

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program:

Biologie

Studijní obor:

Biologie



Petr Petka

Herpetické viry ryb

Fish Herpesviruses

Bakalářská práce

Tržkolitel: doc. RNDr. Jitka Forstová, CSc.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohláším, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14. 8. 2015

Podpis

Velmi rád bych poděkoval své kolegyni doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc. za pomoc při vypracování mé bakalářské práce. Poděkovat bych chtěl také své rodině za velkou podporu během mého studia.

Abstrakt

Herpetické viry napadající ryby jsou jedním z nejrozšířenějších virových patogenů ohrožující souasně rybí populace jak ve volné přírodě tak i ty chované. Je jich celá řada od málo nebezpečných po vysoce rizikové, které se nekontrolovatelně rozšířily a způsobily velké ztráty v komerčních chovech a ohrožení volně žijících populací. U většiny z nich můžeme sledovat zvýšenou citlivost na teplotu a stresové faktory, které jsou nejčastěji důvodem opakovaného vypuknutí nákazy. Mezi nejlépe popsány rybí herpesviry patří ty, které napadají sladkovodní ryby. V současné době jsou objevovány další a další herpetické viry, které pravděpodobně napadají mořské ryby.

Klíčová slova: Rybí herpesviry, rybí nemoci, ryby, virus

Abstract

Herpetetic viruses that attack fish are ones of the most widespread virus pathogens, threatening modern day fish population not only in the wild but also those that are farmed. There are many types of the pathogen, from the ones those do not cause severe diseases to those that are extremely dangerous, spread without any control and caused vast losses in commercial farming and in wild populations. Most of the viruses exhibit increased sensitivity on heat and stress factors, which are the most common reasons of the repeating outbreak of disease. To the best described fish herpesvirus viruses attacking fresh water fishes belong. Nowadays more and more herpetetic viruses which attack mainly salt water fish are being discovered.

Key words: Fish herpesviridae, fish disease, fishes, virus

Seznam použitých zkratk

Zkratka	Z anglického názvu	eský p eklad
AcHV-1	Acipenserid herpesvirus 1	Jeseterových herpesvirus 1
AcHV-2	Acipenserid herpesvirus 2	Jeseterových herpesvirus 2
AngHV-1	Anguillid herpesvirus-1	Úho í herpesvirus 1
CCV	Channel catfish virus	Virus kanálového sume ka
CyHV-1	Cyprinid herpesvirus 1	Kaprovitých herpesvirus 1
CyHV-2	Cyprinid herpesvirus 2	Kaprovitých herpesvirus 2
CyHV-3	Cyprinid herpesvirus 3	Kaprovitých herpesvirus 3
DNA	Deoxyribonucleic acid	Deoxyribonukleová kyselina
EEDV	Epizootic epitheliotropic disease virus	Epizootické epitheliotropické virové onemocnění
GFHNV	goldfish haematopoietic necrosis virus	Virus nekrózy krvetvorných bun k zlaté rybky
HVHNV	herpesviral haematopoietic necrosis virus	Herpesvirus nekrózy krvetvorných bun k
IL-10	Interleukin 10	Interleukin 10
IcHV-1	Ictalurid herpesvirus 1	Sume kovitých herpesvirus 1
IcHV-2	Ictalurid herpesvirus 2	Sume kovitých herpesvirus 2
IcmHV	Ictalurus melas virus	Virus erného sume ka
KF-1	koi fin cell line	bun ná linie pocházející z ploutve koi
KHV	Koi herpesvirus	Koi herpesvirus
OMV	Oncorhynchus masou virus	Virus lososa masou
ORF	Open reading frame	Otev ený tecí rámeček
PCR	polymerase chain reaction	Polymerázová et zová reakce
RaHV-1	Ranid herpesvirus 1	fiabí herpesvirus 1
RaHV-2	Ranid herpesvirus 2	fiabí herpesvirus 2
SalHV-1	Salmonid herpesvirus 1	lososovitých herpesvirus 1
SalHV-2	Salmonid herpesvirus 2	lososovitých herpesvirus 1

SaLHV-3	Salmonid herpesvirus 3	lososovitých herpesvirus 1
SHV	Steelhead herpesvirus	lososí herpesvirus
WSHV-1	white sturgeon herpesvirus 1	herpesvirus bílého jesetera 1
WSHV-2	white sturgeon herpesvirus 2	herpesvirus bílého jesetera 2

1. Obsah

1	Úvod.....	1
2	<i>Alloherpesviridae</i>	2
2.1	Rod Cyprinivirus	4
2.1.1	Cyprinid herpesvirus 3	4
2.1.1.1	Historie	4
2.1.1.2	Struktura virionu	5
2.1.1.3	Replikační cyklus	5
2.1.1.4	Průnik do těla hostitele.....	7
2.1.1.5	Projevy onemocnění	8
2.1.1.6	Léčba a prevence	10
2.1.1.7	Rozšíření viru	11
2.1.1.7.1	Úmrtí onemocnění v Indonésii.....	12
2.1.1.8	Detekční metody.....	13
2.1.1.9	Vliv teploty na replikaci viru.....	14
2.1.1.10	Histopatologické změny.....	15
2.1.2	Cyprinid herpesvirus 2	16
2.1.2.1	Projevy onemocnění	18
2.1.2.2	Rozšíření	18
2.1.2.3	Histopatologické změny.....	19
2.1.3	Cyprinid herpesvirus 1	21

2.1.4	Anguillid herpesvirus 1	22
2.2	Rod Ictalurivirus.....	24
2.2.1	Ictalurid herpesvirus 1	24
2.2.2	Ictalurid herpesvirus 2	25
2.2.3	Acipenserid herpesvirus 1	25
2.2.4	Acipenserid herpesvirus 2	26
2.3	Rod Salmonivirus.....	27
2.3.1	Salmonid herpesvirus 1	27
2.3.2	Salmonid herpesvirus 2	27
2.3.3	Salmonid herpesvirus 3	28
2.4	Nov rozpoznané a nezařazené rybí herpesviry.....	29
2.4.1	Gadid herpesvirus 1.....	29
2.4.2	Pilchard herpesvirus	29
3	Závěr	31
4	Seznam literatury	32

1 Úvod

čele *Herpesviridae* jsou obalené viry. Jejich genomem je lineární dvouvláknová DNA. Napadají celou řádu hostitelů, pro které je typický rozvoj latentní infekce, kdy mohou v hostiteli přetrvávat doživotně. Jedná se o nejrozšířenější viry v rámci filum chordata. Díky tomuto jich stále mnoho není prozkoumáno a ani nejsou stědem takového zájmu, který by jim měl být vnován.

V této práci je skupina virů napadajících kostěné ryby a obojživelníky, které se vymykají klasickému hodnocení virů této třídy. Odlišují se velikostí genomu a svojí teplotní senzitivitou, kdy onemocnění propuká jen v rámci stanovených teplot nebo v případě pokud dosáhne teplota vody určité teploty. Většina z nich má vysokou hostitelskou specifitu. V nedávné době se objevila onemocnění ryb vyvolaná herpesviry doprovázená vysokou mortalitou. Způsobila velké hospodářské škody a díky tomu se tyto viry staly předmětem v této práci zájmu.

Bohužel velká část těchto virových onemocnění není doposud detailně prostudována z důvodu jejich endemického výskytu nebo neexistence vhodné buněčné kultury pro množení odpovídajících herpesvirů. Také o herpetických virech napadajících mořské ryby existuje málo poznatků, protože je obtížné sledovat příměh jimi vyvolaných onemocnění a podmínky, za kterých propuknou.

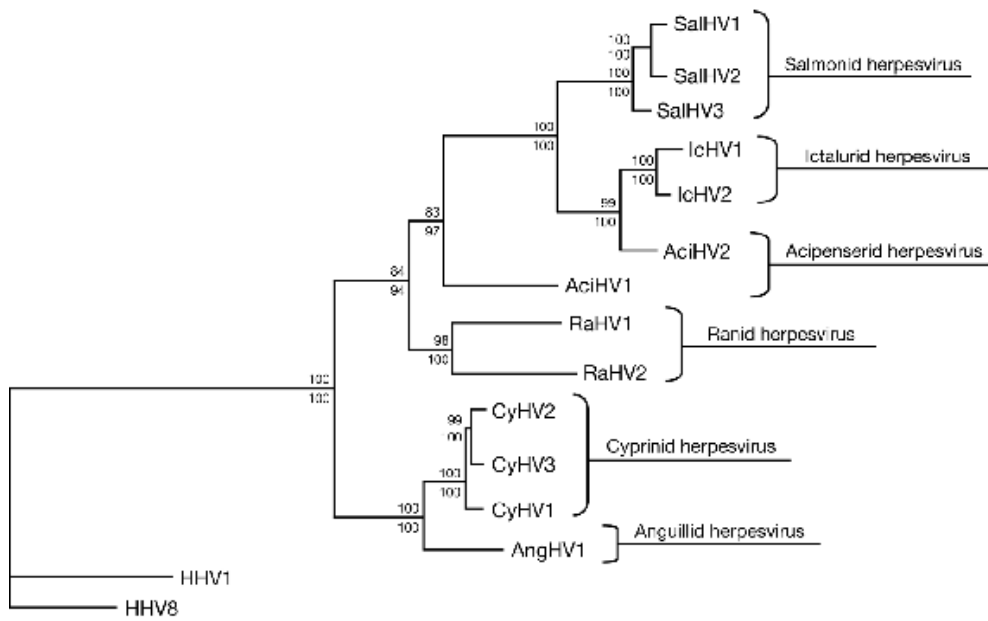
Cílem této práce je představit současně poznatky o jednotlivých herpesvirech napadajících kostěné ryby a o onemocnění, která vyvolávají.

2 *Alloherpesviridae*

Skupina těchto virů byla vyčleněna velmi nedávno díky svým odlišnostem od ostatních členů řady *Herpesviridae*, a vytvořila samostatnou řadu *Alloherpesviridae*. Viry z této řady napadají jenom ryby a obojživelníky, což ukazuje jejich vazbu na vodu a hlavně studenokrevné obratlovce, kteří v nich žijí. Usuzuje se, že se tyto viry vyvinuly z nějakého člena řady *Herpesviridae*, ale před 400 miliony let, kdy došlo k rozdělení hostitelů, se vyvíjely odděleně (Davison, 1998). Podle fylogenetických analýz byla skupina rozdělena do dvou sesterských větví (Michel et al., 2010) (obrázek 1). První zahrnuje herpetické viry napadající kaprovité ryby (CyHV-3, CyHV-2 a CyHV-1) a virus, jenž napadá úhoře (AngHV-1). Tito zástupci patří do rodu *Cyprinivirus*. Jednotlivé viry z tohoto rodu mají největší genom v rámci celé řady *Alloherpesviridae* i *Herpesviridae*. Velikost genomu této větve se pohybuje v rozmezí 245 až 295 kb (Waltzek et al., 2009).

Druhá větev obsahuje několik virů patřících do rodu *Batrachovirus*, které napadají fláby (RaHV-1 a RaHV-2), dále viry infikujících jesetery (AciHV-1 a AciHV-2) nebo sumceky (IcHV-1 a IcHV-2), které patří do rodu *Ictalurivirus* a viry parazitující na lososech (SalHV-1, SalHV-2 a SalHV-3) patřící do rodu *Salmonivirus*. Viry této větve mají menší genom oproti virům první větve. Jeho velikost se pohybuje v rozmezí 134 až 235 kb (Michel et al., 2010).

