

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program:  
Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor:  
Speciální chemicko-biologické obory



**Martina Satoriová**

Rybí Rhabdoviry a jejich prevence

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Alena Morávková, Ph.D.

Praha, 2014

**Prohlášení:**

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

V Praze, dne .....

Děkuji své školitelce RNDr. Aleně Morávkové, Ph.D. za cenné rady, korektury a pomoc při zpracování bakalářské práce.

## Obsah

Seznam zkratk .....	v
Abstrakt .....	vi
1. Úvod .....	1
2. Virové infekce napadající ryby .....	2
2.1 Rhabdoviry .....	2
2.1.1 Infekční cyklus .....	4
3. Imunita ryb .....	6
3.1 Nespecifická imunita .....	6
3.1.1 Fyzické bariéry .....	7
3.1.2 Nespecifická buněčná cytotoxicita .....	7
3.1.3 Antimikrobiální peptidy .....	7
3.1.4 Fagocytóza .....	7
3.1.5 Komplement .....	7
3.1.6 Tumor nekrotizující faktor (TNF) .....	8
3.1.7 Interferony .....	8
3.1.8 Interleukiny (IL) .....	8
3.1.9 Inhibitory proteáz .....	9
3.1.10 Lysozym .....	9
3.1.11 Přírozené protilátky .....	9
3.2 Specifická imunita .....	9
3.2.1 Protilátky .....	10
3.2.2 Imunologická paměť .....	10
3.2.3 Buněčná cytotoxicita .....	10
3.2.4 Cytokiny zapojené do adaptivní imunity .....	10
4. Ryby, viry a vliv teploty vodního prostředí .....	11
5. VHSV (Virus virové hemoragické septikémie) .....	12
6. IHNV (Virus infekční hematopoetické nekrózy) .....	15
7. SVCV (virus jarní virémie kaprovitých) .....	18
8. Prevence proti rhabdovirálním onemocněním .....	21
8.1 Podání vakcíny .....	23
8.2 Vakcíny proti VHSV a IHNV .....	23
8.3 Vakcíny proti SVCV .....	25
9. Závěr .....	26
Seznam použité literatury .....	27

## Seznam zkratek

<b>BEFV</b>	Bovine ephemeral fever virus	Virus bovinní efemerní horečky
<b>CMI</b>	Cell mediated immunity	Buňkami zprostředkovaná imunita
<b>CMP</b>	Cumulative percent mortality	Procento kumulativní mortality
<b>ER</b>	Endoplasmic reticulum	Endoplazmatické retikulum
<b>ERM</b>	Enteric redmouth disease	Bakteriální hemoragická septikémie lososovitých
<b>G</b>	Glycoprotein	Glykoprotein
<b>HIRRV</b>	Hirame Rhabdovirus	Hirame virus
<b>IFN</b>	Interferon	Interferon
<b>IHN</b>	Infectious hematopoietic necrosis	Infekční hematopoetická nekróza
<b>IHNV</b>	Infectious hematopoietic necrosis virus	Virus infekční hematopoetické nekrózy
<b>KHV</b>	Koi herpes virus	Koi herpesvirus
<b>LNYV</b>	Lettuce necrotic yellow virus	Virus žluté nekrózy salátu
<b>IgM</b>	Immunoglobulin M	Imunoglobulin M
<b>IL</b>	Interleukin	Interleukin
<b>i.m.</b>	Intramuscular	intramuskulární
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal	Intraperitoneální
<b>ISG</b>	Interferon-stimulated genes	Interferony stimulované geny
<b>L</b>	Polymerase	Polymeráza
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharides	Lipopolysacharidy
<b>M</b>	Matrix protein	Matrixový protein
<b>MHC I</b>	Major histocompatibility complex class I	MHC (hlavní histokompatibilní komplex) glykoprotein I. třídy
<b>N</b>	Nucleoprotein	Nukleoprotein
<b>NAbs</b>	Naturally occurring antibodies	Přirozeně se vyskytující protilátky
<b>NK</b>	Natural killers	Buňky „přirození zabijáci“
<b>NV</b>	Nonvirion protein	Nestrukturní protein
<b>OAS</b>		2,5-oligoadenylát syntetáza
<b>OIE</b>	Office International des Epizooties	Světová organizace pro zdraví zvířat
<b>P</b>	Phosphoprotein	Fosfoprotein
<b>PKR</b>	Protein kinase	Proteinkináza
<b>PYDV</b>	Potato yellow dwarf virus	Virus žluté zakrslosti brambor
<b>RABV</b>	Rabies virus	Virus vztekliny
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species	Reaktivní formy kyslíku
<b>RPS</b>	Relative percent survival	Relativní procento přeživších
<b>SVC</b>	Spring viraemia of carp	Jarní virémie kaprovitých
<b>SVCV</b>	Spring viraemia of carp virus	Virus jarní virémie kaprovitých
<b>TNF</b>	Tumor necrosis factor	Tumornekrotizující faktor
<b>VHS</b>	Viral hemorrhagic septicemia	Virová hemoragická septikémie
<b>VHSV</b>	Viral hemorrhagic septicemia virus	Virus virové hemoragické septikémie
<b>VSV</b>	Vesicular stomatitis virus	Virus vezikulární stomatitidy

## **Abstrakt**

Vzestup akvakultury je jednou z nejvýznamnějších změn v globální produkci potravin za posledních 100 let. Chov vodních živočichů, poháněný růstem populace a rostoucí poptávkou po darech moře, rapidně expandoval a stal se jedním z hlavních světových průmyslových odvětví.

Celá řada druhů vodních živočichů je chována ve velké hustotě ve vodách sladkých, brakických i mořských, kde jsou vystaveny novému prostředí a také potencionálně i novým chorobám. Stres, kterému jsou na farmách vystavovány, může negativně ovlivnit jejich schopnost porazit infekci. Nedokonalé postupy chovatelů také často ulehčují rychlý přenos nemoci. Virové patogeny, ať už takové, které jsou známé již po desítky let nebo takové, které se teprve nově objevují, jsou mimořádnou výzvou, neboť existuje pouze několik, pokud vůbec, úspěšných léčebných prostředků. Vývoj účinných vakcín k podávání ve vodních systémech zůstává téměř nepostižitelný.

Tato práce podává přehled o několika významných rybích Rhabdovirech, jejich dopadech, prevenci vůči nim a také o obranných mechanismech, které ryby používají při odpovědi vůči Rhabdovirovým infekcím.

**Klíčová slova:** ryby, Rhabdoviry, vakcíny

## **Abstract**

The rise of aquaculture has been one of the most significant changes in global food production over the last 100 years. Driven by rising demand for seafood, the growth of population, the farming of aquatic animals has expanded rapidly to become a major global industry.

A number of aquatic animal species is kept in high densities in freshwater, brackish and marine systems where they are exposed to a new environment and potentially new diseases.

On-farm stresses may negatively affect their ability to defeat infection. Imperfect farming practices often facilitate fast transmission of disease. Viral pathogens, whether they have been known for decades or whether they are newly emerging, are particularly challenging since there are few, if any, efficacious treatments. The development of effective viral vaccines for delivery in aquatic systems still remains almost elusive.

This thesis reviews a few of the more significant Rhabdoviral pathogens of finfish, their impacts, their prevention and the protective immune mechanisms that fish mount in response to rhabdovirus infections.

**Key words:** Fish, Rhabdoviruses, vaccines

## 1. Úvod

Vzrůst akvakultury<sup>1</sup> je jednou z nejpronikavějších změn v globální produkci potravin za posledních 100 let. Poháněná růstem lidské populace, vzrůstající poptávkou po plodech moře a vyrovnáváním produkce ze sádek, se praxe v hospodaření s vodními živočichy rychle rozvinula. V současnosti se stává jedním z hlavních světových průmyslových odvětví a je nyní nedílnou součástí ekonomiky mnoha zemí. Zejména v Asii je navíc hlavním hnacím mechanismem socio-ekonomického rozvoje v chudých venkovských a pobřežních komunitách.

Rapidní nárůst akvakultury je také zdrojem masivních antropogenních změn v krajině a vodních ekosystémech. Vodní živočichové byli přemístěni z jejich přirozeného prostředí, jsou chováni ve vysoké hustotě a vystaveni značnému enviromentálnímu stresu. Navíc je jim poskytováno nepřirozené krmivo. Zároveň, přespřílišné využívání sádek a antropogenní stres vyvíjený na vodní ekosystémy vytvořil velký tlak na divoké populace ryb. Následkem těchto změn je mimo jiné objevení se a šíření se rostoucího množství nových onemocnění zasahujících vodní živočichy.

Neúmyslný přesun infikovaných hostitelů a patogenů jednotlivci nebo společnostmi zapojenými do globální akvakultury nebo do obchodu s orientálními rybami je důležitým hnacím mechanismem výskytu virových onemocnění u vodních živočichů (WHITTINGTON *et al.* 2007). Díky tomu se některé exotické viry přemístěné do nových geografických oblastí rozšířily a způsobily vypuknutí onemocnění v populacích přirozených i chovných druhů. Pohyb vodních živočichů v rámci průmyslu a obchodu je tak zároveň jednou z největších hrozeb pro produktivitu a ziskovost světové akvakultury. Příkladem může být šíření viru infekční hematopoetické nekrózy (IHNV) do Evropy a Asie prostřednictvím lodní přepravy kontaminovaných vajíček pstruha a lososa, nebo světovým rozšířením viru jarní virémie kaprů (SVCV) a koi herpesviru (KHV) skrze obchod s orientálními rybami.

Vzhledem k výše uvedeným informacím je toto téma navýsost důležité a aktuální. Tato práce shrnuje informace o třech nejzávažnějších onemocněních ryb způsobených Rhabdoviry a o možné prevenci vůči těmto onemocněním.

---

<sup>1</sup> Pojem akvakultura značí cílevědomé, plánované obhospodařování vodních ploch (moří, jezer, řek atd.) s cílem docílit dlouhodobě stálých výnosů vodní fauny a flory (t. j. ryb, humrů, raků, krabů, krevet, mušlí, řas a jiných vodních organismů).

Odchov vodních živočichů akvakulturou probíhá jak v přirozeném prostředí (v klecích, sítích apod.) tak i v umělých nádržích a podobných zařízeních (Akvakultura [online]).



## 2. Virové infekce napadající ryby

Nejvýznamnější virové nákazy postihující chovné druhy ryb v Evropě jsou způsobeny různými rody virů patřícími do šesti různých rodin (viz Tabulka č. 1).

Rod viru	Hostitel
Betanodavirus	Cejn mořský, okoun mořský
Aquabirnavirus	Napadají většinu druhů ryb v juvenilních stádiích; způsobují těžké ztráty během vypouštění lososů atlantských ze sladké do slané vody
Novirhabdovirus	Postihují především pstruhy, ale rozšiřují se na více než padesát dalších druhů ryb
Vesikulovirus	Napadají kapry
Alphavirus	Postihují lososy a pstruhy
Isavirus	Napadají lososy

Tabulka č. 1 – Viry napadající ryby

Kvůli riziku šíření onemocnění skrze obchodování s rybami, jsou mnohá onemocnění uvedena v seznamu Světové organizace pro zdraví zvířat (OIE) a podléhají ohlašovací povinnosti. Z tohoto seznamu se v této práci zaměřuji na onemocnění způsobená Rhabdoviry.

### 2.1 Rhabdoviry

Rhabdoviry tvoří skupinu *Mononegavirales* společně s Filoviry (např. virus Eboly), Paramyxoviry (např. spalničky a respirační syncytiální virus) a Bornaviry (např. Borna disease virus). Všechny tyto viry jsou obalené a mají nesegmentovaný genom tvořený jednořetězcovou (-) RNA molekulou. Mezi *Mononegavirales*, mají Rhabdoviry největší hostitelskou diverzitu. Napadají rostliny, hmyz, ryby, savce, plazy a korýše (ROSE & WHITT 2001).

