadou primerů, čímž byl položen základ pro ještě citlivější nested PCR, která je v současnosti nejpreferovanější diagnostickou metodou ve všech národních referenčních laboratořích. Konkrétní sekvence primerů jednotlivých autorů uvádí tabulka č. 2.

Tab. 2. Primerové páry použité pro detekci CyHV-3, sekvence primerů je od ( 5'-3' ), data převzata od Pokorové a kol. (2010).

Autoři primerů	Sekvence F	Sekvence R	Velikost amplikonu
Bercovier a kol., (2005)	GGG TTA CCT GTA CGA G	CAC CCA GTA GAT TAT GC	409 bp
Gilad a kol., (2002)	GAC GAC GCC GGA GAC CTT GTG	CAC AAG TTC AGT CTG TTC CTC AAC	484 bp
Yuasa a kol., (2005)	GAC ACC ACA TCT GCA AGG AG	GAC ACA TGT TAC AAT GGT CGC	290 bp
Bergmann a kol., (2006)	CTC GCC GAG CAG AGG AAG CGC	TCA TGC TCT CCG AGG CCA GCG G	392 bp
CEFAS(nepublikováno)	CGT CTG GAG GAA TAC GAC G	ACC GTA CAG CTC GTA CTG G	348 bp



Obr. 7. Konvenční PCR - vnější primery podle Bercovier a kol. (2005), MM = molekulární marker (Truckit TM1kb Plus DNA Ladder), proužek 1 = pozitivní kontrola, proužek 2 = negativní kontrola, proužek 3 = zkoumaný vzorek, velikost finálního amplikonu = (409 bp) (podle Novotný a kol., 2010).



Obr. 8. Nested PCR - vnitřní primery podle D. Stone (CEFAS), MM = molekulární marker (Truckit TM1kb Plus DNA Ladder), proužek 1 = pozitivní kontrola, proužek 2 = negativní kontrola, proužek 3 = zkoumaný vzorek, velikost finálního amplikonu = (348bp). (podle Novotný a kol., 2010).

Tab. 3. Výsledky PCR vyšetření vzorků tkání z 18 kaprů s použitím různých primerů - porovnání citlivosti (podle Bergmann a kol., 2010b)

Reference (použité primery)	Pozitivní výsledky	Negativní výsledky
Gilad a kol., (2002)	0	18
Bergmann a kol., (2006)	12	6
Bercovier a kol., (2005)	0	18
Nested Bercovier PCR (CEFAS, nepublikováno)	1	17
Loopamp <sup>®</sup> (Bergmann a kol., 2010b)	0	18
PCR (Bergmann a kol., 2010b)	18	0

#### 6.2.4 TaqMan Real-time PCR

Kromě konvenční PCR a nested PCR, které detekují CyHV-3 ve tkáních ryb pouze kvalitativně, se můžeme v diagnostice koi herpesvirózy setkat i s kvantitativní PCR (qPCR; Real-time PCR). Hydrolyzační sondy, běžně známé pod názvem TaqMan, jsou oligonukleotidy s fluoroforem na 5' - konci a zhášečem na 3' - konci a v současné době patří k nejpoužívanějším metodám pro detekci PCR produktu během qPCR (Bustin, 2004).

Tato vysoce citlivá metoda umožňuje detekovat PCR produkt již v průběhu reakce. Je využívána pro studium genové exprese a k diagnostice patogenů. Principem metody je detekce a kvantifikace fluorescenčního materiálu, který je produkován při syntéze PCR produktu v light - cycleru. Jedná se o termocykler se zabudovaným fluorimetrem, tedy o přístroj, který mimo cyklického střídání teplot umožňuje detekci fluorescence a její monitorování během PCR (Šmarda a kol., 2005).

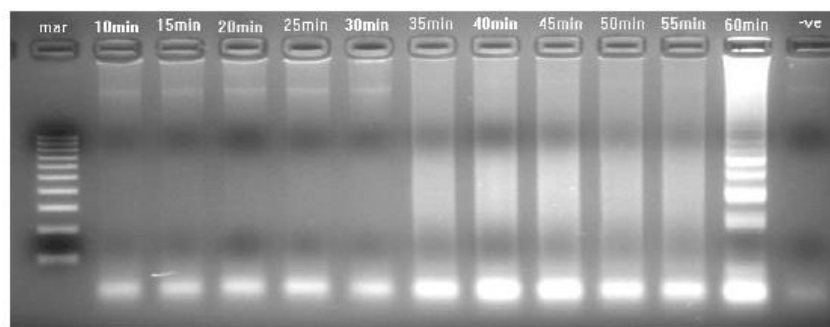
Pomocí qPCR je možno provést detekci a kvantitativní zhodnocení i velmi nízkého počtu cílových molekul DNA (Clementi, 2000; Mackay a kol., 2002). Metoda nabízí stejnou úroveň detekce jako většina konvenčních metod PCR, ale vyvaruje se nebezpečí kontaminace tím, že minimalizuje manipulaci se vzorky během přípravy a cyklického procesu (Gilad a kol., 2004). Tato metoda dokáže určit přesnou koncentraci viru ve vyšetřovaném vzorku (Gilad a kol., 2004; Getchell a Bowser, 2011).

### 6.2.5 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

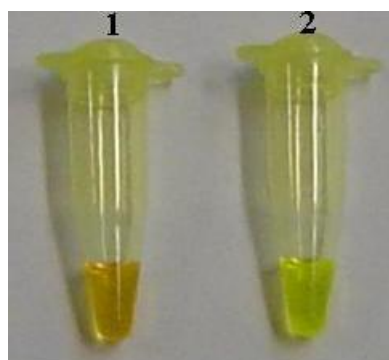
Tato technika „smyčkově zprostředkované“ isotermické amplifikace byla publikována v roce 2000 a je ve svém principu podobná PCR. Rozdíl oproti PCR spočívá v tom, že využívá po celou dobu amplifikace konstantní teplotu - cca 65 °C (odpadá tedy nutnost používat termocyklér) a set čtyř speciálně designovaných primerů rozpoznávajících celkem šest rozdílných sekvencí templátové DNA, což zajišťuje vysokou citlivost této techniky (Notomi a kol., 2000).

Podobně jako u výše zmíněné PCR, tak i zde byly navrženy primery speciálně pro gen thymidinkinázy (Gunimaladevi a kol., 2004), čímž se podařilo získat alternativu k PCR o srovnatelné citlivosti, vhodnou pro běžnou rutinní diagnostiku (Pokorová a kol., 2005). Zobrazení konečného produktu amplifikace je prováděno podobně jako u PCR na agarózovém gelu - obrázek č. 9 (Soliman a El-Matbouli, 2005; Kalvatchev a kol., 2010), avšak někteří autoři používající tuto techniku v diagnostice KHV využívali k vyhodnocování výsledků reakce i sledováním amplifikace v „reálném čase“ pozorováním zákalu reakční směsi difosforečnanem hořečnatým jakožto vedlejším produktem amplifikace (Yoshino a kol., 2009), jehož množství je úměrné amplifikovanému produktu (Kalvatchev a kol., 2010). Soliman a El-Matbouli (2005) dosáhli vizualizace produktu amplifikace přidáním barviva SYBR Green I do reakční směsi, čímž došlo ke změně původního oranžového zbarvení (před amplifikací) na zelené (důkaz přítomnosti amplifikátu - obrázek č. 10). Bylo dokázáno, že tato technika může detekovat DNA s podobnou citlivostí jako PCR s primery podle Gilada a kol. (2002) či Graye a kol. (2002) (Soliman a El-Matbouli, 2005).

Tato metoda má mnoho výhod – je relativně dostupná, rychlá (celková doba detekce je 60 minut) a navzdory své jednoduchosti i přesná a umožňuje využití v terénu (Soliman a El-Matbouli, 2005; Kalvatchev a kol., 2010), avšak v České republice se pro detekci CyHV-3 zatím nepoužívá.