Kromě virů řady *Alloherpesviridae* existuje v současnosti dalších 17 dosud nezařazených rybích herpetických virů. Ve většině případů se jedná o viry, které zřejmě byly nově rozpoznány virová onemocnění nebo i dříve známé viry, které nebyly dosud dostatečně prostudovány.



0.1

Obrázek 1: Fylogenetický strom zobrazující příbuzenské vztahy mezi herpetickými viry ryb a obojživelníků. HHV1 a HHV8 jsou lidské herpesviry 1 a 8. (Převzato z Waltzek et al., 2009)

2.1 Rod Cyprinivirus

2.1.1 Cyprinid herpesvirus 3

2.1.1.1 Historie

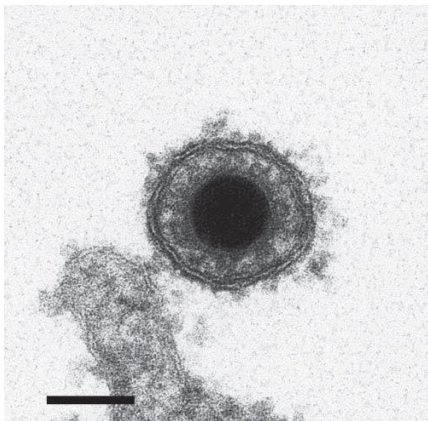
V roce 1998 se objevilo nové onemocnění vykazující vysokou mortalitou 80% až 100% u koi kapra. První prokázané případy byly hlášené z Izraele a USA. Navíc bylo uhlédáno podezření prvního výskytu v Německu, kde se nepodařilo přejít na dříve vod masového úhynu. Po prvotních testech bylo zjištěno, že příčinou úhynu je nové virové onemocnění. Následně byl identifikovaný virový patogen pojmenován Koi herpesvirus (zkrácen KHV), protože jeho morfologie vykazovala velké podobnosti s herpetickými viry (B. Michel et al., 2010). Onemocnění se stejnými příznaky se v zasáhlých zemích začalo objevovat i u koi obecného a vykazovalo shodnou míru mortality. Velmi krátce poté se objevilo několik hlášení o výskytu nemoci, která vykazovala stejné příznaky jako výše zmíněné případy z několika zemí v Evropě, Africe a Asii. V Evropě se virus doposud rozšířil do 28 zemí a dále se šíří. Kypodivu nedošlo k rozšíření do Severní Afriky, Jižní Ameriky a Austrálie (Benjamin Michel et al., 2010). Virus se objevil ve všech zemích, kde se tyto ryby hojně chovají. Objevený rybí virus vykazoval i jisté odlišnosti od známých herpetických virů. Na základě toho, skupina vědců virus pojmenovala Carp interstitial nephritis and gill necrosis virus (Pikarsky et al., 2004), protože odmítala tvrzení, že se jedná o herpetický virus. Později, po dkladném prozkoumání bylo zjištěno, že tento karpí virus vyazuje nejvíce podobnosti právě s viry z čeledi *Herpesviridae* (Waltzek et al., 2005) a došlo k sjednocení názvu na KHV podle hostitele, ve kterém se nemoc poprvé vyskytla. Nakonec došlo k vytvoření nového názvu Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3) díky homologiím s CyHV-1 a CyHV-2 (Wang et al., 2015).

Od doby objevení viru bylo identifikováno 9 genotypů, 7 z Evropy a 2 z Asie (Benjamin Michel et al., 2010). Díky tomu se podařilo zjistit jednotlivé modely šíření viru, kdy bylo například zjištěno, že na Sumatě se vyskytují dvě formy viru - na jižní Sumatě se nachází forma A1 a na severní a západní se nachází A2 (Kurita et al., 2009).

Onemocnění tímto virem podléhají všechny včasně vkořené kohorty koi, a kolivně které vdecké práce uvádějí, že mladé ryby do věku 3 měsíců vykazují lehce vyšší mortalitu než starší jedinci.

2.1.1.2 Struktura virionu

CyHV-3 je členem eledi vir *Alloherpesviridae*. Tomu odpovídá i jeho struktura. Je to obalený virus. Skládá se z ikosahedrální kapsidy, která je tvořena 162 kapsomerami uspořádanými v T=16 ikosahedrální mřížce (Waltzek et al., 2005). Kapsida obsahuje dvouvláknovou lineární molekulu DNA (Waltzek et al., 2005). Mezi obalem a kapsidou je prostor, ve kterém se nachází tegument (obrázek 2). Velikost virové částice je 170-200 nm (Miyazaki et al., 2008). Tento virus má spolu s CyHV-1 jeden z nejvíce genomů mezi Alloherpesviry i členy *Herpesviridae* (Michel et al., 2010). Jeho velikost je 295 kb a obsahuje 156 kódujících rámců (ORF). Navzdory velikosti svého genomu se předpokládá, že kóduje méně genů než lidský cytomegalovirus (Aoki et al., 2007). Díky velikosti svého genomu a vlastnostem je tento virus kandidátem na modelový organismus pro mutagenézu velkých virů.



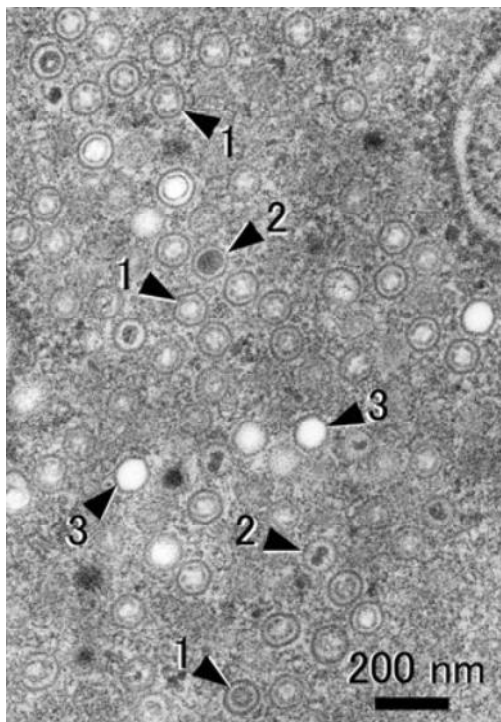
Obrázek 2: Zralý virion CyHV-3
(Převzato z (Benjamin Michel et al., 2010))

2.1.1.3 Replikační cyklus

Replikace virové DNA je závislá na 7 proteinech, které zahrnují dvě podjednotky DNA polymerázy, 3 podjednotky komplexu helikáza-primáza, DNA-vazebný protein vázající jednovláknovou DNA a helikázu, která rozpoznává počáteční místo DNA replikace (Waltzek et al., 2005). Sbalení DNA do virionu vyžaduje také 7 proteinů. Replikace DNA a formování kapsidy probíhá uvnitř buněčného jádra, odkud nezralý virion vylučuje skrz jadernou membránu (Miwa et al., 2007). Nejprve získá obal z vnitřní jaderné membrány. Tento obal poté splývá s vnější jadernou membránou a neobalená kapsida vstupuje do cytoplazmy (Miwa et al., 2007). V cytoplazmě získává virus konečný obal postupně do exocytického vakuolu, který

následně splyne s cytoplazmatickou membránou a virus opouští buňku (Miwa et al., 2007). Přesnější procesy virové morfogeneze a maturace bohužel doposud nejsou dostatečně známy.

K replikaci viru dochází v flábrách, stěvech, játrech, ledvinách i mozku ryb. Kapsidy uvnitř jádra mají odlišnou morfologii, měly by být odlišeny na 3 rozdílné skupiny (obrázek 3). Tyto skupiny jsou prázdné kapsidy bez genomu. Druhá skupina má elektrodenzní jádro (Miwa et al., 2007). První skupina se vyskytuje s největší četností. (Miwa et al., 2007). V malé míře měly by být pozorovány defektní kapsidy, které mohou obsahovat zvláštní komponenty.



Obrázek 3: Kapsidy CyHV-3 v buněném jádře Typka číslo 3 ukazuje prázdné kapsidy. Typka číslo 2 ukazuje kapsidy s elektrodenzním jádrem. Typka číslo 1. ukazuje kapsidy obsahující vnitřní kulovitou strukturu (Převzato z (Miwa et al., 2007))

Virová částice obsahuje 40 proteinů, z nichž 3 se podílejí na stavbě kapsidy, 13 jich nalezneme na obalu, dalších 2 proteiny se nacházejí v tegumentu a 22 neklasifikovaných proteinů (ještě se nepodařilo zjistit jejich úlohu ve virionu) (B. Michel et al., 2010). Dále se zde nacházejí proteiny buněného původu, které se do virionu dostávají při sbalování v buňce hostitele. Tyto proteiny se ve virionu v těle nacházejí v nízkých koncentracích a nejedná se ani o majoritní buněčné proteiny. (B. Michel et al., 2010). Bylo zjištěno, že kapsidové proteiny jsou podobné kapsidovým proteinům viru z řady *Herpesviridae*, ale jeden protein vyskytující se v obalu vykazuje podobnost se skupinou Singapurských iridovirů (Aoki et al., 2007). V tegumentu se vyskytuje protein, který naznačuje podobnost s některými iridoviry a poxviry. Protein (ORF62) je cystein proteasa, a je nejvýznamnějším proteinem virionu

s velikostí 442,2 kDa. Z neklasifikovaných proteinů jeden vykazuje podobnost s eukaryotickými proteiny DUF614 (B. Michel et al., 2010).

Virová DNA tohoto viru obsahuje 156 ORF (B. Michel et al., 2010). Morfologicky tento virus vykazuje velké podobnosti s herpesviry a můžeme u něj nalézt sekvenční homologie s CyHV-1 a CyHV-2. V genomu bylo nalezeno několik ORF podobných s ORF genomu poxviru, iridoviru a dalších velkých DNA virů. Genom také obsahuje 15 genů, které vykazují podobnost s virem Ictalurid herpesvirus ICHV-1 (Aoki et al., 2007). Několik z těchto genů kóduje proteiny, které se zapojují do morfogeneze kapsidy. V genomu je také kódována virová verze interleukinu-10, který se podílí na modulování imunitní odpovědi hostitele (Aoki et al., 2007).

Onemocnění způsobené CyHV-3, mohou přenášet ryby fylogeneticky příbuzné kaprům (El-Matbouli et al., 2007). V několika vdeckých studiích bylo zjištěno, že karas obecný, zlatá ryba i amur bílý po vystavení viru nevykazují klinické příznaky onemocnění, ale je možné z jejich tkání detekovat virovou DNA. V případě, že byla k této jedinci po nějaké době předána naivní populace kapra, v několika případech došlo k přenosu viru a onemocnění (El-Matbouli et al., 2007). Z toho vyplývá, že tyto druhy ryb mohou virus obsahovat a přenášet. Tato skutečnost přispívá k rychlejšímu šíření viru. Hybridi kapra obecného a karase obecného podléhají tomuto onemocnění s mortalitou 60% (Benjamin Michel et al., 2010). Testy odhalily přítomnost viru v leukocytech zlaté rybky (karas zlatý) 14, 45 i 60 dní po vystavení viru (El-Matbouli et al., 2007). Jelikož zlaté ryby nepodléhají onemocnění, neprojevují se u nich příznaky a jsou velmi oblíbené mezi chovateli, jedná se o další vektor, který pomáhá šíření onemocnění.

