

ORIGINALAN NAUČNI RAD – ORIGINAL SCIENTIFIC PAPER

UDK 597.555.3.09:578.825

KOI HERPESVIRUSNO OBOLJENJE ŠARANA*
KOI HERPESVIRUS DISEASE IN CARP

Svetlana Jeremić, V. Radosavljević**

Oboljenje koi šarana (*Cyprinus carpio koi*) i običnog šarana (*Cyprinus carpio carpio*), izazvano herpes virusom, praćeno visokim mortalitetom, od 1998. godine je zahvatilo mnoge ribnjake širom sveta, izazivajući masovna uginuća i značajne finansijske gubitke. Virus nalik herpes virusima, nazvan koi herpesvirus (KHV) izolovan je i identifikovan iz koi i običnog šarana tokom pojavljivanja masovnih uginuća. Prva pojava bolesti sa visokim mortalitetom običnog i koi šarana izazvana koi herpesvirusom (KHV) opisana je 1998. godine u Izraelu i SAD. Od tada je potvrđen veći broj slučajeva izbijanja ovog oboljenja širom sveta, uključujući SAD, Izrael i veliki broj evropskih zemalja. Uginuća su se javljala sezonski, krajem proleća i početkom jeseni, kada je temperatura vode od 18 do 28°C. Najznačajniji faktor spoljašnje sredine koji utiče na pojavu i težinu bolesti je temperatura vode. Trenutno se ovo oboljenje smatra jednim od činilaca koji predstavlja najveću opasnost za populacije običnog i koi šarana. Obolele ribe su dezorijentisane, nekoordinisanih pokreta, ubrzanog disanja, otečenih škraga i sa lokalnim kožnim lezijama. Virus je izolovan iz tkiva obolelih riba i kultivisan na KF-1 (koi fin cells) ćelijskoj liniji. Elektronskom mikroskopijom su uočene virusne čestice identične virusima iz familije Herpesviridae. Analizom polipeptida viriona i DNK utvrđene su razlike između KHV i ranije poznatih herpes virusa ciprinida, Herpesvirus cyprini (CHV) i virusa kanal-skog somića (Channel catfish virus – CCV).

U 2004. i 2005. godini utvrđen je visok mortalitet jednogodišnje i dvogodišnje mlađi šarana na tri ribnjaka. Na dva ribnjaka uginuće se javljalo kod jednogodišnje i dvogodišnje mlađi šarana u prolećnom periodu, kada je temperatura vode bila viša od 18°C. U jesenjem periodu javilo se uginuće jednogodišnje mlađi šarana pri temperaturi vode višoj od 23°C.

* Rad primljen za štampu 18. 4. 2007. godine

** Dr sci. Svetlana Jeremić, naučni savetnik, mr Vladimir Radosavljević, istraživač saradnik, Odeljenje za epizootologiju i zdravstvenu zaštitu riba, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd

Na osnovu utvrđenih patomorfoloških promena i visokog mortaliteta u periodu godine kada je temperatura bila viša od 18°C, sumnja se da je KHV prisutan i na ribnjacima u Srbiji, iako virus nije izolovan.

Cilj ovog rada je da ukratko prikaže relevantne podatke o ovom oboljenju koje nanosi značajne gubitke proizvodnji šarana, trenutnu rasprostranjenost oboljenja, dijagnostičke metode i mogućnosti prevencije i kontrole KHV.

Cljučne reči: šaran, koi šaran, herpes virus, koi herpesvirus

Uvod / Introduction

Koi herpes virus (KHV) je uzročnik akutnog oboljenja sa visokim mortalitetom kod svih starosnih kategorija šarana i koi šarana. Prva pojava bolesti je zapažena kod koi šarana još 1996. godine, ali prva značajna izbijanja zaraze su opisana na uzgajivalištima šarana i koi šarana u Izraelu 1998. godine. Virus sličan herpes virusima, kasnije nazvan koi herpesvirus (KHV) prvi put je izolovan u SAD 1998. godine nakon izbijanja bolesti kod koi i običnog šarana u Izraelu i SAD [6].

Oboljenje je rasprostranjeno po čitavom svetu, od evropskih zemalja (Belgija, Velika Britanija, Holandija, Nemačka, Austrija, Švajcarska, Italija i Luksemburg), preko Južne Afrike, do Izraela, Indonezije i Japana. Još uvek nema potvrđenih slučajeva u istočnoj Evropi, gde ova bolest i ne podleže obavezi prijavljivanja. Iako do sada nije potvrđeno izbijanje bolesti u Srbiji, to ne znači da su naše populacije riba „slobodne“ od koi herpesvirusa. Ubrzano širenje KHV je pre svega vezano za trgovinu ribama. Jedna od preventivnih mera za sprečavanje širenja patogena je kontrola riba pre transportovanja i na samom ribnjaku.

