

Najnowsze badania nad etiologią, patogenezą, diagnostyką i zwalczaniem zakażenia karpia wirusem herpes karpia koi

Jerzy Antychowicz

Zakażenie wirusem herpes karpia koi (koi carp herpesvirus – KHV; cyprinid herpes virus-3 – CyHV-3; **ryc. 1**) stanowi ciągle niezwykle ważny problem w Polsce i innych krajach, w których hoduje się karpie pospolite i ozdobne karpie koi (1, 2). Choroba wywołwana przez ten wirus (**ryc. 1, 2, 3, 4, 5**), określana niekiedy skrótem KHVD (koi carp herpesvirus disease), ogranicza w znacznym stopniu produkcję karpie konsumpcyjnych oraz ozdobnych, powoduje duże straty finansowe i jest przyczyną frustracji hodowców, pomimo to brak jest jakichkolwiek postępów w zwalczaniu tej choroby. Słabo kontrolowany obrót żywymi karpiami jest najważniejszym czynnikiem przyczyniającym się do rozprzestrzeniania się wirusa CyHV-3 po całym świecie. Zwalczanie KHVD utrudniają również specyficzne molekularne cechy wirusa i związane z tym trudności w jego rozpoznawaniu, gdy znajduje się on w stadium latencji. W celu podjęcia prób zwalczania tej groźnej choroby niezbędne jest lepsze poznanie przede wszystkim jej etiologii, diagnostyki i patogenezy. To sprawia, że ważne są wyniki najnowszych badań nad wirusami typu herpes występującymi u ryb, a w szczególności dotyczące wirusa CyHV-3.

Ryc. 1. Wirus CyHV-3 w nerkach karpia chorego na zakażenie wirusem herpes karpia koi

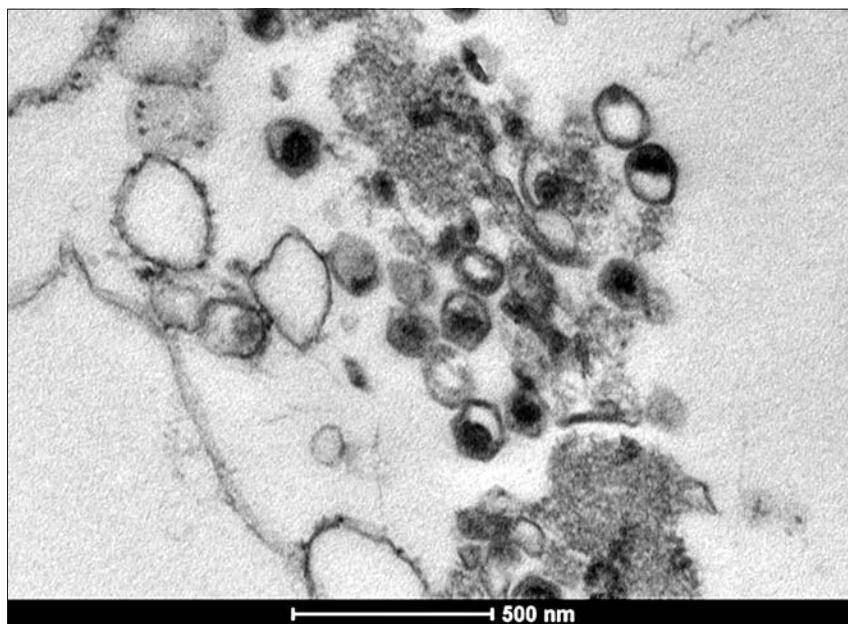
Herpeswirusy należą do rzędu *Herpesvirales*, który podzielono na trzy rodziny: *Herpesviridae* (wirusy ssaków, ptaków i gadów), *Alloherpesviridae* (wirusy płazów i ryb) i *Malacoherpesviridae* (wirusy bezkręgowców; 3). Na uwagę zasługuje fakt, że herpeswirusy ulegały w ciągu długiego czasu ewolucji, która przebiegała równoległe z ewolucją ich gospodarzy. W wyniku tego w wielu przypadkach obserwowano zjawisko wzajemnej adaptacji między

Current investigations on the etiology, pathogenesis, diagnosis and control of CyHV-3 infection in carp

Antychowicz J.