Obr. 9. Agarózový gel, který ukazuje časový průběh amplifikace KHV DNA pomocí LAMP testu. Test se provádí při teplotě 65 °C po dobu trvání 10 - 60 minut. (podle Soliman a El Matbouli, 2005).



Obr. 10. Vizualní detekce KHV produktů pomocí barviva SYBR Green I, 1: negativní LAMP reakce zůstala oranžová, 2: Pozitivní LAMP reakce zezelenala (podle Soliman a El-Matbouli, 2005).

### 6.2.6 ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

Tato metoda se zakládá na vazebné reakci mezi protilátkou a antigenem, přičemž na jednu z těchto složek je navázán vhodný enzym. Tento enzym, který je vázaný kovalentní vazbou, působí na přidaný substrát. Výsledkem je barevná reakce, která slouží jako základ pro hodnocení výsledků. Vyhodnocení je vizuální, nebo spektrofotometrické. První zveřejněná metoda pro rychlejší diagnózu KHV antigenu byla vyvinuta v Izraeli pro detekci CyHV-3 z rybích exkrementů. Tato metoda je jednoduchá a časově nenáročná, avšak má nízkou citlivost a je vhodná pouze pro detekci pokročilejších fází onemocnění (kde se očekává vyšší množství virových partikulí), ale není vhodná pro depistáž KHV v klinicky zdravé populaci ryb (Dishon a kol., 2005). Vyšetření vzorků probíhá během několika hodin.

Metodu ELISA je možno použít i k detekci specifických protilátek proti CyHV-3 v krevním séru ryb. Podle Pokorové a kol. (2005) se však tato nepřímá metoda jako primární diagnostický nástroj pro detekci KHV nepoužívá.

## **7. Prevence koi herpesvirózy**

### **7.1 Karanténa**

Důležité preventivní opatření k zábraně zavlečení CyHV-3 do zdravé populace je karanténizace dovezených ryb (Ronen a kol., 2003). Karanténní nádrž by měla obsahovat vlastní zdroj vody. Odtoková voda nesmí proudit do ostatních nádrží rybochovného zařízení. V době, kdy jsou ryby v karanténní nádrži, se provádějí diagnostické testy a jsou odebírány vzorky ryb pro vyšetření na CyHV-3. Karanténní či izolační nádrže jsou speciální, obvykle menší rybníky, do kterých umísťujeme dovezené ryby na stanovenou pozorovací dobu (Svobodová, 2007). Piačková a kol. (2015) uvádí délku karantény minimálně 3 týdny při teplotě vody 24 °C. Nad průběhem karantény by měl dohlížet veterinární lékař, který také rozhoduje o ukončení karanténní doby. Během této periody důsledně pozorujeme zdravotní stav a případné atypické chování obsádky (Svobodová a kol., 2007).

### **7.2 Desinfekce**

Další prevencí proti zavlečení a rozšíření koi herpesvirózy je důsledná desinfekce veškerého nářadí, pomůcek a nádob, které používáme v rybochovném zařízení (Štěch, 2007). Mezi důležité desinfekční prostředky patří UV záření, které spolehlivě likviduje virus v dávce  $4,0 \times 10^3 \mu\text{Ws}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Působení teploty vyšší než 50 °C po dobu 1 minuty je také účinné. Pro rybářskou praxi jsou nejnázve dostupné přípravky na bázi chloru. Působení těchto desinfekčních prostředků po dobu 20 - 30 min. v koncentraci, která zaručí 3 mg aktivního chloru. $\cdot\text{l}^{-1}$ , lze považovat za dostačující pro kompletní inaktivaci viru. Pro desinfekci zařízení se také používají kvarterní amoniové sloučeniny (KAS). KAS jsou šetrnější k sít'ovinám, než sloučeniny chloru. Nejčastěji používanou účinnou látkou z této skupiny je benzalkonium chlorid. Tato látka je pro likvidaci CyHV-3 účinná v koncentracích od 60 mg. $\cdot\text{l}^{-1}$  (Kasai a kol., 2005). V některých zemích se v rybářství používá přípravek Roccal-D Plus® (Noga, 2010) (u nás se však nepoužívá). Dvacetiminutové působení desinfekčních



prostředků na bázi jódu (např. jodoform v koncentraci 200 mg.l<sup>-1</sup>) nebo 30% etylalkoholu je také pro inaktivaci viru dostačující (Kasai a kol., 2005).

### **7.3 Přirozená imunizace ryb**

Krátce po identifikaci KHV byl v Izraeli vyvinut originální protokol (postup) přirozené imunizace kaprů. Tento protokol využívá skutečnost, že virus vyvolává smrtelné infekce pouze v určitých teplotách, a to mezi 18 °C až 28 °C. Imunizace spočívá v tom, že zdravý kapří plůdek je kohabitován s nemocnými rybami při teplotě 22 - 23 °C po dobu 3 - 5 dnů. Následně jsou ryby přesazeny do rybníků s teplotou vody nad 30 °C. Zde jsou chovány 25 - 30 dní. V průběhu této periody se v jejich těle vytváří protilátky chránící organismus při dalším kontaktu s KHV (Ronen a kol., 2003). Nevýhodou přirozené imunizace kaprů jsou vysoké náklady na energii potřebnou ke zvýšení teploty a také fakt, že ačkoliv 60 % obsádky přežije další vzplanutí infekce, z přeživších jedinců se stávají latentní nosiči viru představující potenciální zdroj sekundární infekce (Rakus a kol., 2013).

### **7.4 Vakcinace**

Ronen a kol. (2003) a Perelberg a kol. (2005) ve svých publikacích uvádí možnost použití živého oslabeného viru k vakcinaci kaprů. Virus je v tomto případě oslaben mnohonásobným pasážováním na buněčných liniích a díky působení UV záření je jeho virulence ještě zmírněna. Tuto vakcínu s názvem KV3 vyrábí firma KoVax v Izraeli. Vakcína byla oficiálně povolena pro nouzové použití v Izraeli a byla široce používána v chovech kaprů po celé zemi. Díky aplikaci vakcíny v chovech kaprů v Izraeli během let 2003 - 2007 došlo ke zvýšení produkce z 8000 t z roku 2003 bez použití vakcín, na 16 000 t v roce 2007. Nevýhodou tohoto způsobu imunizace je, že oslabený virus si část své virulence zachovává a může být pro některé vakcinované ryby, zejména plůdek letální (Perelberg a kol., 2008). Preto a kol. (2013) dokonce uvádí případ nakažení naivních ryb od vakcinovaných.

Výsledky studií v Japonsku prokázaly, že alimentární podání vakcíny na bázi lipozomů, obsahující deaktivovaný virus KHV, může také zajistit ochranu chovů kapra před infekcí KHV (Ilouze a kol., 2010; Yasumoto a kol., 2006).

Piačková a kol. (2015) se však zmiňují, že v současné době není v České republice registrována žádná vakcína proti KHV, tudíž použití jakýkoliv vakcín proti KHV by bylo v rozporu s platnou legislativou.

## **8. Koi herpesviróza z pohledu legislativy**

Koi herpesviróza (KHVD) je podle „Směrnice rady 2006 /88 / ES ze dne 24. října 2006 o veterinárních požadavcích na živočichy pocházející z akvakultury a produkty akvakultury a o prevenci a tlumení některých nákaz vodních živočichů“ (dále jen Směrnice EU) zařazena na evropský seznam neexotických nákaz, které podléhají hlášení, spolu s infekční nekrózou krvetvorné tkáně (IHN), nakažlivou chudokrevností lososů (ISA) a virovou hemoragickou septikémií (VHS).