Infekcija izazvana koi herpesvirusom je veoma kontagiozna i izaziva visok mortalitet kod svih kategorija šarana (*Cyprinus carpio carpio*) i njegovog varijeteta koi šarana (*Cyprinus carpio koi*). Šaran (*Cyprinus carpio carpio*) je vrsta koja se, za ishranu ljudi, gaji širom sveta. Godišnja proizvodnja je oko 1,5 miliona tona, pri čemu su najveći proizvođači Kina i druge azijske i evropske zemlje i Izrael. Koi šaran je varijetet običnog šarana dobijen selekcijom. Gajenje ove ukrasne ribe, prvobitno praktikovano u Japanu, postepeno se proširilo po čitavom svetu.

Prilikom pojavljivanja KHV oboljenja u polikulturi, uginuće je nastalo samo kod običnog i koi šarana. Istraživanja obavljena u Izraelu su pokazala da ne dolazi do prenošenja bolesti sa KHV-inficiranih šarana na pet najčešće uzgajanih vrsta riba – tilapija (*Oreochromis niloticus*), smuđ (*Bidyanus bidyanus*), beli tolstolobik (*Hypophthalmichthys molitrix*), babuška (*Carassius auratus*) i beli amur (*Ctenopharyngodon idella*), čak ni nakon duge kohabitacije sa bolesnim ribama na optimalnoj temperaturi za nastanak bolesti [14].

Imajući u vidu mogućnost ekonomske gubitke, OIE i EU su još 2002. godine razmatrali mogućnost stavljanja KHV oboljenja na listu bolesti koje su

obavezne za prijavljivanje. Tom prilikom je uvažena činjenica da je KHV neizlečivo oboljenje sa velikim negativnim uticajem na proizvodnju šarana u celom svetu i da zahteva stavljanje na listu. Iako se KHV se već tada značajno raširila, usled nedostatka dijagnostičkih metoda nije bilo moguće sa sigurnošću isključiti prisustvo bolesti, a posledično ni odrediti zone slobodne od bolesti. Ukoliko to nije moguće da se uradi sa visokim stepenom sigurnosti, zakonska regulativa je od male pomoći u kontroli i prevenciji širenja virusa. Sa ovim argumentima, odlučeno je da se KHV ne stavlja na listu bolesti čije je prijavljivanje obavezno.

Cilj ovog rada je da ukratko prikaže relevantne podatke o ovom oboljenju koje nanosi značajne gubitke proizvodnji šarana, trenutnu rasprostranjenost oboljenja, dijagnostičke metode i mogućnost prevencije i kontrole KHV.

Geografska rasprostranjenost KHV oboljenja / *Geographic distribution of KHV disease*

KHV je prvi put izolovan 1998. godine u SAD kod riba koje potiču iz ribnjaka u Izraelu i SAD, na kojima je izbila zaraza. Trenutna situacija, prema izveštaju međunarodne radionice o KHV [8] je:

Država / Country	Trenutni status / Current status
Austrija / Austria	Prvi slučaj 2003. godine kod koi šarana – potvrđeno PCR / <i>First case in 2003 in koi carp – confirmed with PCR</i>
Belgija / Belgium	Oboljenja koi šarana sa povremenom pojavom simptoma i mortalitetom do 90% prijavljivana od 1999, izbijanje zaraze 2002. i 2003. godine – potvrđeno PCR / <i>Disease in koi carp with occasional appearance of symptoms and mortality of up to 90% registered since 1999, disease outbreak in 2002 and 2003 confirmed with PCR</i>
Danska / Denmark	Od jula 2002. KHV pozitivna – potvrđeno PCR / <i>Since July 2002, KHV positive – confirmed with PCR</i>
Engleska i Vels / England and Wales	Prva izolacija 2000, sumnje 1998, 1999 i prethodno 1996, 36 izbijanja bolesti 2002. kod šarana različite veličine, infekcija potvrđena i 2003. godine – potvrđeno PCR / <i>First isolation in 2000, suspected in 1998, 1999, and previously in 1996, 36 outbreaks of disease in 2002 in carp of different sizes, infection confirmed also in 2003 – confirmed with PCR</i>
Francuska / France	Dve sumnje 2001, virus detektovan 2003. kod koi šarana uvezenog iz Izraela / <i>Suspected twice in 2001, virus detected in 2003 in koi carp imported from Israel</i>
Nemačka / Germany	Prvo izbijanje zaraze 1997, virus detektovan od 2002. godine – potvrđeno PCR, RT-PCR i <i>in situ</i> hidridizacijom / <i>First outbreak of disease in 1997, virus detected since 2002 – confirmed with PCR, RT-PCR and in situ hybridization</i>
Italija / Italy	KHV pozitivna u 2003. godini / <i>KHV positive in 2003</i>
Luksemburg / Luxembourg	KHV pozitivan u 2003. godini / <i>KHV positive in 2003</i>
Holandija / The Netherlands	Prvi put detektovan 2001 (PCR), pozitivni nalazi od 2002. / <i>First detected in 2001 (PCR), positive findings since 2002</i>