Genomy několika členovců (*Aedes aegypti*, *Ixodes scapularis*, různých druhů *Drosophila*, *Acyrtosiphon pisum*, *Brugia malayi* a dalších) obsahují četné integrované elementy z Rhabdovirů s některými integračními událostmi, které jsou nejméně 11 milionů let staré (FORT *et al.* 2011).

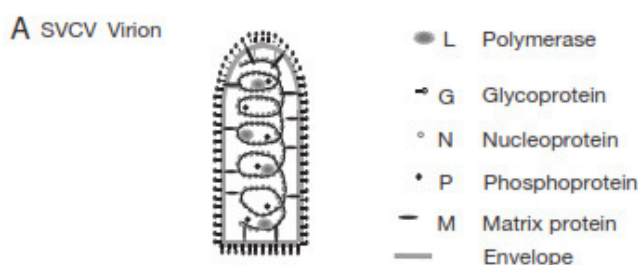
Na základě jejich strukturních vlastností, antigenních determinant a fylogenetických analýz, byly Rhabdoviry rozděleny do šesti rodů (viz Tabulka č. 2).

Rod	Modelový virus
Lyssaviry	Virus vztekliny ( <i>Rabies virus</i> , RABV)
Vesiculoviry	Virus vezikulární stomatitidy (VSV)
Ephemeroviry	Virus bovinní efemerní horečky (BEFV)
Novirhabdoviry	Virus infekční hemopoetické nekrózy (IHNV)
Cytorhabdoviry	Virus žluté nekrózy salátu (LNYV)
Nucleorhabdoviry	Virus žluté zakrslosti brambor (PYDV)

Tabulka č. 2 – Rozdělení Rhabdovirů

Navíc četné identifikované Rhabdoviry nejsou ještě zařazeny.

Všechny Rhabdoviry mají pevně daný tvar patrony s rovnou bází a zakulacenou špičkou (viz obr. 1).



Obr. 1 Struktura virionu zástupce *Rhabdoviridae* viru jarní virémie kaprů (SVCV) (AHNE *et al.* 2002).

Genom se skládá až z deseti genů, mezi kterými je pouze pět společných všem členům rodiny Rhabdovirů (viz obr. 2). Tyto geny kódují nukleoprotein (N), fosfoprotein (P), matrixový protein (M), glykoprotein (G) a virovou polymerázu (L). Genom je spojený s N, L a P formujícími nukleokapsidu, která je kondenzována matrixovým proteinem do těsně stočené helikální struktury. Kondenzovaná nukleokapsida je obklopena lipidovou dvojvrstvou obsahující virální glykoprotein G, který tvoří špičky, které vystupují z povrchu viru. G protein hraje stěžejní roli během počátečních kroků infekčního cyklu. Prvně rozpoznává receptory na povrchu viru a po virionové endocytóze zprostředkovává fúzi mezi virálními a endozomálními membránami (ALBERTINI *et al.* 2012).

### SVCV



### VHSV



### IHNV



Obr. 2 Organizace genomu typického člena rodu Vesikulovirů, Viru jarní virémie kaprů (SVCV) a členů rodu Novirhabdovirů, viru virové hemoragické septikémie (VHSV) (PURCELL *et al.* 2012) a viru infekční hematopoetické nekrózy (IHNV) (Infectious hematopoietic necrosis virus [online]).

#### 2.1.1 Infekční cyklus

Rhabdovir vstupuje do cílové buňky receptorem zprostředkovanou endocytózou, která je vyvolána spojením receptoru na povrchu buňky s virovým G proteinem. Virová a endozomální membrána následně fúzuje a virová kapsida je uvolněna do cytoplazmy hostitelské buňky. Uvnitř cytoplazmy jsou geny viru postupně transkribovány z genomu za použití RNA dependentní RNA polymerázy, která doprovází infekční virion. Virové proteiny jsou syntetizovány mašinérií hostitelské buňky ze subgenomových mRNA a nové kopie genomu jsou syntetizovány z celogenomové jednořetězcové RNA opačné polaritě (+). N, L a P proteiny syntetizované volnými ribosomy v cytoplazmě buňky se připojují k nově syntetizovaným kopiím virového RNA genomu, vytváří ribonukleoproteinové core, které asociuje s M proteinem za vzniku RNP-M komplexu. G protein je syntetizován ribosomy připojenými k endoplazmatickému retikulu (ER). Je glykosilován a dále také modifikován uvnitř ER a Golgiho aparátu a následně transportován do plazmatické membrány na povrchu hostitelské buňky. RNP-M komplex migruje do oblastí plazmatické membrány, které jsou bohaté na virové G proteiny. G proteinem pokrytá plazmatická membrána hostitelské buňky je poté asociována s RNP-M proteinovým komplexem, dochází k pučení z buňky a vzniku nových obalených virionů Rhabdovirů (PURCELL *et al.* 2012).

Viry obecně mají jednu ze dvou strategií k zajištění přežití a přenosu: „udeřit a uniknout“ nebo „udeřit a zůstat“ (HILLEMAN 2004). Jako akutní cytolytické viry způsobující vysokou mortalitu, rybí Rhabdoviry jsou typicky považovány za viry se strategií „udeřit a uniknout“. S nimi spojovaná onemocnění jsou běžně charakterizována jako akutní hemoragické septikémie napadající mnoho orgánů (KURATH & WINTON 2008). Nicméně odlišné formy

onemocnění byly popsány pro IHN (hematopoetická a neurotropická) a VHS (akutní, chronická a nervová) u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) (LAPATRA *et al.* 1995).

### **3. Imunita ryb**

Kostnaté ryby mají hlavní složky vrozené a adaptivní imunity podobné těm, které nacházíme také u ostatních obratlovců (PURCELL *et al.* 2012).

Oproti vyšším obratlovcům jsou ryby volně žijícími organismy již od časných embryálních stádií života a jejich přežití je závislé na vrozeném imunitním systému (ROMBOUT *et al.* 2005).

Nespecifická imunita je u ryb zásadním obranným mechanismem. Navíc hraje klíčovou roli v získané imunitní odpovědi a homeostázi skrze systém receptorových proteinů. Tyto receptorové proteiny rozpoznají molekulové struktury, které jsou typické pro patogenní mikroorganismy včetně polysacharidů, lipopolysacharidů (LPS), peptidoglykanové bakteriální DNA, virové RNA a dalších molekul, které se normálně na povrchu mnohobuněčných organismů nevyskytují.

Tato odpověď je rozdělena na fyzickou bariéru a buněčnou a humorální imunitní odpověď. Tyto imunologické parametry zahrnují růstové inhibitory, lytické enzymy, klasické komplementové dráhy, alternativní a lektinovou dráhu, aglutininy a precipitiny (opsoniny a primární lektiny), protilátky, cytokiny, chemokiny a antibakteriální peptidy.

Vrozenou imunitní odpověď mohou ovlivnit různé vnější a vnitřní faktory. Teplotní změny, zvládání stresu a hustota populace mohou mít potlačující vliv na tento typ odpovědi, zatímco různá potravinová aditiva a imunostimulanty mohou zesílit její účinnost (MAGNADOTTIR 2006, 2010).

Ryby mají populace lymfocytů, které jsou analogní T buňkám, B buňkám, cytotoxickým buňkám (podobné NK buňkám), makrofágům a polymorfonukleárním leukocytům. Příčnoustí a kostnaté ryby jsou nejprimitivnějšími skupinami, které mají MHC (Major Histocompatibility Complex) a T buněčný receptor (TCR, T Cell receptor) (MANNING & NAKANISHI 1996a).

#### **3.1 Nespecifická imunita**

U ryb je vrozená imunitní odpověď považována za esenciální složku v boji s patogeny kvůli omezením, která má jejich adaptivní imunitní systém. Konkrétně mluvíme o poikilotermní podstatě ryb, omezeném množství protilátek, pomalé proliferaci, dozrávání a paměti lymfocytů (WHYTE 2007). Běžně se rozděluje na tři komponenty: epiteliální/mukózní bariéru, humorální parametry a buněčné komponenty. Epiteliální a mukózní bariéra pokožky, žáber a zažívacího traktu je u ryb extrémně důležitou bariérou proti nemocem, vzhledem k tomu že, jsou neustále ponořeny v médiu obsahujícím potenciálně škodlivé agens (MAGNADOTTIR 2010).

### **3.1.1 Fyzické bariéry**

Šupiny, sliz a žábry fungují jako první bariéra pro infekci (ELLIS 2001). Sliz ryb se skládá z lektinů, pentraxinů, lysozymů, proteinů komplementu, antibakteriálních peptidů a imunoglobulinu M (IgM), které mají významnou roli v inhibici při vstupu patogenů (SAURABH & SAHOO 2008).

### **3.1.2 Nеспецифická buněčná cytotoxicita**

U savců jsou nespecifické odpovědi uskutečňovány především cytotoxickými buňkami známými jako NK buňky (z anglického natural killers tedy „přirození zabíječi“). Ačkoliv nespecifické cytotoxické buňky sumců jsou morfologicky vzdálené velkým granulárním lymfocytům savců, jsou funkčně podobné (EVANS & JASO-FRIEDMANN 1992).

Kromě toho byla aktivita cytotoxických buněk prokázána i v dalších druzích ryb například u pstruha duhového nebo kapra obecného.

### **3.1.3 Antimikrobiální peptidy**

Takovéto peptidy byly nalezeny ve slizu, jaterní a žaberní tkáni kostnatých ryb (BIRKEMO *et al.* 2003). Tyto malé polypeptidy mají schopnost rozrušit bakteriální stěnu (ELLIS 2001).

### **3.1.4 Fagocytóza**

Hlavními buňkami zapojenými do fagocytózy jsou neutrofilové a makrofágy (SECOMBES & FLETCHER 1992). Tyto buňky odstraňují bakterie hlavně produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS, Reactive oxygen species) během respiračního vzplanutí. Vedle toho mají neutrofilové v cytoplazmatických granulech myeloperoxidázu, která v přítomnosti halogenidu a peroxidu vodíku zabíjí bakterie halogenací bakteriální buněčné stěny (FISHER *et al.* 2006).

Podobně také makrofágy u savců mohou produkovat oxid dusnatý a mohou tak být stejně účinné jak antibakteriální činitelé, peroxyinitry a hydroxylové skupiny (SECOMBES & FLETCHER 1992).

### **3.1.5 Komplement**

Komplementový systém u ryb stejně jako ten u vyšších obratlovců, může být aktivován třemi drahami: klasickou, která je spouštěna protilátkami vázajícími se na povrch buňky

(HOLLAND & LAMBRIS 2002); alternativní, která je nezávislá na protilátkách a je aktivována přímo cizími mikroorganismy; a lektinová, která je aktivována vazbou proteinového komplexu složeného z manózy/mannanu-vázajícího lektinu v bakteriálních buňkách (SAKAI 1992). Nicméně mechanismu a molekulám, které jsou u ryb v tomto systému zapojeny, nebylo doposud ještě dobře porozuměno (NIKOSKELAINEN *et al.* 2002). Protilátky lososovitých ryb, jsou v přítomnosti proteinů komplementu schopné neutralizovat obalené viry, včetně IHNV a VHSV (LORENZEN & LAPATRA 1999).

### **3.1.6 Tumor nekrotizující faktor (TNF)**

Studie ryb ukazují, že TNF způsobuje aktivaci makrofágů vedoucí k zvýšené respirační aktivitě, fagocytóze a produkci oxidu dusnatého (YIN *et al.* 1997, TAFALLA *et al.* 2001).

### **3.1.7 Interferony**

Přežití akutní rhabdovirální infekce je také závislé na systému interferonů (IFN), který je rychle aktivován při odpovědi na infekci (PURCELL *et al.* 2012).

