

**Andrzej K. Siwicki, Agnieszka Lepa, Elżbieta Terech-Majewska*, Krzysztof Kazuń,
Barbara Kazuń, Edward Głąbski**

Zakład Patologii i Immunologii Ryb Instytutu Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie

***Katedra Epizootiologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie**

Herpeswirus karpia - 3 (CyHV-3): aktualny stan wiedzy oraz wpływ CyHV-3 na nieswoiste humoralne mechanizmy obronne karpia (*Cyprinus carpio* L.)

Nowym zjawiskiem epizootycznym w chowie ryb są różnorodne jednostki chorobowe wywoływane przez wirusy należące do rodziny *Herpesviridae*. U ryb hodowlanych wyizolowano i sklasyfikowano ponad 20 herpeswirusów, które zaliczono do podrodziny *Alphaherpesvirinae*. Zostały one podzielone na grupy w zależności od gatunku, u którego wywołują określone zmiany chorobowe (Ahne i Kurstak 1989, Hanson i in. 2011, Lepa i Siwicki 2012). Do najważniejszych zaliczamy:

- *Cyprinivirus*: herpeswirus karpia -1 (CyHV-1), herpeswirus karpia -2 (CyHV-2), herpeswirus karpia -3 (CyHV-3) nazywany popularnie koi herpes wirus (KHV) oraz herpeswirus węgorza -1 (AngHV-1),
- *Salmonivirus*: herpeswirus łososiowatych -1 (SalHV-1), herpeswirus łososiowatych -2 (SalHV-2) oraz herpeswirus łososiowatych -3 (SalHV-3),
- *Ictalurivirus*: herpeswirus sumowatych -1 (IcHV-1), herpeswirus sumowatych -2 (IcHV-2) oraz herpeswirus jesiotrowatych -2 (AciHV-2).

Herpeswirusy cechują się dużą zmiennością oddziaływania na organizm, z uwagi na różnorodność chorób jakie mogą wywołać u ryb oraz indukują różne postacie chorób: od bezobjawowych zakażeń do ostrych posocznicy z wysoką śmiertelnością. Coraz częściej stwierdza się w badaniach eksperymentalnych onkogenne właściwości herpeswirusów izolowanych od ryb łososiowatych i karpio-watych. Cechą charakterystyczną herpeswirusów izolowanych od ryb jest ich wysoka patogenność, a choroby przez nie wywołane mają charakter posocznicy. W jamie ciała gromadzi się płyn wysiękowy, a narządy wewnętrzne są powiększone, z licznymi ogniskami martwiczymi. U ryb zmiany te stwierdzane są najczęściej w tkance krwiotwórczej nerek, komórkach wątroby, śledziony oraz całym przewodzie pokarmowym. Szczególnie istotne są zmiany martwicze w komórkach skórnych oraz skrzelowych, doprowadzające do masowych śnięć ryb. Zakażone wirusem komórki wykazują charakterystyczne zmiany zwyrodnieniowe, obejmujące rozpad jądra oraz wakuolizację

i rozptylność cytoplazmy (Eide i in. 2011, Hanson i in. 2011, Lepa i Siwicki 2012).

W ostatnich latach pojawiła się w Europie nowa jednostka chorobowa ryb karpio-watych, określana na podstawie objawów klinicznych i zmian anatomopatologicznych, jako zapalenie nerek i martwica skrzelii (carp interstitial nephritis and gill necrosis, CNGN). Towarzyszą jej masowe śnięcia różnych wiekowo ryb (Bretzinger i in. 1999, Haenen i in. 2004). Chorobę zaobserwowano po raz pierwszy już w 1996 roku w Japonii, jednak wtedy nie został wykryty czynnik etiologiczny. Epidemia wystąpiła w 1998 roku w Izraelu, a następnie w Stanach Zjednoczonych, Afryce Południowej oraz kilku państwach Europy (Hedrick i in. 2000, Kotler i in. 2004, Perelberg i in. 2003). W ciągu kolejnych lat choroba rozprzestrzeniła się na całym świecie, prowadząc do dużych strat u karpia hodowlanych i karpia koi.

W latach 2000-2004 Zakład Patologii i Immunologii Ryb Instytutu Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie, we współpracy z Katedrą Epizootiologii podjął zakrojone na szeroką skalę badania, które miały na celu wyjaśnienie przyczyn nasilających się strat w chowie stawowym karpia (Siwicki i in. 2004a). W 2004 roku decyzją dyrektora IRS badania na terenie Polski były prowadzone bezpłatnie, a uzyskane wyniki badań były przedstawione na specjalnie zorganizowanym międzynarodowym sympozjum w Centrum Konferencyjnym UWM w Olsztynie, gdzie problematyka chorób karpia, a szczególnie CyHV-3/KHV była tematem wiodącym (Siwicki i in. 2004b).

