Artykuł przeglądowy *Review*

Infekcja herpeswirusa koi karpia

JERZY ANTYCHOWICZ

Zakład Chorób Ryb Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Antychowicz J.

Koicarpi herpesvirus infection

Summary

Since 1998 the new highly contagious carp (Cyprinus carpio) disease caused by koi Herpesvirus (KHV) has spread throughout North America, Asia and Europe. The presence of the disease, which causes huge mortality of common carp and koi carp, was confirmed in many European countries, among others in Poland. The monitoring of KHV infection is needed and the mandatory notification of this disease is also being considered.

Keywords: carp, Herpesvirus

Infekcja herpeswirusa koi karpia – KHV (Koi Herpes Virus) jest chorobą skrzeli i skóry karpia (*Cyprinus carpio*) hodowanego do konsumpcji i potrzeb wędkarstwa oraz karpia kolorowego, tak zwanego koi karpia hodowanego jako ryba ozdobna. Wysoka zaraźliwość herpeswirusa koi karpia oraz duża śmiertelność ryb w przypadku infekcji tym wirusem wzbudza uzasadnione obawy u hodowców karpi na świecie.

Etiologia

Herpeswirus koi karpia jest wirusem DNA należącym do rodziny *Herpesviridae* (12, 18). Według Body i wsp. (2), wirus osiąga rozmiary 150-200 nm. Badaniem elektronomikroskopowym komórek stałej linii komórkowej KF-1 (koi fin 1) zakażonej wirusem KHV stwierdzono obecność patologicznie zmienionych komórek, w których występuje po kilka jąder. Masowe pączkowanie wirionów obserwuje się na powierzchni błon komórkowych. Wiriony te zagłębiają się do wnętrza komórek, pociągając za sobą błonę komórkową. W związku z tym kompletna cząstka wirusa występująca w cytoplazmie komórkowej otoczona jest zmodyfikowaną błoną gospodarza.

Próby zakażenia ryb należących do różnych gatunków wirusem KHV były negatywne, co świadczy o tym, że wirus ten jest patogenny jedynie dla różnych form karpia. Według Hedrick i wsp. (12) i OATA (15), infekcję wirusem charakteryzuje wysoka zachorowalność ryb (duży procent populacji ulega infekcji) oraz duża śmiertelność dochodząca do 80-100% populacji. Wirus przeżywa w wodzie przynajmniej przez 4 godziny (16).

Występowanie w różnych krajach

Choroba występuje u karpi różnym wieku. Ogólnie uważa się, że najbardziej wrażliwe są duże koi karpie należące do cennych ras, aczkolwiek według Perelberg i wsp. (16) wylęg jest bardziej wrażliwy niż ryby dorosłe.

Herpeswirus koi po raz pierwszy opisano w Japonii w 1990 r., później w Izraelu w 1998 r. Nie jest jednak pewne, czy izolaty: japoński i izraelski są identyczne. Od 1998 roku w Europie zaczęto notować masowe śnięcia koi karpi, które, jak się okazało, spowodowane były infekcją KHV. Choroba ta występowała zarówno u ryb importowanych do Europy, jak i ryb, które pochodziły z tarła koi karpia w krajach europejskich (2, 14).