V roce 2008 byla Směrnice EU implementována do české legislativy a KHVD byla přidána na seznam neexotických nákaz ryb povinných hlášením, který je jednou z příloh zákona č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinárního zákona), ve znění pozdějších předpisů. Státní veterinární správa ČR zahájila po uvedení KHVD na seznam neexotických nákaz monitoring výskytu KHV v chovech ryb v České republice. Vzorky ryb jsou odebírány inspektory SVS ČR a následně vyšetřovány v laboratořích Státních veterinárních ústavů. V případě pozitivního nálezu jsou zasílány k potvrzení do Národní referenční laboratoře pro virové nemoci ryb, která je součástí Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně – Medláncích.

Podle přílohy č. 3, části II vyhlášky č. 290/2008 Sb., se KHVD vyšetřuje u sensitivních druhů ryb, tedy v chovech kapra obecného, kapra obecného koi a jejich kříženců. Povinnost a postup odběru vzorků vyplývá z Metodiky kontroly zdraví a nařízené vakcinace pro daný kalendářní rok. Státní veterinární správa tuto metodiku vydává každý rok a je volně dostupná na stránkách Ministerstva zemědělství České republiky.

Chovy kapra v České republice v rámci kategorizace vycházející ze Směrnice EU spadají do kategorie III, což jsou chovy se zdravotním statutem nedefinovaným. To znamená, že chovy či oblasti nejsou zamořené, ale také nejsou zařazeny do programu k získání statusu chovu, či oblasti prosté nákazy. Podle současné legislativy probíhá v těchto chovech aktivní dozor, včetně odběrů vzorků. Vyšetření na koi herpesvirózu je prováděno jednou ročně na celém území České republiky. Na vybraných

hospodářství se vybere 30 kusů kapra obecného v kategoriích K1 a K2. Odběr vzorků probíhá od června do září (dle zákona č. 166/1999 Sb.).

Povinnosti a postup chovatelů a KVS SVS (Krajské veterinární správy Státní veterinární správy) při podezření na výskyt a při potvrzení výskytu KHVD jsou uvedeny v Zákonu č. 166/1999 Sb. o veterinární péči (veterinární zákon) a ve vyhlášce č. 290/2008 Sb.

## 9. Závěr

Koi herpesviróza je nebezpečné virové onemocnění, které poprvé vzplanulo v Izraeli roku 1998. V průběhu sedmnácti let se nákaza díky výstavám a mezinárodním obchodům s rybami rozšířila téměř do celého světa a způsobila úhyn mnoha tun konzumních i okrasných kaprů a značné ekonomické ztráty počítané na desítky milionů dolarů.

K druhům ryb vnímavým k tomuto onemocnění zařazuje Mezinárodní organizace pro zdraví zvířat (OIE) pouze kapra obecného, kapra koi a jejich křížence. Některé experimentální studie byly zaměřeny na snížení mortality obsádek vysazováním odolnějších plemen a kříženců kapra. Výsledky studií prokázaly vyšší odolnost vůči KHV u kříženců s Amurským sazanem (*Cyprinus rubrofuscus*) oproti plemenům a meziplemenným hybridům, kteří byli odvozeni od kapra obecného (*Cyprinus carpio carpio*). Experimentální infekce kříženců kapra obecného a koi kapra s jinými druhy kaprovitých ryb prokázaly největší vnímavost vůči KHVD u kříženců koi kapra a karase obecného. Menší vnímavost vůči KHVD prokázali kříženci koi kapra a karase zlatého a nejvyšší přežití měli kříženci mezi kaprem obecným a karasem zlatým.

Mezi potenciální asymptomatické přenašeče a zároveň hospodářsky významné druhy ryb, které jsou schopné přenášet CyHV-3 na vnímavé druhy, zařazujeme lína obecného, karase zlatého, amura bílého a tolstolobika bílého. Některé druhy ryb (jeseter ruský a karas zlatý) při experimentálních infekcích vykazovali i klinické příznaky onemocnění.

Po zařazení koi herpesvirózy na seznam neexotických nákaz podléhajících hlášení, má chovatel povinnost v případě podezření z nákazy uvědomit Krajskou veterinární správu Státní veterinární správy. Je možné, že někteří chovatelé se snaží vyhnout nepříjemnostem, které jsou spojené s ohlášením nákazy a s následnými předběžnými a zdolávacími opatřeními. Dochází tedy k likvidaci uhynulých ryb bez uvědomění Státní veterinární správy. Tento nesprávný přístup chovatelů přispívá k rozšíření onemocnění do míst prostých této nákazy, zkresluje informace o nakažové situaci a snižuje důvěryhodnost našich ryb na mezinárodním trhu. Chovatelé by tedy měli při každém nákupu ryb ze zahraničí požadovat osvědčení o vyšetření ryb na KHV a prohlášení o tom, že u dovezených ryb neproběhla vakcinace.

V současné době je toto onemocnění předmětem mnohých studií. Zkoumají se další potenciální přenašeči CyHV-3, jsou vyvíjeny a zdokonalovány diagnostické metody k potvrzení nákazy, vyvíjejí se vakcíny a hledají se další možnosti zajištění ochrany chovů před infekcí KHV.

Kontrola importovaných a exportovaných ryb, monitoring výskytu onemocnění a zodpovědný přístup chovatelů mohou zabránit tradičnímu českému rybníkářství od masivního úhynu ryb způsobeného touto infekční nákazou, která již postihla řadu zemí po celém světě.

## 10. Seznam použité literatury:

- Adamek, M., Syakuri, H., Harris, S., Rakus, K. L., Brogden, G., Matras, M., Irnazarow, I., Steinhagen, D., 2013. Cyprinid herpesvirus 3 infection disrupts the skin barrier of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Vet. Microbiol.* 162, 456–470.
- Alberts, B., 2006. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero. přeložil Pavel Hozák. 1–30 s. ISBN 8090290620.
- Amita, K., Oe, M., Matoyama, H., Yamaguchi, N., Fukuda, H., 2002. A survey of koi herpesvirus and carp edema virus in color carp cultured in Niigata Prefecture, Japan. *Fish. Pathol.* 37(4), 197–198.
- Antychowicz, J., Reichert, M., Matras, M., Bergmann, S. W., Haenen, O., 2005. Epidemiology, pathogenicity and molecular biology of koi herpesvirus isolated in Poland. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 49, 367–373.
- Aoki, T., Hirono, I., Kurokawa, K., Fukuda, H., Nahary, R., Eldar, A., Davison, A. J., Waltzek, T. B., Bercovier, H., Hedrick, R. P., 2007. Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide. *J. Virol.* 81, 5058–5065.
- Ariav, R., Tinman, S., Bejerano, I., 1999. First report of newly emerging viral disease of *Cyprinus carpio* species in Israel. In: EAFP Conference, Rhodes, September 1999, Abstract of poster.
- Bercovier, H., Fishman, Y., Nahary, R., Sinai, S., Zlotkin, A., Eyngor, M., Gilad, O., Eldar, A., 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, 1–13.
- Bretzinger, A., Fischer – Scherl, T., Oumouna, M., Hoffmann, R., Truyen, U., 1999. Mass mortality in koi carp, *Cyprinus carpio*, associated with gill and skin disease. *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pat.* 19, 182–185.
- Bergmann, S. M., Kempter, J., Sadowski, J., Fichtner, D., 2006. First detection, confirmation and isolation of koi herpesvirus (KHV) in cultured common carp (*Cyprinus carpio* L.) in Poland. *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pat.* 26, 97–104.
- Bergmann, S. M., Schütze, H., Fischer, U., Fichtner, D., Riechardt, M., Meyer, K., Schrudde, D., Kempter, J., 2009. Detection KHV genome in apparently health fish. *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pat.* 29, 145–152.