This paper aims at presenting results from current research on CyHV-3 (cyprinid herpes virus-3), infection and at stressing importance of the expanding worldwide disease in common carp and koi carp. Some critical remarks concerning monitoring of CyHV-3 and control of this infection in Europe were presented. It was underscored that the multiple sophisticated diagnostics methods adequate for detection of not only replicating virus but also its latent form and eventually for mutant strains should be implemented in each laboratory involved in CyHV-3 monitoring. Also the measures recommended by EU Commission for controlling this disease in carp should be revised.

Keywords: CyHV-3, monitoring, common carp, koi carp.





Ryc. 2. Zakażenie wirusem herpes karpia koi u dwuletniego karpia, martwica około 50% tkanki skrzelowej



Ryc. 3. Zakażenie wirusem herpes karpia koi u dwuletniego karpia; ogniska martwice skóry, martwica skrzeli



Ryc. 4. Zakażenie wirusem herpes karpia koi u trzyletniego karpia; martwica i złuszczenie się naskórka, martwica około 30% tkanki skrzelowej



Ryc. 5. Eksperymentalne zakażenie wirusem herpes karpia koi u karpia, rozległa martwica naskórka i skóry oraz rogówki oka

określonym herpeswirusem a swoistym dla niego gospodarzem (4). Istnienie zjawiska wzajemnej adaptacji potwierdzono w wielu molekularnych badaniach filogenetycznych, jak również w tym, że w większości przypadków herpeswirusy wykazują umiarkowaną patogenność wobec gospodarzy. Powszechnie uważa się, że ostre postaci choroby o etiologii herpeswirusowej pojawiają się jedynie wówczas, gdy dojdzie do znacznego osłabienia układu odpornościowego gospodarza lub gdy zakażenie wystąpi u nowego, ale wrażliwego gospodarza (5). Do najbardziej znanych chorób ryb wywoływanych przez herpeswirusy należą: herpeswirusowa choroba łososia wywoływana przez wirus SalHV-1, herpeswirusowa choroba jesiotrów wywoływana przez wirus AcHV-1, herpeswirusowa choroba sumików wywoływana przez wirus IchV-1, ospa karpia wywoływana przez wirus CyHV-1, martwica układu krwiotwórczego karasi wywoływana przez wirus CyHV-2, zakażenie wirusem herpes karpia koi wywoływane przez wirus CyHV-3 oraz herpeswirusowa choroba węgorzy wywoływana przez wirus AqHV-1. Porównanie genotypów różnych szczepów CyHV-1, CyHV-2 i CyHV-3, zaliczanych do herpeswirusów ryb karpiojących, wykazało, że

są one blisko ze sobą spokrewnione. Fakt ten wskazuje, że na początku ewolucji ryb karpiojących występował prawdopodobnie jeden wirus-protoplasta, który dał początek istniejącym wspólnie herpeswirusom karpia i karasi. Herpeswirusy ryb ulegały trwającej miliony lat ewolucji, podobnie jak inne herpeswirusy, równocześnie ze swoimi swoistymi gospodarzami, doprowadziła ona do powstania współcześnie występujących gatunków herpeswirusów, wykazujących swoistość dla określonych gospodarzy (6, 7).

Wirus herpes karpia koi (CyHV-3)

Obecnie rozróżnia się trzy linie genetyczne wirusa CyHV-3, a mianowicie izraelską – CyHV-3-I, japońską – CyHV-3-J oraz amerykańską – CyHV-3-U (8). Badania izolatów CyHV-3 pochodzących z Francji, Holandii i Polski wykazały, że w Europie występują trzy linie genetyczne tego wirusa, a mianowicie: I, U i J, i oprócz nich dodatkowa linia genetyczna zajmująca miejsce pośrednie (9). Rakus i wsp. (10) wykazali, że w Europie występuje 7 wariantów genetycznych wirusa CyHV-3: od E1 do E7; podczas gdy w Azji 2 warianty A1 i A2 (11). Analiza genotypu