W stanach Zjednoczonych Hedrick i wsp. (12) wykazali obecność wirusa KHV w rozrostach brodawkowatych występujących u koi karpi oraz izolowali go z narządów wewnętrznych tych ryb, stwierdzając, że jest to herpeswirus. Obecność KHV stwierdzono dotąd w następujących krajach: Anglia, Dania, Holandia, Belgia, Niemcy, Włochy, Polska, Izrael, Indonezja, Jawa, Sumatra, Tajwan i USA. Przypuszcza się, że choroba ta występuje również na Filipinach w Japonii i Chinach. W Anglii w 2001 r. zanotowano 3 przypadki KHV, w 2002 r. 36 przypadków tej infekcji (8). Przypadki te rozpoznawano metodą PCR, a w 9 z nich udało się dokonać izolacji wirusa w stałej linii komórkowej KF-1 (8). W Holandii tylko w 2003 r. stwierdzono 12 przypadków infekcji KHV u koi karpi, przy śmiertelności dochodzącej do 100%. Przypadki te identyfikowano metodą PCR i tylko w jednym z nich udało się wyizolować wirusa w hodowli komórkowej. W 2003 r. w Belgii wskutek infekcji KHV doszło do bankructwa dużej hodowli koi karpi (8). W Niemczech infekcja KHV stanowi również poważny problem i jest uważana za jedną z najgroźniejszych chorób karpi (13). W Niemczech do 2002 r. wirus KHV został wyizolowany z 21 przypadków. Badania elektronomikrosko-

powe przeprowadzone w tym kraju potwierdziły, że chodzi tu o herpeswirusa. W 2002 r. w Niemczech stwierdzono 60 przypadków infekcji KHV, głównie u koi karpi różnych grup wiekowych. W kilku przypadkach infekcja dotyczyła również zwykłych karpi. Obecność KHV we Włoszech stwierdzono jedynie metodą PCR (9).

Według informacji ustnej udzielonej autorowi publikacji w 2004 r. (16.06.04 r.) przez Bergmanna i Fichtnera (z Federalnego Centrum do badań wirusowych chorób zwierząt w Niemczech), u karpi importowanych do Niemiec z polskiego obiektu sadzowego usytuowanego na podgrzanych wodach zrzutowych stwierdzono infekcję KHV. Na tej podstawie podejrzewa się, że w krajach wschodniej Europy mogą występować nie rozpoznane dotąd przypadki KHV. Hipoteza ta jest bardzo prawdopodobna, ponieważ w krajach wschodniej Europy znajduje się wiele gospodarstw rybackich, w których hoduje się karpie; niekiedy równocześnie w tym samym stawie zwykłe karpie przebywają razem z koi karpiami i krzyżówkami obu tych odmian. Na uwagę zasługuje fakt, że w ostatnim okresie notuje się wzrost importu koi karpi do krajów wschodnioeuropejskich, czemu towarzyszy wzmożony obrót tymi rybami.

Największymi producentami i eksporterami koi karpi do Europy są Izrael i Japonia. Przypuszcza się, że karpie z tych krajów są pierwotnym źródłem wirusa KHV. Międzynarodowe targi koi karpi organizowane kilkakrotnie w ciągu roku oraz intensywny międzynarodowy obrót tymi rybami, przy braku przepisów weterynaryjnych dotyczących obrotu tymi rybami, stanowi realne zagrożenie zdrowia nie tylko karpi ozdobnych hodowanych w wielu krajach, ale również karpi hodowanych do celów konsumpcyjnych i wędkarskich. Niekontrolowany obrót koi karpiem jest niewątpliwą przyczyną powstawania nowych ognisk infekcji KHV w krajach, gdzie dotąd nie notowano tej choroby. Infekcję tę stwierdza się często w Europie u koi karpi pochodzących z Izraela i z Japonii i u zwykłych karpi pochodzących z Malezji. W krajach zachodniej Europy od 2000 r. notuje się stały wzrost przypadków infekcji KHV.

W sierpniu i wrześniu 2004 r. w Zakładzie Chorób Ryb i Zakładzie Anatomii Patologicznej PIWet.-PIB przeprowadzono badanie karpi z 8 gospodarstw rybackich w kierunku obecności infekcji KHV. W dwóch obiektach, u karpi wykazujących martwicę skrzeli, wynik badania metodą PCR był dodatni (niepublikowane dane).