- Bergmann, S. M., Lutze, P., Schütze, H., Fischer, U., Dauber, M., Fichtner, D., Kempster, J., 2010a. Goldfish (*Carassius auratus auratus*) is a susceptible species for koi herpesvirus (KHV) but not for KHV disease (KHVD). Bull. Eur. Assoc. Fish. Pat. 30, 74–84.
- Bergmann, S. M., Riechart, M., Fichtner, D., Leeb, P., Kempster, J., 2010b. Investigation on the diagnostic sensitivity of molecular tools used for detection of koi herpesvirus. J. Virol. Methods. 163, 229–233.
- Bergmann, S. M., Sadowski, J., Kielpinski, M., Bartlomiejczyk, M., Fichtner, D., Riebe, R., Lenk, M., Kempster, J., 2010c. Susceptibility of koi x crucian carp and koi x goldfish hybrids to koi herpesvirus (KHV) and the development of KHV disease (KHVD). J. Fish. Dis. 33, 267–272.
- Bergmann, S. M., Kempster, J., 2011. Detection of koi herpesvirus (KHV) after reactivation in persistently infected common carp (*Cyprinus carpio* L.) using non – lethal sampling methods. Bull. Eur. Assoc. Fish. Pat. 31, 92–100.
- Bustin, S. A., 2004. A - Z of quantitative PCR. La Jolla, CA: International University Line, pp. 882. ISBN 978-0-9636817-8-2.
- Carter, J. B., Saunders, V. A., 2013. Virology: principles and applications, 2nd edition. Wiley Chichester, pp. 364.
- Clementi, M., 2000. Quantitative molecular analysis of virus expression and replication. J. Clin. Microbiol. 38, 2030–2036.
- Costes, B., Stalin Raj, V., Michel, B., Fournier, G., Thirion, M., Gillet, L., Mast, J., Lieffrig, F., Bremont, M., Vanderplasschen, A., 2009. The major portal of entry of koi herpesvirus in *Cyprinus carpio* is the skin. J. Virol. 83, 2819–2830.
- Davidse, A., Haenen, O. L. M., Dijkstra, S. G., Van Nieuwstadt, A. P., Van der Vorst, T. J. K., Wagenaar, F., Wellenberg, G. J., 1999. First isolation of herpesvirus of eel (*Herpesvirus anguillae*) in diseased European eel (*Anguilla anguilla* L.) in Europe. Bull. Eur. Assoc. Fish. Pat. 19, 137–141.
- Davison, A. J., 1992. Channel catfish virus: A new type of herpesvirus. Virology. 186, 9–14.
- Davison, A. J., Trus, B. L., Cheng, N., Steven, A. C., Watson, M. S., Cunningham, C., Le Deuff, R. M., Renault, T., 2005. A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. J. Gen. Virol. 86, 41–53.

- Davison, A. J., Cunningham, C., Sauerbier, W., McKinnell, R. G., 2006. Genome sequences of two frog herpesviruses. *J. Gen. Virol.* 87, 3509–3514.
- Davison, A. J., Kurobe, T., Gatherer, D., Cunningham, C., Korf, I., Fukuda, H., Hedrick, R. P., Waltzek, T. B., 2013. Comparative genomics of carp herpesviruses. *J. Virol.* 87, 2908–2922.
- Denham, K., 2003. Koi herpesvirus in wild fish. *Vet. Rec.* 153(16), p. 507.
- Dishon, A., Perelberg, A., Bishara – Shieban, J., Ilouze, M., Davidovich, M., Werker, S., Kotler, M., 2005. Detection of carp interstitial nephritis and gill necrosis virus in fish droppings. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7285–7291.
- Dixon, P. F., Joiner, C. L., Way, K., Reese, R. A., Jeney, G., Jeney, Z., 2009. Comparison of the resistance of selected families of common carp, *Cyprinus carpio* L., to koi herpesvirus: preliminary study. *J. Fish. Dis.* 32, 1035–1039.
- Doszpoly, A., Benk, M., Csaba, G., Dan, A., Lang, M., Harrach, B., 2011. Introduction of the family Alloherpesviridae: the first molecular detection of herpesviruses of cyprinid fish in Hungary. *Magy Allatorvosok Lapja* 133, 174–181.
- Duda, P., Gela, D., Linhart, O., 1999. Top-crossing with paternal inheritance trstiny of 4-month-old common carp *Cyprinus carpio* L. progeny in three altitude conditions. *Aquac. Res.* 30, 911–916.
- Eide, K., Miller – Morgan, T., Heidel, J., Bildfell, R., Jin, L., 2011. Results of total DNA measurement in koi tissue by Koi Herpesvirus real - time PCR. *J. Virol. Methods.* 172, 81–84.
- El – Matbouli, M., Soliman, H., 2011. Transmission of Cyprinid herpesvirus-3 (CyHV-3) from goldfish to naive common carp by cohabitation. *Res. Vet. Sci.* 90, 536–539.
- Fabian, M., Baumer, A., Steinhagen, D., 2013. Do wild fish species contribute to the transmission of ki herpesvirus to carp in hatchery ponds? *J. Fish. Dis.* 36, 505–514.
- FAO (Food and Agriculture Organization), 2015. Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service . [online]. [cit. 2015–4–20]. Dostupné z <http://www.fao.org/figis/servlet/SQSeervlet?ds=Aquaculture&k1=SPECIES&k1v=1&k1s=2957&outtype=html>.
- Fournier, G., Boutier, M., Stalinraj, V., Mast, J., Parmentier, E., Vanderwalle, P., Peeters, D., Lieffrig, F., Farnir, F., Gillet, L., Vanderplasschen, A., 2012. Feeding *Cyprinus carpio* with



infectious materials mediates cyprinid herpesvirus 3 entry through infection of pharyngeal periodontal mucosa. *Vet. Res.* 43, p. 6.

- Garver, K. A., Al – Hussine, L., Hawley, L. M., Schroeder, T., Edes, S., LePage, V., Contador, E., Russell, S., Lord, S., Stevenson, R. M., Souter, B., Wright, E., Lumsden, J. S., 2010. Mass mortality associated with koi herpesvirus in wild common carp in Canada. *J. Wildlife. Dis.* 46, 1242–1251.
- Getchell, G., Bowser, R. P., 2011. Real-time PCR assays for fish pathogens. Proceedings of the Third Bilateral Conference between Russia and the United States: bridging America and Russia with shared perspectives on aquatic animal health. Khaled bin Sultan Living Oceans Foundation, Landover, Maryland. Eds. R. C. Cipriano, A. Bruckner, and I. S. Shchelkunov.
- Gilad, O., Yun, S., Andree, K. B., Adkison, M. A., Lotkin, A., Bercovier, H., Eldar, A., Hedrick, R. P., 2002. Initial characteristics of koi herpesvirus and the development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio*. *Dis. Aquat. Organ.* 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. *J. Gen. Virol.* 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. Organ.* 60, 179–187.
- Goodwin, A. E., Merry, G. E., Sadler, J., 2006. Detection of the herpesviral hematopoietic necrosis disease agent (*Cyprinid herpesvirus 2*) in moribund and healthy goldfish: validation of a quantitative PCR diagnostic method. *Dis. Aquat. Organ.* 69, 137–143.
- Gotesman, M., Kattlun, J., Bergmann, S. M., El-Matbouli, M., 2013. CyHV-3: the third cyprinid herpesvirus *Dis. Aquat. Organ.* 105(2), 163–174.
- Gray, W. L., Mullis, L., LaPatra, S. E., Groff, J. M., Goodwin, A., 2002. Detection of koi herpesvirus DNA in tissues of infected fish. *J. Fish. Dis.* 25, 171–178.
- Grimmett ,S. G., Warg, J. V., Getchell, R. G., Johnson, D. J., Bowser, P. R., 2006. An unusual koi herpesvirus associated with a mortality event of common carp *Cyprinus carpio* in New York State, USA. *J. Wildlife. Dis.* 42, 658–662.