2.1.1.4 Průnik do těla hostitele

Mechanismus vstupu viru do organismu není objasněn. V dřívějších publikacích se usuzovalo, že virus do těla vstupuje přes flábrý, kde se mu nejspíše nejlehčeji dostat do krevního řečiště a postupně infikovat další tkáň. V novějších publikacích bylo zjištěno, že virus do těla hostitele vstupuje přes ploutve i pokožku a následně se rozšíří do krevního řečiště, které slouží jako cesta jeho šíření do okolních tkání (Raj et al., 2011). Poškození pokožky nebo slizové vrstvy, které je nejcitlivější zřejmě způsobeno stresem či špatnou manipulací, usnadňuje průnik

viru do hostitele (Raj et al., 2011). Nakazení jedinci 2 až 3 dny po vystavení patogenu vykazují abnormální chování, kdy se otírají o jiné ryby a různé pedem ty, což způsobuje šíření z pokofky nakazeného jedince na pokofku zdravého (Costes et al., 2009). Dále byl popsán vstup viru do těla při krmení infikovanou potravou, kdy se virus do těla dostává přes hltan (Fournier et al., 2012).

Při vhodné teplotě dochází k úmrtí nakazeného jedince mezi 8 až 11 dnem od vystavení patogenu. Nejvíce virové DNA bylo detekováno v flábrách a ledvinách, kde probíhá pomnožení viru. Infekce probíhá masivně i ve středním epitelu a odtud se uvolují nové virové partikule s trusem (Fournier et al., 2012).

2.1.1.5 Projevy onemocnění

První příznaky onemocnění se projevují přibližně třetí den od vystavení viru. K úmrtí dochází nejčastěji mezi 7 až 21 dnem od nakazení jedince (Miyazaki et al., 2008). Nejprve je možno pozorovat světlé skvrny na pokofce, které jsou způsobeny sníženou sekrecí hlenu, zarudnutí v oblasti ploutví a krvácení z pokofky (obrázek 5). Pokofka v místech světlých skvrn je na ohmat drsná (Wang et al., 2015), což může být důvodem pro těžení o další ryby. Dále se objevují typicky vpádlé oči (Wang et al., 2015). Následuje snížená chuť k jídlu, letargie, nakazený jedinec špatně plave a vyhledává mělké vody. Dochází k rozpadu konc ploutví, na pokofce se objevují léze (obrázek 6). Také nastávají změny zbarvení na flábrách, kdy dochází ke ztrátě jejich funkce (Miyazaki et al., 2008).



Obrázek 4: Klinické projevy onemocnění vyvolaného CyHV-3. Změna zbarvení fláber, kdy dochází ke ztrátě jejich funkce u umírajícího jedince infikovaného CyHV-3. Šipka ukazuje, kde nedošlo k poškození. (Převzato a upraveno z Benjamin Michel et al., 2010)



Obrázek 5: Klinické projevy onemocnění vyvolaného CyHV-3 Krvácení podle základu ploutve u umírajícího kapra infikovaného CyHV-3 z Chadakoin river ve stát New York. (P evzato z Grimmett et al, 2006).



Obrázek 6: Klinické projevy onemocnění vyvolaného CyHV-3 Rozpad ploutví a výskyt lézí u jedince infikovaného CyHV-3. (P evzato a upraveno z. (Benjamin Michel et al., 2010)

Na usmrcených nakafleňých jedincích pozorovali v dci zv t-enou slezinu, ledviny, ohniskovou nekrózu jater, srde ních bun k a ucpávání malých kapilár v mozku (Miyazaki et al, 2008). Nejvíce virové DNA je mořno pozorovat práv v t chto tkáních. Virovou DNA je mořno detekovat i v krvi. V zasafleňých tkáních dochází ke ztrát osmoregulace, což p ispívá k zvý-ené mortalit b hem akutní fáze (Gilad et al., 2004). Po roz-í ení infekce do fláber dochází k jejich otoku, jaderné degeneraci a cytoplazmatické vakuolizaci. Nakafleňý jedinec za íná h e dýchat, díky nadm rné sekreci hlenu. Je mořné pozorovat, jak se zdrřluje u hladiny, kde lapá po vzduchu (Sunarto et al., 2014).

Znakem pozorovatelným pouhým okem je změna zbarvení na flábrách, které ukazuje, že došlo k nekróze. Dále na kůži jsou viditelné léze na kůži. Nemocná ryba má nepředvídatelné plavání a pár okamžiků před úmrtím leží bokem při hladině. Erosivní léze na pokožce, které jsou způsobeny nekrotizací epidermálních buněk (Miyazaki et al., 2008), jsou zdrojem dalšího šíření viru ve vodním prostředí. Jeden z důvodů tak vysoké mortality tohoto onemocnění je fakt, že nakazený jedinec se stává od počátku náchylný k houbovým, bakteriálním a parazitárním infekcím, které přibíhají a zvyšují míru mortality. Smrt nakazeného jedince nastává díky poruše dýchacího ústrojí a celkovému poškození vnitřních orgánů. U přecházejících jedinců lze virovou DNA detekovat ještě 64 dní od vypuknutí nákazy (Gilad et al., 2004).

2.1.1.6 Léčba a prevence

V současné době neexistuje žádná efektivní léčba tohoto onemocnění. Jediná možnost je mu předcházet. Aby nedošlo k introdukci viru do daného prostředí, jsou zapotřebí příslušná opatření, kontroly a karanténa nově přivezených jedinců (Grimmett et al., 2006).

Jestli se virus v dané lokalitě nachází, existuje několik možností. Pokud se jedná o uzavřený chov bez přístupu volně plávajících ryb, možností je vypuštění nádrží a její dezinfekce s následnou karanténou, předoperačním použitím (Michel et al., 2010). Pokud se jedná o chov, kde dochází ke kontaktu chovaných jedinců s volně plávající populací, která byla ufl vystavena viru, tak jediná možnost je imunizovat chované jedince v daném místě. Bohužel zatím neexistuje plně používaná metoda vedoucí k tomuto cíli, ale v laboratorních podmínkách se povedlo najít způsob, jak k tomuto cíli dojít. Jedince vystavíme viru a po 2 dnech zvýšíme teplotu na 30°C (kdy přestává fungovat virová polymeráza) (Gilad et al., 2003). Bohužel tato metoda je velmi náročná a v praxi zatím obtížně uskutečnitelná (takovéto zvýšení teploty je silný stresový faktor). Navíc v komerčních chovech je to velmi obtížně uskutečnitelné. Vývoj vakcíny probíhá, ale ta je stále ve fázi testování (Sunarto et al., 2014).

Virus se v laboratorních podmínkách kultivuje na buněčné kultuře pocházející z ocasní ploutve koi kapra (KF-1) a mozku kapra obecného (Gotesman et al., 2014). Virus se kultivuje velmi obtížně, což je patrné způsobem relativně nízké virion (Sunarto et al., 2011). Další

vlastností zt flující jeho identifikaci a izolaci je skute nost, že aby se ho poda ilo zachytit, musel infikovaný jedinec uhynout nedávno. Pokud byl jedinec mrtvý delší asový rámeček, neda í se virus izolovat. Další skute ností je, že ze zmrazených vzork tkání, se též virus velmi obtížně izoluje.

Jednou z nejasností je p eřívání viru v teplých a chladných sezónách. P edpokládá se, že virus m že klesat ke dnu se sedimentem a zde p etrvávat (Dishon et al, 2007). Pro p eřívání v chladných periodách se usuzuje, že virus se nachází v nakaflených jedincích v latentním stavu (Dishon et al., 2007).

2.1.1.7 Rozšíení viru

Onemocn ní kapr virem CyHV-3 v t-ínu sv ta p ekvapilo rychlostí, jakou se ší ilo, což bylo způsobeno tím, že v první fázi zasažení jedinci neprojevují žádné příznaky. Rychlé šíení rybích patogen , byla způsobena také absencí veterinárních kontrol a karantén (Gilad et al., 2003), což spolu s mezinárodním a regionálním obchodem s živými kapry umožnilo neúměrně rychlé rozšíení patogenu do míst, kam by se jinak virus nemohl šíit. Další skute nost, která pomohla rozšíení viru na nová stanovišt je vzr stající obliba koi kapr u amatérských chovatel , p í emfl ani tyto ryby nepodléhaly přísným veterinárním kontrolám a jejich st hování mezi chovateli taktéž nebylo monitorováno (Gilad et al., 2003). Jako příklad lze uvést rozšíení viru do USA, kam byl zavle en p í p ehlídce KOI kapr nakaflenou rybou z Izraele. V reakci na tyto faktory došlo k přísné veterinárních kontrol a zavedení karantén p í obchodu s živými rybami. To vedlo k snížení rychlosti, se kterou se tento patogen ší il na nová stanovišt (Sunarto et al, 2005).

Virus se během 16 let od svého objevení dokázal šíit do 28 zemí Evropy, Asie Afriky a Ameriky, do všech zemí, kde se hojně chová kapr obecný (Sunarto et al., 2014). V Austrálii je to nedošlo k rozšíení, a koliv by to mohlo ulevit tamním vodním ekosystém m, kde je kapr invazivní druh a ni í p vodní floru a faunu v místních ekách. V současné době se uvažuje o umělé introdukci viru do tamních ekosystém (Conroy, 2007), což by mohlo vést k eradikaci kapr z volné přírody i k radikálnímu snížení jejich populace. Stále probíhá výzkum, jaký by mohl virus vliv na zdejší populaci ryb a zda by nemohl infikovat i jiné ryby než invazivní kapry.

Do volné přírody se virový patogen rozšířil například v Indonésii díky klecovým chovům na jezerech, kde došlo ke kontaktu divoké populace s populací chovanou. Další šíření je zprostředkováno volnými viriony, které mohou přetrvávat ve vodním prostředí.

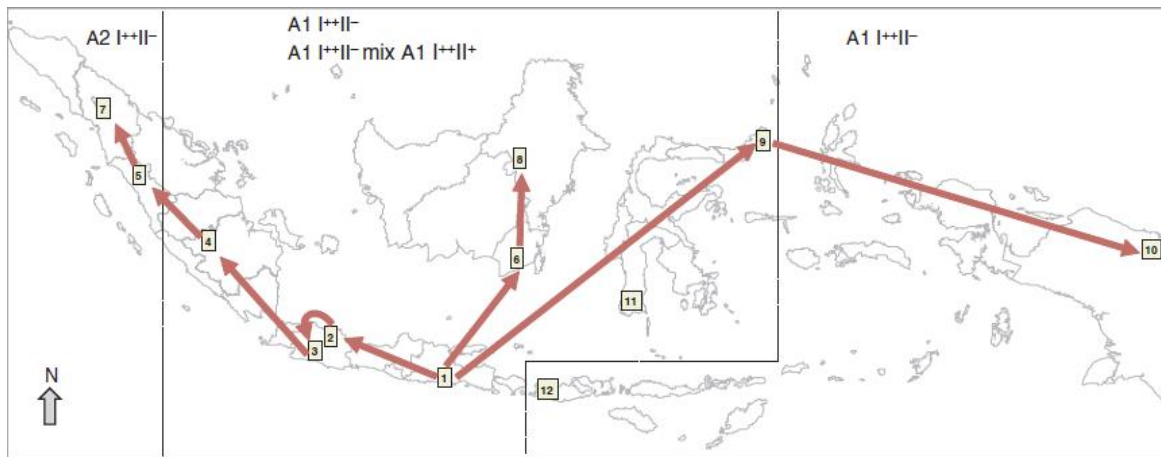
Dle srovnání virů z jednotlivých kontinentů bylo zjištěno, že ve velkém počtu případů jsou identické například virus izolovaný v Japonsku a Kalifornii. V oblasti státu New York je virus shodný s virem pocházejícím z Izraele, jednoho z prvních míst výskytu. Od jeho objevení nicméně došlo k několika mutacím a můžeme pozorovat několik kmenů, které mají nepatrné odlišnosti. V Asii se vyskytují tyto kmeny dva a v Evropě můžeme pozorovat sedm kmenů (Sunarto et al., 2011). Vyšší výskyt kmenů v Evropě je způsoben delším přenosem viru na tomto území.