Czynniki środowiskowe

Największą wrażliwość ryb na infekcję KHV obserwuje się w temperaturach od 22°C do 27°C (OATA 2001). Infekcja KHV występuje najczęściej w temperaturze wody powyżej 20°C, ale poszczególne przypadki tej choroby notowano w zakresie 18°C-29°C. Przy temperaturach powyżej i poniżej tego zakresu objawy choroby ulęgają zahamowaniu. W temperaturze 13°C nie dochodzi do śnięć ryb (z powodu infekcji KHV), natomiast wraz ze wzrostem temperatury od 18°C do 29°C obserwuje się coraz szybszy przebieg choroby. Pora roku nie ma wpływu na występowanie choroby. Infekcje KHV mogą wystąpić również w zimie (13).

Droga zakażenia

Ryby zakażają się przez kontakt za pośrednictwem wody i osadów dennych. Jak dotąd nie stwierdzono nosicielstwa wirusa KHV u innych ryb, poza karpiem.

Patogeneza

Okres inkubacji, licząc czas od umieszczenia ryb chorych wśród zdrowych, do wystąpienia, u tych ostatnich, pierwszych objawów choroby wynosi 4 dni (15, 17). Przypuszczać należy, że pierwotnym miejscem infekcji herpeswirusa są przede wszystkim skrzela. Wirusa tego najczęściej izoluje się w hodowli komórkowej właśnie z tkanki skrzelowej, znacznie rzadziej z nerek.

Śnięcia ryb występują niekiedy już po 24-48 godzinach od wystąpienia pierwszych objawów (11). Ze skrzeli uszkodzonych pierwotnie przez herpeswirusy i w których rozpoczął się już proces martwicy izoluje się różne rodzaje bakterii, takie jak: *Aeromonas sp.*, *Citrobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Micrococcus sp.* i inne (2). Obserwuje się również wtórne inwazje pasożytów (5, 12, 15).

Wtórne zakażenia bakteryjne komplikują pierwotną infekcję herpeswirusa koi i uniemożliwia w wielu przypadkach jego izolację w stałych liniach komórkowych.

Ozdrowieńcy, po wygaśnięciu objawów choroby stają się nosicielami wirusa KHV; nosicielstwo tego wirusa może utrzymywać się ponad 2 lata; niektórzy uważają, że nawet przez całe życie ryby. Stres może spowodować u nosicieli-ozdrowieńców nawrót choroby, której towarzyszyć mogą ograniczone śnięcia (13). Przypuszczać należy, że nosiciele niewykazujący objawów choroby w warunkach stresu stają się głównym źródłem infekcji.

Objawy kliniczne

Chore ryby wykazują objawy letargu, pływają tuż pod powierzchnią wody i gromadzą się przy dopływie wody, wykazując objawy zaburzeń w oddychaniu. Niekiedy przy pływaniu obserwuje się u nich nieskoordynowane ruchy płetw. Często u chorych osobników obserwuje się zwiększone wydzielanie twardniejącego śluzu na skórze (ryc. 1). Po pewnym czasie warstwa nagromadzonego śluzu złuszcza się, pozostawiając odsłonięty rejon szorstkiej skóry. Zwiększone wydzielanie śluzu występuje również w skrzelach; po pewnym czasie w oddechowej części skrzeli pojawiają się białawe ogniska martwicy na tle czerwonej zdrowej jeszcze tkanki (ryc. 2). W końcowym stadium cho-

Ryc. 1. Karp (*Cyprinus carpio*) chory na infekcję KHV, zwiększone wydzielanie twardniejącego śluzu w przedniej części ciała ryby. CEFAS, Weymouth UK

Ryc. 2. Karp (*Cyprinus carpio*) chory na infekcję KHV, ograniczona martwica skrzeli. CEFAS, Weymouth UK

Ryc. 3. Karp (*Cyprinus carpio*) chory na infekcję·KHV, rozległa martwica skrzeli CEFAS, Weymouth UK

roby dochodzi do uogólnionej martwicy tkanki skrzelowej (ryc. 3), która jest główną przyczyną śmierci ryb (2). Niekiedy w trakcie infekcji KHV w skrzelach obserwuje się krwawienie. Ryby chore wykazują często zapadnięcie gałek ocznych.