szczepu CyHV 3 I pochodzącego z Izraela i CyHV3 U pochodzącego z USA wykazała wysoki stopień pokrewieństwa, przy znacznie mniejszym podobieństwie do szczepu CyHV3 J pochodzącego z Japonii. Oznacza to, że szczepy amerykańsko-izraelskie pochodzą od innego herpeswirusa macierzystego niż szczepy azjatyckie. Podejrzuje się ponadto, że karpie koi, które stały się źródłem zakażenia rozprzestrzeniającego się w USA były nosicielami pierwotnie mało patogennego szczepu wirusa, u którego w wyniku delekcji doszło do częściowej redukcji genotypu, który następnie w rezultacie mutacji nabrał ponownie właściwości patogennych (12, 13).

Badania sekwencji nukleotydów w genomach różnych wirusów herpes występujących u różnych gatunków ryb wykazało, że wirus AngHV-1 występujący endemicznie u wolno żyjących węgorzy europejskich jest blisko spokrewniony z herpeswirusami występującymi u ryb karpiojących (CyHV 1–3). Eksperymentalne zakażenia wykazały dodatkowo, że zakażone wirusem AngHV-1 karpie chorują ciężiej niż zakażone tym wirusem węgorze (3). Oprócz tego zaobserwowano, że u węgorzy często występuje latentna forma zakażenia wirusem AngHV-1 i przez dłuższy

czas może nie występować kliniczna forma choroby, jeżeli ryby nie doznają silnego stresu. Na tej podstawie uważa się, że relacje między wirusem AngHV-1 i węgorzami musiały trwać bardzo długo i dlatego mogły doprowadzić do wzajemnej adaptacji. Istnieje również teoria mówiąca, że wirus AngHV-1 jest mutantem szczepu występującego przed milionami lat u ryb karpinowatych.

Występowanie wirusa CyHV-3

Jak już wspomniano, wirus CyHV-3 występuje w Izraelu, USA, Południowej Afryce, Europie oraz w Azji, między innymi w Japonii; niedawno jego obecność wykryto w Korei. Po analizie filogenetycznego drzewa herpeswirusów występujących u ryb okazało się, że szczep wirusa CyHV-3 z Korei znacznie odbiega w zakresie sekwencji nukleotydów od szczepów amerykańskich, izraelskich i japońskich (14). Według Olesena i wsp. (15) na 10 403 gospodarstw karpinowych zarejestrowanych w Europie oficjalnie tylko w 53 stwierdzono ten wirus. Można jednak mieć wątpliwość co do wartości tych danych, jeżeli badania w kierunku obecności tego wirusa przeprowadzane są tylko w 5% gospodarstw karpinowych!

Patogeneza

Zakażenie wirusem herpes karpia koi (KHVD) zostało po raz pierwszy opisane w 1998 r. w Izraelu i w Stanach Zjednoczonych (16). Panuje pogląd, że przyczyną dużej patogenności tego wirusa była mutacja jego szczepów występujących pierwotnie u wolno żyjących pospolitych karpia. Niewątpliwie dużą rolę w powstaniu patogennej mutacji było trwałe obniżenie odporności w licznych populacjach karpia pospolitych i karpia koi hodowanych w Izraelu systemem superintensywnym, przy wielokrotnie większym zagęszczeniu ryb niż to, które stosuje się powszechnie w Europie.

Według Rakus i wsp. (10) genotyp wirusa CyHV-3 jest unikatowy i w grupie herpeswirusów wyróżnia się ekstremalnymi rozmiarami wynoszącymi 295 kb, jak również dużą liczbą genów, które w wielu przypadkach nie mają homologicznych odpowiedników w genach innych herpeswirusów. Genom herpeswirusów występuje w postaci dwuniciowego DNA, którego replikacja przebiega wewnątrz jąder komórek gospodarza. Na początku zakażenia herpeswirusy docierają do jąder komórkowych, a następnie przechodzą w fazę zakażenia latentnego określanego również jako faza spoczynkowa, podczas której kopie wirusowego DNA przybierają postać „minichromosomów”, a genom wirusa jest zintegrowany z genomem komórki