2.1.1.7.1 Šíření onemocnění v Indonésii

V Indonésii proběhla introdukce CyHV-3 v roce 2002 z Hongkongu. (Sunarto et al., 2005). Věc poprvé byl potvrzen výskyt ve východní Jávě u města Blitar. Následně došlo na několika farmách v blízkém okolí města k úniku viru do volné přírody a jeho následnému šíření po ostrově. Zde vznikla 4 ohniska, ze kterých se virus následně rozšířil do celého ostrova (Sunarto et al., 2011). Další šíření nemoci například země způsobil obchod s koi kapry a absence kontrol, kdy se díky tomuto faktoru onemocnění rozšířilo až do hlavního města provincie, odkud se onemocnění díky obchodu rozšířilo na další ostrov. Během následujících 4 let se virus rozšířil po celé Indonésii. V Indonésii byla mortalita infikovaných ryb 95%. To mělo katastrofální vliv na tamní průmysl a významný sociální dopad pro chovatele ryb (Sunarto et al., 2011). O několik let později byla zjištěna v Indonésii přítomnost dvou kmenů viru. Před vodní se myslelo, že došlo k introdukci dvakrát nezávisle na sobě, ale později bylo zjištěno, že k zavlečení viru došlo jenom jednou a následovala mutace genomu. Kmen A2 se odlišuje od A1 jedno nukleotidovou inzercí (Sunarto et al., 2011). (obrázek 7)

Nejtíživější podíl na šíření viru v Indonésii měla absence kontrol a pak i zmiňovaný klecový odchov kaprů na místních jezerech a tocích, kdy mohli jedinci z komerčního chovu přistup k divoce plávající populaci a virus mohl mezi nimi kolovat a pak se následně šířit po celém ekosystému (Sunarto et al., 2005). Díky těmto faktorům došlo ke ztrátám v hodnotě 15 milionů dolarů jen během prvního roku výskytu viru (Sunarto et al., 2005). Následně přišla

na adu opat ení, v podob kontrol a nucených karantén a do-lo k snížení rychlosti, s kterou se virus ší il. Bohužel z ekosystému nejde virus eradikovat a tak v p ípad výskytu stresových faktor , jako jsou nap . silné de-t a výkyvy teplot dochází k op tovnému vypuknutí onemocnění (Sunarto et al., 2005).



Obrázek 7: Mapa ší ení CyHV-3 v Indonésii ísla ukazují významná vzplanutí infekce a šípkou cestu, kterou do-lo k ší ení infekce CyHV-3 na základ epidemiologických nález . (P evzato z Sunarto et al., 2010)

2.1.1.8 Detek ní metody

P í výskytu onemocnění vyvstal problém, jak nejefektivn ji prokázat výskyt viru. V sou asné době se vyuffívá n kolik diagnostických metod slouffících k detekci. Jedna z nich vyuffívá reakci nespecifických protilátek pomocí imnoflorescence. Dal-í hojn vyuffívanou metodou je PCR a *in situ* hybridizace. (Wang et al., 2015). První metoda k rozpoznání viru bylo jeho pomnožení v KF-1 bun né linii, kde se projevoval cytopatologický efekt, který je pozorovatelný 2 aíl 3 dny po nao kování. Bohužel tato metoda dokázala jenom ov ít, fle práv probíhající infekce je zp sobena CyHV-3 (Gilad et al., 2002). Následn byla vyvinutá metoda PCR, jeffl je založená na amplifikaci ORF, který kóduje protein s významnou podobností s thymidin kináze (TK) (Bercovier et al., 2005). Touto metodou se dá prokázat p ítomnost viru ufl po 7 hodinách po infekci hostitele a k detekci sta í pouze 10 fg DNA, cofl odpovídá p íblifn 30 virion m (Bercovier et al., 2005). U tohoto genu se uvafluje, fle byl

získán právě horizontálním genovým transferem. Prokázat přítomnost viru ze zmrazených tkání je téměř nemožné. V současné době se používají několik detekčních metod PCR, ELISA a elektronová mikroskopie a nejvíce rozšířené jsou právě PCR a pozorování plak na buněčných kulturách (Soliman & El-Matbouli, 2005).

2.1.1.9 Vliv teploty na replikaci viru

Zajímavostí je vliv teploty na replikaci viru. Při teplotách 30°C a výše dochází k zastavení replikace viru. Během 24 hodin dochází k degradaci proteinů podílejících se na replikaci virové DNA. Kritická je teplota 28°C, kdy dochází ještě k replikaci. Po jejím překročení se replikace zastavuje (Gilad et al., 2003). Na buněčných kulturách nejsou za vyšší teploty viditelné žádné patologické změny a ani pomocí PCR nebyly detekovány virové DNA ani proteiny. U infikované buněčné kultury při zvýšení teploty nad 30°C pozorujeme okamžité zastavení replikace virové DNA, postupné ukončení transkripce RNA a translace virových proteinů (Dishon et al., 2007). Transkripty, ale v nakaflené buňce můžeme pozorovat až po dobu 17 dní od zvýšení teploty. Toto dává výhodu imunitnímu systému, kdy nedochází k replikaci, ale tvorba antigenů stále pokračuje, což spouští specifickou imunitní odpověď (Dishon et al., 2007). Dochází k tvorbě protilátek a imunizaci

Při nízké teplotě dochází k útlumu aktivity nescifických cytotoxických buněk, což vede ke snížení produkce protilátek.

Pokud uflou buňky vykazují projevy virové infekce, tak po zvýšení teploty a navrácení zpět do permissivní teploty se po 7 dnech znovu opět projevovat příznaky infekce a po 10 dnech můžeme pozorovat vznik plaků (Dishon et al., 2007). Rozdílná situace nastává, když je infikována buněčná kultura a po dvou dnech zvednuta teplota na 30°C a následně po několika dnech opět kultura přesunuta do permissivní teploty (Dishon et al., 2007). U této kultury dojde k imunizaci. Toto bylo pozorováno i u ryb, u kterých po vystavení viru došlo k zvednutí teploty v nádrži na 30°C. Nedošlo k rozvoji onemocnění a takéšlo došlo k imunizaci nakaflených jedinců (Dishon et al., 2007).

Pokud jedinci byli drženi při teplotě 13°C v kratším časovém úseku a následně byla teplota zvednuta na 23°C, došlo k úmrtím, ale pokud se teplota zvedla na 23°C po delším časovém

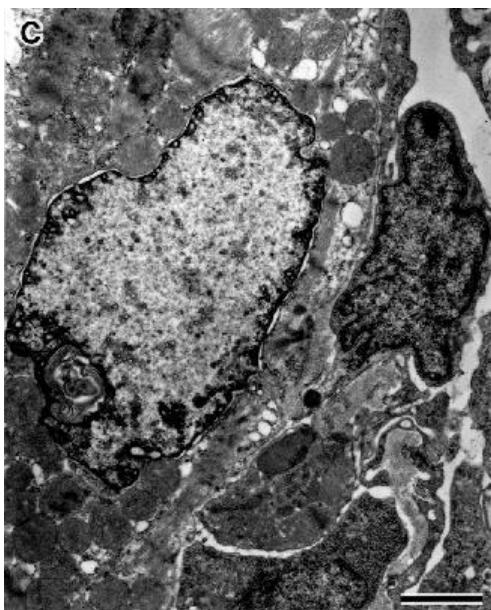
prodlev cca 64 dní, nedošlo k žádnému úmrtí ani projevu onemocnění (Gilad et al., 2003). Dle toho se usuzuje, že v nízké teplotě virus přechází do latentní fáze a slouží jako přirozený rezervoár. Onemocnění se znovu může projevit vlivem stresu, ke kterému nejčastěji dochází na jaře a v létě, kdy dochází ke změnám teploty vody i během dne (Takahara et al., 2014). Tyto teplotní výkyvy na ryby působí jako stresový faktor, který je oslabuje a pokud je nakažený virem v latentní fázi virus se může opět aktivovat. Dalším faktorem, který je jeden ze spouštěčů infekce, jsou výkyvy teplot během dne, které jsou časté v malých nádržích a ryby stresují, což oslabuje jejich imunitní systém a infikované ryby pak vykazují v této míře mortality, než ve velkých nádržích, kde je stabilní teplota (Takahara et al., 2014).

Další studie ukázala, že pokud byly ryby vystaveny viru při teplotě 22 °C, onemocnění bylo velmi rychlé a přibýhalo jen velmi málo jedinců. Pokud byl předán k takto infikovaným rybám vzorek neinfikované a neimunizované rybí populace, nevyskytlo se u ní onemocnění (Sunarto et al., 2014). Naopak pokud byly ryby vystaveny viru při teplotě 22°C a pak teplota snížena na 11°C, po dobu 23 dní byla úmrtnost jenom 10%. Když byl následně k této jedinci předán vzorek naivní populace a teplota zvýšena na 22°C došlo u naivní populace k mortalitě 75%. P vodní populace měla mortalitu cca 50%.

2.1.1.10 Histopatologické změny

Jedny z nejvýznamnějších změn po infekci virem CyHV-3 se vyskytují na žlábrách, které slouží jako hlavní dýchací orgán, na kterém můžeme pozorovat patologický efekt už 2. den od infekce této tkáně. Dochází k degeneraci buněk, u buněk jader dochází k hyperchromatóze způsobené sesazením heterochromatinu z vnitřní jaderné membrány (Miyazaki et al., 2008). Těžištěm dochází k hyperplasmii žláberního epitelu a formování sekundárních lamel. Zároveň dochází k překrvení centrální žilní dutiny v žlábrách a ucpávání krevních cév v žláberním oblouku (Sunarto et al., 2011).

V buňkách srdeční svaloviny, infikované virem, dochází k fragmentaci nebo srážení svazků myofibril a deformaci interkalárních disků (Miyazaki et al., 2008). Také dochází k degeneraci mitochondrií a byla pozorována jaderná deformace (obrázek 8). Při infekci se objevují rovněž infikované lymfocyty, makrofágy i granulocyty (Miyazaki et al., 2008).



Obrázek 8: Deformace buněného jádra u buňky myokardu jedince nakaženého CyHV-3. (Převzato z Miwa et al., 2007)

Jedno z nejvíce postižených orgánů lze pozorovat také u ledvin, kde jsou nejvíce zasažené hematopoetické buňky u kterých dochází k nekróze a snížení jejich funkce (Miyazaki et al., 2008). Nákaza se zde začíná projevovat 3 až 5 den po vystavení viru.

U sleziny dochází k nekróze buněk a může sledovat krvácení a její zduření (Miyazaki et al., 2008).

V mozku dochází k ucpání malých kapilár (Miyazaki et al., 2008), což vede k poruchám centrální nervové soustavy, které se projevují různými defekty plavání, plavání ve spirálách i kruhu. K poškození neuronů přítomností viru nedochází. K poškození centrální nervové soustavy dochází až v poslední fázi onemocnění (Miyazaki et al., 2008).

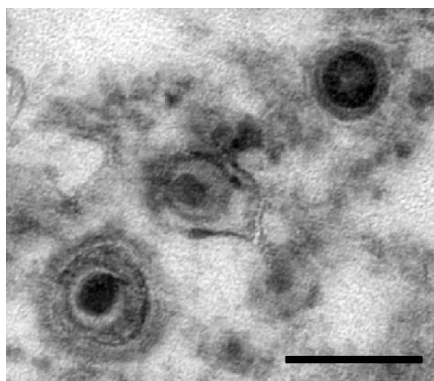
2.1.2 Cyprinid herpesvirus 2

Cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) vyvolává onemocnění karasidního (*Carassius auratus*), známého též jako zlatá rybka, který se vykytuje v mnoha vyhledávaných variantách. Mortalita u toho onemocnění dosahuje až 100% zejména u mladých jedinců.