W latach 2005-2007 notowano w Polsce masowe śnięcia karpia. Dotyczyły one zarówno narybku, jak i handłówki, a straty w hodowli karpia były znaczące (Antychowicz i in. 2005, Bergmann i in. 2006, Siwicki i in. 2006). Niestety do dnia dzisiejszego choroba wywoływana przez CyHV-3 powoduje w niektórych rejonach Polski duże straty w produkcji materiału obsadowego i ryby towarowej.

Na podstawie podobieństw sekwencji DNA ustalono, że czynnikiem etiologicznym jest wirus należący do rodziny *Herpesviridae*, który zaliczono do nowej grupy i nazwano

cyprini herpes virus -3 (CyHV-3). Został on wyizolowany z nerek chorych ryb przez naukowców z Izraela (Pikarskyi in. 2004, Shapira i in. 2005). Badania molekularne wykazały duże podobieństwo CyHV-3 do KHV (Gilad i in. 2002, Gilad i in. 2003, Pikarskyi in. 2004, Shapira i in. 2005). CyHV-3 lokalizuje się w jądrze i cytoplazmie komórek nabłonka skrzel, komórkach wątroby oraz w limfocytach (Davison 2002, Hutoran i in. 2005).

Źródłem zakażenia są chore ryby. Stwierdzono możliwość przeniesienia zakażenia przez bezpośredni kontakt ryb oraz sprzęt rybacki. Nieznany jest czas aktywności wirusa poza organizmem. Dotychczasowe wyniki badań pozwalają przypuszczać, że utrzymuje swoją aktywność od 4 do 20 godzin w wodzie. Niewiele też wiadomo, jak długo wirus pozostaje aktywny w osadach dennych. Narzuca się pytanie, dlaczego tylko karp hodowlany i koi są podatne na zakażenie tym wirusem. Przypuszcza się, że jest to związane z obecnością odpowiednich receptorów na powierzchni komórek tych ryb. Dlatego też na zakażenie wrażliwe są wszystkie stadia rozwojowe karpia hodowlanych, koi, jak też ich krzyżówki. Ryby młode o masie od 2,5 do 6 g są bardziej wrażliwe niż dorosłe (powyżej 200 g). Obserwacje własne wskazują na fakt, że krzyżówki karpia pospolitego z karpem koi są najbardziej wrażliwe na ten wirus, a straty w hodowli sięgają 90-100%. Niezwykle istotnym czynnikiem warunkującym rozwój zakażenia jest temperatura wody. Warunki optymalne do rozwoju choroby to temperatura 18-25°C. Ale zdarzały się przypadki zachorowań w temperaturze wody 15°C, jak również 28°C. Okres inkubacji choroby wynosi 7-21 dni. W niższej temperaturze przebieg choroby jest znacznie wolniejszy, a w 4°C wirus już się nie namnaża. Również w temperaturze powyżej 30° zostaje zahamowany rozwój CyHV-3. Niezależnie jednak od szybkości przebiegu choroby, zachorowalność wynosi 100%, a śmiertelność dochodzi do 90% (fot. 1).

Wychodząc naprzeciw potrzebom praktyki podjęto w Instytucie Rybactwa Śródlądowego, we współpracy z Katedrą Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej oraz



Fot. 1.

Katedrą Epizootiologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, szereg badań, których celem było:

- doskonalenie metod diagnostyki CyHV-3 z użyciem testu ELISA oraz metod molekularnych z zastosowaniem metod PCR i real time PCR oraz hybrydyzacji *in situ* (Siwicki i in. 2006, Siwicki i in. 2008a),
- wprowadzanie skutecznych metod profilaktyki ogólnej przez opracowanie nowej generacji środków dezynfekcyjnych dla potrzeb rybactwa stawowego,
- stymulowanie nieswoistych mechanizmów obronnych i odporności na CyHV-3 przez stosowanie naturalnych i syntetycznych immunostymulatorów u narybku (preparat Bioimmuno IRS Olsztyn),
- stymulowanie odporności przeciwwirusowej u tarlaków, co ma istotne znaczenie dla poprawienia odporności u potomstwa od nich uzyskanego (Anderson 1992),
- ocena możliwości zastosowania szczepionki importowanej (KOVAX, Izrael) oraz jej skuteczności w warunkach polskich (Ronen i in. 2003, Siwicki i in. 2009b),
- stosowanie preparatów antystresowych przy wszystkich zabiegach hodowlanych u karpia w celu eliminacji negatywnego wpływu stresu polietiologicznego na odporność przeciwważną (Propiscin IRS Olsztyn)
- aktywacja ukierunkowanych badań genetycznych mających na celu określenie linii karpia o najwyższym potencjale odporności na CyHV-3,
- ocena wpływu zabiegów hodowlanych, transportu oraz nieprzestrzegania zasad dobrostanu w chowie karpia na występowanie CyHV-3.