IFN $\alpha$  a  $\beta$  jsou cytokiny s nescifickou antivirovou funkcí, která je založená na inhibici replikace nukleové kyseliny uvnitř infikovaných buněk. IFN hrají důležitou roli v obraně proti virové infekci v hostitelských buňkách obratlovců, které po rozpoznání virové nukleové kyseliny vylučují IFN $\alpha/\beta$  (ROBERTSEN 2006). Tyto interferony ochraňují ostatní buňky před virovou infekcí tím, že se váží na různé receptory. To má za následek indukci několika stovek genů, které jsou stimulovány interferony (ISG). Některé z těchto genů kódují antivirové proteiny, jako jsou protein MX, dsRNA aktivovaná proteinkináza (PKR) a 2,5-oligoadenylát syntetáza (OAS) (SAMUEL 2001). Dva interferony (IFN $\alpha$ -1 a IFN $\alpha$ -2) byly klonovány z lososa obecného (KILLENG *et al.* 2007). IFN $\alpha$ -1 indukuje expresi MX a ISG. Oba mají podobné vlastnosti jako IFN $\alpha/\beta$  a IFN $\gamma$  u savců (ROKENES *et al.* 2007).

Rhabdoviry jsou citlivé na účinky interferonů. Virulentní Rhabdoviry ale mohou pokračovat s replikací díky schopnostem matrixového (M) proteinu zprostředkovat zastavení hostitelských buněk a NV proteinu rozvrátit programovanou buněčnou smrt a potlačovat funkční IFN (PURCELL *et al.* 2012).

### **3.1.8 Interleukiny (IL)**

IL-1 hraje u savců důležitou roli při zánětech a hostitelské obraně (DINARELLO 1997). IL-1 $\beta$  byl detekován u třinácti druhů kostnatých ryb a je zapojený v regulaci imunity skrze

stimulaci T buněk. Funkce IL-1 $\beta$  u těchto druhů ryb je obdobná té u savců (MAGNADOTTIR 2010).

### **3.1.9 Inhibitory proteáz**

Několik inhibitorů proteáz je přítomno v séru a ostatních tělních tekutinách ryb (BOWDEN et al. 1997). Hlavní funkce inhibitorů proteáz je udržovat homeostázi tělních tekutin. Tyto molekuly jsou zapojeny při reakcích akutní fáze a v obraně proti patogenům, které sekretují proteolytické enzymy (MAGNADOTTIR 2010).

### **3.1.10 Lysozym**

Lysozym je baktericidní enzym, který je široce rozložený po celém těle a je součástí nespecifického obranného mechanismu u většiny zvířat. U lososovitých byl lysozym zaznamenán v séru, sekretech, mukózních membránách a tkáních bohatých na leukocyty, především v ledvinách a střevě (LIE *et al.* 1989). Podle všeho jsou hlavními zdroji lysozymu monocyty, makrofágy a neutrofily (SVEINBJORNSSON *et al.* 1996). Baktericidní působení enzymu zahrnuje hydrolyzaci peptidoglykanu bakteriálních buněčných stěn, jejímž výsledkem je lýze buňky (MAGNADOTTIR 2006).

### **3.1.11 Přirozené protilátky**

Přirozené protilátky se ve velkém množství nalézají v séru ryb, kde poskytují okamžitou a obecnou ochranu proti bakteriálním a virovým patogenům. Tyto faktory jsou tak klíčovými komponenty nespecifické imunity. Přirozené protilátky jsou ale taky spojeny s adaptivní imunitou. Kostnaté ryby jsou schopné vytvářet specifické přirozené protilátky IgM typu proti nejrůznějším antigenům (WHYTE 2007).

## **3.2 Specifická imunita**

Specifická imunitní odpověď nastává skrze mechanismy zahrnující složitou síť specializovaných buněk, proteinů, genů a biochemických zpráv, které poskytují prostředky nutné pro specifickou odpověď těla na antigeny, protilátky a efektorové buňky s vysokou specifitou a afinitou (URIBE *et al.* 2011).



### **3.2.1 Protilátky**

Převládajícím imunoglobulinem u kostnatých ryb je tetramer třídy IgM (ACTON *et al.* 1971). Imunitní odpověď pokožky a žáber je důležitá, protože tyto orgány jsou v přímém kontaktu s prostředím. Specifické protilátky jsou produkovány usídlenými B buňkami a to v pokožce (CAIN *et al.* 2000), střevě (JONES *et al.* 1999) a žábrách (LUMSDEN *et al.* 1993) ne nutně s vytvořením systematické odpovědi.

### **3.2.2 Imunologická paměť**

Ryby si vyvinou imunologickou paměť po prvním střetu s antigenem (ARKOOSH & KAATARI 1991; WHITTINGTON *et al.* 1994). Pstruh duhový odpovídá na suboptimální dávky T lymfocytů dvěma způsoby, na antigenu závislým a nezávislým způsobem, po počátečním vystavení se tomu stejnému antigenu (ARKOOSH & KAATARI 1991).

### **3.2.3 Buněčná cytotoxicita**

U savců je adaptivní imunitní odpověď realizována CD8+ cytotoxickými T lymfocyty. Ty jsou kritické v boji s různými virovými infekcemi. Tyto lymfocyty rozpoznávají a zabíjejí buňky nesoucí na MHC I od virů odvozené peptidy. Několik studií naznačuje, že tento mechanismus buněčné smrti existuje také u ryb. Sekvenování homologů MHC I a CD3+ T buněk u ryb naznačuje, že CD8+ MHC I prezentace je podobná té, která se objevuje u vyšších obratlovců (FISHER *et al.* 2006).

### **3.2.4 Cytokiny zapojené do adaptivní imunity**

Cytokiny jsou součástí adaptivní imunity ryb a s nedávnými objevy CD4 buněk u kostnatých se zdá pravděpodobné, že tyto cytokiny pohánějí aktivaci a diferenciaci podmnožin T pomocných buněk, které tak uvolní různé repertoáry cytokinů (SECOMBES 2008).

#### 4. Ryby, viry a vliv teploty vodního prostředí

Většina ryb (výjimkou jsou například některé druhy tuňáka, žraloků nebo mečouni) je poikilotermní a teplota má mimořádně rozhodující roli v ovlivňování průběhu onemocnění. Ovlivňuje rychlost replikace viru a stejně tak imunitní odpověď hostitele a další fyziologické faktory týkající se rezistence.

Teplota ovlivňuje veškeré fyziologické procesy včetně metabolismu a imunitních reakcí. Optimální imunitní odpovědi u ryb bývá obvykle dosaženo během léta (ELLIS 1988). Teplota vody je jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících rovnováhu mezi rybou a prostředím. Ačkoliv není to ani tak teplota sama, jako spíš její výkyvy, které ovlivňují imunitní systém ryb (ROBERTS & RODGER 2001).

Obecně je osvojený imunitní systém teplotně citlivější než vrozená složka imunitního systému (s určitými výjimkami) (MAGNADOTTIR 2006). V rámci adaptivní imunitní odpovědi jsou T pomocné a T cytotoxické buňky při nízkých teplotách negativně regulovány, což vede k narušení produkce protilátek a cytotoxické odpovědi. Bylo názorně prokázáno, že suprese T buněčné odpovědi nastala kvůli narušení zpracování a prezentaci antigenu (VALLEJO *et al.* 1991). Lépe řečeno, T buňky v porovnání s B buňkami nabývají pomalejší, takzvané „homeoviskózní“ adaptace k nižším teplotám (VALLEJO *et al.* 1991, BLY & CLEM 1992). Tato adaptace zahrnuje nárůst v množství polynenasycených mastných kyselin fosfolipidů v buněčné membráně v období 2 až 3 týdnů. Ukázalo se, že během tohoto období aklimatizace jsou komponenty vrozené imunitní odpovědi (neutrofilů, makrofágů, NK buňky a alternativní dráha komplementu) ve zvýšeném množství a to až do ukončení aklimatizace ryb (ALCORN *et al.* 2002, BLY & CLEM 1992). Tudíž afinita protilátek k T-dependentním antigenům se zdá vyšší při nižších teplotách (BLY & CLEM 1992). Nicméně, kapři imunizovaní a udržovaní v optimálních teplotách (25 °C) po 20 dní a potom přemístění do vody o nízké teplotě (14 °C) těsně před druhou imunizací, byly schopni zahájit protilátkovou odpověď pravděpodobně díky generování Th paměťových buněk během přípravného období (WEISS & AVTALION 1977). Na základě těchto studií se předpokládá, že pouze určité fáze specifické imunitní odpovědi jsou citlivé k nízkým teplotám (MANNING & NAKANISHI 1996b). V souladu s tím, virové infekce jako jsou VHS nebo jarní virémie kaprů, se objevují během nebo po nízkých či měnících se teplotách vody během jara a podzimu (WOLF 1988a). Je potřeba další studie, abychom lépe porozuměli teplotní závislosti imunitní odpovědi u ryb.

## 5. VHSV (Virus virové hemoragické septikémie)

Virus hemoragické septikémie (VHSV) je Rhabdovirus z rodu Novirhabdovirů a je původcem virové hemoragické septikémie – nejzávažnější chorobu chovných pstruhů duhových v Evropě (WOLF 1988a). Dobře známá byla již od počátku 20. století. Virová hemoragická septikémie byla považována za nemoc více či méně omezenou na pstruha duhového v Evropě až do 1988, kdy byl VHS virus izolován z lososa pacifického.

Následné genetické analýzy názorně ukázaly, že tento virus nebyl ve skutečnosti importován z Evropy, ale jednalo se o odlišný kmen nejspíš vycházející z rezervoáru druhů ryb v Tichém Oceánu (OSHIMA *et al.* 1993, BATTIS *et al.* 1993).

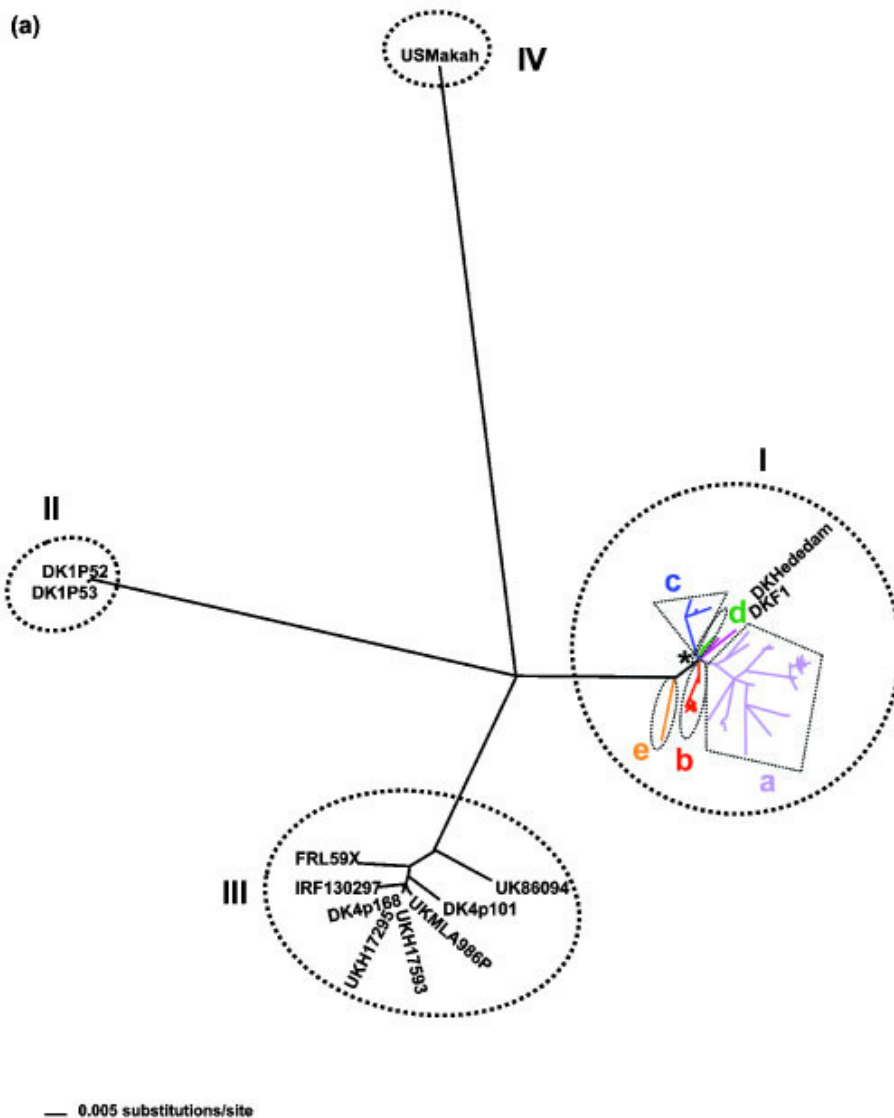
Od té doby, skrze systematické sledovací programy, se již známá hostitelská škála pro VHSV enormně zvětšila a zahrnuje druhy z několika rodin ryb včetně např. lososovitých, štikovitých, sled'ovitých, treskovitých a platýsovitých.