- Groff, J. M., LaPatra, S. E., Munn, R. J., Zinkl, J. G., 1998. A viral epizootic in cultured populations of juvenile goldfish due to a putative herpesvirus etiology. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10, 375–378.
- Gunimaladevi, I., Kono, T., Venugopal, M. N., 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., Dijkstra, S. G., Van Tulden, P. W., Davidse, A., Van Nieuwstadt, A. P., Wagenaar, F., Wellenberg, G. J., 2002. Herpesvirus anguillae (HVA) isolations from disease outbreaks in cultured European eel, *Anguilla anguilla* in The Netherlands since 1996. *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pat.* 22, 247–257.
- Haenen, O., Way, K., Bergmann, S. M., Ariel, E., 2004. The emergence of koi herpesvirus and its significance to European aquaculture. *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pat.* 24, 293–307.
- Haenen, O., Hedrick, R., 2006. Koi herpesvirus workshop. *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pat.* 26, 26–37.
- Haenen, O., Evans, J. J., Berthe, F., 2013. Bacterial infections from aquatic species: potential for and prevention of contact zoonoses. *Rev. Sci. Tech. Oie.* 32 (2), 497-507.
- Hanson, L., Dishon, A., Kotler, M., 2011. Herpesviruses that Infect Fish. *Viruses.* 3(11), 2160–2191.
- Hara, H., Aikawa, H., Usui, K., Nakanishi, T., 2006. Outbreaks of koi herpesvirus disease in rivers of Kanagawa Prefecture. *Fish. Pathol.* 41, 81–83.
- Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K., Ohgaki, S., 2005. Application of cation-coated filter method to detection of noroviruses, enteroviruses, adenoviruses, and torque teno viruses in the Tamagawa River in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2403–2411.
- Haramoto, E., Kitajima, M., Katayama, H., Ohgaki, S., 2007. Short communication Detection of koi herpesvirus DNA in river water in Japan. *J. Fish. Dis.* 30, 59–61.
- Hedrick, R. P., Gilad, O., Yun, S., Spangenberg, J., Marty, G. D., Nordhausen, R. W., Kebus, M., Bercovier, H., Eldar, A., 2000. A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. *J. Aquat. Anim. Health.* 12, 44–57.
- Hedrick, R. P., Waltzek, T. B., McDowell, T. S., 2006. Susceptibility of Koi Carp, Common Carp, Goldfish, and Goldfish × Common Carp Hybrids to Cyprinid Herpesvirus – 2 and Herpesvirus – 3. *J. Aquat. Anim. Health.* 18, 26–34.

- Hoffmann, R., 2000. Koiseuche bedroht Karpfenteichwirtschaft. Fischer und Teichwirt 11, pp. 432.
- Hulák, M., 2008. Molekulárne základy biológie a genetiky v rybárstve, VÚRH JU Vodňany, 187 s.
- 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. J. Virol. 79, 1983–1991.
- Ilouze, M., Dishon, A., Kahan, T., Kotler, M., 2006. Cyprinid herpesvirus-3 (CyHV-3) bears genes of genetically distant large DNA viruses. Febs. Lett. 580, 4473–4478.
- Ilouze, M., Davidovich, M., Diamant, A., Kotler, M., Dishon, A., 2010. The outbreak of carp disease caused by CyHV-3 as a model for new emerging viral diseases in aquaculture: a review. Ecol. Res. 26, 885–892.
- Ito, T., Sano, M., Kurita, J., Yuasa, K., Lida, T., 2007. Carp Larvae Are Not Susceptible to Koi Herpesvirus. Fish Pathol. 42, 107–109.
- Jakob, E., Neuhaus, H., Steinhagen, D., Luckhardt, B., Hanel, R., 2009. Monitoring of Herpesvirus anguillae (HVA) infections in European eel, *Anguilla anguilla* (L.), in northern Germany. J Fish. Dis. 32, 557–561.
- Jung, S. J., Miyazaki, T., 1995. Herpesviral haematopoietic necrosis of goldfish, *Carassius auratus* (L.). J. Fish. Dis. 18, 211–220.
- Kalvatchev, Z., Tsekov, I., Kalvatchev, N., 2010. Loop-Mediated Amplification for Sensitive and Specific Detection of Viruses. Biotechnol. Biotech. Eq. 24 (1), 1559–1561.
- Kasai, H., Muto, Y., Yoshimizu, M., 2005. Virucidal effect of ultraviolet, heat treatment and disinfectants against koi herpesvirus (KHV). Fish Pathol. 40, 137–138.
- Kempton, J., Bergmann, S. M., 2007. Detection of koi herpesvirus (KHV) genome in wild and farmed fish from Northern Poland. Aquaculture. 272, p. 275.
- Kempton, J., Sadowski, J., Schütze, H., Fischer, U., Dauber, M., Fichtner, D., Panicz, R., Bergmann, S. M., 2009. Koi herpesvirus: do acipenserid restitutions programs pose a threat to carp farms in the disease-free zones? Acta. Ichthyol. Piscat. 39, 119–126.

- Kempton, J., Kielpinski, M., Panicz, R., Sadowski, J., Mysłowski, B., Bergmann, S. M., 2012. Horizontal transmission of koi herpes virus (KHV) from potential vector species to common carp. *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pat.* 32, 212–219.
- Kimiya, H., 2004. The status of Koi Herpesvirus Disease and its management measures in Japan. Book of Abstract at Int. Symp. on KHV Disease – Strategy for KHV Disease Control. 13 March 2004. Pacifico Yokohama, Japan. p. 23.
- Kočárek, E., Pánek, M., Novotná, D., 2006. *Klinická cytogenetika I.* Karolinum Praha. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. 120 s. ISBN 80-246-1069-8.
- Le Morvan, C., Troutaud, D., Deschaux, P., 1998. Differential effects of temperature on specific and nonspecific immune defences in fish. *J. Exp. Biol.* 201,165–168.
- Lio - Po, G. D., 2007. Koi herpesvirus (KHV): Diagnosis, prevention and control. *Aquarama.* 9, 10–13.
- Lio - Po, G. D., Amar, E., de la Peña, L., Orozco, Z. G., Faisan, J., Suarnaba, V., Tubo, D. B., 2009. Surveillance of emerging fish viral pathogens in some Southeast Asian countries. *Isr. J. Aquacult-Bamid.* 61, 208–214.
- Liu, H., Shi, X., Gao, L., Jiang, Y., 2002. Study on the aetiology of koi epizootic disease using the method of nested-polymerase chain reaction assay (nested-PCR). *Journal of Huazhong Agricultural University.* 21, 414–419.
- Mackay, I. M., Arden, K. E., Nitsche, A., 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic. Acids. Res.* 30, 1292–1305.
- Matsui, K., Honjo, M., Kohmatsu, Y., Uchii, K., Yonekura, R., Kawabata, Z., 2008. Detection and significance of koi herpesvirus (KHV) in freshwater environments. *Freshwater Biol.* 53, 1262–1272.
- McCleary, S., Ruane, N. M., Cheslett, D., Hickey, C., Rodger, H. D., Geoghegan, F., Henshilwood, K., 2011. Detection of koi herpesvirus (KHV) in koi carp (*Cyprinus carpio* L.) imported into Ireland. *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pat.* 31, 124–128.
- Mettenleiter, T. C., Klupp, B. G., Granzow, H., 2009. Herpesvirus assembly: an update. *Virus. Res.* 143, 222–234.
- Michel, B., Fournier, G., Loeffrig, F., Costes, B., Vanderplasschen, A., 2010. Cyprinid herpesvirus 3. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1835–1843.