Większość tych kierunków badań jest aktualnie weryfikowana i opracowywana do wdrożenia w praktyce rybactwej, a uzyskane wyniki są bardzo obiecujące (Siwicki i in. 2009b, Siwicki i Terech-Majewska 2010). Dotyczy to szczególnie badań nad skutecznością preparatu Bioimmuno oraz oceny innych immunomodulatorów (Siwicki i in. 2008b, Siwicki i in. 2009a). Szczególnie istotne było opracowanie protokołu prawidłowego postępowania w zakresie pobierania materiału do badań wirusologicznych z zachowaniem podstawowych zasad dotyczących dobrostanu (fot. 2 i 3). Ryby zawsze wprowadzane są w stan znieczulenia ogólnego w celu eliminacji stresu manipulacyjnego, a pobrany materiał badawczy (krew, narządy) pozwala na uzyskanie wiarygodnych i powtarzalnych wyników badań. Pobieranie materiału do badań w warunkach terenowych odbywa się przy zachowaniu ściśle określonych procedur, a wykonanie badań

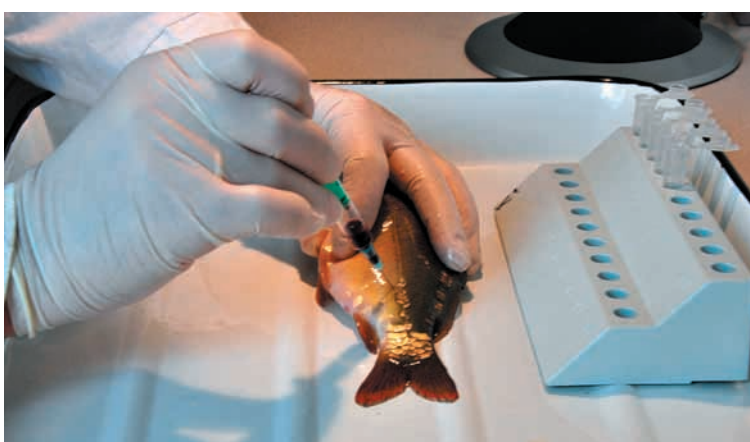
w warunkach laboratoryjnych przy użyciu procedur stosowanych w laboratoriach referencyjnych dotyczących diagnostyki chorób ryb.

Wyniki badań doświadczalnych ze szczepionką importowaną wykazały, że zastosowanie jej w warunkach polskich wymaga wspólnej rozsądnej decyzji hodowców i Państwowej Inspekcji Weterynaryjnej. Szczególnie istotny jest utrudniony dostęp do ryby, która ma być poddana szczepieniu w polskich warunkach klimatycznych oraz wymagania hodowlane w warunkach stawowych. Przedstawione wyniki badań (Siwicki i in. 2009b) wykazały, że efektywność szczepionki jest ściśle uzależniona od temperatury, w której wykonuje się zabieg szczepienia. Jedynym realnym momentem pozwalającym na zastosowanie szczepionki jest odłów lipcówki i jej transport do stawów narybkowych. W tym czasie można wykonać szczepienia szczepionką KOVAX.

Bardzo zaawansowane są badania nad uzyskaniem linii karpia opornych na tę chorobę. Przykładem mogą być eksperymentalne badania prowadzone przez Zakład Ichtobiologii i Akwakultury PAN w Gołyszcu. Uzyskane wyniki badań doświadczalnych, z zastosowaniem zakażeń eksperymentalnych w warunkach laboratoryjnych, wykonane w Zakładzie Patologii i Immunologii Ryb IRS w Żabieńcu wykazały, że istnieją krzyżówki karpia, które posiadają wyższą odporność przeciwko CyHV-3 (Rakus i in. 2009).



Fot. 2.



Fot. 3.

Wpływ CyHV-3 na nieswoiste humoralne mechanizmy obronne u narybku karpia (*Cyprinus carpio*)

Herpeswirus karpia -3 (CyHV-3) wykazuje wysoką patogenność dla karpia i koi karpia. Zmiany lokalizują się w tkance krwiotwórczej nerek, w komórkach śledziony i wątroby powodując w tych narządach charakterystyczne zmiany zwyrodnieniowe, obejmujące rozpad jądra oraz wokuolizację i rozplywność cytoplazmy (Hanson i in. 2011). Niewiele jest danych w dostępnej literaturze dotyczących immunotropowego oddziaływania CyHV-3 u karpia. Jednakże zmiany powodowane przez CyHV-3 w tkance krwiotwórczej nerek oraz śledziony, narządach immunokompetentnych u ryb sugerują, że wirus ten może powodować zaburzenia w prawidłowym funkcjonowaniu leukocytów czy splenocytów, zwłaszcza że badania Eide i in. (2011) sugerują, że u karpia po przechorowaniu wirus utrzymuje się przez dłuższy czas w leukocytach i innych komórkach organizmu. Badania prowadzone przez Siwickiego i in. (2012) wykazały, że CyHV-3 wykazuje w badaniach *in vitro* silne działanie supresyjne, w zależności od temperatury, na

aktywność makrofagów i limfocytów izolowanych z nerki główkowej i śledziony karpia.