Švajcarska / <i>Switzerland</i>	Izbijanje zaraze 2003, sumnje od 2001. godine / <i>Outbreak of disease in 2003, suspect since 2001</i>
Poljska / <i>Poland</i>	Prvi put detektovan 2003, dva izbijanja zaraze 2004. – potvrđeno PCR, RT-PCR i in situ hidridizacijom / <i>First detected in 2003, two outbreaks of disease in 2004 – confirmed with PCR, RT-PCR and in situ hybridization</i>
Azija / <i>Asia</i>	
Indonezija / <i>Indonesia</i>	KHV pozitivna od 2002. godine / <i>KHV positive since 2002</i>
Izrael / <i>Israel</i>	KHV prvi put dijagnostikovano 1998, nakon uvoza koi šarana iz Evrope, izbijanje zaraze u svim narednim godinama / <i>KHV diagnosed for the first time in 1998, after imports of koi carp from Europe, outbreaks of disease in all subsequent years</i>
Japan / <i>Japan</i>	KHV pozitivan od maja 2003. godine / <i>KHV positive since May 2003</i>
Tajvan / <i>Taiwan</i>	Prvo izbijanje zaraze prijavljeno 2002, nakon toga i 2003. i 2004. / <i>First outbreak of disease reported in 2002, after that in 2003 and 2004</i>
Tajland / <i>Thailand</i>	KHV pozitivni koi šarani izvezeni u Nemačku 2004. godine / <i>KHV positive koi carp exported to Germany in 2004</i>
Države sa sumnjom na KHV / <i>Countries with suspected KHV</i>	
Kina / <i>China</i>	Izbijanje zaraze prijavljeno 2001. u Hong Kongu, koi poreklom iz Kine KHV pozitivni (CEFAS), 2002. nije potvrđeno na mestu porekla / <i>Outbreak of disease reported in 2001 in Hong Kong, koi originating from China KHV positive (CEFAS), in 2002, not confirmed at place of origin</i>
Malezija / <i>Malaysia</i>	Koi šarani potiču iz Malezije pozitivni, 2001. nije potvrđeno na mestu porekla / <i>Koi carp originating from Malaysia positive in 2001, not confirmed at place of origin</i>
Afrika / <i>Africa</i>	
Južna Afrika / <i>South Africa</i>	Izbijanje zaraze prijavljeno 2001-2003. godine / <i>Outbreak of disease reported in 2001-2003</i>
Severna Amerika / <i>North America</i>	
SAD / <i>USA</i>	Prvo izbijanje zaraze 1998. godine / <i>First outbreak of disease in 1998</i>
Južna Amerika / <i>South America</i>	
Čile / <i>Chile</i>	Nema zaraze / <i>No disease</i>
Australija	Nema zaraze / <i>No disease</i>

Trenutna situacija u Srbiji / *Current situation in Serbia*

U 2004. i 2005. godini utvrđen je visok mortalitet jednogodišnje i dvogodišnje mlađi šarana na tri ribnjaka na teritoriji Republike Srbije. Na dva ribnjaka uginuća su se javljala kod jednogodišnje i dvogodišnje mlađi šarana u prolećnom periodu (april-maj), kada je temperatura vode bila viša od 18°C. U pojedinim jezerima uginulo je više od 80 posto jednogodišnje mlađi šarana, a procenat uginuća

dvogodišnje mlađi šarana bio je nešto niži, 60 posto, sa kliničkim simptomima i pato-morfološkim promjenama koje upućuju na KHV, a da pri tome nije bilo uginuća tolstolobika i amura koji su bili u kohabitaciji sa obolelim šaranima.

Na jednom ribnjaku uginuće jednogodišnje mlađi šarana se javilo u jesenjem periodu (septembar) kada je temperatura vode bila oko 23°C.

Obolele ribe su prestale da uzimaju hranu i nekoordinisano se kretale. Kod svih obolelih riba utvrđene su promene na škrgama u vidu jačih ili slabijih diskoloracija sa umerenom do jakom nekrozom. Kod pojedinih primeraka utvrđena su tačkasta krvarenja u osnovi peraja. Po koži su bila prisutna nepravilno raspoređena polja svetlije boje. U tim područjima utvrđeno je smanjeno lučenje sluzi. Sekcijom na unutrašnjim organima nisu utvrđene promene.

Parazitološkim pregledima utvrđene su umerene do jake infestacije protozoama (*Trichodina sp.*, *Chilodonella cyprini* i *Ichthyophthirius sp.*) i monogenim trematodama.

Bakteriološkim ispitivanjima utvrđene su bakterijske infekcije sa *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas sp.* i miksobakterijama.