gospodarza, w której się znajduje. W tym okresie replikacja wirusa ustaje, a jego materiał genetyczny nabiera zdolności unikania różnych elementów układu odpornościowego gospodarza. Pod wpływem stresu i obniżenia odporności gospodarza dochodzi do wznowienia replikacji wirusa (18). Wzrost miana wirusa w komórkach karpia i powstające w związku z jego replikacją niszczenie komórek i tkanek doprowadza do wystąpienia objawów chorobowych (19). W większości przypadków w trakcie replikacji wirusa następuje śmierć gospodarza. W przeciwieństwie do innych chorób ryb wywołanych przez herpeswirusy, wyjątkowo w przypadku KHVD, do reaktywacji replikacji wirusa w organizmie ryby i wystąpienia objawów klinicznych wystarczy zwykle stosunkowo niewielki stres (nieopublikowane badania własne). U karpia utajone zakażenie latentne może być aktywowane przez różne czynniki stresowe, przede wszystkim przez odłow, sortowanie i transport, a u tarlaków karpia również manipulacje w okresie przeprowadzania rozrodu lub tarła naturalnego (20, 21). W warunkach terenowych zwykle trudno jest nawet określić, co przyczyniło się do ujawnienia zakażenia w określonym stawie. W przypadku chorób wywołanych przez inne herpeswirusy jedynie silny stres, np. długotrwałe niekorzystne dla ryb zmiany w środowisku zewnętrznym, mogą doprowadzić do wystąpienia objawów chorobowych. Według Xu i wsp. (13) w przypadku zakażeń większością wirusów herpes u ryb nie dochodzi do poważnych śnięć. Wiąże się to zdaniem autorów z wytworzeniem się, na drodze długotrwałej ewolucji, równowagi między układem odpornościowym gospodarza i czynnikami patogenności występującymi u wirusów. W wyniku długotrwałej ewolucji u niektórych herpeswirusów wytworzyła się zdolność do kodowania genów gospodarza. Mechanizm ten pozwala na modyfikowanie określonych elementów układu odpornościowego ryby w taki sposób, że umożliwia to wirusom przebywanie przez długi czas w komórkach gospodarza bez wywoływania u niego objawów klinicznych (22). Na przykład w genomie wirusa KHV są kodowane geny TNFR i IL-10, które mają z kolei zdolność modulowania odporności gospodarza w kierunku dla siebie korzystnym (12).

Najbardziej patogenny wśród herpeswirusów występujących u ryb wirus CyHV-3 szerzy się obecnie w hodowlach karpia pospolitego i karpia koi w Europie, powodując ogromne straty ekonomiczne. Niektóre gospodarstwa rybackie są skutkiem corocznych nawrotów KHVD w skrajnie bankructwa (12). Istnieje pogląd, że wirus odpowiedzialny obecnie za tę chorobę mógł przez wiele lat występować jako

mało patogenny, a więc pozostać niezauważony w populacjach dzikich – wolno żyjących karpia (12). Biorąc pod uwagę nietypowy dla herpeswirusów, często ostry przebieg choroby, nie można jednak wykluczyć, że pierwotnym gospodarzem wirusa wywołującego KHVD mogły być ryby innego gatunku niż karp.

Diagnostyka

Do rozpoznawania obecności wirusa CyHV-3 u bezobjawowych nosicieli czy też wirusowego DNA w stadium latencji należy stosować cały zespół metod, które są w dyspozycji jedynie nielicznych laboratoriów ichtiopatologicznych na świecie. Stawia to pod znakiem zapytania wiarygodność wyników badań przeprowadzanych przez regionalne, słabo wyposażone laboratoria. Trzeba przy tym podkreślić, że wykrycie DNA wirusa CyHV-3 jest niewystarczające, aby stwierdzić, czy w danym przypadku występuje nosicielstwo wirusa przy obecności w organizmie ryby kompletnych wirionów, czy też w komórkach ryby występuje jedynie jego materiał genetyczny. W związku z tym nie jest wiadome, czy ryba może być w tym stadium bezpośrednim źródłem zarażenia innych ryb, czy też dopiero po zadziałaniu stresu, który aktywuje replikację wirusa (23).