Celem badań było określenie wpływu CyHV-3 na nieswoiste humoralne mechanizmy obronne u narybku karpia po eksperymentalnym zakażeniu oraz w warunkach naturalnego zakażenia.

Materiał i metody

Badania doświadczalne przeprowadzono u 200 sztuk narybku karpia o masie ciała 20-25 g, który nie wykazywał zmian chorobowych, a badaniami wirusologicznymi wykluczono obecność CyHV-3 w materiale biologicznym. Po okresie aklimatyzacji do temperatury 2°C ryby poddano eksperymentalnemu zakażeniu w iniekcji dootrzewnowo CyHV-3 izolowanym od chorych karpia w Polsce (0,2 ml; koncentracja wirusa 5×10^2 TCID₅₀ /ml). Rybom grupy kontrolnej (100 szt.) podano w iniekcji PBS w takiej samej objętości. Nerkę oraz krew do badań immunologicznych pobierano w 2, 4 i 6 dniu po eksperymentalnym zakażeniu z żyły ogonowej, po wprowadzeniu ryb w stan znieczulenia ogólnego.

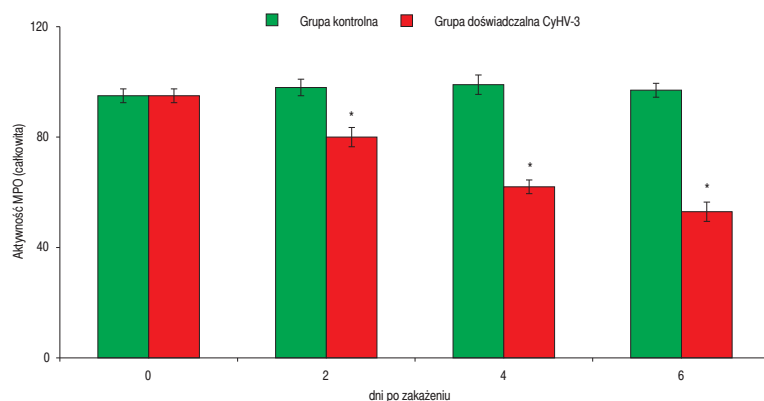
nego preparatem Propiscin (IRS Olsztyn). Z pełnej krwi przygotowywano preparaty do oznaczania mieloperoksydazy w neutrofilach, a następnie po odwirowaniu krwi, w surowicy oznaczano aktywność lizozymu i ceruloplazminy oraz poziom immunoglobulin (Ig). Aktywność mieloperoksydazy (MPO) oznaczano metodą opisaną przez Siwickiego i in. (1993a). Aktywność lizozymu w nerce i surowicy oznaczano metodą turbidymetryczną opisaną przez Siwickiego i Anderson (1993b) oraz aktywność ceruloplazminy metodą spektrofotometryczną (Siwicki i in. 2003). Poziom Ig oznaczano metodą spektrofotometryczną przy użyciu glikolu etylenowego 10000 (Sigma), (Siwicki i Anderson 1993b). Równocześnie w homogenacie z nerki oznaczano aktywność lizozymu wg metody opisanej przez Siwickiego i Anderson (1993b).

Pobierano również krew i nerki od 20 sztuk ryb o masie ciała od 20 do 50 g, pochodzących z gospodarstwa rybackiego, w którym badaniem klinicznym i anatomopatologicznym stwierdzono zmiany wskazujące na rozwój choroby, a badaniem wirusologicznym, przy zastosowaniu wybranej metody PCR stwierdzono obecność CyHV-3 (Siwicki i in. 2006). W pełnej krwi, nerce oraz w surowicy oznaczano te same parametry, co w badaniach eksperymentalnych. Grupę kontrolną stanowiło 20 sztuk narybku pochodzącego z gospodarstwa wolnego od CyHV-3 na podstawie badań ELISA i PCR.

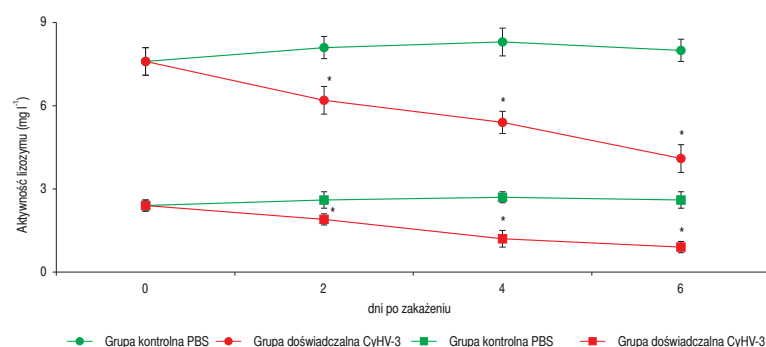
Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej określając wartości średnie, odchylenie standardowe (SD) przy użyciu programu Statistica for Windows 7.1 (Stat-Soft, Inc 2004) oraz istotność różnic na poziomie $P < 0,05$ przy zastosowaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA).