- Minamoto, T., Honjo, M. N., Yamanaka, H., Tanaka, N., Itayama, T., Kawabata, Z., 2011. Detection of cyprinid herpesvirus-3 DNA in lake plankton. *Res. Vet. Sci.* 90, 530–532.
- Miyazaki, T., Kuzuya, Y., Yasumoto, S., Yasuda, M., Kobayashi, T., 2008. Histopathological and ultrastructural features of Koi herpesvirus (KHV) - infected carp *Cyprinus carpio*, and the morphology and morphogenesis of KHV. *Dis. Aquat. Organ.* 80, 1–11.
- Musa, N., Leong, L. K., Sunarto, A., 2005. Koi herpesvirus (KHV) – An emerging pathogen in koi. pp. 146–147. In *Proceedings of the Colloquium on Viruses of Veterinary & Public Health Importance* held. 11–12 Jan. 2005.
- Neukirch, M., Böttcher, K., Bunnajirakul, S., 1999. Isolation of a virus from koi with altered gills. *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pat.* 19. 221–224.
- Neukirch, M., Kunz, U., 2001. Isolation and preliminary characterization of several viruses from koi (*Cyprinus carpio*) suffering gill necrosis and mortality. *Dis. Aquat. Organ.* 21(4), 125–135.
- Noga, E. J., 2010. *Fish disease: diagnosis and treatment*. Wiley-Blackwell, Ames, IA, pp. 519.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic. Acids. Res.* 28 (12), p. 63.
- Novotný, L., Pokorová, D., Reschová, S., Vicenová, M., Axmann, R., Veselý, T., Mikler, J. R., 2010. First clinically apparent koi herpesvirus infection in the Czech Republic. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pat.* 30, 85–91.
- Oh, M. J., Jung, S. J., Choi, T. J., Kim, H. R., Rajendran, K.V., Kim, Y. J., Park, M. A., Chun, S. K., 2001. A viral disease occurring in cultured carp *Cyprinus carpio* in Korea. *Fish. Pathol.* 36, 147–151.
- OIE., 2012. *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animal*, Chapter 2. 3. 6.: Koi Herpesvirus Disease. 328 – 344.
- Ouyang, P., Rakus, K., Boutier, M., Reschner, A., Leroy, B., Ronsmans, M., Fournier, G., Scohy, S., Costes, B., Wattiez, R., Vanderplasschen, A., 2013. The IL-10 homologue encoded by cyprinid herpesvirus 3 is essential neither for viral replication in vitro nor for virulence in vivo. *Vet. Res.* 44, p. 53.
- Palmeiro, B., Weber, S. E., 2010. Viral pathogens of fish. In: Roberts HE (Ed.): *Fundamentals of Ornamental Fish Health*. Blackwell Publishing, pp. 113–124.

- 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. *Isr. J. Aquacult-Bamid*. 55 (1), 5–12.
- Perelberg, A., Ronen, A., Hutoran, M., Smith, Y., Kotler, M., 2005. Protection of cultured *Cyprinus carpio* against a lethal viral disease by an attenuated virus vaccine. *Vaccine*. 23, 3396–3403.
- Perelberg, A., Ilouze, M., Kotler, M., Steinetz, M., 2008. Antibody response and resistance of *Cyprinus carpio* immunized with cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3). *Vaccine*. 23: 3396–3403.
- Piačková, V., Flajšhans, M., Pokorová, D., Reschová, S., Gela, D., Čížek, A., Veselý, T., 2013. Sensitivity of common carp, *Cyprinus carpio* L., strains and crossbreeds reared in the Czech Republic to infection by Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3; KHV). *J. Fish. Dis.* 36, 75–80.
- Piačková, V., Pokorová, D., Veselý, T., Čížek, A., Zusková, E., Pospíchal, A., Reschová, S., 2015 - v tisku. Prevence vzniku koi herpesvirózy v chovech kapra a koi kapra. *Edice Metodik. VÚRH Vodňany č. 161*, 31 s.
- Pikarsky, E., Ronen, A., Abramowitz, J., Levavi – Sivan, B., Hutoran, M., Shapira, Y., Steinetz, 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, 9544–9551.
- Plumb, J. A., Hanson, L. A., 2011: Carp and minnow viruses. In: Plumb JA, Hanson LA (Eds): *Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes*, 3rd edition. Blackwell Publishing, pp. 109–134.
- Pokorová, D., Veselý, T., Piačková, V., Reschová, S., Hulová, J., 2005. Current knowledge on koi herpesvirus (KHV): a review. *Vet. Med – Czech.* 50, 139–147.
- Pokorová, D., Piačková, V., Čížek, A., Reschová, S., Hůlová, J., Vicenová, M., Veselý, T., 2007. Test for the presence of koi herpesvirus (KHV) in common carp (*Cyprinus carpio carpio*) and koi carp (*Cyprinus carpio koi*) in the Czech Republic. *Vet. Med – Czech.* 52, 562–568.
- Pokorová, D., Reschová, S., Hůlová, J., Vicenová, M., Veselý, T., Piačková, V., 2010. Detection of Cyprinid Herpesvirus-3 in Field Samples of Common and Koi Carp by Various Single-Round and Nested PCR Methods. *J. World. Aquacult. Soc.* 41 (5), 773–779.
- Pokorová, D., Reschová, S., Piačková, V., Veselý, T., 2013. Koi herpesvirové onemocnění

kapra a jeho prevalence v ČR. Veterinářství 12, 938-941.

- Preto, T., Manfrin, A., Ceolin, C., Dalla Pozza, M., Quartesan, R., Abbadi, M., Panzarin, V., Toffan, A., 2013. First isolation of KHV in Italy from imported koi (*Cyprinus carpio koi*). Abstract Book of the 16th International Conference of Diseases of Fish and Shellfish, Tampere, Finland, September 2–6, 2013, P-036:190.
- Radosavljević, V., Jeremić, S., Ćirković, M., Lako, B., Milićević, V., Potkonjak, A., Nikolin, V., 2012. Common fish species in polyculture with carp as cyprinid herpesvirus 3 carriers. Acta. Vet – Beograd. 5–6, 675–681.
- Rakus, K., Ouyang, P., Boutier, M., Ronsmans, M., Reschner, A., Vancsok, C., Jazowiecka – Rakus, J., Vanderplasschen, A., 2013. Cyprinid herpesvirus 3: an interesting virus for applied and fundamental research. Vet. Res. 44, p. 85.
- Raj, VS., Fournier, G., Rakus, K., Ronsmans, M., Ouyang, P., Michel, B., Delforges, C., Costes, B., Farnir, F., Lerov, B., Wattiez, R., Melard, C., Mast, J., Lieffrig, F., Vanderplasschen, A., 2011. A skin mucus of *Cyprinus carpio* inhibits cyprinid herpesvirus 3 binding to epidermal cells. Vet. Res. 42, 92–100.
- Rijsewijk, F., Pritz – Verschuren, S., Kerkhoff, S., Botter, A., Willemsen, M., Van Nieuwstadt, T., Haenen, O., 2005. Development of a polymerase chain reaction for the detection of Anguillid herpesvirus DNA in eels based on the herpesvirus DNA polymerase gene. J. Virol. Methods. 124, 87–94.
- Ronen, A., Perelberg, A., Abramowitz, J., Hutoran, M., Tinman, S., Bejerano, I., Steinitz, M., Kotler, M., 2003. Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*. Vaccine. 21, 4677–4684.
- Ronsmans, M., Boutier, M., Rakus, K., Farnir, F., Desmecht, D., Ectors, F., Vandecan, M., Lieffrig, F., Melard, C., Vanderplasschen, A., 2014. Sensitivity and permissivity of *Cyprinus carpio* to cyprinid herpesvirus 3 during the early stages of its development: importance of the epidermal mucus as an innate immune barrier. Vet. Res. 45, p. 100.
- Sadler, J., Marecaux, E., Goodwin, A. E., 2008. Detection of koi herpes virus (CyHV-3) in goldfish, *Carassius auratus* (L.), exposed to infected koi. J. Fish. Dis. 31, 71–72.
- Sano, N., Fukada, H., Sano, T., 1990. Isolation and characterization of a new herpesvirus from eel (*Anguilla anguilla*). In: Perkins TO, Cheng TC (Eds): Pathology in marine science. 3rd edition. Academic Press, New York City, pp. 15–31.