Virus je též známý pod označením goldfish haematopoietic necrosis virus (GFHNV) (Gilad et al., 2004) nebo herpesviral haematopoietic necrosis virus (HVHNV) (Goodwin et al., 2006).

Onemocnění způsobené tímto virem se poprvé objevilo na podzim roku 1992 a na jaře roku 1993 v Japonsku u mladých karas (*carassius auratus auratus L.*) (J. Xu et al., 2013). Tehdy byl virus prvně izolován. O tomto viru i o onemocnění, které způsobuje, je doposud málo informací, ale chování viru naznačuje, že ho bude velmi těžké eradikovat (Goodwin et al., 2006). Infekce CyHV-2, se projevuje jen v určitém rozmezí teplot 15 až 28 °C (J. Xu et al., 2013). Onemocnění velmi často doprovázejí sekundární infekce, které zvyšují míru mortality a urychlují průběh onemocnění (J. Xu et al., 2013). První úmrtí se vyskytuje ufi 4 dny od experimentální infekce virem. První klinické příznaky je možno pozorovat 24 hodin po infekci, kdy nakazení jedinci ztrácejí chuť k potravě, jeví se unavení a začínají se přesouvat do mělké vody (L. Xu et al., 2014). K úmrtí jedinců dochází 1 až 2 dny od objevení klinických příznaků (L. Xu et al., 2014). Virus vykazuje velké homologie s CyHV-1 a CyHV-3, ale odlišuje se spektrem hostitelů, antigenními vlastnostmi a dynamikou replikace.

Velikost virionu se pohybuje v rozmezí 170 až 200 nm a kapsidy 110 až 120 nm (J. Xu et al., 2013).



Obrázek 10: Zralé částice viru CyHV-2 v cytoplasmu. (Převzato z J. Xu et al., 2013).

Doposud nebylo zjištěno, zda některé blízké příbuzné druhy ryb mohou být přenašeči viru, což je aktuálně předmětem výzkumu (Ito & Maeno, 2014).

Pro detekci viru, jako potvrzení probíhajícího onemocnění, se využívá vyvinutá PCR. Též se hledá vhodná buněčná kultura pro dlouhodobou kultivaci viru (J. Xu et al., 2013). V používání buněčných kulturách (převážně KF-1) po 5 pasážích dochází k ztrátě infekčnosti.

2.1.2.1 Projevy onemocnění

Infekce CyHV-2 se projevuje letargií, na pokofce se objevují bílé skvrny p ipomínající puchý e, etná krvácení v podkoffí (obrázek 9), flábry b hem n kolika hodin ztrácí barvu z ervené na bílou, oteklé b icho (obrázek 9), nechutenství, v n kterých p ípadech je moflné pozorovat i vyboulené o i a nakonec daný jedinec zahyne. P ed úmrtím nej ast ji vyhledávají infikované ryby m lké vody, kde se zdrflují p i hladin , lapají po dechu a jsou p idu-ené. U itního otvoru se m fle objevovat otok (J. Xu et al., 2013).



Obrázek 9: Projevy onemocnění virem CyHV-2 Otok b icha a povrchové krvácení u nakafleného jedince nakafleného CyHV-2. (P evzato z J. Xu et al., 2013).

Na mrtvých karasích lze pozorovat nekrózu fláber spolu s po-kozením jater, ledvin, nekrózou krvetvorné tkán , která zp sobuje anémii a krvácení vnit ních orgán (Goodwin et at., 2006). K nejrozsáhle-ímu po-kození dochází práv u ledvin. U ledvin a sleziny bylo p i pitv pozorováno jejich zdu ení. P ítomnost viru byla prokázána v gonádách, slezin a mozku (Goodwin et at., 2006).

2.1.2.2 Roz-í ení

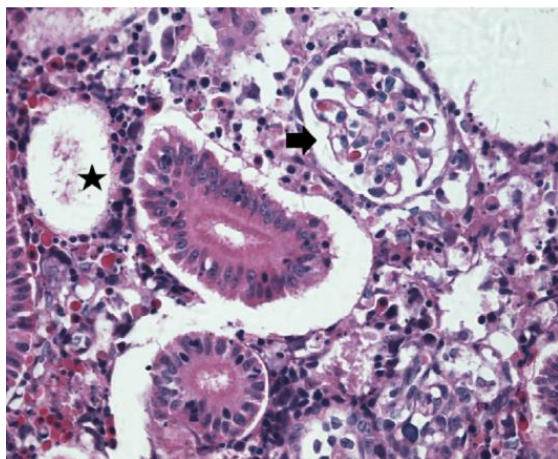
Výskyt onemocnění byl hlá-en v Japonsku, Austrálii, Taiwanu, Ma arsku, USA, Velké Británii, Novém Zélandu a n kolika zemí st ední Evropy a nejnov j-í výskyt byl pozorován v ín u karasa (*carassius auratus gibelio*). V severní provincii Jiangsu, ve východní ín , mortalita infikovaných ryb dosahovala 90% (Ding et al., 2014). V provincii Jiangsu je tato ryba hojn chována. Virus se velmi rychle roz-í il po celé provincii a zasáhl i sousední iang-su, a zp sobil velké ekonomické ztráty (Ding et al., 2014).

V roce 2011 byl pozorován výskyt tohoto virového onemocnění i na území České republiky v rybníku na středním toku řeky Labe, kde došlo k infekci karase (*Carassius gibelio*). Následně se onemocnění rozšířilo i do Itálie, kde způsobilo úmrtnost divoké populace této ryby (Daněk et al., 2012).

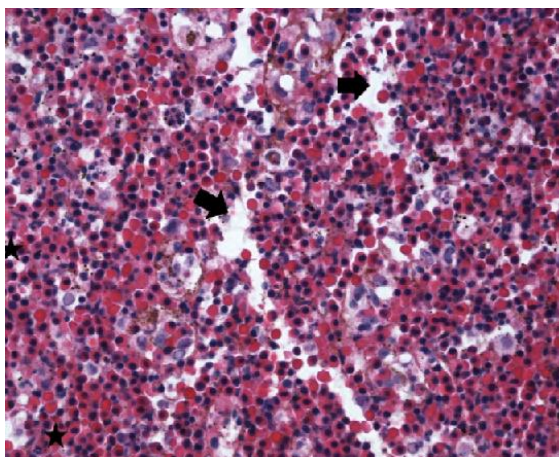
K rozšíření onemocnění do oblastí výskytu došlo stejně jako u CyHV-3 díky absenci veterinárních kontrol a karantén při transportu ryb, kdy v rámci země se onemocnění šířilo mezi rybami chovatelů (Jeffery et al., 2007).

2.1.2.3 Histopatologické změny

U ledvin infikovaných ryb byly pozorovány dilatace kapilár glomerulu (obrázek 11), rozvoj nekrotických lézí, vakuolizace buněk (Ding et al., 2014). Dochází k závažnému poškození hematopoetických buněk (obrázek 12), což vede k snížení i ztrátě funkce ledvin. Poškození hematopoetických buněk se projevuje rozvojem anémie. Také byla pozorována degenerace ledvin. Jedná se o orgán, který je zasáhl nejvíce a s největším postihem, proto jsou ledviny uhynulých jedinců vhodným orgánem pro včasnou diagnostiku onemocnění (Ding et al., 2014).

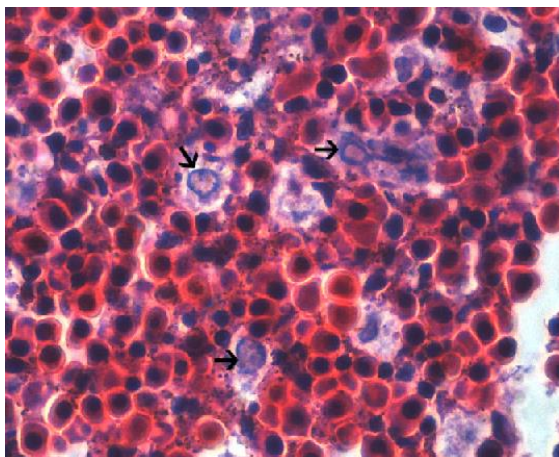


Obrázek 11: Histologie ledviny karase infikovaného CyHV-2 Nekrotické léze a dilatace kapilár glomerulu (ukazuje šipka) (Převzato z Ding et al., 2014) barveno hematoxylin a eosin



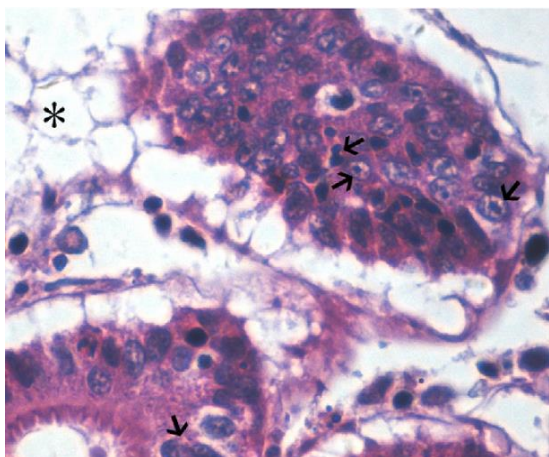
Obrázek 12: Histologie hemocytů a lymfatických buněk infikovaných CyHV-2. Hvězda označuje lymfatické buňky a šipky ukazují endoplazmatické vakuolizace. (Převzato z Ding et al., 2014) barveno hematoxylin a eosin

Přítomnost nekrotických lézí může být pozorovatelná i ve slezině, kde dochází k vakuolizaci buněk (Ding et al., 2014). Rozsah poškození sleziny není tak fatální jako v zasažených ledvinách a flábrách (obrázek 13).



Obrázek 13: Splenocyty infikované CyHV-2 vykazující nevratné poškození chromatinu (Modře obarvená DNA poškození ukazují šipky) (Převzato z Ding et al., 2014) barveno hematoxylin a eosin

U jater dochází k ztvrdnutí jader hepatocytů, závažné vakuolizaci buněk (obrázek 14) a dochází k zánětlivému procesu, který je způsoben ztvrdnutím a fúzí buněk (Ding et al., 2014).



Obrázek 14: Infikovaná játra: Hvězdičky ukazují vakuolizaci buněk. Šipky ukazují poškození jader hepatocytů, kde dochází k nevratnému poškození chromatinu (Převzato z Ding et al., 2014) barveno hematoxylin a eosin

U fláber dochází k fzi sekundárních lamel a projevuje se zde nekróza s odlupováním epiteliálních bun k (Ding et al., 2014). To vede k snížení funkce fláber a je možné pozorovat na hladině lapání infikovaných ryb po dechu. Byla vyslovena hypotéza, že tento orgán je místem pro niku viru do hostitele, odkud se krevním e i-t m-í í do dal-ích orgán a m že se tímto zp sobem op t vracet do vodního prostředí (Ding et al., 2014). Jedná se o zp sob rychlého a efektivního -í ení viru. V pr b hu onemocnění dochází v n kterých místech k ztmavnutí fláber, což je zp sobeno jejich p ekrvením, zatímco ostatní ásti jsou bledé z d vodu nedostatku krevního zásobení.