Wyniki i dyskusja

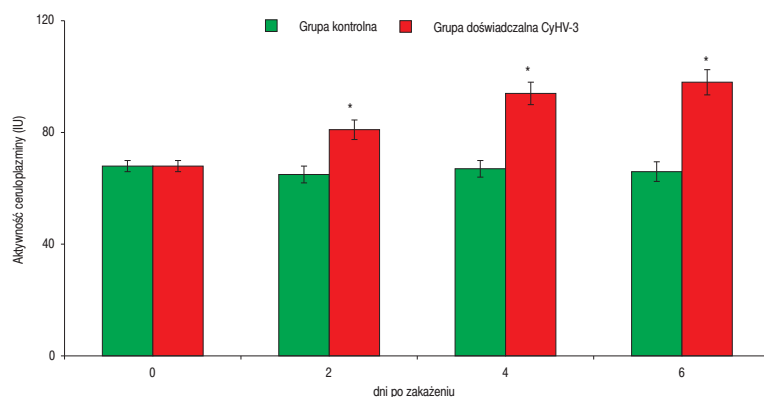
Badania prowadzone w warunkach doświadczalnych wykazały, że CyHV-3 działa silnie supresyjne na nieswoiste humoralne mechanizmy obronne u narybku karpia. Kinetykę zmian w aktywności MPO w neutrofilach krwi po eksperymentalnym zakażeniu karpia wirusem CyHV-3 przedstawiono na rysunku 1, kinetykę zmian w aktywności lizozymu w nerce i surowicy na rysunku 2, kinetykę zmian w aktywności ceruloplazminy w surowicy na rysunku 3, natomiast kinetykę zmian w poziomach Ig na rysunku 4. Już w 2 dniu po zakażeniu obserwowano statystycznie istotny ($P < 0,05$) spadek, w porównaniu z kontrolą, poziomu MPO w neutrofilach oraz aktywności lizozymu zarówno w nerce, jak



Rys. 1. Wpływ wirusa CyHV-3 na aktywność mieloperoksydazy (MPO) w neutrofilach krwi obwodowej po eksperymentalnym zakażeniu karpia ($n=10$, $x \pm SD$, *statystycznie istotne różnice, $P \leq 0,05$).

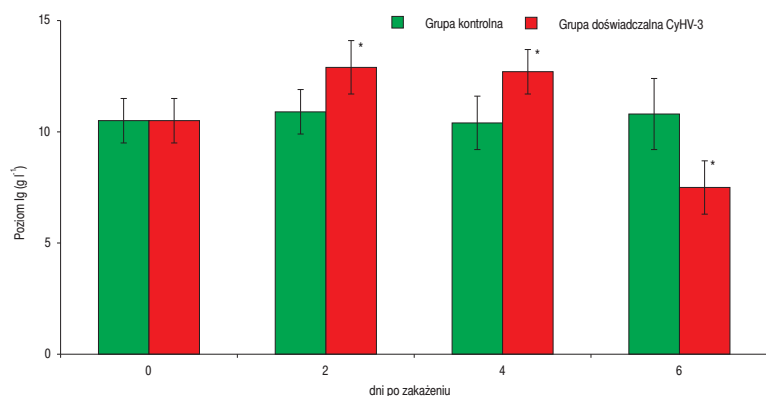


Rys. 2. Wpływ wirusa CyHV-3 na aktywność lizozymu w nerce (—●—) oraz w surowicy (—■—) po eksperymentalnym zakażeniu karpia ($n=10$, $x \pm SD$, *statystycznie istotne różnice, $P \leq 0,05$).



Rys. 3. Wpływ wirusa CyHV-3 na aktywność ceruloplazminy w surowicy po eksperymentalnym zakażeniu karpia ($n=10$, $x \pm SD$, *statystycznie istotne różnice, $P \leq 0,05$).

i w surowicy, a obniżone wartości utrzymywały się do końca doświadczenia (dzień 6). Natomiast od 2 dnia po zakażeniu obserwowano statystycznie istotny wzrost ($P < 0,05$) aktywności ceruloplazminy w porównaniu z grupą kontrolną (ryby nie zakażone wirusem). Również w 2 i 4 dniu po zakażeniu stwierdzono statystycznie istotny wzrost poziomu Ig, ale już w 6 dniu obserwowano statystycznie istotny spadek tego parametru. Potwierdzeniem wstępnych obserwacji