Według Eide i wsp. (24) wykrywanie obecności wirusa CyHV-3 w leukocytach przy równoczesnym użyciu techniki PCR i metody Southern blot znacznie zwiększa prawdopodobieństwo wykrycia wirusa w stosunku do stosowania jedynie metody PCR. Zastosowanie metody nested PCR zmniejsza natomiast prawdopodobieństwo mylnego rozpoznania wirusa. Według Bergmana i Schutze (25) jednym z bardzo istotnych elementów diagnostyki KHV jest badanie na obecność we krwi przeciwciał przeciwko CyHV-3. Sekwencjonowanie genomu wirusa jest niezbędne dla określenia, do jakiego szczepu należy i skąd pochodzi. Sekwencjonowanie całego genomu wirusa może również umożliwić wykrycie nowych jego mutacji, o ile pojawią się na określonym terenie. Haenen i Hedrick (26) i inni badacze zwrócili uwagę, że obrót rybami niewykazującymi objawów chorobowych przy braku odpowiednich metod, pozwalających na stwierdzenie obecności wirusa w rybach, gdy jest on w stanie latencji spowodował rozprzestrzenienie się KHV po całym świecie.

Według Bergman i Schutze (25) zbyt mała czułość metod stosowanych do diagnostyki latentnej formy zakażenia KHV u karpia jest podstawową przyczyną uniemożliwiającą zwalczanie tej choroby. Pomimo stosowania nowoczesnej metody PCR równocześnie z metodą nested PCR, obecność wirusa CyHV-3 u ryby można

stwierdzić dopiero gdy jego miano wynosi ponad 102–103 cząstek w 1 ml materiału stanowiącego próbkę. Problem ten częściowo rozwiązuje przetrzymywanie ryb w basenie lub akwarium przez 3–4 dni przy działaniu czynników wywołujących u nich reakcję stresową, przed pobraniem od nich próbek do badań. Uważa się, że w tym czasie miano wirusa w narządach wewnętrznych ryby może wzrosnąć kilkakrotnie. Zdaniem wielu autorów należy jednak przede wszystkim dążyć do stworzenia wystarczająco czulej metody, dzięki której można by wykrywać obecność 5–10 cząstek wirusa w 1 ml homogenizatu sporządzonego z narządów. Właśnie takie miano wirusa występują często w próbkach do badań pobranych od karpia, które są bezobjawowymi nosicielami, co jest przyczyną fałszywie ujemnych wyników badań diagnostycznych.

Inną przyczyną fałszywie ujemnych wyników badań diagnostycznych jest pojawienie się nowych mutacji wirusa różniących się do 5% w zakresie sekwencji par zasad w kwasie nukleinowym od dotychczas izolowanych szczepów wirusów CyHV-3. Mutanty nie mogą bowiem być wykrywane przy użyciu dotąd stosowanych rutynowych metod. Badania prowadzone przez Bergman i Schutze (25) w Holandii i w Anglii wykazały obecność typowych i nietypowych – powstałych w wyniku mutacji izolatów CyHV-3 u ryb europejskich należących do 7 gatunków. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że polecane przez OIE metody laboratoryjne do diagnostyki KHV są zbyt mało czule do wykrywania bezobjawowego nosicielstwa wirusa czy też latentnej formy zakażenia KHV.

Ostatnio oprócz wyżej wymienionych technik diagnostycznych opracowano wiele bardzo czułych metod wykrywania wirusa CyHV-3, genomu tego wirusa czy też przeciwciał swoistych na tego wirusa, które powinny znaleźć zastosowanie w dużych krajowych laboratoriach ichtiopatologicznych. Na uwagę zasługuje między innymi swoisty test RT-PCR na mRNA pozwalający stwierdzić obecność replikującego się wirusa CyHV-3 w tkankach ryb, jak również wirusa replikującego się w hodowlach komórkowych (27). Jak wiadomo ryby, u których następuje replikacja wirusa stają się źródłem zakażenia dla innych ryb.