Akutní VHSV infekce je charakterizována vysokým procentem mortality (až 100% u potěru). Postižené ryby mají abnormální plavací chování, nafouklou dutinou břišní (kvůli ascitu=vodnatelnosti břišní), rozsáhlé krvácení vnější v různých vnitřních viscerálních orgánech doprovázené nekrotickými změnami. Dalšími klinickými příznaky jsou tmavnutí kůže, anémie a exoftalmie. Vážnost se liší dle konkrétního kmene VHSV a také dle napadeného druhu ryb, přičemž nejvážnější je u pstruha duhového. Při latentní infekci je mortalita nízká a ryby se mohou jevit téměř normálně, ačkoliv mohou být hyperaktivní.

Genom VHSV se skládá z asi 11 200 nukleotidů a obsahuje 6 genů v pořadí 3'-N-P-M-G-Nv-L-5', kódující nestrukturní protein (Nv) a 5 strukturní proteinů (N, P, M, G, L).

Četné fylogenetické analýzy G proteinu i dalších proteinových sekvencí z různých izolátů vymezily čtyři hlavní VHSV genotypy (I-IV) (Obr. 3) lišící se o cca 6% v nukleotidových sekvencích.

Genotyp I zahrnuje širokou škálu virů pocházejících ze sladkovodních farem pstruhů duhových v kontinentální Evropě (EINER-JENSEN *et al.* 2004, THIERY *et al.* 2002) a velký počet izolátů pocházejících z mořských druhů v Baltském moři, Skagerraku, Kattegatu, Lamanšském průlivu (EINER-JENSEN *et al.* 2004, SNOW *et al.* 2004, DIXON *et al.* 1997). Tyto izoláty spadají pod dvě z pěti navrhovaných podskupin v rámci Genotypu I (podskupiny Ia a Ib v tomto pořadí (EINER-JENSEN *et al.* 2004). V rámci podskupiny Ia se VHSV vyvinul v odlišné větve. Izoláty z infikovaných dánských sladkovodních povodí ve větev Ia-1, zatímco izoláty z pstruhů pocházející z ostatních kontinentálních evropských zemí se shlukují v jinou vzdálenou větev, Ia-2.



Obr. 3 Radiální fylogenetický strom ukazující příbuznost mezi 62 unikátními celými sekvencemi G genu VHSV (EINER-JENSEN *et al.* 2004).

Mořské izoláty z podskupiny Ib se výrazně liší od dalších izolátů Genotypu I, jelikož bylo experimentálně prokázáno, že mají nízkou patogenicitu vůči pstruhu duhovému (SKALL *et al.* 2004). Zbývající podskupiny identifikované v rámci Genotypu I zahrnují izoláty získané v osmdesátých letech minulého století z Dánských sladkovodních farem chovajících pstruhu duhové (podskupina Ic), izoláty z pstruhů duhových chovaných na farmách v moři ve Skandinávii (podskupina Id) (EINER-JENSEN *et al.* 2004, RAJA-HALLI *et al.* 2006) a izoláty získané z pakambaly velké a pstruha duhového v Georgii a černomořské oblasti (podskupina Ie) (NISHIZAWA *et al.* 2006).

Genotyp II zahrnuje omezené množství izolátů VHSV získaných z Černého moře (SNOW *et al.* 2004), zatímco Genotyp III obsahuje izoláty pocházející z vypuknutí VHS na farmách pakambaly velké na Britských ostrovech společně s izoláty získanými z celé škály mořských druhů chycených ve Skotských a Severoatlantských vodách (SNOW *et al.* 2004). Poslední genetická skupina VHSV dodnes identifikovaných izolátů sestává z izolátů odebraných z divokých mořských ryb z Pacifického severozápadu (NISHIZAWA *et al.* 2002) a východopobřežních oblastí Kanady a USA, izolátů z japonských platýsů (NISHIZAWA *et al.* 2002) a izolátů pocházejících z nedávných sérií epidemií ve Velkých jezerech v Severní Americe (LUMSDEN *et al.* 2007).

## 6. IHNV (Virus infekční hematopoetické nekrózy)

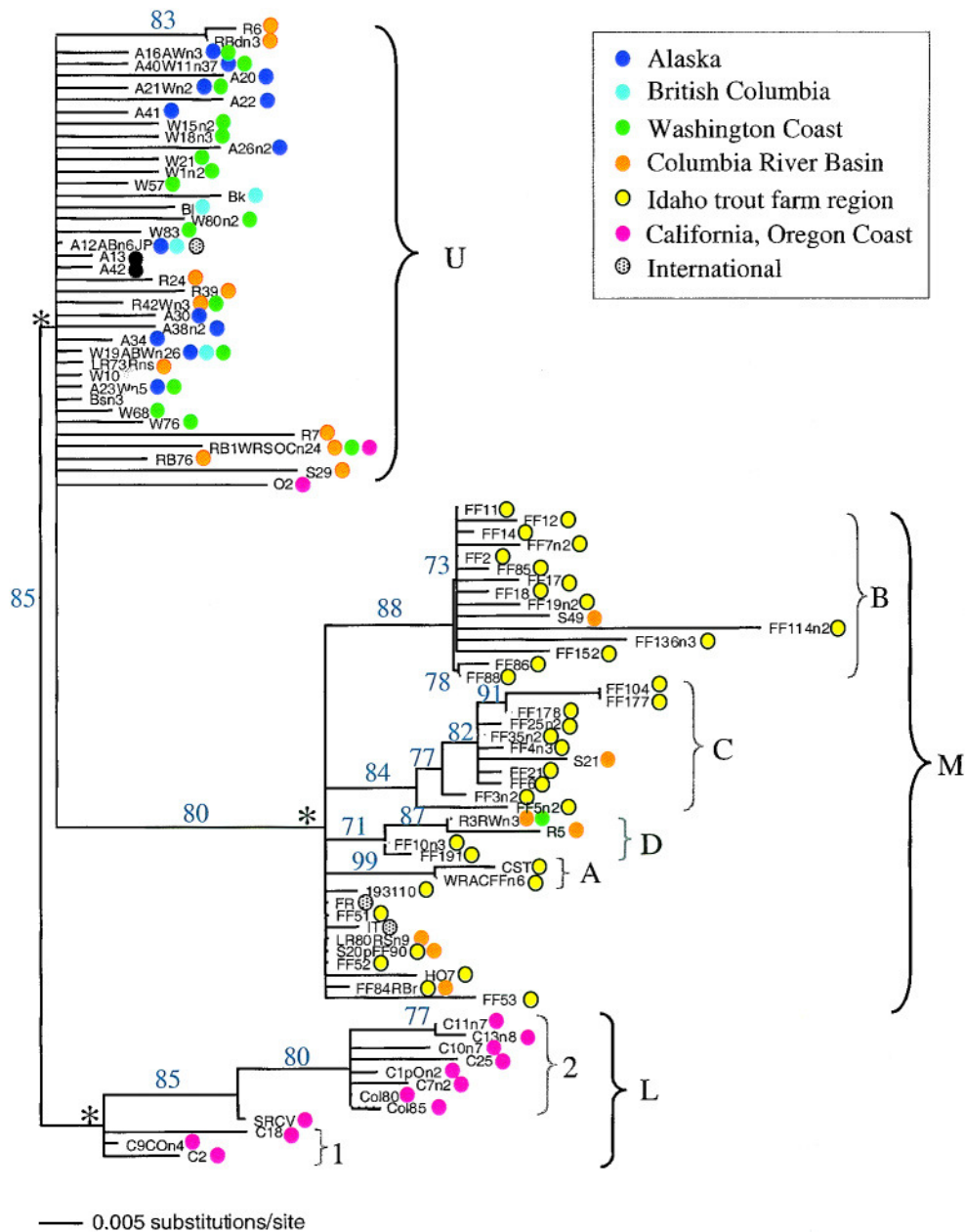
IHNV patří do rodu Novirhabdovirů a infikuje několik druhů divokých i v líhních chovaných lososovitých. Podobně jako ostatní Rhabdoviry, IHNV má lineární jednořetězcový (-) RNA genom o délce přibližně 11 000 nukleotidů a kódující 6 genů.

IHNV je pravděpodobně jedním z nejvýznamnějších virových patogenů způsobujících akutní, systémové a často prudce nakažlivé onemocnění především u divokých ale i chovaných lososů a pstruhů (WOLF 1988b, WINTON 1991). První nahlášená epidemie IHNV se vyskytla u potěru lososa nerky (*Oncorhynchus nerka*) v líhních ve Washingtonu a Oregonu během padesátých let minulého století (RUCKER *et al.* 1953).

IHNV je původním patogenem lososovitých v oblasti pacifického severozápadu Severní Ameriky a jeho současný geografický rozsah se táhne od Aljašky k severní Kalifornii podél pobřeží Tichého oceánu a ve vnitrozemí do Idaho (WOLF 1988b, BOOTLAND & LEONG 1999). IHNV se rozšířil do Asie a Evropy nejpravděpodobněji díky pohybu infikovaných ryb a jiker (WINTON 1991).

Stejně jako u všech Rhabdovirů, se genom IHNV skládá z jednořetězcové RNA negativního smyslu. Pořadí genů IHNV je 3'-N-P-M-G-NV-L-5', přičemž NV protein IHNV je esenciální pro efektivní růst a patogenitu IHNV.

Na základě parciální sekvenční analýzy G genu 323 severoamerických izolátů byly definovány tři hlavní genetické skupiny IHNV, nazvané jako U, M a L (Obr. 4) (KURATH *et al.* 2003, TROYER *et al.* 2000). Genoskupina M je endemická pro chovnou oblast pro pstruhy duhové v Idaho, kde byly nahlášený fylogeneticky vzdálené podskupiny určené jako MA-MD, MB, MC a MA podskupiny jsou tři nejvíce běžné a široce rozšířené typy IHNV ve virově endemickém regionu, a bylo prokázáno, že společně kolují v oblasti více než 20 let (TROYER & KURATH 2003).



Obr. 4 Fylogenetický strom ukazující evoluční příbuznost mezi 93 mid-G sekvenčními typy odvozenými od 323 izolátů IHNV. Velké černé složené závorky ukazují hlavní tři genoskupiny, U, M a L a šedé složené závorky naznačují podskupiny A-D u M skupiny a podskupiny 1-2 uvnitř genoskupiny L (KURATH *et al.* 2003).