Za virusološka ispitivanja uzeti su delovi promenjenih škruga i pulirani uzorci parenhimatoznih organa koji su inokulisani na EPC, FHM, RTG-2 i BF-2 ćelijsku liniju. Ni nakon treće slepe pasaže nije se javio citopatogeni efekat.

Karakteristike Koi herpes virusa / *Characteristics of koi herpesvirus*

Do sada je poznato približno 130 herpesvirusa. Za osam je poznato da izazivaju infekciju kod ljudi, a ostali su izolovani iz drugih kičmenjaka, uključujući i ribe.

Koi herpes virus je DNK herpes virusima sličan patogen. Okruglog je oblika, veličine 170-230 nm, a prečnik spoljašnjeg lipoproteinskog omotača virusa je od 70 do 120 nm. Nukleokapsid sadrži dvolančanu DNK oko koje se nalazi kapsid sastavljen od kapsomera raspoređenih po simetriji ikosaedra, prečnika od 100 do 110 nm. Virion se sastoji od trideset jednog polipeptida i najmanje osam glikoproteina, i sadrži tegument. Glavna komponenta omotača je lipoproteinski dvosloj.

Morfologija i veličina ovog virusa odgovara virusima iz familije Herpesviridae. Međutim, veličina genoma KHV, koja je ~280 kbp, prevazilazi 250 kbp, što je karakteristika pripadnika familije *Herpesviridae* [17]. Trenutno poznate sekvence virusne DNK ukazuju na veliku divergentnost genoma koji sadrži male fragmente (16 do 45 bp), slično genomima nekoliko velikih DNK virusa. Takođe, amino-kiselinske sekvence kodirane fragmentima virusne DNK pokazuju sličnost sa sekvencama virusa iz familija *Poxviridae*, *Herpesviridae* i drugih velikih dvolančanih DNK virusa [19].

Waltzek i sar [19], analizirali su sekvence četiri gena kako bi utvrdili srodnost KHV sa tri virusa riba iz familije *Herpesviridae*: herpesvirus boginja šarana (herpesvirus ciprinida 1, CyHV-1), herpesvirus hematopoezne nekroze zlatne

ribice (herpesvirus ciprinida 2, CyHV-2) i herpesvirusa kanalskog somića (herpesvirus iktalurida, ICHV-1). Rezultati su pokazali da postoji značajna sličnost analiziranih gena KHV sa genima CyHV-1 i CyHV-2, kao i sličnost ova tri virusa ciprinida sa ICHV-1. Ovi nalazi, kao i morfološki i biološki podaci, ukazuju da KHV treba svrstati u grupu srodnih virusa nižih kičmenjaka u okviru familije *Herpesviridae*, kao herpesvirus ciprinida 3 (CyHV-3) [19].

Skorašnja poređenja većeg broja virusa sličnih herpesu izolovanih iz šarana, zlatne ribice, jegulje, jesetre, pastrmke i žaba, ukazuju da ovi virusi predstavljaju grupu jedinstvenih virusa, značajno različitih od drugih virusa iz familije *Herpesviridae* i drugih virusa uopšte. Sekvence, dobijene analizom DNK polimeraza i drugih gena KHV i još 11 virusa sličnih herpesu izolovanih iz riba i vodozemaca, pokazuju da se virusi razlikuju zavisno od vrste domaćina. Utvrđeno je da je KHV najrodniji sa herpesvirusom ciprinida 1 (izolovan iz šarana) i 2 (izolovan iz zlatne ribice). Prema tome, KHV može da se smatra herpes virusom ciprinida 3 (CyHV-3), familija *Herpesviridae*. Očigledno je i da je potrebno redefinisati familiju *Herpesviridae* kako bi obuhvatila viruse slične herpesu riba i vodozemaca, i herpesviruse sisara, ptica i reptila [7].

Prva izolacija virusa / *First isolation of virus*

KHV je prvi put izolovan 1998. godine u SAD posle masovnog uginuća koi šarana iz uzgajališta u SAD i Izraelu. Kako novi virus nije bilo moguće izolovati na ćelijskim linijama koje se standardno koriste u laboratorijama, za njegovu izolaciju se koristila KF-1 (koi fin) ćelijska linija. KF-1 ćelijska linija je inkubisana na temperaturi od 25°C, a posle inokulacije na temperaturi od 20°C. Virus je izolovan iz različitih tkiva obolelih riba (škrge, parenhimatozni organi i creva). Petog dana posle inokulacije, na temperaturi od 20°C, pojavila se fuzija ćelija i izrazita vakuolizacija citoplazme. Potpuniji CPE se javio 7 do 10 dana posle inokulacije, a kompletan CPE je uočen 14 dana posle inokulacije [6]. Virus je umnožavan na KF-1 ćelijskoj liniji na temperaturama od 15 do 25°C, sa optimalnom temperaturom 20°C [5]. Najveća koncentracija virusa je bila sedmog dana nakon inokulacije, pri temperaturi od 20°C. Količina virusa detektovana na temperaturi od 4°C i 10°C i sedmog i trinaestog dana je bila malo viša od detekcionog limita testa (42 TCID₅₀KHV/ml). Nije bilo umnožavanja virusa na 30°C ili 37°C [5].