U trávicího traktu existují d kazy o odumírání *lamina propria* a slizni ní vrstvy st eva (Jeffery et al., 2007)

Velký počet zasažených bun k u postižených orgán v poslední fázi onemocnění zp sobuje jejich selhání, která jsou neslu itelná se flivotem.

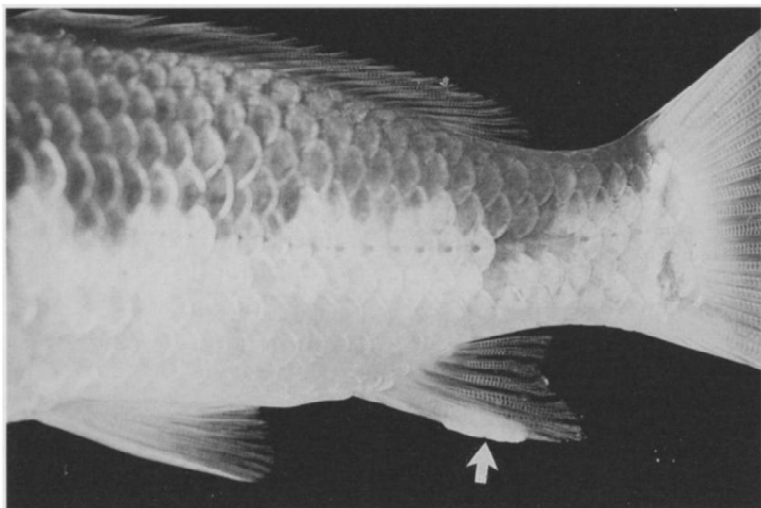
2.1.3 Cyprinid herpesvirus 1

Onemocnění zp sobené virem Cyprinid herpesvirus 1 (CyHV-1) bylo poprvé popsáno v roce 1966 (Gilad et al., 2002), ale k první izolaci viru do-lo v roce 1981. Jedná se o virus, který podobn jako CyHV-3 napadá kapra obecného a koi kapra. U obou zn m ných druh zp sobuje papilární výr stky nebo léze na pokožce (Gilad et al., 2002). O podobném projevu jsou známé záznamy ufl ze st edov ku (Papillomas et al., 2015). U dvou týdn starých jedinc m žeme pozorovat 80% mortalitu, u ty týdn starých jedinc dochází k poklesu na 20% a u kapr star-ích nefl osm týdn nebyla fládná mortalita pozorována. U dosp lých jedinc dochází k úmrtí jen výjime n . P efliv-í jedinci jsou pravd podobn zdrojem nákazy u následujících generací. Tento virus vykazuje podobnosti s dal-ími herpetickými viry napadajícími kapry.

D íve byl virus znám pod názvem CHV (cyprinid herpesvirus) , ale pozd ji po objevení dal-ích rybích vir do-lo ke zm n ozna ení na CyHV-1 (Cyprinid herpesvirus 1). Virus je také popsán pod star-ím názvem carp poxvirus (Papillomas et al., 2015)

Onemocnění se projevuje m kkými, r flivými výr stky p ipomínajícími bradavice (obrázek 15). Nej ast ji se vyskytují na ploutvích a v oblasti hlavy.

Nemoc propuká v chladných obdobích a její léčba spoívá v postupném zvyšování teploty, kdy dochází k postupné ztrátě výrstků, po nichž mohou zůstat nápadné jizvy. U propuknutí ve volné pěstování projevy onemocnění mizí s nástupem jara.



Obrázek 15: Výrstek na ploutvi koi kapra (ukazuje šipka) infikovaného CyHV-1. (Převzato a upraveno z Papillomas et al., 2015a)

2.1.4 Anguillid herpesvirus 1

Anguillid herpesvirus 1 (AngHV-1) může nalézt pod názvem Eel herpesvirus (úhoí herpesvirus) a vyskytuje se i pod staršími názvy úhoí herpesvirus ve městě Formosa (Eel herpesvirus in Formosa), evropský úhoí herpesvirus (European eel herpesvirus) a úhoí herpesvirus fláber (Gill herpesvirus of eel) (Van Beurden et al., 2010). Způsobuje závažné onemocnění úhoí, které má za následek ztrátu jak v divoké populaci, tak i v chovech. Mortalita se pohybuje v rozmezí 1% až 7%. Onemocnění mohou doprovázet sekundární infekce. (citace) Postihuje Evropského úhoí eí ního (*Anguilla anguilla*) a Japonského úhoí e (*Anguilla japonica*) (Haenen et al., 2002). Za jeden z nejpravděpodobnějších faktorů způsobujících propuknutí onemocnění po infekci virem je považován stres vyvolaný špatnou kvalitou vody nebo manipulací pěstování ryb. Stejně jako u nemocí vyvolaných ostatními zástupci eledi *Alloherpesviridae* se jedná o teplotně senzitivní onemocnění, které propuká v rozmezí teplot 23 až 26°C. První projevy onemocnění může sledovat 3 dny po infekci (Hangalapura et al, 2007).

K první izolaci viru došlo v roce 1985 z nákazy, která se objevila v Evropě a Japonsku. Záhy bylo zjištěno, že se jedná o identický patogen. Předpokládá se, že toto onemocnění je

jedním z důvodů úpadku divoké populace úhoře (Van Beurden et al., 2011). Následně došlo k rozšíření viru do Francie, Nizozemí a dalších zemí Evropy.

Zpočátku se onemocnění rychle šířilo na nové farmy, což bylo zapříčineno doplněním jedinců z divokých populací (Haenen et al., 2002).



Obrázek 16: Úhoř infikovaný AngHV-1 projevující klinické příznaky, hemoragii na spodní elisti, břišní ploutvi a žabrách (ventrální pohled). (Převzato z Hangalapura et al., 2007)

Projevy onemocnění se v rámci různých míst výskytu odlišovaly (Haenen et al., 2002), ale mezi nejčastější patří apatie, krvácení v oblasti hlavy, ploutví, žábry (Van Beurden et al., 2010) (obrázek 16) a vnitřní krvácení z jater. Žábry ztrácejí barvu a byla pozorována nadměrná produkce hlenu jak na nich, tak i na povrchu těla. Může též objevit i nekróza žábry a vzácně i pokofky. Na pokofce můžeme pozorovat skvrny a malé vředy (Haenen et al., 2002). U infikovaných buněk byla pozorována i tvorba syncytií. Na žábřích byly pozorovány stopy nekrózy a krvácení svalů (Hangalapura et al., 2007). Mírná nekróza se vyskytla také na některých vnitřních orgánech, jako jsou játra a slezina.

Léčba neexistuje, ale pro snížení míry mortality se doporučuje pokles teploty v infikovaných nádržích (Haenen et al., 2002).

2.2 Rod Ictalurivirus

2.2.1 Ictalurid herpesvirus 1

Ictalurid herpesvirus 1 (IcHV-1) je také znám pod názvem channel catfish virus (CCV) (Plant et al., 2005). Napadá sume ky te kované (*Ictalurus punctatus*). U p eřívajících infikovaných jedinc lze pozorovat rozvoj latentní infekce. Od vir zmín ných v minulých kapitolách je tento virus odli-ný v tom, že p es vysokou hustotu populace sume k dochází po infekci jen málokdy k rozvoji vlastního onemocn ní. To se vyskytuje u mladých jedinc do stá í 1 roku za teplých období (Goodwin et al., 2006). Míra jejich mortality m že dosahovat až 100%. Nej ast j-ím spou-t em propuknutí nákazy je op t stres. Velikost virionu IcHV-1 se pohybuje v rozmezí 175 až 200 nm (Wolf & Darlington, 1971) s kapsidou o pr m ru 100 nm. Genom stvo ený dvouvláknovou DNA je dlouhý 134 kb (Plant et al., 2005).

Oblast jeho výskytu je severní Amerika, kde se vyskytuje tém ve v-ech komer ních chovech. Onemocn ní propuká, když je teplota vody v rozmezí 28 až 30°C, díky tomuto limitujícímu faktoru je jeho výskyt omezen jen na jifní státy USA. Lé ba snížením ve snížení teploty je v komer ních chovech velmi t flko uskute nitelná. Po snížení teploty dochází k poklesu mortality (Wolf & Darlington, 1971)

Hlavní projevy onemocn ní jsou nafouklé b icho, které je napln né tekutinou a t flké hemoragie. M že pozorovat chaotické plavání doprovázené letargií. Úmrtí nastává nej ast ji 3 až 10 den po infekci (Stingley & Gray, 2000). Z vnit ních orgán jsou nejvíce postížená játra a ledviny, kde dochází k silnému rozvoji nekrózy. Její rozvoj byl pozorován tém u v-ech vnit ních orgán . U p eřívajících jedinc virus vstupuje do latentní infekce.

Zatím je velmi málo poznatk o molekulárních mechanismech a replika ním cyklu IcHV-1 (Stingley & Gray, 2000).

Jako místo primárního vstupu viru do t la hostitele se uvád jí flábry (Davis et al., 2002). Bylo zji-t no, že replikace m že probíhat í v krvi, která virus zároveň -í í do dal-ích orgán a zp sobuje lytickou destrukci v t-iny tkání (Davis et al., 2002).

2.2.2 Ictalurid herpesvirus 2

Onemocnění po infekci virem Ictalurid herpesvirus 2 (IcHV-2) se poprvé objevilo v severní Itálii v roce 1994 u sumek černých (*Ameiurus melas*), kteří jsou v severní Americe invazivním druhem. Virus je také znám pod starším názvem Ictalurus melas virus (IcmHV) (Hedrick et al, 2003). V Itálii došlo k velmi rychlému rozšíření viru na většinu farem, což způsobilo až 90% ztráty. Onemocnění vzniká u mladých infikovaných jedinců a propuká za nižších teplot na rozdíl od výše popsaného IcHV-1. Velikost virionu se pohybuje kolem 227nm a kapsidy 107nm (Hedrick et al, 2003).

Mezi hlavní projevy onemocnění patří krvácení epidermis v oblasti břicha, fláber, poškození vnitřních orgánů, kdy k nejvážšímu poškození dochází u hematopoetických buněk, ohniskové nekrózy ve slezině a játrech (Hedrick et al., 2003). Průběh onemocnění je rychlý. U ryb experimentálně vystavených IcHV-2 začínalo docházet k úmrtí v průběhu druhého dne po infekci. Během 4 až 5 dnů došlo k úmrtí většiny infikovaných ryb.

Velmi znepokojující je skutečnost, že sumek tečkovaný je pro toto onemocnění velmi citlivý a pokud by došlo k introdukci tohoto viru do severní Ameriky, mohlo by to mít katastrofální dopad na tamní chovy (Hedrick et al., 2003). Rizikovým faktorem je nižší teplota, při které propuká onemocnění po infekci IcHV-2 než u IcHV-1. Tudíž by mohlo dojít k rozšíření viru i do severnějších oblastí, kde se IcHV-1 nevyskytuje. K rozšíření mimo uvedenou oblast výskytu zřejmě dosud nedošlo z důvodu malého obchodu se sumeky (Hedrick et al., 2003).

2.2.3 Acipenserid herpesvirus 1

Acipenserid herpesvirus 1 (AciHV-1) je znám také pod starším názvem white sturgeon herpesvirus-1 (WSHV-1) (Hendrick et al, 1991a). Velikost virionu AciHV-1 se pohybuje v rozmezí 176 až 196 nm (Lapatra et al, 2014).

Onemocnění vyvolané tímto virem se poprvé objevilo u bílých jeseterů chovaných na farmách v Itálii. Nejčastěji postihuje mladé jedince do věku 6 měsíců s mortalitou pohybující se okolo 40%.