U snadno podléhajících lososovitých se zdá, že většina orgánů může být potenciálním cílem viru, ačkoliv podle výchozích histologických vyšetření je nejpoškozenější hematopoetická tkáň (AMEND *et al.* 1969).

Ačkoliv histochemické studie naznačují, že leukocyty a endotelie jsou primárními místy infekce (DROLET *et al.* 1994), použití rekombinantního viru s expresí luciferázy odhalilo, že vstupem pro vodou přenášený virus u mladých pstruhů duhových je báze ploutví (HARMACHE *et al.* 2006).

Výrazné klinické příznaky zahrnují zpomalení a zastavení toku krve, ztrátu reaktivity, krvácení a edémy. Tyto příznaky jsou spojeny s neustálým nárůstem virového titru. Smrt obvykle nastává během tří nebo čtyř dní.

IHNV je virus vyskytující se ve studených vodách, který se těžko replikuje při teplotách nad 18°C.

Otázky ohledně epidemiologie IHNV jako je zdroj infekce, způsob přenosu a mechanismu, který udržuje virus mezi populacemi lososovitých, jsou již nyní plně zodpovězeny. Laboratorní studie zcela demonstrují odhalení vody jako efektivního způsobu přenosu IHNV jak na lososa pacifického, tak na lososa atlantského ve slané i sladké vodě. Navíc, epidemiologické šetření prostorového a časového výskytu IHNV na slanovodních farmách lososů atlantských naznačují, že přenos vodou může hrát roli v šíření viru mezi farmami situovanými v těsné blízkosti. Zcela nelze vyloučit ani alternativní způsoby přenosu IHNV, včetně možnosti přenosu vodními bezobratlými.

Tato možnost je postulována s ohledem na odhalení Rhabdovirů u různých druhů vodních bezobratlých. Ne-rybí hostitelé mohou fungovat jako vektory i rezervoáry virů a tudíž mají potenciál podílet se na přenosu viru (JAKOB et al. 2011).



## 7. SVCV (virus jarní virémie kaprovitých)

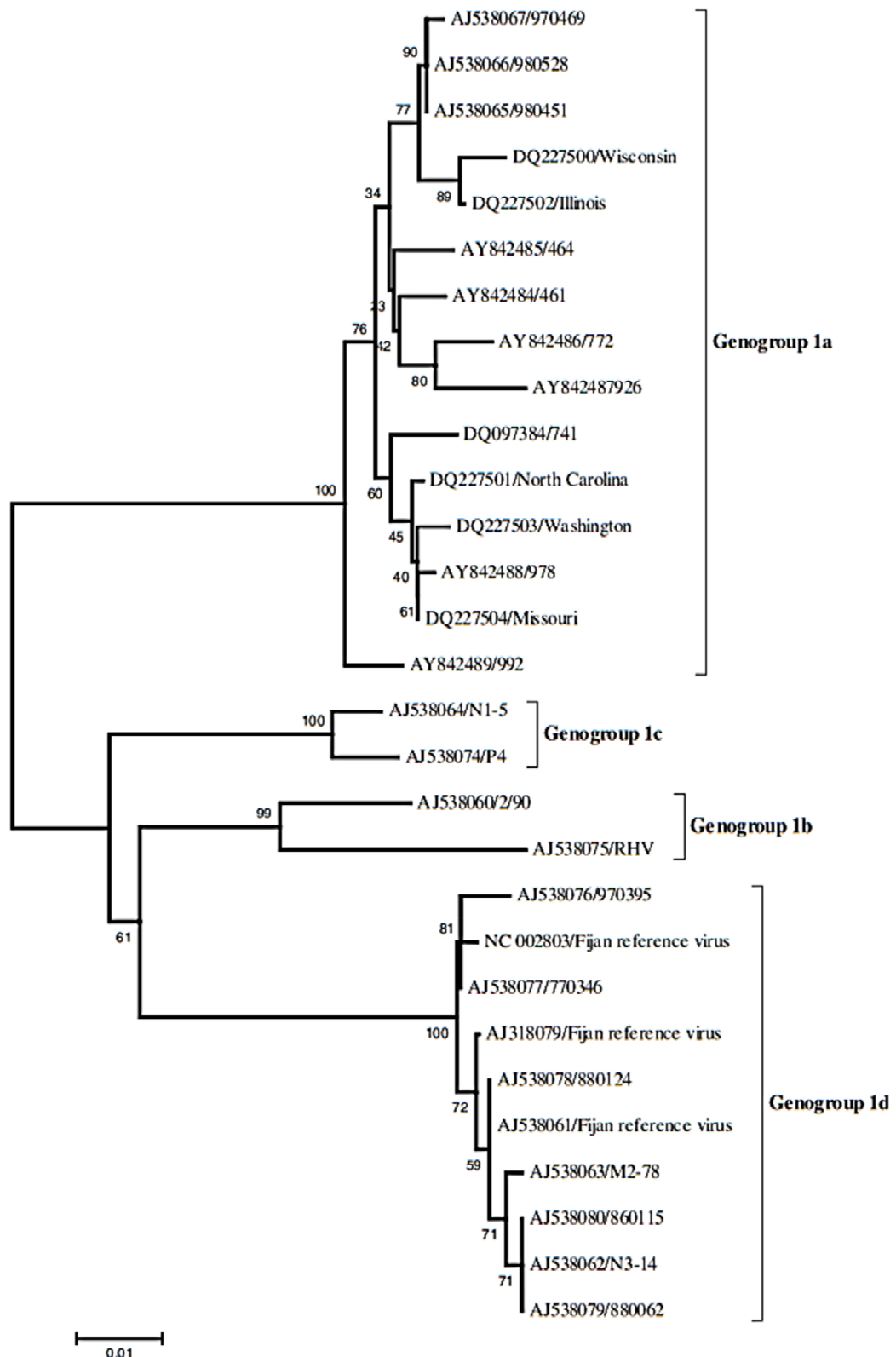
Virus jarní virémie kaprovitých je klasifikovaný jako člen rodiny Rhabdovirů a patří do rodu Vesikulovirů. Genom SVCV je lineární jednořetězcová RNA negativního smyslu. Jarní virémie kaprů způsobená SVCV je akutní hemoragické infekční onemocnění napadající kaprovité, obzvláště kapra obecného (*Cyprinu carpio*) (AHNE *et al.* 2002).

Tato nemoc způsobující vysokou mortalitu je rozšířena v Evropě včetně Ruska, v Americe a části Asie.

Genom SVCV kóduje 5 strukturálních proteinů: nukleoprotein, fosfoprotein, glykoprotein, matrixový protein a virovou RNA-dependentní RNA polymerázu v pořadí 3'-N-P-M-G-L-5' (AHNE *et al.* 2002). N protein interaguje s virovou RNA a společně formují helikální strukturu nukleokapsidy. P protein se spojuje s L a N proteiny, aby společně vytvořily nukleokapsidu Rhabdoviru, která je nutná pro transkripci. Kapsida virionu SVCV ve tvaru střely se skládá z M proteinu, který se také účastní sestavování a pučení viru (AHNE *et al.* 2002). L protein interaguje s P a N proteiny, aby se dosáhlo transkripce a replikace viru. G protein formuje trimerické výběžky na povrchu viru, které se váží na buněčné receptory, které spouští endocytózu viru (AHNE *et al.* 2002). Také nese neutralizující epitopy a je potenciálním cílem pro DNA vakcíny. Doposud G proteiny slouží jako nejdůležitější antigeny k stanovení sérologických vlastností Rhabdovirů (AHNE *et al.* 2002).

Založeno na nukleotidové oblasti 550 u G genů, SVCV izoláty mohou být rozříděny do 4 skupin: Ia, Ib, Ic a Id (STONE *et al.* 2003).

Viry skupiny Ia byly izolovány v Anglii a USA. Skupiny Ib a Ic obsahují viry izolované v Moldávii, Ukrajině a Rusku a skupina Id sestává z virových kmenů izolovaných ve Spojeném království.



Obr. 5 Fylogenetický strom izolátů SVCV ze Spojených států amerických a představitelů genoskupin SVCV založený na 550 nukleotidech G genů použitého k rozřídění SVCV do genoskupin (WARG *et al.* 2007).

SVCV může nakazit mnoho druhů ryb. Přirozené infekce byly pozorovány například u kapra obecného (*Caprinu carpio carpio*), amura bílého (*Ctenopharyngodon idellus*), karasa stříbřitého (*Carassius auratus*), dánia pruhovaného (*Danio rerio*) a dalších.

Propuknutí této nemoci je ovlivněno několika faktory, včetně geografické polohy rybníka/nádrže, věku ryb (měsíc až rok staré) a teploty vody (AHNE 1986).

SVC se obvykle objevuje na jaře a počet případů a procento mortality ryb může dosahovat až 90 %, pokud je teplota vody mezi 10-17 °C (BAUDOY *et al.* 1980).

Studie kapra ukázaly, že několik dospělých ryb bylo infikováno, i když byla teplota nad 17 °C. Mladé ryby mohly být infikovány dokonce při 22-23 °C (AHNE 1986).

Obecně je přenos SVCV horizontální a hlavními biologickými vektory jsou kapřivec plochý (*Argulus foliaceus*) a chobotnatka rybí (*Pisciola geometra*) (AHNE 1985).

Přenašeči latentní infekce a přeživší mohou sloužit jako přirození přenašeči SVCV.

V posledních letech byla propuknutí SVC hlášena u okrasných a divokých ryb v Americe a Evropě, které byly importovány z různých zdrojů včetně Číny. Přesněji řečeno, založeno na fylogenetických datech, 5 virů izolovaných v Americe bylo nahlášeno jako „Asijská větev“, jelikož jejich G geny byly vzdálené od Evropských referenčních vzorků (TENG *et al.* 2005).

## 8. Prevence proti rhabdovirálním onemocněním

Úrovně produkce ryb a jejich frekvence růstu slouží k přibližnému odhadu relativních ekologických a socio-ekonomických dopadů virových onemocnění. Kvůli vysoké mortalitě u chovných ryb a nedostatku specifických léčebných metod nebo proveditelných preventivních metod, jako jsou například vakcíny, podléhají mnohé z těchto onemocnění ohlašovací povinnosti OIE (Office International des Epizooties) a/nebo Evropské Unii.

Nejvýznamnějšími pro možný vývoj vakcín je identifikace specifických proteinů, které jsou cílem pro rybí neutralizující protilátky (NAbs) a/nebo pro některé proteiny, které interferují s rybí imunitní odpovědí (viz Tabulka č. 3).

<b>Virus</b>	<b>Protein</b>	<b>Velikost (~kDa)</b>	<b>Supramolekulární struktura</b>	<b>~ počet na virion</b>
IHNV	Glykosilovaný glykoprotein	65	trimer	300
VHSV	Glykosilovaný glykoprotein	65	trimer	300
SVCV	Glykosilovaný glykoprotein	65	trimer	300

Tabulka č. 3: Virové proteiny identifikované jako cíle pro rybí neutralizující protilátky (NAbs).

Abychom mohli porovnat úspěšnost vakcín, tradičně se vyjadřuje stupeň ochrany jako relativní procento přežití (RPS = relative percent survival) virového onemocnění počítané pomocí tohoto vzorce:  $[1 - (\text{mortalita u očkovaných ryb} / \text{mortalita u neočkovaných ryb})] \times 100$ . Nicméně aby se dala správně interpretovat RPS hodnota, procento kumulativní mortality (CMP = cumulative percent mortality) neočkovaných kontrolních skupin vystavených stejným podmínkám jako očkované ryby, musí být alespoň 60% (KURATH 2008).