U Koreji su tkivni homogenati bubrega i slezine obolelih riba inokulisani na CHSE-214, FHM, EPC i RTG-2 ćelijske linije [11]. CPE je uočen samo na FHM ćelijskoj liniji, tri do pet dana nakon inokulacije. Kompletan liza ćelija mogla je da se uoči nakon 15 dana. Elektronskom mikroskopijom FHM ćelija sa citopatogenim efektom, detektovane su jasno uočljive virusne partikule, prečnika od 70 do 80 nm.

U Nemačkoj, pulirani uzorci parenhimatoznih organa su inokulisani na CCB (ćelijska linija koja potiče od moždanog tkiva šarana), CCG (ćelijska linija

koja potiče od škrge šarana), FHM, CHSE-214 i EPC ćelijske linije [10]. Na CCB ćelijama, pet dana nakon inokulacije homogenata organa, pojavio se CPE u vidu velikih sincicijalnih formacija. Sincicijum se širio u ćelijskoj kulturi tokom narednih četiri do pet dana. Na CCG ćelijama, CPE je nastao šest dana posle inokulacije. Na EPC ćelijama, prvi sincicijum je detektovan od jedanaestog dana posle inokulacije. CPE nije uočen na CHSE-214 i FHM ćelijama.

U Izraelu, uzorci bubrega i jetre inficiranih riba inokulisani su na KF-1 i EPC ćelijske linije. Citopatogeni efekat se na KF-1 ćelijskoj liniji javio pet do šest dana posle inokulacije, dok na EPC ćelijskoj liniji nije uočen [9].

Način širenja virusa / *Manner of virus spreading*

Virus se prenosi direktnim kontaktom sa inficiranom ribom, ekskretima obolelih riba i/ili vodom ili muljem. Zavisno od temperature vode, prijemčive ribe se inficiraju i obolevaju ili postaju kliconoše [12]. Virus ostaje infektivan u vodi najmanje četiri časa [13, 14, 15]. Još uvek nije definitivno utvrđeno da li virus ulazi u organizam riba preko škrge ili creva [6, 14]. Najverovatnije je da virus ulazi u organizam riba preko škrge, s obzirom da su škrge prvi organ zahvaćen infekcijom [16]. U škragama se virus replikuje, i odatle krvlju dospeva u bubreg i creva, gde se nastavlja umnožavanje virusa [6, 4]. Šta više, dokazano je da je bubreg organ u kome se virus najintenzivnije umnožava [16].

Uticaj temperature na tok bolesti / *Effect of temperature on course of disease*

Kod poikilotermnih kičmenjaka, temperatura ima značajan uticaj na nastanak, tok i težinu bolesti [1, 2]. Temperatura vode direktno utiče na funkcionisanje celularnog i humoralnog imuniteta. Na nastanak KHV kod šarana utiče temperatura vode. Koncentracija virusa u spoljašnjoj sredini nije presudan faktor u izbijanju zaraze, za razliku od temperature. Eksperimentalno inficirani koi šarani su obolevali i pri infekciji sa veoma niskim koncentracijama virusa (12TCID₅₀KHV/ml i 1.2 TCID₅₀KHV/ml); na 23°C mortalitet je bio 90-95 posto, na 18°C 90 posto, na temperaturi 13°C nije bilo uginuća [5]. Koncentracije KHV DNK su određivane u različitim tkivima koi šarana izloženih virusu koji su držani u vodi temperature od 13, 18, 23 i 28°C, pomoću „real-time” PCR. Virusna DNK je detektovana na sve četiri temperature vode, ali je do uginuća došlo samo kod riba na temperaturama od 18, 23 i 28°C [4].

Najkritičniji period za nastanak KHV bolesti je proleće, kada je imuni odgovor domaćina supresiran [3, 6]. Eksperimentalno je dokazano da uginuća riba nastala u prolećnom i letnjem periodu, kao posledica delovanja koi herpes virusa, predstavljaju aktivaciju virusne infekcije koja je nastala ranije, ali je bila neaktivna na niskoj temperaturi (13°C). Prebacivanjem inficiranih riba iz hladnije u topliju vodu (na primer 23°C) brzo dolazi do uginuća.