Nemoc se projevuje poškozením dýchacího epitelu a pokořky. Bohužel ve většině případů není poškození pokořky rozpoznatelné pouhým okem, ale dochází k závažnému poškození buněk. Pod mikroskopem je pozorovatelná jejich degenerace. Měly docházet i k nekróze.

Onemocnění, které bývá často doprovázeno sekundární bakteriální infekcí, se projevuje letargií, nepřijímáním potravy, nakažený jedinec se zdržuje u dna nádrže. Tyto příznaky se začínají projevovat 6 den od vystavení viru po infekci AciHV-1 (Shchelkunov et al., 2009).

2.2.4 Acipenserid herpesvirus 2

Acipenserid herpesvirus 2 (AciHV-2) známý též pod starším názvem white sturgeon herpesvirus 2 (WSHV-2) (Watson et al., 1995). Tento virus je uspořádáním genů velmi podobný ICHV-1. Na rozdíl od AciHV-1 způsobuje nákazy s vyšší mírou mortality pohybující se okolo 80%. Onemocnění se také vyskytuje u starších jedinců. Projevuje se bílými puchýřky a vředy na pokořce. U starších jedinců se mortalita pohybuje okolo 10%. Epiteliální buňky jsou u infikovaných ryb zbytnělé. Měly docházet k tvorbě syncytií. Klinické příznaky jsou téměř shodné jako u výše zmíněného AciHV-1. Odlišný je dopad na vnitřní orgány. Při infekci AciHV-2 dochází k poškození srdce a jater, zatímco u AciHV-1 mají tyto orgány normální vzhled.

2.3 Rod Salmonivirus

2.3.1 Salmonid herpesvirus 1

Virus Salmonid herpesvirus 1 (SalHV-1) je patogen pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) s velikostí genomu 174,4 kbp (Davison, 1998). Je znám pod několika staršími názvy HV salmonis (HPV) a Steelhead herpesvirus (SHV). V jeho genomu máme nalézt 18 genů, které se shodují s geny IcHV-1 (Davison, 1998). Onemocnění nastává v rozmezí teplot 6 až 9°C u mladých jedinců, kde dosahuje velké míry mortality.

2.3.2 Salmonid herpesvirus 2

Salmonid herpesvirus 2 (SalHV-2) se poprvé objevilo v září 1978 v Japonsku u lososa masu (*Oncorhynchus masou*) a onemocnění tímto virem je spojováno s mortalitou u mladých jedinců dosahující až 80%. Hostitelsky není tak specifický jako výše zmíněné SalHV-1 a může infikovat, pstruhy duhové i lososy kokanee. U pohlávkajících jedinců dochází k rozvoji neoplazie. Je důležité, aby bylo zabráněno rozšíření tohoto viru do Severní Ameriky, kde by mohl mít katastrofální dopad na populaci lososů a pstruhů duhových. Virus je též znám pod názvem *Oncorhynchus masou virus* (OMV).

Onemocnění se projevuje kožními vředy, červenými tečkami na vnitřních orgánech, ztrátou chuti k jídlu, zpomalením reakcí a ztmavnutím těla (Yoshimizu et al., 1995). Nejvíce poškození bylo nalezeno u jater, která jsou skvrnitá, mohou mít perleťové bílé zbarvení, dochází i u nich k rozvoji nekrózy. Dále byla pozorována výrazná světlá barva ledvin. Játra mají bledé zbarvení doprovázené krvácením žilních vláken (Japanese, 2005). Ve stěvkách dochází k separaci epitelového hlenu s vnitřním krvácením (Japanese, 2005), které má za následek odumírání klků. Buňky srdeční svaloviny vykazovaly mírnou vakuolizaci a byla pozorována malá nekrotická ložiska. U více než 60% pohlávkajících jedinců dochází k rozvoji nádoru elisti (Pathology, 1981). K vlastnímu rozvoji nádorů dochází přibližně 120 dní po infekci. U některých jedinců vzniká nádor mimo oblast elisti na ocasní ploutvi nebo oku. Tyto nádory vykazovaly podobné charakteristiky, například nadměrný růst epitelálních buněk (Pathology, 1981). Vzácně může docházet i k rozvoji nádorů vnitřních orgánů, nejčastěji v ledvinách.

2.3.3 Salmonid herpesvirus 3

Salmonid herpesvirus 3 (SalHV-3) je označován též jako Epizootic epitheliotropic dinase virus (EEDV). Poprvé se objevilo v roce 1980 v oblasti velkých jezer v USA (Kurobe et al, 2009) Hlavní hostitelé jsou pstruzi flující ve velkých jezerech. V infikovaných pstruzích byly pozorovány částice partikule o velikosti 150 až 200 nm .

Onemocnění, které tento virus vyvolává, je typické rychlým nástupem, úmrtností a nespecifickými příznaky jako plavání ve spirále a letargie. Bylo pozorováno i krvácení očí a edóbné skvrny na pokožce (Kurobe et al., 2009). Onemocnění doprovází sekundární plísňové infekce, díky kterým dochází až k 100% mortalitě. Výzkum viru je značně omezen neexistencí vhodné buněčné kultury pro jeho pomnožení. Dostupné poznatky byly získány pouze pozorováním infikovaných ryb. U tohoto patogenu lze pozorovat i vertikální přenos infekce. Virovou DNA je možno detekovat i z epidermis ryb nevykazujících žádné příznaky onemocnění (Kurobe et al., 2009).

Kromě výše zmíněných symptomů infekce nebylo pozorováno poškození fláber a vnitřních orgánů nejevila žádná závažná poškození (McAllister & Herman, 1989).

2.4 Nov rozpoznané a neza azené rybí herpesviry

Je známo pibližně 17 herpetických virů, které infikují kostnaté ryby. Některé z nich byly identifikovány, ale stále neprobíhá jejich dostatečná charakterizace, umožňující jejich zařazení v rámci řádu *Alloherpesviridae* (Crockford et al, 2008).

2.4.1 Gadid herpesvirus 1

Jedním z dosud nezařazených virů je virus napadající tresku velkohlavou (*Gadus macrocephalus*). Tento virus byl nazván Gadid herpesvirus 1. Velikost virionu se pohybuje v rozmezí 120 až 200 nm (Marcos-Lopez et al., 2012). Infekce tímto virem se projevuje přítomností kožních lézí, které jsou s největší pravděpodobností způsobeny bakteriální infekcí. Největší poškození zasahuje srdce. Dochází i k poškození ledvin, fláber a pokořky. U fláberů můžeme pozorovat hypertrofii buněk (Marcos-Lopez et al., 2012).

Podle nejnovějších výzkumů naznačují, že tento virus by mohl patřit do rodu *Ictalurivirus* nebo *Salmonivirus*.

2.4.2 Pilchard herpesvirus

Pilchard herpesvirus napadá sardinky a zatím byl pozorován u Pobřeží Austrálie a Nového Zélandu. Poprvé se objevil v roce 1995, kdy jeho objev doprovázela vysoká úmrtnost sardinek po celém pobřeží Austrálie (Crockford et al, 2005).

Onemocnění tímto virem se šířilo pomocí mořských proudů podél pobřeží Austrálie. Velká mortalita, která doprovázela toto onemocnění, měla negativní vliv na místní rybolov. Odhaduje se, že došlo k úmrtí až 70% místní populace. Symptomy infekce virem byly pozorovány jenom u dospělých jedinců (Crockford et al., 2008). Na mrtvých infikovaných exemplářích bylo hlavně pozorováno poškození fláber. Na základě toho se usuzuje, jako hlavní příčinou úmrtí je zadušení.

V roce 1998 došlo k dalšímu propuknutí infekce sardinek, kdy mortalita dosahovala 70%. Předpokládá se, že do ekosystému byl virus zavlečen lodní dopravou (Crockford et al, 2005).

Klinické příznaky onemocnění se začínají patrně projevovat 4 den od kontaktu ryb s virem (Crockford et al., 2008) Na základě modelu šíření viru byla postulována inkubační doba 4 až 12 dní.

Také o tomto viru se soudí, že by mohl patřit do rodu Ictalurivirus nebo Salmonivirus.

3 Závěr

Tato práce by měla být stručným přehledem známých herpetických virů napadajících kosterné ryby a onemocnění, která způsobují.

U některých rybích virových onemocnění byla pozorována vysoká mortalita spolu s jejich globálním rozšířením. Tato skutečnost je důležitá především z důvodu zájmu a poptávky pro vývoj vakcín s jejich detailnějším prozkoumáním. Bohužel jim je věnována větší pozornost, ať když způsobují hospodářské ztráty. Příkladem je CyHV-2, kdy se mu dostalo větší pozornosti, ať po napadení hojně chovaných karasů (*carassius auratus gibelio*) v Číně.

Nejvíce prozkoumaným virem řádu *Alloherpesviridae* je CyHV-3, který díky svému rychlému globálnímu rozšíření spolu s vysokou mortalitou se stal především zájmem několika vědeckých týmů a je u něj největší požadavek na vývoj vakcíny. Díky jeho rychlému šíření došlo k zapsání veterinárních kontrol, které měly za následek zpomalení i zastavení introdukce mnoho rybích virových onemocnění do nových lokalit.

Na závěr nezbyvá neřící, že viry z této řádu mají obrovský potenciál, což se týká dalšího vývoje, ale i tvorby vakcín proti závažnějším patogenům z této řádu. Výzkum těchto virů je teprve v počátcích.

4 Seznam literatury

- Aoki, T., Hirono, I., Kurokawa, K., Fukuda, H., Nahary, R., Eldar, A., í 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. *Journal of Virology*, 81(10), 505865065.
- Bercovier, H., Fishman, Y., Nahary, R., Sinai, S., Zlotkin, A., Eynogor, M., í 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 Microbiology*, 5, 13.
- Conroy, D. (2007). *Mycobacteriosis as a potentially important tilapia disease. Aquaculture Health International*.
- Costes, B., Raj, V. S., Michel, B., Fournier, G., Thirion, M., Gillet, L., í Vanderplasschen, a. (2009). The major portal of entry of koi herpesvirus in *Cyprinus carpio* is the skin. *Journal of Virology*, 83(7), 281962830.
- Crockford, M., Jones, J. B., Crane, M. S. J., & Wilcox, G. E. (2005). Molecular detection of a virus, Pilchard herpesvirus, associated with epizootics in Australasian pilchards *Sardinops sagax neopilchardus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 68(1), 165.
- Crockford, M., Jones, J. B., McColl, K., & Whittington, R. J. (2008). Comparison of three molecular methods for the detection of Pilchard herpesvirus in archived paraffin-embedded tissue and frozen tissue. *Diseases of Aquatic Organisms*, 82(1), 37644.
- Dan k, T., Kalous, L., Veselý, T., Krásová, E., Reschová, S., Rylková, K., í Knytl, M. (2012). Massive mortality of Prussian carp *Carassius gibelio* in the upper Elbe basin associated with herpesviral hematopoietic necrosis (CyHV-2). *Diseases of Aquatic Organisms*, 102(2), 87695.
- Davis, K. B., Griffin, B. R., & Gray, W. L. (2002). Effect of handling stress on susceptibility of channel catfish *Ictalurus punctatus* to *Ichthyophthirius multifiliis* and channel catfish virus infection. *Aquaculture*, 214(1-4), 55666.
- Davison, a J. (1998). The genome of salmonid herpesvirus 1. *Journal of Virology*, 72(3), 197461982.
- Ding, Z., Xia, S., Zhao, Z., Xia, A., Shen, M., Tang, J., í Yuan, S. (2014). Histopathological characterization and fluorescence in situ hybridization of Cyprinid herpesvirus 2 in cultured Prussian carp, *Carassius auratus gibelio* in China. *Journal of Virological Methods*, 206, 76683.
- Dishon, A., Davidovich, M., Ilouze, M., & Kotler, M. (2007). Persistence of cyprinid herpesvirus 3 in infected cultured carp cells. *Journal of Virology*, 81(9), 482864836.