Infekcja KHV charakteryzuje się ostrym lub podostrym przebiegiem; w obu przypadkach dochodzi do masowych śnięć ryb (7).

Zmiany anatomopatologiczne

Zmiany anatomopatologiczne występują głównie w skrzelach; oprócz tego w niektórych przypadkach obserwuje się zrosty otrzewnej i nierównomierne ukrwienie narządów wewnętrznych (5, 12).

Rozpoznawanie

Wstępne badania diagnostyczne można przeprowadzić przez umieszczenie nowo nabytych karpi lub koi karpi wspólnie z koi karpiami, które były hodowane w warunkach wykluczających ich kontakt z wirusami. W przypadku, gdy u tych wrażliwych (nieuodpornionych na KHV) koi karpi wystąpią objawy typowe dla infekcji tym wirusem, wówczas można wstępnie wysunąć przypuszczenie, że testowane (nowo nabyte) karpie są zakażone KHV.

Zdecydowana większość przypadków infekcji KHV została rozpoznana przy użyciu metody PCR pozwalającej na stwierdzenie obecności fragmentu kwasu nukleinowego herpeswirusa w tkankach zakażonej ryby. Metodę PCR do diagnostyki infekcji herpeswirusa koi karpia opracował jako pierwszy Gilad i wsp. (3, 4); obecnie używana jest również metoda Gray i wsp. (6).

W niewielkim procencie przypadków, w niektórych laboratoriach udało się wyizolować wirusa w stałych liniach komórkowych; w niektórych dodatkowo badano również jego morfologię przy pomocy mikroskopu elektronowego. Przeszkodą w izolacji wirusa KHV w hodowlach komórkowych są wtórne obfite infekcje bakteryjne w zmienionych przez wirusa tkankach ryby. Oprócz tego mały procent udanych izolacji przypisuje się zbyt małej wrażliwości hodowli komórkowych na niektóre szczepy herpeswirusa koi karpia.

Do izolacji herpeswirusa koi karpia poleca się stosować stałą linię komórkową KF-1 sporządzoną z płetw koi karpi i ustaloną przez Hedricka i wsp. (12) oraz CCB sporządzoną z komórek mózgu. Herpeswirusa koi karpia można wyizolować również w stałych liniach komórkowych, takich jak EPC i FHM (2). Linie komórkowe KF-1 i CCB są jednak znacznie bardziej wrażliwe na infekcję herpeswirusa koi karpia (co stwierdzono w temperaturze inkubacji od 22°C do 26°C) niż wymienione linie standardowe.

Materiał do zakażenia hodowli komórkowych sporządza się głównie ze skrzeli, ewentualnie również z nerek ryb, w drugiej kolejności z wątroby, śledziony i mózgu. Zmiany cytopatyczne w hodowlach komórkowych można uzyskać w temperaturze 14°C, 21°C i 28°C. Efekt cytopatyczny w przypadku inkubacji w temperaturze 14°C może wystąpić dopiero po 1 miesiącu, natomiast przy temperaturze 21°C po 2 tygodniach. Optymalną temperaturą dla wzrostu wirusa jest prawdopodobnie temperatura 21°C (2).

Po zakażeniu hodowli komórkowych supernatantem pochodzącym ze śledziony i nerek chorych ryb zmiany cytopatyczne często nie występują. Zmiany cyto-

patyczne w stałych liniach komórkowych KF-1 charakteryzują się tworzeniem syncytiów komórkowych, w których obserwuje się zanik granic między poszczególnymi stykającymi się komórkami. Na peryferiach syncytiów powstają natomiast zwakuolizowane komórki, które odrywają się od hodowli i pływają w płynie odżywczym. Przy użyciu do izolacji wirusa stałej linii komórkowej KF-1 poleca się wykonanie przynajmniej dwóch pasaży, minimum co 2 tygodnie każdy. Pomimo że linia KF-1 jest wrażliwa na infekcję wirusa KHV, to jednak nie zawsze dodatni wynik PCR znajduje potwierdzenie w izolacji wirusa w tej linii.