Klinička slika / Clinical picture

Oboljenje se javlja pri temperaturi vode od 18 do 28°C, sa inkubacionim periodom od 7 do 21 dan što zavisi od temperature vode. Morbiditet je najčešće 100 posto, a mortalitet i do 90 posto pri višim temperaturama. Obolele ribe često prestaju da uzimaju hranu tri do četiri dana pre uginuća. Kod obolelih riba su prisutni poremećaji u ponašanju – letargija, dezorijentacija i nekoordinirano plivanje. Ribe često uginu u roku od nekoliko časova od pojave prvih simptoma oboljenja, dok je pri nižim temperaturama vode, bolest nešto dužeg toka [18]. Uvek prisutan opšti klinički simptom bolesti je mestimična diskoloracija škrge sa umerenom do jakom nekrozom. Ostali, najčešće prisutni klinički simptomi su: anoreksija, endoftalmus, otvoreni škržni poklopci, oštećenje peraja, površinska krvarenja u osnovi peraja, nepravilno raspoređena polja svetlije boje po koži sa smanjenom količinom sluzi, pa ovi, promenjeni delovi kože izgledaju poput šmirgle, i povećana količina sluzi na nepromenjenim delovima kože. Pri sekciji, promene na unutrašnjim organima ne moraju uvek da budu prisutne, a ukoliko su prisutne, zapažaju se u vidu povećanja prednjeg dela bubrega i otoka slezine u ranim stadijumima bolesti. Često su prisutne sekundarne, umerene do jake parazitske infekcije (*Trichodina sp.*, *Ichtyobodo sp.*, *Ichthyophthirius sp.*, *Dactylogyrus sp.* i *Chilodonella cyprini*), kao i sekundarne bakterijske infekcije izazvane sa *Aeromonas sp.*, *Pseudomonas sp.*, i *Shewanella putrefaciens* [16].

Patohistološke promene / Pathohistological changes

Oboljenje karakteriše jak intersticijalni nefritis i nekroza škrge, sa blagim fokalnim zapaljenjem jetre. Nervno tkivo nije zahvaćeno bolešću, ali su kod eksperimentalno inficiranih riba zapažene intranuklearne inkluzije u neuronima [6, 13].

Histološkim pregledom se primećuje proliferacija škržnog epitela sa degenerativnim i nekrotičnim promenama, i intranuklearne inkluzije u inficiranim ćelijama. Mikroskopskim pregledom parenhimatoznih organa i gastrointestinalnog trakta uočava se nekroza parenhimskih i epitelnih ćelija i prisustvo velikog broja makrofaga sa ingestiranim ćelijskim ostacima. Pri eksperimentalnoj infekciji [16], patološke promene na škragama su primećene već drugog dana posle inficiranja, u vidu gubitka lamela na pojedinim filamentima praćenog pojavom infiltrata sastavljenog od inflamatornih ćelija. Od šestog dana posle infekcije, promene na škragama su postajale sve naglašenije, sa potpunim gubitkom građe škrge, što je pratila jaka inflamacija, u gotovo svim filamentima. U ovom stadijumu je bila primetna i kongestija centralnog venskog sinusa škrge. Ovakve promene su bile prisutne i osmog i desetog dana posle infekcije. Promene na škržnim lukovima su bile još uočljivije od onih na filamentima, i obuhvatale su jaku subepitelijalnu inflamaciju i kongestiju krvnih sudova škržnih lukova.

Pored promena na škragama, najizraženije patološke promene su prisutne na bubrezima, u kojima virus izaziva jak intersticijalni nefritis. Nakon eksperimentalne infekcije, umereni peritubularni inflamatorni infiltrat je bio prisutan već drugog dana posle infekcije. Šestog dana je uočena pojava obimnog intersticijalnog infiltrata, zajedno sa kongestijom krvnih sudova. Osmog dana posle infekcije infiltracija je bila još izraženija i praćena degeneracijom epitela tubula u većini nefrona.

U jetri je prisutan zapaljenjski infiltrat i to uglavnom u parenhimu. Na preseku moždanog tkiva se uočavaju fokalne meningealne i parameningealne zapaljenjske promene [16].

Dijagnostika / *Diagnostics*

Tokom radionice nacionalnih referentnih laboratorija o bolestima šarana (CEFAS, Weymouth, 2003), data je preporuka da se, radi povećanja sigurnosti dijagnoze KHV, paralelno koriste najmanje dve od raspoloživih dijagnostičkih metoda, a to su:

- Svetlosna mikroskopija,
- Elektronska mikroskopija,
- Izolacija virusa na kulturi ćelija,
- PCR detekcija KHV DNK,
- Detekcija antitela protiv KHV (*ELISA*),
- *in situ* hibridizacija.

Preporučene dijagnostičke metode: Sumnja na KHV se postavlja na osnovu kliničke dijagnoze i patohistoloških promena na škragama, parenhimatoznim organima i crevima. Definitivna dijagnoza se postavlja na osnovu izolacije virusa, ili, još pouzdanije, PCR detekcijom DNK KHV u tkivnim homogenatima škriga i bubrega.