- Sano, N., Moriwake, M., Hondo, R., Sano, T., 1993. Herpesvirus cyprini: a search for viral genome in infected fish by in situ hybridization. *J. Fish. Dis.* 16, 495–499.
- Sano, M., Ito, T., Kurita, J., Yuasa, K., Miwa, S., Iida, T., 2004. Experience on common carp mass mortality in Japan. pp. 14–24. In Lavilla-Pitogo, C.R. and Nagasawa, K. (eds.). *Transboundary Fish Diseases in Southeast Asia: Occurrence, Surveillance, Research and Training*. Seafdec Aqd, Philippines.
- Shapira, Y., Magen, Y., Zak, T., Kotler, M., Hulata, G., 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.
- Shimizu, T., Yoshida, N., Kasai, H., Yoshimizu, M., 2006. Survival of koi herpesvirus (KHV) in environmental water. *Fish. Pathol.* 41, 153–157.
- Soliman, H., El – Matbouli, M., 2005. An inexpensive and rapid diagnostic method of Koi Herpesvirus (KHV) infection by loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol.* 2, p. 83.
- St-Hilaire, S., Beevers, N., Way, K., Le Deuff, R. M., Martin, P., Joiner, C., 2005. Reactivation of koi herpesvirus infections in common carp *Cyprinus carpio*. *Dis. Aquat. Organ.* 67, 15–23.
- Strouhalová, R., 2011: Změny v genomu viru klíšťové encefalitidy u variant s různou historií pasáží a odlišnými biologickými vlastnostmi. Diplomová práce JU České Budějovice. 96 s.
- Sunarto, A., Rukyani, A., Itami, T., 2005. Indonesian experience on the outbreak of koi herpesvirus in koi and carp (*Cyprinus carpio*). *Bulletin of the Fisheries Research Agency Supplement*. 2, 15–21.
- Svobodová, Z., Kolářová, J., Navrátil, S., Veselý, T., Chloupek, P., Tesarčík, J., Čítek, J., 2007. *Nemoci sladkovodních a akvarijních ryb*. 4., přeprac. vyd. Informatorium. 264 s. ISBN 9788073330514.
- Šmarda, J., 2005. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita. 188 s.
- Štěch, L., 2007. *Koi: barevní japonské kapři*. 1. vyd. Zlín: Alcedor. 350 s.
- Tandavanitj, S., Kanchanakhan, S., Polchana, J., Puttinaowarat, S., Somsiri, T., Somjetlertcharoe, A., Laoprasert, T., Kessuwan, K., Wannaprapha, M., Panyawachira, V., Chinabut, S., 2005. First occurrence of koi herpesvirus disease (KHVD) in Thailand. In *Abstracts of Diseases in Asian Aquaculture VI*, held in Sri Lanka, Oct. 2005.



- Tellier, R., Bukh, J., Emerson, S. U., Purcel, R. H., 2003. Long PCR amplification of large fragments of viral genomes: a technical overview. *Method. Mol. Biol.* 226, 167–172.
- Ueno, Y., Kitao, T., Chen, S. N., Aoki, T., Kou, G. H., 1992. Characterization of herpes-like virus isolated from cultured Japanese eels in Taiwan. *Gyobyo Kenkyu (Fish. Pathol.)* 27, 7–17.
- Uchii, K., Matsui, K., Iida, T., Kawabata, Z., 2009. Distribution of the introduced cyprinid herpesvirus 3 in a wild population of common carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish. Dis.* 32, 857–864.
- Van Beurden, S. J., Bossers, A., Voorbergen – Laarman, M. H. A., Haenen, O. L. M., Peters, S., Abma – Henkens, M. H. C., Peeters, B. P. H., Rottier, P. J. M., Engelsma, M. Y., 2010. Complete genome sequence and taxonomic position of anguillid herpesvirus 1. *J. Gen. Virol.* 91, 880–887.
- Van Ginneken, V., Haenen, O., Coldenhoff, K., Willemze, R., Antonissen, E., Van Tulden, P., Dijkstra, S., Wagenaar, F., Van den Thillart, G., 2004. Presence of virus infections in eel populations from various geographic areas. *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pat.* 24, 270–274.
- Van Nieuwstadt, A. P., Dijkstra, S. G., Haenen, O. L. M., 2001. Persistence of herpesvirus of eel *Herpesvirus anguillae* in farmed European eel *Anguilla anguilla*. *Dis. Aquat. Organ.* 45, 103–107.
- Walster, C. I., 1999. Clinical observations of several mortalities in Koi carp, *Cyprinus carpio*, with gill disease. *Fish. Vet. Journal.* 3, 54–58.
- Walster, C. I., 2000. Koi carp mortality syndrome: an update. *Fish. Vet. Journal.* 5, 72–75.
- Waltzek, T. B., Kelley, G. O., Stone, D. M., Way, K., Hanson, L., Fukuda, H., Hirono, I., Aoki, T., Davison, A. J., Hedrick, R. P., 2005. Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family Herpesviridae. *J. Gen. Virol.* 86, 1659–1667.
- Waltzek, T. B., Kelley, G. O., Alfaro, M. E., Kurobe, T., Davison, A. J., Hedrick, R. P., 2009. Phylogenetic relationships in the family Alloherpesviridae. *Dis. Aquat. Organ.* 84, 179–194.
- Way, K., Le Deuf, R – M., Ecclestone, L., Feist, S. W., Dixon, P. F., Wildgoose, W. H., Hedrick, R. P., 2001. Isolation of a herpesvirus during disease outbreaks in adult koi carp, *Cyprinus carpio*, in the UK. Abstract EAFP conference Dublin, Sept. 2001.

- Way, K., Le Deuff, M., Stone, D. M., Denham, K. L., St-Hilaire, S., 2004. Diagnostics and research at CEFAS Weymouth laboratory 2000–2003. In: Report of International Workshop on Koi Herpesvirus, 12–13 February 2004, London, 9–10.
- Way, K., Dixon, P., 2007. Koi herpesvirus - An update. *Finfish News*. 3, 8–13.
- Xu, J. R., Bently, J., Beck, L., Reed, A., Miller – Morgan, T., Heidel, J. R., Kent, M. L., Rockey, D. D., Jin, L., 2013. Analysis of koi herpesvirus latency in wild common carp and ornamental koi in Oregon, USA. *J. Virol. Methods*. 187, 372–379.
- Yamada, K., 2004. Preventive measures against Koi Herpesvirus disease in fancy carp in Niigata Prefecture. Abstract of oral presentation at Int.Symp. on KHV Disease – Strategy for KHV Disease Control, 13 March 2004, Pacifico Yokohama, Japan.
- Yasumoto, S., Kuzuya, Y., Yasuda, M., Yoshimura, T., Miyazaki, T., 2006. Oral immunization of common carp with a liposome vaccine fusing koi herpesvirus antigen. *Jpn. Soc. Fish. Pathol.* 41, 141–145.
- Yoshino, M., Watari, H., Kojima, T., Ikedo, M., Kurita, J., 2009. Rapid, sensitive and simple detection method for koi herpesvirus using loop-mediated isothermal amplification. *Microbiol. Immunol.* 53, 375–383.
- Yuasa, K., Sano, 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 Pathol.* 40, 37–39.