Byly zkoumány různé možnosti pro vakcinaci ryb proti rhabdovirálním infekcím zahrnující atenuované kmeny, inaktivovaný virus, podjednotkové vakcíny a DNA vakcíny (LORENZEN & OLESEN 1997; WINTON 1997; LORENZEN & LAPATRA 2005; LORENZEN 1999; LAPATRA *et al.* 1995). Tyto postupy jsou všechny do jisté míry účinné, ale – s výjimkou IHNV DNA vakcíny v Kanadě (SALONIUS *et al.* 2007) – nezískali licenci kvůli obavám týkajících se bezpečnosti, stálosti a také ceny. Aby byly překonány některé obavy z bezpečnosti DNA vakcín, byly vyvinuty nové vektorové konstrukty užívající rybí navozené

promotory (aktivita těchto promotorů je vyvolána přítomností nebo absencí biotického či abiotického faktoru; exprese genů na ně funkčně vázaných tak může být během určitého stádia vývoje organismu nebo tkáně spuštěna či vypnuta) a sebevražedné geny (geny, často mikrobiálního původu, jejichž produkty jsou schopné měnit jinak neškodné látky ve vysoce cytotoxické substance; buňky, do kterých byly tyto geny úspěšně vneseny, zabíjejí v přítomnosti těchto látek samy sebe; M protein IHNV) sloužící k omezení dlouhodobého přežití vakcínové DNA ve svalových tkáních (ALONSO *et al.* 2011, ALONSO *et al.* 2003). Experimentální DNA vakcíny založené na rhabdovirálním G proteinu IHNV, VHSV, HIRRV a SVCV jsou úspěšné u několika různých druhů ryb (ANDERSON *et al.* 1996, LORENZEN *et al.* 1998, TRAXLER *et al.* 1999, EMMENEGGER & KURATH 2008, TAKANO *et al.* 2004). Tyto G proteinové vakcíny vyvolávají brzkou nespecifickou imunitní odpověď, která chrání proti dalším virům, zatímco specifická imunitní odpověď se objevuje později (LORENZEN *et al.* 2002, LAPATRA *et al.* 2001, SOMMERSET *et al.* 2003). G protein slouží jako obranný antigen, ale pouze je-li ve správné konformaci (pro REVIEW čtěte LORENZEN & OLESEN 1997, WINTON 1997). Produkce glykosilovaných a složených G proteinů ve velkém množství je obtížná. Komerční potenciál podjednotkových vakcín je tímto limitován, ale recentní úspěchy se systémy založenými na bakulovirovém expresním systému toto mohou změnit (ENCINAS *et al.* 2011).

Tabulka č. 4 shrnuje komerčně dostupné vakcíny proti Rhabdovirovým onemocněním u ryb.

<b>Virové onemocnění/patogen</b>	<b>Napadené druhy ryb (hlavní)</b>	<b>Primární regiony/země</b>	<b>Komerčně dostupná/é vakcína/y</b>
Infekční hematopoetická nekróza/ IHNV	Lososovití	Kanada/USA (západní)	ANO (APEX-IHN)
Virová hemoragická septikémie/VHSV	Pstruh duhový a obecný, pakambala velká, platýs (Japonsko),	Evropa, Asie	Ne
Jarní virémie kaprů/SVCV	Především kaprovití	Evropa	Ne*
*Dříve dostupná inaktivovaná vakcína, ale již komerčně nedostupná			

Tabulka č. 4: Virová onemocnění u ryb v souvislosti s dostupností vakcín (SOMMERSET *et al.* 2005)

## 8.1 Podání vakcíny

Hlavní bariérou, která brání komercializaci rhabdovirální vakcín, je možnost hromadné vakcinace velkého množství vysoce citlivých malých ryb. Všechny rybí rhabdovirální vakcíny vytvořené do této doby vyžadují manipulaci s jednotlivými rybami (ADELMANN *et al.* 2008).

Vakcíny jsou rybám podávány mnoha různými způsoby včetně orálního podání, postříkem, přímým ponořováním (koupelí) a injekčně. Injekční podání je nejvíce úspěšné, co se týče efektivity, trvání a úrovně ochrany. Dovoluje také přidávání adjuvantů. Má však také řadu nevýhod včetně: stresu během vakcinace, nedá se použít u malých ryb, je velmi pracné a časově náročné. Metoda ponořování do vakcíny je také velmi účinná u některých bakteriálních vakcín, které jsou odvozené od kultur, které byly chemicky inaktivovány (obvykle formalinem) (ROBERTS 2012). Tato metoda je velice levná a jednoduše se dá podávat i malým rybám. Nevýhodné je však potřebné množství vakcíny (SOMMERSET *et al.* 2005). Orální vakcinace je v současné době obecně komerčně používána spíše jako podpůrná vakcinace (např. po předchozím ponořování ve vakcíně) než jako prvořadý typ vakcinace. Velkou výhodou je, že podání tímto způsobem, nezpůsobuje rybám žádný stres. Nevýhodou ovšem je nevyrovnané množství konzumované vakcíny, jelikož každá ryba konzumuje jiné množství potravy. Další nevýhodou jsou potom velká množství vakcíny, kterou musí být ryby krmeny po dlouhou dobu. Ochrana je ve většině případů pouze průměrná. To může být způsobeno destrukcí vakcíny v trávicím traktu (ROBERTS 2012).

## 8.2 Vakcíny proti VHSV a IHNV

VHSV a IHNV genomy ukazují rozdílné sekvence kódující 5 strukturních virových proteinů (N, P, M, G a L proteiny) a nestrukturní (NV) protein.

Jejich genom (3'-N-P-M-G-NV-L-5') je obklopen nukleokapsidovým proteinem N spojeným s RNA dependentní RNA polymerázou, L a P proteiny formujícími replikační komplex.

Studie IHNV a/nebo VHSV s deltovaným NV proteinem ukázala, že NV proteiny jsou potřebné jak pro optimální replikaci v buněčné kultuře, tak pro *in vivo* patogenicitu, ačkoliv mechanismus jejich působení zůstává i nadále neprozkoumán. Přestože VHSV indukuje apoptózu, protein způsobující tento efekt nebyl zatím identifikován (DU *et al.* 2004). U IHNV je induktorem apoptózy M protein (CHIOU *et al.* 2000).

Živé viry atenuované pasážíváním buněk byly nejprve vyvinuty k získání termorezistentního VHSV kmenu a několika IHNV kmenů. Použitím těchto atenuovaných kmenů bylo dosaženo vysokých stupňů ochrany, nicméně jedním z problémů těchto vakcín bylo, že ačkoliv

fungovaly dobře v laboratoři, nefungovaly stejně dobře v praxi. Například, rozdíly v citlivosti ryb k onemocnění způsobily, že bezpečný oslabený vir pro jeden kmen ryb, byl virulentní pro jiný. Další problém se týká jejich bezpečnosti. Živé atenuované VHSV nebo IHNV kmeny nejsou komerčně využívány a to především proto, že jejich frekvence navrácení se k patogennímu divokému typu viru nebyla ještě určena. Současný alternativní postoj navrhuje nové a snad bezpečnější živé rekombinantní VHSV/IHNV kmeny s „knockouty“ je založen na reverzní genetice.

Poté bylo provedeno několik pokusů k získání účinné a bezpečnější vakcíny proti VHSV a/nebo IHNV použitím inaktivovaných virů. Některé z těchto vakcín byly velmi úspěšné. Nicméně, nebyly vyráběny ve velkém měřítku, pravděpodobně kvůli obtížnostem a rizikům spojeným s požadavky na produkci velkého množství živého viru pomocí technik buněčných kultur.

Nástup genetického inženýrství byl další technologickou alternativou jak získat velké množství antigenních virových podjednotek, jako je například G protein. Ačkoliv je známo, že G protein Novirhabdovirů indukuje N-Abs a je zodpovědný za vysoký stupeň ochrany, rekombinantní G protein vykazoval velmi omezenou ochranu.

Všechny tyto neúspěchy mohou být způsobeny komplexem posttranslačního zpracování G proteinu v hostitelských buňkách ryb, které je obtížné napodobit v jiných organismech, obzvláště prokaryotických.

Anderson a kolektiv byli v roce 1996 prvními, kteří ohlásili úspěšné použití DNA vakcíny k ochraně pstruhů duhových před IHNV napadením. Od té doby, DNA vakcíny obsahující G gen IHNV a/nebo VHSV prokázali 70-100 RPS reprodukovatelné ochrany proti napadení imunity po i.m. injekci. Mimo to, DNA vakcíny využívající příslušné G geny byly úspěšné proti jakémukoliv testovanému Novirhabdoviru (VHSV, IHNV a také proti HIRRV) a existuje také DNA vakcína proti mořskému kmenu VHSV, která vykazuje ochranu u platýsů.

U každého z těchto Novirhabdovirů, byla ochrana prokázána s minimálně dvěma různými plazmidovými konstrukty a minimálně ve dvou různých laboratořích. Úspěch těchto vakcín umožnil v roce 2005 povolení DNA vakcíny APEX-IHN, vyráběnou Vical-Aqua Health Ltd. v Kanadě, aby byla testována v praxi v Kanadě během posledních let. Nicméně, kvůli bezpečnostním kritériím jejich komercializace v Evropě ještě nebyla povolena.

### **8.3 Vakcíny proti SVCV**

Již před nějakou dobou bylo prokázáno, že dlouhotrvající imunity a ochrany může být dosaženo i.p. nebo orálními vakcínami kaprů živým virem. Navíc, kapři takto očkovaní živým atenuovaným SVCV si dokáží vyvinout rezistenci vůči reinfekci (AHNE *et al.* 2002).

První virová vakcína pro ryby byla vytvořena československou společností Bioveta v roce 1982. Jednalo se o vakcínu proti Rhabdoviru způsobujícímu jarní virémii kaprovitých (SVC), která byla založena na dvou inaktivovaných kmenech SVC emulgovaných v oleji a podávaných injekčně (RONEN *et al.* 2003).

Podjednotkové vakcíny neprokázaly doposud potřebnou ochranu, což se dá doložit neúspěšným pokusem o komercializaci bakulovirem exprimovaného G proteinu firmou Pharos SA (DIXON 1997). Ani DNA vakcíny zatím neukázaly takovou ochranu a reprodukovatelnost jako ty proti Novirhabdovirům (SOMMERSET *et al.* 2005).

Zatím není zcela jasné, jestli rozdílnost účinností mezi DNA vakcínami u Novirhabdovirů a SVCV je způsobena problémy s pokusnými modely u kaprů nebo jestli je spojena s tím, že SVCV patří do odlišného rodu. Další výzkum je zapotřebí, aby se daly určit ty nejlepší podmínky, dávky, metody podávání vakcín, optimální vektor, adjuvanty a celkově tedy k dosažení lepších výsledků u DNA vakcín (KANELLOS *et al.* 2006).



## 9. Závěr

Mnoho faktorů ovlivňujících užití vakcín (věk ryb, období a teplota) již bylo probráno v předchozích kapitolách. Nicméně, je zde stále mnoho k poznávání, co se týká imunitních odpovědí ryb, než dokonale porozumíme, jak u nich vakcíny pracují. Charakter lokální imunity je záležitostí, na kterou je potřeba se zaměřit a stejně tak nálezy IgT produkujících B buněk v mukosálních oblastech (ZHANG *et al.* 2010). Role CMI (buňkami zprostředkovaná imunita) je stále z větší části neznámá, ačkoliv recentní studie naznačují, že produkce některých cytokinů v mukosálních oblastech (žábrách) může hrát podstatnou roli v ochraně očkovaných ryb (CORRIPIO-MIYAR *et al.* 2009). Toto konkrétně souvisí s případy, kde ochrana existuje i v nepřítomnosti sérových protilátek. Stejně tak, je málo porozuměno virulenčním mechanismům u většiny rybních patogenů, proto je často těžké vytvořit přípravky, které by mohly stimulovat imunitní systém. Avšak byly učiněny obrovské pokroky od doby prvních komerčních vakcín, které dostaly licenci (proti ERM v roce 1976), včetně uvědomění si chovatelů ryb, že vakcinace může hrát významnou roli ve zlepšení zdravotního stavu ryb. Současný výzkum se zaměřuje především na nalezení efektivnějších způsobů podání orálních vakcín pomocí ochrany antigenu enkapsulací polyetylglykolem, mikrosférami řas a liposomy; na produkci podjednotkových a DNA vakcín; vynalezení parazitárních vakcín a zesílení účinku vakcín pomocí adjuvantů.