Rys. 4. Wpływ wirusa CyHV-3 na poziom immunoglobulin (Ig) w surowicy po eksperymentalnym zakażeniu karpia (n=10, x±SD, *-statystycznie istotne różnice, P≤0,05)

w warunkach eksperymentalnych były badania wykonane u karpia z hodowli stawowej, u których obserwowano zmiany chorobowe, a badaniem wirusologicznym stwierdzono występowanie CyHV-3. U badanych ryb obserwowano statystycznie istotnie (P<0,05) niższy poziom mieloperoksydazy w neutrofilach oraz niższą aktywność lizozymu w nerce oraz surowicy (tab. 1). Aktywność ceruloplazminy była statystycznie istotnie wyższa w porównaniu z grupą ryb wolnych od CyHV-3. Natomiast poziom Ig w tym okresie badań był również niższy w porównaniu z grupą kontrolną.

TABELA 1

Kształtowanie się aktywności MPO w neutrofilach, aktywności lizozymu w nerce i surowicy, aktywności ceruloplazminy oraz poziomu Ig w surowicy u narybku karpia pochodzącego z hodowli stawowej, u którego stwierdzono zmiany chorobowe i potwierdzono badaniem PCR obecność CyHV-3 oraz u ryb zdrowych (wartości średnie SD; n = 20; * istotność różnic na poziomie P<0,05)

Oznaczone parametry	Ryby zdrowe	Ryby chore
Aktywność mieloperoksydazy w neutrofilach (całkowity)	98 ± 2,5	62 ± 3,5*
Aktywność lizozymu w nerce (mg l ⁻¹)	9,6 ± 0,7	3,4 ± 0,8*
Aktywność lizozymu w surowicy (mg l ⁻¹)	2,3 ± 0,3	0,9 ± 0,2*
Aktywność ceruloplazminy (IU)	62 ± 3,5	97 ± 4,5*
Poziom Ig w surowicy (g l ⁻¹)	11,5 ± 0,6	4,8 ± 1,4*

Siwicki i in. (2012) podjęli badania nad określeniem *in vitro* wpływu CyHV-3 na aktywność makrofagów i limfocytów po inkubacji komórek w temperaturach: 16°C, 18°C, 22°C i 28°C. Uzyskane wyniki badań jednoznacznie sugerują, że CyHV-3 upośledza funkcjonowanie makrofagów oraz limfocytów, które odpowiedzialne są za prawidłowe funkcjonowanie nieswoistych mechanizmów obronnych i determinują swoistą odpowiedź immunologiczną u ryb. Szczególną rolę w odporności przeciwwirusowej przypisuje się makrofagom, które wykazują bezpośrednią cytotoksyczność wobec zakażonych komórek, niezależnie od swoistych przeciwciał ani obecności składników dopełniacza. Makrofagi hamują replikację wirusa w komórkach wydzielając argininazę, która interferuje z wykorzystaniem arginy

przez cząsteczki wirusa. Limfocyty T pełnią również bardzo istotną rolę w odporności przeciwwirusowej dzięki zdolności do zabijania komórek zakażonych wirusem. Prezentowane przez Siwickiego i in. (2012) wstępne badania wskazują, że CyHV-3 posiada silne działanie immunotropowe, szczególnie upośledzając funkcję makrofagów i limfocytów u karpia. Potwierdzają to badania własne, w których obserwowano silne działanie negatywne CyHV-3 na leukocyty obniżające poziom MPO w neutrofilach oraz na produkcję lizozymu w nerce i surowicy. Oznaczone parametry stanowią istotny element nieswoistej odporności humoralnej u ryb. Równocześnie początkowy wzrost poziomu Ig oraz jego gwałtowny spadek w 6 dniu po zakażeniu sugeruje, że badany wirus upośledza funkcję komórek produkujących przeciwciała (ASC), do których zaliczamy komórki plazmatyczne. Wzrost aktywności ceruloplazminy, bardzo ważnego białka ostrej fazy u ryb, świadczy o silnym działaniu negatywnym wirusa na aktywność hepatocytów. Uzyskane wyniki badań jednoznacznie sugerują, że badany CyHV-3 wykazuje silne działanie immunotropowe powodując upośledzenie produkcji substancji o bardzo istotnym znaczeniu dla nieswoistych humoralnych mechanizmów obronnych. Natomiast kształtowanie się kinetyki zmian w aktywności ceruloplazminy może być wykorzystane do wczesnego wykrywania zakażenia oraz monitorowania przebiegu choroby wywołanej przez CyHV-3 u karpia.