Przeprowadzenie prawidłowej diagnostyki bezobjawowej czy też latentnej formy zakażenia KHV, która jest niezbędnym warunkiem skutecznego zwalczania tej choroby, wymaga stosowania równocześnie kilku metod diagnostycznych oraz prowadzenia ciągłych badań naukowych dotyczących mutacji herpeswirusów. Warunki takie może spełnić tylko duże centralne laboratorium chorób ryb mające ciągły kontakt ze światowymi ośrodkami zajmującymi się

diagnostyką wirusowych chorób ryb. Dlatego powierzenie badań diagnostycznych w kierunku KHV w Polsce laboratorium wojewódzkim i rozproszenie w ten sposób funduszy na diagnostykę KHVD uważałem zawsze za błędne, co widać szczególnie jasno w świetle przytoczonego powyżej materiału dotyczącego problemów diagnostyki wirusa CyHV-3. Niewłaściwe jest również zezwalanie na przeprowadzanie badań próbek polskich ryb w regionalnych laboratoriach niemieckich. Staje się to źródłem nieporozumień z hodowcami karpia, którzy konfrontują badania przeprowadzane w Polsce, w wiodącej, akredytowanej placówce, uznanej przez Komisję Unii Europejskiej, jakim jest Zakład Chorób Ryb Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach, z badaniami tych samych próbek ryb przesłanych do podrzędnego laboratorium w Niemczech. Zupełnie inną sprawą jest przesłanie materiału, o ile zajdzie taka potrzeba, przez Zakład Chorób Ryb w Puławach do badań odwoławczych do nadrzędnego referencyjnego w zakresie KHVD Referencyjnego Laboratorium w Weimouth w Anglii.

Zwalczanie

Oficjalne instytucje nie posiadają realnych danych dotyczących strat wywołanych przez KHVD na terenie Europy z powodu słabego rozpoznania występowania wirusa CyHV-3 w poszczególnych krajach. Jest to jedna z przyczyn niepodejmowania programów zwalczania KHVD i wybranie drogi biernego oczekiwania na powstanie naturalnej odporności na wirus CyHV-3 w populacjach karpia. W Polsce hodowla karpia odgrywa istotną rolę jako źródło cennego białka, a karpie sprzedawane są już nie tylko w dni świąteczne i nie tylko w obrocie krajowym. W związku z tym KHVD jest przyczyną dotkliwych strat ekonomicznych i stosunkowo wysokiej ceny karpia. Potencjał naukowy i laboratoryjny Zakładu Chorób Ryb Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach, którego kierownikiem byłem przez wiele lat, i w którym uruchomiłem uznane przez Unię Europejską Wirusologiczne Laboratorium Diagnostyki Chorób Ryb, dysponuje wieloma metodami niezbędnymi do prawidłowej diagnostyki wirusa CyHV-3. W związku z tym jest ono przygotowane do prowadzenia krajowego monitoringu różnych form zakażeń tym wirusem. Pomimo tego brak jest w naszym kraju, nawet w skali eksperymentalnej, prób uwolnienia określonych dorzeczy od wirusa CyHV-3. Brak jest również prób analizy źródeł zakażenia w określonych obiektach hodowli karpia w przypadku stwierdzenia wystąpienia choroby. Moim zdaniem rzeczywiste znaczenie innych, poza karpkiem,

ryb i różnych zwierząt wodnych jako źródeł zakażenia w realnych warunkach hodowlanych nie jest do końca wyjaśnione.