Zaključak / *Conclusion*

Prisustvo velikog broja slučajeva KHV oboljenja u Evropi upozorava na značajnu pretnju šaranskom ribarstvu u istočno-evropskim zemljama i divljim populacijama šarana širom Evrope. Kako bi se sprečila pojava i širenje bolesti u našoj zemlji potrebno je da se preduzmu sve neophodne mere, koje obuhvataju: kontrolu uvoza šarana i koi šarana, obavezno sprovođenje karantina u trajanju od najmanje 21 dana, obavljanje redovne kontrole zdravstvenog stanja šarana na ribnjacima, i brza i pouzdana detekcija i identifikacija KHV koje obavljaju dijagnostičke laboratorije koje se bave ovom problematikom.

Literatura / References

1. Ahne W., Bjorklund H. V., Essbauer S., Fijan N., Kurath G., Winton J. R.: Spring viremia of carp (SVC). *Diseases of Aquatic Organisms*, 52, 261-272, 2002.
2. Alcorn S. W., Murray A. L., Pascho R. J.: Effects of rearing temperature on immune functions in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Fish & Shellfish Immunology*, 12, 303-334, 2002.
3. Fijan N., Petrinc Z., Sulimanovic O., Zwillenberg L. O.: Isolation of the viral causative agent from the acute form of infectious dropsy of carp. *Veterinarski Archiv*, 41, 125-138, 1971.
4. Gilad O., Yun S., Zagmutt-Vergara F. J., Leutenegger C. M., Bercovier H., Hedrick R. P.: Concentrations of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio koi* as assessed by real-time TaqMan PCR. *Diseases of Aquatic Organisms*, 60, 179-187, 2004.
5. Gilad O., Yun S., Adkison M. A., Way K., Willits N. H., Bercovier H., Hedrick 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. *Journal of General Virology*, 84, 2661-2668, 2003.
6. Hedrick R. P., Gilad O., Yun S., Spangenberg J., Marty G., Nordhausen R., Kebus M., Bercovier H., Eldar A.: A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. *J. Aquat. Anim. Health* 12, 44-55, 2000.
7. Hedrick R. P., Gilad O., Yun S. C., McDowell T. S., Waltzek T. B., Kelley G. O., Adkison M. A.: Initial isolation and characterization of a herpes-like virus (KHV) from koi. Report of International Workshop on Koi Herpesvirus, 12-13 Februar 2004, London, 6-7, 2004.
8. Haenen O. L. M., Way K., Bergmann S. M., Ariel E.: The emergence of koi herpesvirus and its significance to European aquaculture. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 24, 293-307, 2004.
9. Hutoran M., Ronen A., Perelberg A., Ilouze M., Dishon A., Bejerano I., Chen N., Kotler M.: Description of an as yet unclassified DNA virus from diseased *Cyprinus carpio* species. *Journal of Virology*, 79, 1983-1991, 2005.
10. Neukirch M., Bottcher K., Bunnajirakul S.: Isolation of a virus from Koi with altered gills. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 19, 221-224, 1999.
11. Oh M. J., Jung S. J., Choi T. J., Kim H. R., Rajendran K., Kim Y. J., Park M. A., Chun S. K.: A viral disease occurring in cultured carp *Cyprinus carpio* in Korea. *Fish Pathol.* 36, 147-151, 2001.
12. Ornamental Aquatic Trade Association (OATA): Koi Herpes Virus (KHV). OATA, Westbury, Wilts, UK. 4-33, 2001.
13. 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. Aquaculture* 55, 5-12, 2003.
14. 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 Journal of Aquaculture-Bamid-geh*, 55, 5-12, 2003.
15. Perelberg A., Ronen A., Hutoran M., Kotler M.: Protection of cultured *Cyprinus carpio* against lethal disease by attenuated virus. *Vaccine* 23, 3396-3403, 2005.
16. Pikarsky E., Ronen A., Abramowitz J., Levavi-Sivan B., Hutoran M., Shapira Y., Steinitz M., Perelberg A., Soffer D., Kotler M.: Pathogenesis of acute viral disease induced in fish by carp interstitial nephritis and gill necrosis virus. *Journal of Virology*, 78, 9544-9551, 2004.
17. Ronen A., Perelberg A., Abramowitz 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*, 21, 4677-4684, 2003.
18. Walster C. I.: Koi carp mortality syndrome: an update. *Fish Vet. Journal* 5, 72-75, 2000.
19. Waltzek T. B., Kelley O. G., Stone D. M., Way K., Hanson L., Fukuda H., Hirono I., Aoki T., Davison A. J., Hedrick R. P.: Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family Herpesviridae. *J. Gen. Virol.* 86, 1659-1666, 2005.