Zwalczanie

W Izraelu przeprowadzono próby immunizacji karpi na KHV przy pomocy antygenu sporządzonego z inaktywowanych formaliną wirusów, który wstrzykiwano rybom do jamy ciała (9). Immunizacja ta dotąd nie przyniosła spodziewanych rezultatów, gdyż po sześciu tygodniach po iniekcji szczepionki nie stwierdzono u ryb odporności na challange (zakażenie przez kąpiel ryb w zawiesinie wirusa) KHV (9).

Dobre rezultaty osiągnięto w Izraelu stosując metodę uodparniania przez bezpośrednie zakażanie młodych koi karpi od dorosłych chorych ryb przy podwyższonej temperaturze wody i ekspozycji trwającej 5 dni. Uważa się, że po zastosowaniu tej metody ryby stają się całkowicie odporne na infekcję KHV i nie są nosicielami wirusa. Prawdopodobnie nawet po zastosowaniu silnego stresu nie udało się u nich wywołać objawów chorobowych; nie udało się również zakazić od nich innych karpi. Dane te pozostają jednak w pewnej sprzeczności z faktem, że podobnie jak inne infekcje herpeswirusowe, również infekcja KHV pozostaje u ryby często na całe życie, a więc ozdrowieńcy powinni być traktowani jako potencjalne źródło tego wirusa (15) być może przez całe ich życie.

Według Haenen i wsp. (9) i Hartman i wsp. (11), jedyną skuteczną metodą zwalczania infekcji KHV jest likwidacja wszystkich ryb i ikry z zakażonego obiektu oraz przeprowadzenie odpowiedniej dezynfekcji sprzętu zbiorników służących do inkubacji ikry, podchowu wylęgu i tuczu ryb dorosłych według zasad stosowanych przy innych chorobach wirusowych (1). W zakresie profilaktyki proponuje się kwarantannę nowo zakupionych koi karpi, która powinna wynosić 30 dni. W przypadku, gdy w trakcie tej kwarantanny wystąpią u ryb objawy infekcji KHV, należy przeprowadzić u nich badania w kierunku KHV w uznanym laboratorium. W przypadku wyniku dodatniego, ryby należy uśmiercić i odpowiednio utylizować.

Na uwagę zasługuje fakt, że Chiny i Jawa, wyprzedzając decyzje innych krajów, wprowadziły już całkowity zakaz importu koi karpi na swoje terytoria, aby zabezpieczyć się przed wprowadzeniem herpeswirusa koi karpia do swoich obiektów rybackich.

Na dorocznych konferencjach kierowników Krajowych Laboratoriów Referencyjnych krajów Unii Europejskiej, w których bierze udział również przedstawiciel Polski, od kilku lat wyraża się potrzebę stałego monitorowania zakażeń KHV, a oprócz tego rozważa się potrzebę wprowadzenia infekcji herpeswirusa koi karpia na listę chorób objętych obowiązkiem zgłaszania. Wielkość strat, które wywoływane są przez tę chorobę, jak również zaraźliwość herpeswirusa dla karpi w pełni uzasadniają celowość realizacji tego postulatu.