Jednak większość hodowców karpia nie jest przekonana co do skuteczności i celowości realizacji oficjalnych programów. Realizacja tego typu programów związana jest bowiem z wprowadzeniem określonej dyscypliny w zakresie obrotu żywymi karpkami, która nie uzyskuje u nich akceptacji. Poza próbami zwalczania KHVD na Węgrzech i w Irlandii w innych krajach europejskich nie podejmuje się oficjalnych akcji uwalniania gospodarstw od KHVD (1). Należy przy tym podkreślić, że zalecane przez Komisję Unii Europejskiej programy nadzorów nad gospodarstwami rybackimi, które polegają głównie na ich lustracji pod kątem wykrywania występowania u karpia objawów klinicznych przy sporadycznych badaniach laboratoryjnych w kierunku obecności u chorych ryb wirusa CyHV-3, uniemożliwiają zwalczanie KHV, a więc mijają się całkowicie z celem. Od wielu lat uważałem, że zalecenia Komisji Unii Europejskiej w zakresie zwalczania KHVD należy zmienić, ale dopiero niedawno podobne zdanie wyrazili czołowi badacze zajmujący się tą chorobą, między innymi Bergman i Schutze (25).

W klimacie umiarkowanym, w którym znajduje się większość gospodarstw karpkowych, wirus CyHV-3 ma zdolność do przeżycia w organizmie ryby, nawet jeżeli uzyskała ona już odporność na tego wirusa. Zjawisko to zaobserwowano zarówno u ryb, które uzyskały odporność po przechorowaniu KHVD, jak i u ryb, które uodporniano przy użyciu szczepionki (28). Jest to jedna z przyczyn (poza czynnikami natury technicznej i finansowej), dlaczego szczepienia ryb na KHVD w dużych karpkowych gospodarstwach europejskich są niecelowe i niemożliwe do przeprowadzenia.

Piśmiennictwo

1. Antychowicz J.: Możliwość zwalczania infekcji wirusa CyHV-3 u karpia (*Cyprinus carpio*). *Komunikaty Rybackie*. 2012, **1**, 25–29.
2. Radosavljević V., Jeremić S., Čirković M., Lako B., Milićević V., Potoniak A., Nikolin V.: Common fish species in polyculture with carp as cyprinid herpes virus 3 carriers. *Acta Veterinaria*, Beograd, 2012, **62**, 675–681.
3. Ueno Y., Kitao T., Chen S.N., Aoki T., Kou G.H.: Characterisation of herpes-like virus isolated from cultured Japanese eels in Taiwan. *Fish Pathol.* 1992, **27**, 7–17.
4. Davison A.J.: Evolution of the herpesviruses. *Vet. Microbiol.* 2002, **86**, 69–88.
5. Pellet P.E., Roizman B.: The family *Herpesviridae*: A brief introduction. W: *Fields Virology*, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2007.
6. Davison A.J.: Channel catfish virus: a new type of herpesvirus. *Virology*. 1992, **186**, 9–14.
7. Waltzek T.B., Kelly G.O., Alfaro M.E., Kuvobe T., Davison A.J., Hedrick R.P.: Phylogenetic relationships in the family Alloherpesviridae. *Dis. Aquat. Org.* 2009, **84**, 179–194.
8. Aoki T., Hirono I., Kurokawa K., Fukuda H., Nahary R., Eldar A., Davison A.J., Waltzek T.B., Bercovier H., Hedrick R.P.: Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging

- disease threatening koi and common carp worldwide. *J. Virol.* 2007, **81**, 5058–5065.
9. Bigarre L., Baud M., Cabon J., Antychowicz J., Bergman S.M., Engelsman M., Prozet F., Reichert M., Castric J.: Differentiation between Cyprinid herpesvirus type-3 lineages using duplex PCR. *J. Virol. Meth.* 2009, **158**, 51–57.
 10. Rakus K., Ouyang P., Boutier M., Rosmans M., Reschner A., Vancsok C., Jazowiecka-Rakus J., Vanderplasschen A.: Cyprinid herpesvirus 3; an interesting virus for applied and fundamental research. *Vet. Res.* 2013, **44**, 1–16.
 11. Kurita J., Yuasa K., Ito T., Sano M., Hedrick R.P., Engelsman M.Y., Haenen O.L.M., Sunatro A.: Molecular epidemiology of koi herpesvirus. *Fish. Pathol.* 2009, **44**, 59–66.
 12. Uchii K., Matsui K., Lida R., Kawabata Z.: Distribution of the introduced cyprinid herpesvirus 3 in a wild population of common carp, *Cyprinus carpio* L.J. *J. Fish. Dis.* 2009, **32**, 857–864.
 13. Xu J.R., Bentley J., Beck L., Reed A., Miller-Morgan T., Heidel J.R., Kent M.L., Rockey D.D., Jin L.: Analysis of koi herpesvirus latency in wild common carp and ornamental koi in Oregon, USA. *J. Virol. Meth.* 2013, **187**, 372–379.
 14. Han J.E., Kim J.H., Renault T., Choresca Jr. C., Shin S.P., Jun J.W., Park S.C.: Identifying the viral genes encoding envelope glycoproteins for differentiation of *Cyprinid herpesvirus* 3 isolates. *Viruses* 2013, **5**, 568–576.
 15. Olesen N.J., Vendamin N., Nikolajsen N.: Overview of the disease situation and surveillance in Europe in 2012. *Report on the 17-th Annual Meeting of the National Reference Laboratories for Fish Diseases*. Copenhagen, Denmark 2013, 11–13.
 16. Bretzinger A., Fischerl-Scherl T., Oumouna M., Hoffman R., Truyen U.: Mass mortality in koi carp, *Cyprinus carpio*, associated with gill and skin disease. *Bull. Eur. Assoc. Fisch. Pathology*. 1999, **19**, 182–185.
 17. Gotesman M., Kattlun J., Bergman S.M., El-Matbouli M.: CyHV-3 the third cyprinid herpesvirus. *Dis. Aquat. Org.* 2013, **105**, 163–174.
 18. Roizmann B.: Herpesviridae, w: Field B.F., Knipe D.M., Hovley P.M., W: *Fields Virology* 2, Lippincott-Raven, Philadelphia 1996, 2221–2230.
 19. Warden Ch., Tang Q., Zhu H.: Herpesvirus BACs: past, present, and future. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, **124595**, 1–16.
 20. Miamoto T., Honjo M.N., Kawabata Z.J.: Seasonal distribution of Cyprinid herpesvirus 3 in Lake Biva, Japan. *Appl. Environm. Microbiol.* 2009, **75**, 6900–6904.
 21. Bergman S.M., Kempter J.: Detection of koi herpesvirus (KHV) after reactivation in persistently infected carp (*Cyprinus carpio*). Raising nonlethal sampling methods. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 2011, **31**, 92–100.
 22. Beurden S.: *Molecular characterisation of the alloherpesvirus Anguilla herpesvirus 1*. Central Veterinary Institute of Wageningen UR, Leysland, Holandia 2012.
 23. St-Hilarie S., Beevers N., Way K., Le Deuff M., Martin P., Joiner C.: Reactivation of koi herpesvirus infection in common carp *Cyprinus carpio*. *Dis. Aqua. Organ.* 2005, **67**, 15–23.
 24. Eide K., Miller-Morgan T., Heidel J.R., Bildfell R.J., Jin L.: Results of total DNA measurement in koi tissue by Koi Herpesvirus real-time PCR. *J. Virol. Methods* 2011, **172**, 81–84.
 25. Bergman S.M., Schutze H.: The koi herpesvirus (KHV): Identification and characterisation of cyprinid Herpesvirus 3 (CyHV-3). *Report on the 17th Annual Meeting of the National Reference Laboratories for Fish Diseases* Copenhagen, Denmark, May 2013, 29–30.
 26. Haenen O., Hedrick R.: Koi herpesvirus workshop. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 2006, **26**, 26–37
 27. Yuasa K., Kurita J., Kawama M., Kiryu I., Oseko N., Sano M.: Development of mRNA-specific RT-PCR for the detection of koi herpesvirus (KHV) replication stage. *Dis. Aquat. Organ.* 2012, **100**, 11–18.
 28. Kucuktas H., Brady Y.J.: Molecular biology of channel catfish virus. *Aquaculture* 1999, **172**, 147–161.

Prof. dr hab. Jerzy Antychowicz,
e-mail: jerzy.antychowicz@gmail.com