### **Zdroje online:**

- Dreamstime. Structure of the Herpesvirus virion. [online]. Dreamstime © 2000-2015 [cit. 2015–4–29]. Dostupné z < <http://www.dreamstime.com/royalty-free-stock-photo-herpes-virus-structure-image27182865> >.
- Outdoorhub. Michigan DNR Detects Koi Herpes Virus in Silver Lake Fish Kill. [online]. Michigan: Department of Natural Resources. © 2015 [cit. 2015–4–20]. Dostupné z < <http://www.outdoorhub.com/news/2011/10/27/michigan-dnr-detects-koi-herpes-virus-in-silver-lake-fish-kill/> >.
- Směrnice rady 2006 /88 /ES o veterinárních požadavcích na živočichy pocházející z akvakultury a produkty akvakultury a o prevenci a tlumení některých nákaz vodních

živočichů ze dne 24. října 2006 [online]. [cit. 2015–4–15]. Dostupné z <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:328:0014:0056:cs:PDF>.

Vyhláška č. 290/2008 Sb. o veterinárních pořadavcích na živočichy pocházející z akvakultury a na produkty akvakultury, o opatřeních pro předcházení a zdolávání některých nálezů vodních živočichů ze dne 19. srpna 2008 [online]. [cit. 2015–5–3]. Dostupné z [http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe\\_uplna-zneni\\_Vyhlaska-2008-290-veterinarnipece.html](http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe_uplna-zneni_Vyhlaska-2008-290-veterinarnipece.html).

Zákon č. 166 /1999 Sb. o veterinární péči a o změně souvisejících zákonů (veterinární zákon) ze dne 30. 7. 1999 [online]. [cit. 2015–4–15]. Dostupné z [http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe\\_uplna-zneni\\_zakon-1999-166-viceoblasti.html](http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe_uplna-zneni_zakon-1999-166-viceoblasti.html).

## **11. Seznam zkratek:**

AngHV-1 – Anguillid herpesvirus 1

CAF-2 – buněčná linie z kapřích ploutví (Carp fin 2)

CCB- buněčná linie z kapřího mozku (Cyprinus Carpio Brain)

CCG- buněčná linie z tkání žaber (Cyprinus Carpio Gill)

CEFAS- Centrum vědy pro životní prostředí, rybolov a akvakulturu (Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science)

CEV- Kapří edema virus (Carp Edema Virus)

CPE- Cytopatický efekt (Cytopathic effect)

CyHV-1 – Cyprinid herpesvirus 1

CyHV-2 – Cyprinid herpesvirus 2

CyHV-3 – Cyprinid herpesvirus 3

DNA- Deoxyribonukleová kyselina

dpi- den po infekci

EAFP- Evropská asociace rybích patogenů (European Association of Fish Diseases)

ELISA- Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

EPC- Epitelioma Papulosum Cyprini

FAO- Potravinářská a zemědělská organizace (Food and Agriculture Organization)

FHM- Fathead minnow

CHSE- Chinook Salmon Embryo

IcHV-1 – Ictalurid herpesvirus 1

IHN- Infekční hematopoetická nekróza

ISA- Nakažlivá chudokrevnost lososů

KAS- Kwartérní amoniové sloučeniny

kbp- pár kilobází (kilobase pair)

KF- 1 - buněčná linie z kapří ploutve (koi fin 1)

KHV- Koi herpes virus

KHVD- Koi herpes viróza (Koi Herpes Virus Disease)

KVS SVS- Krajská veterinární správa Státní veterinární správy

LAMP- Loop-mediated isothermal amplification („smyčkově zprostředkovaná“ isotermická amplifikace)

MM- Molekulární marker

OIE- Světová organizace pro zdraví zvířat (World Organisation for Animal Health)

PCR- Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)

qPCR- Real Time quantitative PCR (kvantitativní polymerázová řetězová reakce)

RaHV-1 – Ranid herpesvirus 1

RTG- Rainbow Trout Gonad – pohlavní žlázy pstruha duhového

TEM- Transmisní elektronová mikroskopie

TK- Thimidin kináza

VHS- Virová hemoragická septikémie

## Abstrakt

### Vnímavost jednotlivých druhů ryb ke koi herpesviróze - přehledová studie

Koi herpesviróza (KHVD) je nebezpečné virové onemocnění, které poprvé vzplanulo v Izraeli roku 1998. V průběhu 17 ti let se nákaza díky výstavám a mezinárodním obchodům s rybami rozšířila téměř do celého světa a způsobila úhyn mnoha tun konzumních i okrasných kaprů a značné ekonomické ztráty počítané na desítky milionů dolarů. Evropská unie zařadila koi herpesvirózu vzhledem k její nebezpečnosti na seznam neexotických nákaz. Od roku 2008 povinnost hlášení z této nákazy platí i v České republice. Za původce onemocnění je považován koi herpesvirus, zařazený do systému virů jako Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3). Za hlavní druhy ryb vnímavé ke KHVD jsou považováni koi kapr (*Cyprinus carpio koi*) a kapr obecný (*Cyprinus carpio carpio*). Bylo však prokázáno, že virus může být detekován i ve tkáních jiných druhů ryb a u některých z nich se mohou dokonce projevit i klinické příznaky. Je pravděpodobné, že tyto druhy ryb by mohly v akvakultuře hrát roli vironosičů a u některých druhů byla tato skutečnost v experimentálních podmínkách již prokázána.

Vzhledem k tomu, že koi herpesvirózu nelze léčit a v České republice není možné ani použít vakcínu, je pro ochranu chovů ryb nejdůležitější zabránit zavlečení nákazy. Hromadným úhynům ryb způsobeným KHVD je třeba předcházet kontrolou dovážených a vyvážených ryb, monitoringem výskytu nákazy a zodpovědným přístupem ze strany chovatelů. Cílem této práce bylo formou přehledové studie sumarizovat dostupné informace o koi herpesviróze a o vnímavosti různých druhů ryb k tomuto nebezpečnému infekčnímu onemocnění.

**Klíčová slova:** CyHV-3, KHV, kapr obecný, kapr obecný koi, kříženci, mortalita, nákaza, diagnostické metody

## **Abstract**

### **Susceptibility of Individual Fish Species to Koi Herpes Viral Disease - a research study**

Koi herpes viral disease (hereinafter referred to as “KHVD”) is a dangerous viral disease, outbreak of which was recorded in Israel in 1998 for the first time. Due to exhibitions and international fish trade it spread almost to the whole world in the course of the next 17 years and it caused a loss of many tonnes of both breed and consumption carp as well as it inflicted significant economic losses calculated in the tens millions of dollars. The European Union has added the koi herpes viral disease, due to its hazards, to the list of non-exotic diseases. Since 2008 there is a duty to report this infection in the Czech Republic as well.

Koi herpes virus classified in the system of viruses as Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3) is considered the infective agent. Koi carp (*Cyprinus carpio koi*) and common carp (*Cyprinus carpio carpio*) are considered the main species susceptible to KHVD. However, it has been proved that the virus may be also detected in tissues of other fish species and in some of them clinical symptoms may appear. It is of high degree of probability that such fish species may play the role of viral communicants and this presumption has already been proved in some species in experimental conditions.

With a view to the fact that koi herpes viral disease is incurable and application of a vaccine is impossible in the Czech Republic, for protection of fish breeding it is crucial to prevent bringing the disease in the territory. Mass fish perish caused by KHVD shall be prevented by strict inspection processes of the imported and exported fish, monitoring of the disease spread and responsible breeders' approach.

The major objective of this work was to summarise available information about koi herpes viral disease and susceptibility of the individual fish species to this dangerous viral infectious disease in a form of a research study.

**Key words:** CyHV-3, KHV, common carp, koi carp, cross-breeds, mortality, infection, diagnostic methods