- 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*(2005), 7926793.
- Fournier, G., Boutier, M., Stalin Raj, V., Mast, J., Parmentier, E., Vanderwalle, P., & Vanderplasschen, A. (2012). Feeding *Cyprinus carpio* with infectious materials mediates cyprinid herpesvirus 3 entry through infection of pharyngeal periodontal mucosa. *Veterinary Research*, *43*(1), 6.
- Gilad, O., Yun, S., Adkison, M. a., Way, K., Willits, N. H., Bercovier, H., & Hedrick, R. P. (2003). Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi. *Journal of General Virology*, *84*(10), 266162668.
- Gilad, O., Yun, S., Andree, K. B., Adkison, M. a., Zlotkin, A., Bercovier, H., & Hedrick, R. P. (2002). Initial characteristics of koi herpesvirus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio koi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, *48*(2), 1016108.
- 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. *Diseases of Aquatic Organisms*, *60*(3), 1796187.
- 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. *Diseases of Aquatic Organisms*, *69*(2-3), 1376143.
- Gotesman, M., Soliman, H., Besch, R., & El-Matbouli, M. (2014). In vitro inhibition of Cyprinid herpesvirus-3 replication by RNAi. *Journal of Virological Methods*, *206*, 63666.
- 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. *Journal of Wildlife Diseases*, *42*(3), 6586662
- Haenen, O. L. M., 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. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, *22*(4), 2476257.
- Hangalapura, B. N., Zwart, R., Engelsma, M. Y., & Haenen, O. L. M. (2007). Pathogenesis of Herpesvirus anguillae (HVA) in juvenile European eel *Anguilla anguilla* after infection by bath immersion. *Diseases of Aquatic Organisms*, *78*(1), 13622.
- Hedrick, R. P., Mcdowell, T. S., Gilad, O., Adkison, M., & Bovo, G. (2003). Systemic herpes-like virus in catfish *Ictalurus melas* (Italy) differs from *Ictalurid herpesvirus 1* (North America), *55*, 85692.

- HEDRICK, R. P., MCDOWELL, T. S., GROFF, J. M., YUN, S., & WINGFIELD, W. H. (n.d.). Isolation of an epitheliotropic herpesvirus from white surgeon *Acipenser transmontanus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 11(1), 49656. Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsid=5355380>
- Ito, T., & Maeno, Y. (2014). Susceptibility of Japanese Cyprininae fish species to cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2). *Veterinary Microbiology*, 169(3-4), 1286134.
- Japanese, T. (2005). Histopathological Study on Oncorhynchus masou Virus Disease (OMVD) of Cultured Rainbow Trout in.
- Jeffery, K. R., Bateman, K., Bayley, a., Feist, S. W., Hulland, J., Longshaw, C., & Way, K. (2007). Isolation of a cyprinid herpesvirus 2 from goldfish, *Carassius auratus* (L.), in the UK. *Journal of Fish Diseases*, 30(11), 6496656.
- Kurita, J., Yuasa, K., Ito, T., Sano, M., Hedrick, R. P., Engelsma, M. Y., & Iida, T. (2009). The molecular epidemiology of herpesvirus. *Fish Pathology*, 44(2), 59666. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21963664>
- Kurobe, T., Marcquenski, S., & Hedrick, R. P. (2009). PCR assay for improved diagnostics of epitheliotropic disease virus (EEDV) in lake trout *Salvelinus namaycush*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 84(1), 17624.
- Lapatra, S. E., Groff, J. M., Keith, I., Hogans, W. E., & Groman, D. (2014). Case report: Concurrent herpesviral and presumptive iridoviral infection associated with disease in cultured shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum* (L.), from the Atlantic coast of Canada. *Journal of Fish Diseases*, 37(2), 1416147.
- Marcos-Lopez, M., Waltzek, T. B., Hedrick, R. P., Baxa, D. V., Garber, a. F., Liston, R., & Ferguson, H. W. (2012). Characterization of a novel alloherpesvirus from Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24(1), 65673.
- McAllister, P., & Herman, R. (1989). Epizootic mortality in hatchery-reared lake trout *Salvelinus namaycush* caused by a putative virus possibly of the herpesvirus group . *Diseases of Aquatic Organisms*, 6, 1136119.
- Michel, B., Fournier, G., Lieffrig, F., Costes, B., & Vanderplasschen, A. (2010). Cyprinid herpesvirus 3. *Emerging Infectious Diseases*, 16(12), 183561843.
- Michel, B., Leroy, B., Raj, V. S., Lieffrig, F., Mast, J., Wattiez, R., & Costes, B. (2010). The genome of cyprinid herpesvirus 3 encodes 40 proteins incorporated in mature virions. *Journal of General Virology*, 91, 4526462.
- Miwa, S., Ito, T., & Sano, M. (2007). Morphogenesis of koi herpesvirus observed by electron microscopy. *Journal of Fish Diseases*, 30(12), 7156722.
- 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. *Diseases of Aquatic Organisms*, 80(1), 1611.

Papillomas, H., Carp, K., Calle, P. P., Mcnamara, T., Kress, Y., Journal, S., í Mar, N. (2015). Published by : American Association of Zoo Veterinarians Linked references are available on JSTOR for this article : Your use of the JSTOR archive indicates your acceptance of the Terms & Conditions of Use , available at <http://www.jstor.org/page/HERPESV>, 30(1), 1656169.

Pathology, F. (1981). fry that survived experimental infection with OMV We have previously described that Oncorhynchus masou virus (OMV), a new herpesvirus , which (at 150 days of age) described previously (KIMURA et al ., 1981) were held for further observation . had b, 15, 1496153.

Pikarsky, E., Ronen, A., Abramowitz, J., Hutoran, M., Shapira, Y., Perelberg, A., í Steinitz, M. (2004). Pathogenesis of Acute Viral Disease Induced in Fish by Carp Interstitial Nephritis and Gill Necrosis Virus Pathogenesis of Acute Viral Disease Induced in Fish by Carp Interstitial Nephritis and Gill Necrosis Virus. *Journal of Virology*, 78(17), 954469551.

Plant, K. P., Harbottle, H., & Thune, R. L. (2005). Poly I:C induces an antiviral state against Ictalurid Herpesvirus 1 and Mx1 transcription in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Developmental and Comparative Immunology*, 29(7), 6276635.

Raj, V. S., Fournier, G., Rakus, K., Ronsmans, M., Ouyang, P., Michel, B., í Vanderplasschen, A. (2011). Skin mucus of *Cyprinus carpio* inhibits cyprinid herpesvirus 3 binding to epidermal cells. *Veterinary Research*, 42(1).

Shchelkunov, I. S., Shchelkunova, T. I., Shchelkunov, A. I., Kolbassova, Y. P., Didenko, L. V., & Bykovsky, A. P. (2009). First detection of a viral agent causing disease in farmed sturgeon in Russia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 86(3), 1936203.

Soliman, H., & El-Matbouli, M. (2005). An inexpensive and rapid diagnostic method of Koi Herpesvirus (KHV) infection by loop-mediated isothermal amplification. *Virology Journal*, 2, 83.

Stingley, R. L., & Gray, W. L. (2000). Transcriptional regulation of the channel catfish virus genome direct repeat region. *Journal of General Virology*, 81(8), 200562010.

Sunarto, a, Rukyani, a, & Itami, T. (2005). Indonesian experience on the outbreak of Koi Herpesvirus in Koi and Carp (*Cyprinus carpio*). *Bulletin of Fisheries Research Agency (Japan)*, (2), 15621. Retrieved from <http://search.proquest.com/docview/17448406?accountid=14643> \n http://mlbsfx.sibi.usp.br:3410/sfxlcl41?url_ver=Z39.88-2004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&genre=article&sid=ProQ:ProQ:asfaaquaculture&atitle=Indonesian+experience+on+the+outbreak+of+K

- Sunarto, a., McColl, K. a., Crane, M. S. J., Sumiati, T., Hyatt, a. D., Barnes, a. C., & Walker, P. J. (2011). Isolation and characterization of koi herpesvirus (KHV) from Indonesia: Identification of a new genetic lineage. *Journal of Fish Diseases*, 34(2), 876101.
- Sunarto, A., McColl, K. a., Crane, M. S. J., Schat, K. a., Slobedman, B., Barnes, A. C., & Walker, P. J. (2014). Characteristics of cyprinid herpesvirus 3 in different phases of infection: Implications for disease transmission and control. *Virus Research*, 188, 45653.
- Takahara, T., Honjo, M. N., Uchii, K., Minamoto, T., Doi, H., Ito, T., & Kawabata, Z. (2014). Effects of daily temperature fluctuation on the survival of carp infected with Cyprinid herpesvirus 3. *Aquaculture*, 433(July 2004), 2086213. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.06.001
- Van Beurden, S. J., Bossers, A., Voorbergen-Laarman, M. H. a, Haenen, O. L. M., Peters, S., Abma-Henkens, M. H. C., í Engelsma, M. Y. (2010). Complete genome sequence and taxonomic position of anguillid herpesvirus 1. *Journal of General Virology*, 91(4), 8806 887.
- Van Beurden, S. J., Leroy, B., Wattiez, R., Haenen, O. L., Boeren, S., Vervoort, J. J., í Vanderplasschen, A. F. (2011). Identification and localization of the structural proteins of anguillid herpesvirus 1. *Veterinary Research*, 42(1), 105.
- Waltzek, T. B., Kelley, G. O., Alfaro, M. E., Kurobe, T., Davison, A. J., & Hedrick, R. P. (2009). Phylogenetic relationships in the family Alloherpesviridae. *Diseases of Aquatic Organisms*, 84(3), 1796194.
- Waltzek, T. B., Kelley, G. O., Stone, D. M., Way, K., Hanson, L., Fukuda, H., í Hedrick, R. P. (2005). Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family Herpesviridae. *Journal of General Virology*, 86(6), 165961667.
- Wang, Y., Zeng, W., Li, Y., Liang, H., Liu, C., Pan, H., í Wang, Q. (2015). Development and characterization of a cell line from the snout of koi (*Cyprinus carpio* L.) for detection of koi herpesvirus. *Aquaculture*, 435, 3106317.
- WATSON, L. R., YUN, S. C., GROFF, J. M., & HEDRICK, R. P. (n.d.). Characteristics and pathogenicity of a novel herpesvirus isolated from adult and subadult white sturgeon *Acipenser transmontanus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 22(3), 1996210. Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=3617896>
- Wolf, K., & Darlington, R. W. (1971). Channel catfish virus: a new herpesvirus of ictalurid fish. *Journal of Virology*, 8(4), 5256533.
- Xu, J., Zeng, L., Zhang, H., Zhou, Y., Ma, J., & Fan, Y. (2013). Cyprinid herpesvirus 2 infection emerged in cultured gibel carp, *Carassius auratus gibelio* in China. *Veterinary Microbiology*, 166(1-2), 1386144.
- Xu, L., Podok, P., Xie, J., & Lu, L. (2014). Comparative analysis of differential gene expression in kidney tissues of moribund and surviving crucian carp (*Carassius auratus*

gibelio) in response to cyprinid herpesvirus 2 infection. *Archives of Virology*, 159(8), 1961-1974.

Yoshimizu, M., Fukuda, H., Sano, T., Kimura, T., Yoshimizu, M., Fukuda, H., & Salmonid, T. K. (1995). relationship To cite this version :