Literatura

- Ahne W., Kurstak E. 1989 – Viruses of Lower Vertebrates – Spring-Verlag New York: 141-168.
- Anderson D.P. 1992 – Immunostimulants, adjuvants and vaccine carriers in fish: Applications to aquaculture – Annu. Rev. Fish Dis. 2: 281-307.
- Antychowicz J., Reichert M., Matras M., Bergmann S., Haenen O. 2005 – Epidemiology, pathogenicity and molecular biology of koi herpesvirus isolated in Poland – Bull. Vet. Inst. Pulawy, 49: 367-373.
- Bergmann S.M., Kempter J., Sadowski J., Fichtner D. 2006 – First detection, confirmation and isolation of koi herpesvirus (KHV) in cultured common carp (*Cyprinus carpio* L.) in Poland – Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 26: 97-104.
- Bretzinger A., Fisher-Scherl T., Oumouma M., Hoffann R., Truyen U. 1999 – Mass mortalities in koi carp, *Cyprinus carpio*, associated with gill and skin disease – Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 19: 182-185.
- Davison A. 2002 – Evolution of the herpes viruses – Vet. Microbiol. 86: 69-88.
- Eide K.E., Miller-Morgan T., Heidel J.R., Kent M.L., Bildfell R.J., Lapatra S., Watson G., Jin L. 2011 – Investigation of koi herpesvirus (KHV) latency in koi – J. Virol. 85: 4954-4962.
- Gilad O., Yun S., Andree K., Adkinson M., Zlotkin A., Bercovier H., Hedric R. 2002 – Initial characteristics of koi herpesvirus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio koi* – Dis. Aquat. Org. 48: 101-108.
- Gilad O., Yun S., Adkinson A., Way K., Willits N., Bercovier H., Hedric R. 2003 – Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi – J. Gen. Virol. 84: 2661-2668.
- Haenen O., Way K., Bergmann S., Ariel E. 2004 – The emergence of koi herpesvirus and its significance to European aquaculture – Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 24: 293.
- Hanson L., Dishon A., Kotler M. 2011 – Herpesviruses that infect fish – Viruses 3: 2160-2191.