Tato práce podává ucelený pohled na současné znalosti, které se týkají nejdůležitějších rybních Rhabdovirů. Je zřejmé, že v této oblasti máme již mnoho poznatků, ale pro plné pochopení a vývoj vakcín, bude potřeba tyto znalosti prohloubit.

## Seznam použité literatury

- Acton, R.T., Weinheimer, P.F., Hall, S.J., Niedermeier, W., Shelton, E., Bennett, J.C. (1971): Tetrameric immune macroglobulins in three orders of bony fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68: 107–111.
- Adelmann, M., Köllner, B., Bergmann, S.M., Fischer, U., Lange, B., Weitschies, W., Enzmann, P.-J., Fichtner, D. (2008): Development of an oral vaccine for immunisation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against viral haemorrhagic septicaemia. *Vaccine* 26: 837–844.
- Ahne, W. (1985): *Argulus foliaceus* L. and *Piscicola geometra* L. as mechanical vectors of spring viraemia of carp virus (SVCV). *J. Fish. Dis.* 8: 241–242.
- Ahne, W. (1986): The influence of environmental temperature and infection route on the immune response of carp (*Cyprinus carpio*) to spring viraemia of carp virus (SVCV). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 12: 383–386.
- Ahne, W., Bjorklund, H.V., Essbauer, S., Fijan, N., Kurath, G., et al. (2002): Spring viraemia of carp (SVC). *Dis. Aquat. Organ.* 52: 261–272.
- Akvakultura. *In: Wikipedie: otevřená encyklopedie* [online]. Posl. akt. 29. 7. 2013 [citováno 11. 3. 2014]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Akvakultura>
- Albertini, A., Baquero, E., Ferlin, E., Gaudin, Y. (2012): Molecular and Cellular Aspects of Rhabdovirus Entry. *Viruses* 4: 117–139.
- Alcorn, S.W., Murra, A.L., Pascho, R.J. (2002): Effects of rearing temperature on immune functions in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Fish Shellfish Immunol.* 12: 303–334.
- Alonso, M., Chiou, P.P., Leong, J.A. (2011): Development of a suicidal DNA vaccine for infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Fish Shellfish Immunol.* 30: 815–823.
- Alonso, M., Johnson, M., Simon, B., Leong, J.A. (2003): A fish specific expression vector containing the interferon regulatory factor 1A (IRF1A) promoter for genetic immunization of fish. *Vaccine* 21: 1591–1600.
- Amend, D., Yasutake, W., Mead, R. (1969): A hematopoietic virus of rainbow trout and sockeye. *Trans. Am. Fish. Soc.* 98: 796–804.
- Anderson, E.D., Mourich, D.V., Fahrenkrug, S.C., La Patra, S.E., Shepard, J., Leong, J.C. (1996): Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 5: 114–122.
- Arkoosh, M.R., Kaattari, S.L. (1991): Development of immunological memory in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). I. An immunochemical and cellular analysis of the B cell response. *Developmental and Comparative Immunology* 15: 279–293.
- Batts, W.N., Arakawa, C.K., Bernard, J., Winton, J.R. (1993): Isolates of viral hemorrhagic septicemia virus from North America and Europe can be detected and distinguished by DNA probes. *Dis. Aquat. Organ.* 17: 67–71.
- Birkemo, G.A., Luders, T., Andersen, O., Nes, I.F., NissenMeyer, J. (2003): Hipposin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Journal of Biochemistry, Molecular Biology and Biophysics* 1646: 207–215.
- Bootland, L.M., Leong, J.C. (1999): Infectious hematopoietic necrosis virus. *In: Woo, P.T.K., Bruno, D.W.* (eds.): *Fish diseases and disorders*. CAB International, New York, 3: 57–121.
- Baudouy, A.M., Danton, M., Merle, G. (1980): SVCV infection of Carp (author's transl). *Ann. Rech. Vet.* 11: 245–249.
- Bowden, T.J., Butler, R., Bricknell, I.R., Ellis, A.E. (1997): Serum trypsininhibitory activity in five species of farmed fish. *Fish and Shellfish Immunology* 7: 377–385.

- Bly, J.E., Clem, W. (1992): Temperature and teleost immune functions. *Fish Shellfish Immunol.* 2: 159–171.
- Cain, K.D., Jones, D.R., Raison, R.L. (2000): Characterisation of mucosal and systemic immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using surface plasmon resonance. *Fish and Shellfish Immunology* 10: 651–666.
- Corripio-Miyar, Y., Zou, J., Richmond, H., Secombes, C.J. (2009): Identification of interleukin-22 in gadoids and examination of its expression level in vaccinated fish. *Molecular Immunology* 46: 2098-2106.
- Dinarello, C.A. (1997): Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Review* 8: 253–265.
- Dixon, P. F. (1997): Immunization with viral antigens: viral diseases of carp and catfish. *Dev. Biol. Stand.* 90: 221–232.
- Dixon, P.F., Feist, S., Kehoe, E., Parry, L., Stone, D.M., Way, K. (1997): Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus from Atlantic herring *Clupea harengus* from the English Channel. *Dis. Aquat. Org.* 30: 81-89.
- Drolet, B., Rohovec, J., Leong, J. (1994): The route of entry and progression of infectious haematopoietic necrosis virus in *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): a sequential immunohistochemical study. *J. Fish. Dis.* 17: 337–347.
- Du, C., Zhang, Q., Li, C., Miao, D., Gui, J. (2004): Induction of apoptosis in a carp leucocyte cell line infected with turbot (*Scophthalmus maximus* L.) rhabdovirus. *Virus Res.* 101(2): 119–126.
- Einer-Jensen, K., Ahrens, P., Forsberg, R., Lorenzen, N. (2004): Evolution of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicaemia virus. *J. Gen. Virol.* 85:1167-1179.
- Ellis, A.E. (1988): Optimizing factors for fish vaccination. *In: Ellis, A.E. (ed.): Fish Vaccination*, 1st ed. Academic Press, London, 32–46.
- Ellis, A.E. (2001): Innate host defence mechanism of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology* 25: 827–839.
- Emmenegger, E.J., Kurath, G. (2008): DNA vaccine protects ornamental koi (*Cyprinus carpio koi*) against North American spring viremia of carp virus. *Vaccine* 26: 6415–6421.
- Encinas, P., Gomez-Sebastian, S., Nunez, M., Gomez-Casado, E., Escribano, J., Estepa, A., Coll, J. (2011): Antibody recognition of the glycoprotein g of viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) purified in large amounts from insect larvae. *BMC Res. Notes* 4: 210.
- Evans, D., Jaso-Friedmann, L. (1992): Nonspecific cytotoxic cells as effectors of immunity in fish. *Annual Review of Fish Disease* 2: 109.
- Fischer, U., Utke, K., Somamoto, T., Kollner, B., Ototake, M., Nakanishi, T. (2006): Cytotoxic activities of fish leucocytes. *Fish and Shellfish Immunology* 20: 209–226.
- Fort, P., Albertini, A., Van-Hua, A., Berthomieu, A., Roche, S., Delsuc, F., Pasteur, N., Capy, P., Gaudin, Y., Weill, M. (2011): Fossil rhabdoviral sequences integrated into arthropod genomes: Ontogeny, evolution, and potential functionality. *Mol. Biol. Evol.*, doi:10.1093/molbev/msr226.
- Harmache, A., LeBerre, M., Droineau, S., Giovannini, M., Bre´mont, M. (2006): Bioluminescence imaging of live infected salmonids reveals that the fin bases are the major portal entry of novirhabdoviruses. *J. Virol.* 80: 3655–3659.
- Hilleman, M.R. (2004) Strategies and mechanisms for host and pathogen survival in acute and persistent viral infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 14560–14566.
- Holland, M.C., Lambris, J.D. (2002): The complement system of teleosts. *Fish and Shellfish Immunology* 12: 399–420.

- Chiou, P.P., Kim, C.H., Ormonde, P., Leong, J.A.C. (2000): Infectious hematopoietic necrosis virus matrix protein inhibits host-directed gene expression and induces morphological changes of apoptosis in cell cultures. *J. Virol.* 74: 7619–7627.
- Jakob, E., Barker, D. E., Garver K. A. (2011): Vector potential of the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* in the transmission of infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV). *Dis. Aquat. Org.* 97: 155–165.
- Jones, D.R., Hannan, C.M., Russel-Jones, G.J., Raison, R.L. (1999): Selective B cell non-responsiveness in the gut of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 172: 29–39.
- Kanellos, T., Sylvester, I.D., D’Mello, F., Howard, C.R., Mackie, A., Dixon, P.F., et al. (2006): DNA vaccination can protect *Cyprinus carpio* against spring viraemia of carp virus. *Vaccine* 24: 4927–4933.
- Kileng, O., Brundtland, M.I., Robertsen, B. (2007): Infectious salmon anemia virus is a powerful inducer of key genes of the type I interferon system of Atlantic salmon, but is not inhibited by interferon. *Fish and Shellfish Immunology* 23: 378–389.
- Kurath, G. (2008): Biotechnology and DNA vaccines for aquatic animals. *Rev. Sci. Technol.* 27: 175–96.
- Kurath, G., Garver, K.A., Troyer, R.M., Emmenegger, E.J., Einer-Jensen, K., Anderson, E.D. (2003): Phylogeography of infectious haematopoietic necrosis virus in North America. *J. Gen. Virol.* 84: 803-814.
- Kurath, G., Winton, J. (2008): Fish Rhabdoviruses. *In: Mahy, B.W.J., van Regenmortel, M.H.V. (eds.): Encyclopedia of Virology, 3rd ed. Academic Press, Oxford, UK, 221–227.*
- Winton, J.R. (1997): Immunization with viral antigens: Infectious haematopoietic necrosis. *Dev. Biol. Stand.* 90: 211–220.
- LaPatra, S.E., Corbeil, S., Jones, G.R., Shewmaker, W.D., Lorenzen, N., Anderson, E.D., Kurath, G. (2001): Protection of rainbow trout against infectious hematopoietic necrosis virus four days after specific or semi-specific DNA vaccination. *Vaccine* 19: 4011–4019.
- LaPatra, S.E., Lauda, K.A., Jones, G.R., Walker, S.C., Shewmaker, B.S., Morton, A.W. (1995): Characterization of IHNV isolates associated with neurotropism. *Vet. Res.* 26: 433–437.
- Lie, O., Evensen, O., Sorensen, A., Froysadal, E. (1989): Study on lysozyme activity in some fish species. *Disease of Aquatic Organism* 6: 1–5.
- Lorenzen, N. (1999): Recombinant vaccines: Experimental and applied aspects. *Fish Shellfish Immunol.* 9: 361–365.
- Lorenzen, N., LaPatra, S.E. (1999): Immunity to rhabdoviruses in rainbow trout: the antibody response. *Fish. Shellfish. Immunol.* 9: 345–360.
- Lorenzen, N., LaPatra, S.E. (2005): DNA vaccines for aquacultured fish. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties.* 24: 201–213.
- Lorenzen, N., Lorenzen, E., Einer-Jensen, K., Heppell, J., Wu, T., Davis, H.L. (1998): Protective immunity to VHS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) following DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunol.* 8: 261–270.
- Lorenzen, N., Lorenzen, E., Einer-Jensen, K., La Patra, S.E. (2002): Immunity induced shortly after DNA vaccination of rainbow trout against rhabdoviruses protects against heterologous virus but not against bacterial pathogens. *Dev. Comp. Immunol.* 26: 173–179.
- Lorenzen, N., Olesen, N. (1997): Immunization with viral antigens: Viral haemorrhagic septicaemia. *Dev. Biol. Stand.* 90: 201–209.
- Lumsden, J.S., Morrison, B., Yason, C., Russell, S., Young, K., Yazdanpanah, A., Huber, P., Al-Hussinec, L., Stone, D., Way, K. (2007): Mortality event in freshwater drum *Aplodinotus grunniens* from Lake Ontario, Canada, associated with viral haemorrhagic septicemia virus, type IV. *Dis. Aquat. Org.* 76: 99-111.