KOI HERPESVIRUS DISEASE IN CARP

Svetlana Jeremic, V. Radosavljevic

A disease in the koi carp (*Cyprinus carpio koi*) and the common carp (*Cyprinus carpio carpio*), caused by the herpesvirus and accompanied by a high mortality rate, has spread across numerous fish ponds all over the world since 1998, resulting in massive mortality and significant financial losses. The herpesvirus-like virus, called the koi herpesvirus (KHV) has been isolated and identified from the koi and the common carp in the course of the incidences of massive mortalities. The first appearance of a disease with a high mortality in the common and the koi carp caused by the koi herpesvirus (KHV) was described in 1998 in Israel and the United States of America (USA). Since that time, a large number of cases of outbreaks of this disease have been confirmed throughout the world, including the USA, Israel, and a large number of European countries. The deaths occurred seasonally, in late spring or early autumn, when the water temperature was from 18-28°C. The most important factor of the environment that affects the occurrence and gravity of this disease is the water temperature. This disease is currently considered one of the factors that present the biggest threat to populations of the common and the koi carp. Diseased fish are disoriented, their movements uncoordinated, their breathing rapid, gills swollen, and they have local skin lesions. The virus was isolated from tissue of diseased fish and cultivated on a KF-1 (koi fin cells) cell line. Electronic microscopy examinations revealed virus identical viral particles of the Herpesviridae family. Analyses of the virion polypeptide and DNA established differences between the KHV and the previously known herpesvirus of the Cyprinida family, *Herpesvirus cyprini* (CHV), and the virus of the channel catfish (*Channel catfish virus* – CCV).

In the years 2004 and 2005, high mortality was established among one-year and two-year carp fry on three fish ponds. At two ponds, the deaths occurred among one-year and two-year carp fry during the spring period, when the water temperature was over 18°C. During the autumn period, mortality was recorded among one-year carp fry at water temperatures above 23°C.

On the grounds of the determined pathomorphological changes and the high mortality during the period of the year when the temperature was above 18°C, we suspect that KHV is also present in fish ponds in Serbia, even though the virus itself has not been isolated.

The objective of this work is briefly to present the relevant data on this disease which is inflicting significant losses to carp production, to show the current distribution of this disease, the diagnostic methods, and the possibilities for the prevention and control of KHV.

Key words: carp, koi carp, herpesvirus, koi herpesvirus

КОИ ГЕРПЕСВИРУСНОЕ ЗАБОЛЕВАНИЕ КАРПОВ

Светлана Еремич, В. Радосавлевич

Заболевание кои карпов (*Cyprinus carpio koi*) и обычного карпа (*Cyprinus carpio carpio*), вызвано герпес вирусом, слежено высокой смертностью, от 1998 года захватило многие пруды по всему миру, вызывая массовые гибели и значительные финансовые убытки. Вирус похожий герпес вирусами, назван кои герпесвирус (КГВ) изолирован и идентифицирован из кои и обычного карпа в течение явлений массовых гибелей. Первое явление болезни с высокой смертностью обычного и кои карпа вызвано кои герпесвирусом (КГВ) описано 1998 года в Израиле и США. С тех пор подтверждено большее число случаев возникновения этого заболевания по всему миру, включая США, Израиль и большое число европейских стран. Гибели являлись сезонно, в конце весны и в начале осени, когда температура воды от 18-28°C. Наиболее значительный фактор внешней среды, влияющий на явление и тяжести болезни температура воды. Мгновенно это заболевание считается одним из факторов, представляющий собой наибольшую опасность для популяций обычного и кои карпа. Заболевшие рыбы дезориентированы, некоординированных движений, ускоренного дыхания, опухлых жабр и с локальными повреждениями. Вирус изолирован из тканей заболевших рыб и культивирован на *KF-1 (koi fin cells)* клеточной линии. Электронной микрокопией замечены вирусные частицы идентичные вирусам из семейства *Herpesviridae*. Анализом полипептидов вириона и ДНК утверждены различия среди КГВ и раньше знакомых герпес вирусов ципринидов, *Herpesvirus cyprini* (ЦХВ), и вируса канавного сомика (*Channel catfish virus - CCV*).

В 2004 и 2005 году утверждена высокая смертность однолетней и двухлетней молодежи карпа на трёх прудах. На двух прудах гибель явилась у однолетней и двухлетней молодежи карпов в весеннем периоде, когда температура воды была больше 18°C. В осеннем периоде явилась гибель однолетней молодежи карпов при температуре воды выше 23°C.

На основе утверждённых патоморфологических изменений и высокой смертности в периоде года, когда температура была выше 18°C, мы сомневаем, что КГВ присутствующий и на прудах в Сербии, хотя вирус не изолирован.

Цель этой работы кратко показать релевантные данные об этом заболевании, наносящее значительные убытки производству карпов, мгновенную распространённость заболевания, диагностические методы и возможности профилактики и контроля КГВ.

Ключевые слова: карп, кои карп, герпес вирус, кои герпесвирус