Piśmiennictwo

1. *Antychowicz J.*: Przeżywalność w środowisku wodnym wirusów wywołujących choroby ryb oraz ich zwalczanie. Medycyna Wet. 2002, 58, 99-103.
2. *Body A., Liefring F., Charlier G., Collard A.*: Virus-like particles isolation from koi Suffering Gill Necrosis. Workshop and Third Annual Meeting of EU National Reference Laboratories for Fish Diseases, Aarhus, Denmark 1999, June 9-11.
3. *Gilad O., Yun S., Andree K. B., Adkison M. A.,Zlotkin A., Bercovier H., Eldar A., Herdick R. P.*: Initial characteristics of koi herpesvirus and development a polymerase chain reaction assay to detect the virus in Cyprinus carpio koi. Dis. Aquat. Organ. 2002, 48, 101-108.
4. *Gilad O., Yun S., Adkison M. A., Way K., Willits N. H., Bercovier H., Herdick R. P.*: Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi. J. Gen. Virol. 2003, 84, 2661-2667.
5. *Goodwin A.*: Differential Diagnosis: SVC vs. KHV in Koi. Fish Health Newsletter, AFS/FHS 2003, 31, 9-13.
6. *Gray W. L., Mullis L., La Patra S. E., Groff J. M., Goodwin A.*: Detection of koi herpesvirus DNA in tissue of infected fish. J. Fish Dis. 2002, 25, 171--178.
7. *Haenen O. L. M.*: Fifth Annual Meeting of EU National Reference Laboratories for Fish Diseases. The koi carp herpes virus story a model for introduction of exotic diseases to the EU? Fifth Annual Meeting of EU National Reference Laboratories for fish diseases, Brussels, Belgium 2001.
8. *Haenen O. L. H.*: Koi Herpesvirus – the global situation, EU Workshop on Diagnostic Techniques with Special Emphasis on Carp Diseases, Weymouth, United Kingdom 2003, 2-4 June.
9. *Haenen O. L. M., Schlotfeldt H. J., Hoffmann R., Lieffring F., Bovo G., Ariel E.*: Update of the koi carp herpes virus story since its introduction to the EU. Sixth Annual Meeting of EU National Reference Laboratories for Fish Diseases, Brussels, Belgium 2002.
10. *Haenen O. L. M., Fichter D., Bergmann S., Bovo G., Stagg R., Hellström A., Schyth B. D., Ariel E., Lieffrig F., Tapiowaara H., Rimaile-Pärnänen E., Hoffmann R., Fukuda H., Okamoto N., Way K., Castric J., Csaba G., Gilad O., Ashocelin O.*: EU Workshop on Diagnostic Techniques with Special Emphasis on Carp Diseases, Weymouth, United Kingdom 2003.
11. *Hartman K. H., Yanong P. E. R., Petty B. D., Francis-Floyd R., Riggs A. C.*: Koi Herpes Virus (KHV) disease, Fact Sheet VM-149, Department of Large Animal Clinic Sciences, College of Veterinary Medicine, Florida (2004).
12. *Hedrick R. P., Gilad O., Yun S.*: An herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi Cyprinus carpio. J. Aquatic Anim. Health 2000, 12, 44-57.
13. *Hoffman R. W.*: Koi carp Herpesvirus. KLAN koi magazin. 2001, 2, 61-64.
14. *Olsen N. J., Ariel E., Sielendrecht W.*: Report of the Second Annual Meeting of EU National Reference Laboratories for Fish Diseases, Brussels, Belgium 1998.
15. Ornamental Aquatic Trade Association (OATA). Koi Herpes Virus (KHV). OATA, Westbury, Wilts, UK 2001, 4-33.
16. *Perelberg A., Smirnov M., Hutoran M., Diamant A., Bejerano Y., Kotler M.*: Epidemiological description of a new viral disease afflicting cultured Cyprinus carpio in Israel. Israeli J. Aquacult. 2003, 55, 5-12.
17. *Ronen A., Perelberg A., Abramovitz J., Hutoran M., Tinman S., Bejerano I., Steinitz M., Kotler M.*: Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured Cyprinus carpio. Vaccine 2003, 21, 4625-4743.
18. *Waltzek T. B., Kelley G. O., Yun S. C., McDowell T. S., Hedrick R. P.*: Relationship of Koi Herpesvirus (KHV) to Herpes-like Viruses of Fish and Amphibians. 35th Annual Conf. Internat. Ass. for Aquatic Animal Medicine, Galveston, TX 2004, 35, 16-17.

Adres autora: prof. dr hab. Jerzy Antychowicz, ul. Norwida 3/6, 24-100 Puławy; e-mail: antych@piwet.pulawy.pl