- Hedrick R., Gilad O., Yun S., Spangenberg J. 2000 – A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp – *J. Aquat. Anim. Health* 12: 44-57.
- Hutoran M., Ronen A., Perelberg A., Ilouze M., Dishon A., Bejerano I., Chen N., Kotler M. 2005 – Description of an as yet unclassified DNA virus from diseased *Cyprinus carpio* species – *J. Virol.* 79: 1983-1991.
- Kotler M., Ronen A., Levavi-Sivan B., Hutoran M., Shapira Y., Steinitz M., Perelberg A., Pikarsky E. 2004 – Prevention of a mortal disease of carps induced by the carp interstitial nephritis and gill necrosis virus (CNGV) – International Workshop on KOI Herpesvirus, London.
- Lepa A., Siwicki A.K. 2012 – Fish herpesvirus diseases: a short review of current knowledge – *Acta Vet. Brno* – złożone do druku.
- Perelberg A., Smirnov M., Hutoran M., Diamant A., Bejerano Y., Kotler M. 2003 – Epidemiological description of a new viral disease afflicting cultured *Cyprinus carpio* in Israel – *Isr. J. of Aquac.* – *Bamidgeh* 55: 5-12.
- Pikarsky E., Ronen A., Levavi-Sivan B., Hutoran M., Shapira Y., Steinitz M., Perelberg A., Soffer D., Kotler M. 2004 – Pathogenesis of acute viral disease induced in fish by carp interstitial nephritis and gill necrosis virus – *J. Virol.* 78: 9544-9551.
- Rakus K., Wiegertjes G.F., Adamek M., Siwicki A.K., Lepa A., Imazarow I. 2009 – Resistance of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to Cyprinid herpesvirus – 3 is influenced by major histocompatibility (MH) class II B gene polymorphism – *Fish and Shellfish Immunol.* 26: 737-743.
- Ronen A., Perelberg A., Abramovitz 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.
- Shapira Y., Magen Y., Zak T., Hulata G., Levavi-Sivan B. 2005 – Differential resistance to koi herpes virus (KHV)/carp interstitial nephritis and gill necrosis virus (CNGV) among common carp (*Cyprinus carpio* L.) strains and crossbreds – *Aquaculture* 245: 1-11.
- Siwicki A.K., Anderson D.P., Antychowicz J. 1993a – Nonspecific defence mechanisms assay in fish I. Phagocytic index, adherence and phagocytic ability of neutrophils (NBT test) and myeloperoxidase activity test – *Fish Disease Diagnosis and Preventions Methods.* Wyd. IRS Olsztyn: 95-103.
- Siwicki A.K., Anderson D.P. 1993b – Nonspecific defence mechanisms assay in fish II. Potential killing activity of neutrophils and monocytes, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin (Ig) level in serum – *Fish Disease Diagnosis and Preventions Methods.* Wyd. IRS, Olsztyn: 105-111.
- Siwicki A.K., Zakęś Z., Trapkowska S., Terech-Majewska E., Czerniak S., Głąbski E., Kazuń K. 2003 – Nonspecific cellular and humoral defence mechanisms in pikeperch (*Sander lucioperca*) grown in a intensive system of culture – *Arch. Pol. Fish.* 11: 207-212.
- Siwicki A., Terech-Majewska E., Daczka A., Trapkowska S., Kazuń B. 2004a – Choroby wirusowe ryb. Herpeswirusy – nowe zagrożenie w hodowli karpia – *Komun. Ryb.* 4: 16-18.
- Siwicki A., Terech-Majewska E., Daczka A., Trapkowska S., Kazuń B. 2004b – Herpeswirusy a szczególnie Koi herpes wirus (KHV) – nowe zagrożenie w hodowli karpia – Konferencja Ochrona zdrowia ryb – aktualne problemy Wyd. IRS, Olsztyn: 31-38.
- Siwicki A.K., Lepa A., Małaczewska J., Kazuń B., Kazuń K., Terech-Majewska E. 2006 – Isolation and identification of carp interstitial nephritis and gill necrosis virus (CNGV) in fingerling common carp (*Cyprinus carpio* L.) – *Arch. Pol. Fish.* 14: 157 – 167.
- Siwicki A.K., Lepa A., Małaczewska J., Terech-Majewska E., Kazuń K. 2008a – Isolation and identification of cyprinid herpes virus 3 (CyHV-3) in common carp (*Cyprinus carpio*) and goldfish (*Carassius auratus*) in pond culture – *Aquaculture Europe 08 Kraków*: 602-603.
- Siwicki A.K., Kazuń B., Głąbski E., Kazuń K., Terech-Majewska E. 2008b – Influence of methisoprinol on the CyHV-3 replication – *in vitro* study – International Workshop on CyHV-3 (KHV), Hebrew University of Jerusalem: 31.
- Siwicki A.K., Kazuń B., Kazuń K., Lepa A., Głąbski E., Terech-Majewska E. 2009a – Effect of methisoprinol on the nonspecific cellular and humoral defence mechanisms and protection against CyHV-3 in fingerling of common carp (*Cyprinus carpio*) – 14th EAAP International Conference, Prague: 140-141.
- Siwicki A.K., Kotler Y., Terech-Majewska E., Kazuń K., Głąbski E., Kazuń B. 2009b – Ocena skuteczności szczepionki przeciwko CyHV-3 u narybku karpia (*Cyprinus carpio* L.) – badania doświadczalne – *Komun. Ryb.* 5: 2-4.
- Siwicki A.K., Terech-Majewska E. 2010 – Choroby wirusowe karpia: zapalenie nerek i martwica skrzelii wywołane przez CyHV-3 oraz koi herpeswirusa (KHV) – diagnostyka i zwalczanie w Unii Europejskiej – *Choroby Ryb Podlegające Obowiązкови Zwalczania*, Wyd. IRS, Olsztyn 2010: 33-44.
- Siwicki A.K., Kazuń K., Kazuń B., Majewicz-Zbikowska E. 2012 – Influence of herpesvirus CyHV-3 develop interstitial nephritis and gill necrosis on the macrophage and lymphocyte activity of carp (*Cyprinus carpio*) – *Arch. Pol. Fish.* – w druku.

Przyjęto po recenzji 29.03.2012 r.

CYPRINID HERPESVIRUS-3 (CYHV-3): CURRENT STATE OF KNOWLEDGE AND IMPACT OF CYHV-3 ON INNATE HUMORAL IMMUNITY IN CARP (*CYPRINUS CARPIO* L.)

Andrzej K. Siwicki, Agnieszka Lepa, Elżbieta Terech-Majewska, Krzysztof Kazuń, Barbara Kazuń, Edward Głąbski

ABSTRACT. The cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3), genus Cyprinivirus, family Alloherpesviridae, order Herpesvirales, is the etiological agent of a lethal disease in common carp (*Cyprinus carpio*) and koi carp (*Cyprinus carpio koi*). Since its emergence in the early twenty-first century, diseases induced by CyHV-3 caused severe economic losses in common carp in Poland. The Inland Fisheries Institute in Olsztyn with the Faculty of Veterinary Medicine University of Warmia and Mazury in Olsztyn developed several methods for diagnosing and preventing CyHV-3 in carp culture. This study focuses on the impact of CyHV-3 on nonspecific humoral defense mechanisms following experimental infection and in pond culture. The results indicated that CyHV-3 decreases myeloperoxidase levels in neutrophils, lysozyme activity in pronephros and serum, and total immunoglobulin (Ig) levels in serum. The ceruloplasmine activity was statistically higher in sick carp as compared to the control carp that were free of CyHV-3. The present results suggest that CyHV-3 decreases the neutrophils, macrophages, and lymphocytes activities to produce nonspecific humoral factors.

Keywords: carp, CyHV-3, innate humoral immunity