- Lumsden, J.S., Ostland, V.E., Byrne, P.J., Ferguson, H.W. (1993): Detection of a distinct gill-surface antibody response following horizontal infection and bath challenge of brook trout *Salvelinus fontinalis* with *Flavobacterium branchiophilum*, the causative agent of bacterial gill disease. *Disease of Aquatic Organism* 16, 21–27.
- Magnadottir, B. (2006): Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology* 20: 137–151.
- Magnadottir, B. (2010): Immunological control of fish diseases. *Journal of Marine Biotechnology* 12: 361–379.
- Manning, M.J., Nakanishi, T. (1996a): Cellular defenses. *In: Iwama, G.K., Nakanishi, T. (eds.): Fish Physiology, XV. The fish immune system. Academic press, London, 159–205.*
- Manning, M.J., Nakanishi, T. (1996b): The specific immune system: cellular defences. Effect of temperature. *In: Iwama, G., Nakanishi, T. (eds.): The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment. Academic Press, San Diego, 15: 183–185.*
- Nikoskelainen, S., Lehtinen, J., Lilius, E.M. (2002): Bacteriolytic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) complement. *Developmental and Comparative Immunology* 26: 797–804.
- Nishizawa, T., Iida, H., Takano, R., Isshiki, T., Nakajima, K., Muroga, K. (2002): Genetic relatedness among Japanese, American and European isolates of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) based on partial G and P genes. *Dis. Aquat. Org.* 48: 143–148.
- Nishizawa, T., Savas, H., Isidan, H., Ustundag, C., Iwamoto, H., Yoshimizu, M. (2006): Genotyping and pathogenicity of viral hemorrhagic septicemia virus from free-living turbot (*Psetta maxima*) in a Turkish coastal area of the Black Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2373–2378.
- Oshima, K.H., Higman, K.H., Arakawa, C.K., de Kinkelin, P., Jorgensen, P.E.V., Meyers, T.R., Winton, J.R. (1993): Genetic comparison of viral hemorrhagic septicaemia virus isolates from North America and Europe. *Dis. Aquat. Org.* 17: 73–80.
- Purcell, M.K., Laing, K.J, Winton, J.R. (2012): Immunity to Fish Rhabdoviruses. *Viruses* 4: 140–166.
- Raja-Halli, M., Vehmas, T.K., Rimaila-Parnanen, E., Sainmaa, S., Skall, H.F., Olesen, N.J., Tapiovaara, H. (2006): Viral haemorrhagic septicaemia (VHS) outbreaks in Finnish rainbow trout farms. *Dis. Aquat. Org.* 72: 201–211.
- Roberts, R.J. (2012): The Immunology of Teleosts. *In: Roberts, R.J. (ed.): Fish Pathology, 4th ed. Wiley-Blackwell, Chichester, 165–166.*
- Roberts, R.J., Rodger, H.D. (2001): The pathophysiology and systematic pathology of teleosts. *In: Roberts, R.J. (ed.): Fish Pathology, 3rd ed. W.B. Saunders, London, 55–132.*
- Robertsen, B. (2006): The interferon system of teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology* 20: 172–191.
- Rokenes, T.P., Larsen, R., Robertsen, B. (2007): Atlantic salmon ISG15: expression and conjugation to cellular proteins in response to interferon, double-stranded RNA and virus infections. *Molecular Immunology* 44: 950–959.
- Rombout, J.H., Huttenhuis, H.B.T., Picchietti, S., Scapigliati, S. (2005): Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. *Fish and Shellfish Immunology* 19: 441–455.
- 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.
- Rose, J. K., Whitt, M. A. (2001): Rhabdoviridae: The viruses and their replication. *In: Fields Virology, 4th ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, USA, 1221–1224.*

- Rucker, R.R., Whipple, W.J., Parvin, J.R., Evans, C.A. (1953): A contagious disease of salmon possibly of virus origin. *US Fish Wildl. Serv. and Fish Bull.* 54: 174-175.
- Sakai, D.K. (1992): Repertoire of complement in immunological defense mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Disease* 2: 223–247.
- Salonius, K., Simard, N., Harland, R., Ulmer, J.B. (2007): The road to licensure of a DNA vaccine. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 8: 635–641.
- Samuel, C.E. (2001): Antiviral actions of interferons. *Clinical Microbiology Review* 14: 778–809.
- Saurabh, S., Sahoo, P.K. (2008): Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research* 39: 223–239.
- Secombes, C.J. (2008): Will advances in fish immunology change vaccination strategies? *Fish and Shellfish Immunology* 25: 409–416.
- Secombes, C.J., Fletcher, T.C. (1992): The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Disease* 2: 53–71.
- Skall, H.F., Slierendrecht, W.J., King, J.A., Olesen, N.J. (2004): Experimental infection of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* with viral haemorrhagic septicaemia virus isolates from European marine and farmed fishes. *Dis. Aquat. Org.* 58: 99-110.
- Snow, M., Bain, N., Black, J., Taupin, V., Cunningham, C.O., King, J.A., Skall, H.F., Raynard, R.S. (2004): Genetic population structure of marine viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV). *Dis. Aquat. Org.* 61: 11-21.
- Sommerset, I., Lorenzen, E., Lorenzen, N., Bleie, H., Nerland, A.H. (2003): A DNA vaccine directed against a rainbow trout rhabdovirus induces early protection against a nodavirus challenge in turbot. *Vaccine* 21: 4661–4667.
- Sommerset, I., Krossoy, B., Biering, E., Frost, P. (2005): Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Rev. Vaccines* 4(1): 89-101.
- Stone, D.M., Ahne, W., Denham, K.L., Dixon, P.F., Liu, C.T., Sheppard, A.M., Taylor, G.R., Way, K. (2003): Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp virus and pike fry rhabdovirus isolates reveals four genogroups. *Dis. Aquat. Org.* 53: 203-210.
- Tafalla, C., Figueras, A., Novoa, B. (2001): Viral hemorrhagic septicemia virus alters turbot *Scophthalmus maximus* macrophage nitric oxide production. *Disease of Aquatic Organism* 47: 101–107.
- Takano, T., Iwahori, A., Hirono, I., Aoki, T. (2004): Development of a DNA vaccine against hiramé rhabdovirus and analysis of the expression of immune-related genes after DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunol.* 17: 367–374.
- Teng, Y., Liu, H., Lv, J.Q., Fan, W.H., Zhang, Q.Y., et al. (2007): Characterization of complete genome sequence of the spring viremia of carp virus isolated from common carp (*Cyprinus carpio*) in China. *Arch. Virol.* 152: 1457–1465.
- Thiery, R., de Boisseson, C., Jeffroy, J., Castric, J., de Kinkelin, P., Benmansour, A. (2002): Phylogenetic analysis of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) isolates from France (1971-1999). *Dis. Aquat. Org.* 52: 29-37.
- Traxler, G.S., Anderson, E., LaPatra, S.E., Richard, J., Shewmaker, B., Kurath, G. (1999): Naked DNA vaccination of Atlantic salmon *Salmo salar* against IHNV. *Dis. Aquat. Organ.* 38: 183–190.
- Troyer, R.M., LaPatra, S.E., Kurath, G. (2000): Genetic analyses reveal unusually high diversity of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout aquaculture. *J. Gen. Virol.* 81: 2823-2832.

- Troyer, R.M., Kurath, G. (2003): Molecular epidemiology of infectious hematopoietic necrosis virus reveals complex virus traffic and evolution within southern Idaho aquaculture. *Dis. Aquat. Organ.* 55: 175-185.
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., Moran, G. (2011): Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinari Medicina* 56: 486-503.
- Vallejo, A.N., Miller, N.W., Clem, L.W. (1991): Phylogeny of immune recognition: processing and presentation of structurally defined proteins in channel catfish immune responses. *Dev. Immunol.* 1: 137-148.
- Weiss, E., Avtalion, R. (1977): Regulatory effect of temperature and antigen upon immunity in ectothermic vertebrates. II. Primary enhancement of antihapten antibody response at high and low temperatures. *Dev. Comp. Immunol.* 1: 93-104.
- Whittington, R.J., Chong, R. (2007): Global trade in ornamental fish from an Australian perspective: the case for revised import risk analysis and management strategies. *Prev. Vet. Med.* 81: 92-116.
- Whittington, R.J., Munday, B.L., Akhlaghi, M., Reddacliff, G.L., Carson, J. (1994): Humoral and peritoneal cell responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to ovalbumin, *Vibrio anguillarum* and Freund's complete adjuvant following intraperitoneal and bath immunisation. *Fish and Shellfish Immunology* 4: 475-488.
- Whyte, S.K. (2007): The innate immune response of finfish - A review of current knowledge. *Fish and Shellfish Immunology* 23: 1127-1151.
- Winton, J.R. (1991): Recent advances in detection and control of infectious hematopoietic necrosis virus in aquaculture. *Annual Rev. Fish. Dis.* 1: 83-93.
- Winton, J.R. (1997): Immunization with viral antigens: Infectious haematopoietic necrosis. *Dev. Biol. Stand.* 90: 211-220.
- Wolf, K. (1988a): *Fish Viruses and Fish Viral Diseases*. Cornell University Press, Ithaca, NY, USA, 476.
- Wolf, K. (1988b): Infectious hematopoietic necrosis virus. *In: Fish Viruses and Fish Viral Diseases*. Cornell University Press, Ithaca, NY, 83-114.
- Yin Z, Lam TL, Sin YM (1997): Cytokine-mediated antimicrobial immune response of catfish, *Clarias gariepinus*, as a defence against *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology* 7, 93-104.
- Zhang, Y., Salinas, I., Li, J., Parra, D., Bjork, S., Xu, Z., LaPatra, S.E., Bartholomew, J., Sunyer, J.O. (2010): IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nat Immunology* 11(9): 827-835.

### **Zdroje obrázkových příloh**

- Obr. 1: Ahne, W., Bjorklund, H.V., Essbauer, S., Fijan, N., Kurath, G., et al. (2002): Spring viremia of carp (SVC). *Dis. Aquat. Organ.* 52: 263.
- Obr. 2: Purcell, M.K., Laing, K.J., Winton, J.R. (2012): Immunity to Fish Rhabdoviruses. *Viruses* 4: 142. Infectious hematopoietic necrosis virus. *In: ViralZone* [online]. Swiss Institute of Bioinformatics. [cit. 2014-1-1]. Dostupné z: <http://viralzone.expasy.org/>.
- Obr. 3: Einer-Jensen, K., Ahrens, P., Forsberg, R., Lorenzen, N. (2004): Evolution of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicaemia virus. *J. Gen. Virol.* 85: 1175.
- Obr. 4: Kurath, G., Garver, K.A., Troyer, R.M., Emmenegger, E.J., Einer-Jensen, K., Anderson, E.D. (2003): Phylogeography of infectious haematopoietic necrosis virus in North America. *J. Gen. Virol.* 84: 807.
- Obr. 5: Warg, J.V., Dikkeboom, A.L., Goodwin, A.E., Snekvik, K., Whitney, J. (2007): Comparison of multiple genes of spring viremia of carp viruses isolated in the United States. *Virus Genes* 35: 92.