

## CHƯƠNG 2.3.6.

# BỆNH DO HERPESVIRUS Ở CÁ CHÉP KOI (KOI HERPESVIRUS DISEASE)

## 1. Phạm vi

Bệnh do herpesvirus ở cá chép koi (KHVD) là bệnh nhiễm herpesvirus (18) có khả năng lây lan và gây nhiễm virus huyết cấp tính trong cá chép thường (*carp: Cyprinus carpio*) và các biến thể như cá chép koi (koi carp) và cá chép ma (ghost carp) (16).

## 2. Thông tin về bệnh

### 2.1. Các yếu tố thuộc về tác nhân gây bệnh

#### 2.1.1. Tác nhân sinh bệnh học (aetiological agent), các dòng (strains) tác nhân gây bệnh

Tác nhân sinh bệnh học là koi herpesvirus (KHV) thuộc họ Herpesviridae (18, 45) mặc dù virus này cũng có tên là virus gây viêm thận kẽ và hoại tử mang thở của cá chép (*carp interstitial nephritis and gill necrosis virus – CNGV*) (20, 30). Waltzek và cộng sự (42) đưa ra bằng chứng để giúp phân loại virus này là herpesvirus, và đặt tên là cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3), kèm theo danh pháp của các cyprinid herpesvirus khác: CyHP-1 (virus đậu cá chép [*carp pox virus*], virus ung thư mụn sần ở cá [*fish papilloma virus*]) và CyHV-2 (virus gây hoại tử hệ thống tạo huyết của cá vàng [*goldfish haematopoietic necrosis*]). Các phân tích kết chuỗi của phần gen di truyền đã cho thấy rằng KHV có liên quan gần với CyHV-1 và CyHV-2, và có liên quan xa với virus cá da trơn nước ngọt (*Ictalurid herpesvirus: IvHV-1*) và Ranid (ếch) herpesvirus (*RaHV-1*) (42). Gần đây, Aoki và cộng sự (2) đã mô tả đầy đủ kết chuỗi gen di truyền của KHV và nhận diện 156 đơn vị gen mã hóa các protein. Họ chỉ ra rằng 15 gen của KHV có tương đồng với các gen trong ICHV-1, xác nhận đề xuất xếp KHV vào họ Herpesviridae. Các ước tính gần đây về gen di truyền của KHV biến thiên từ ít nhất 150 kbp (14) đến 270 kbp (20), nhưng kích thước này gần đây được xác nhận là 295 kbp (2, 42). Các ước tính về kích thước của hạt virus (virion) cũng có khác nhau. Vỏ bao hạt nhân (nucleocapsid) của virus đem nhuộm âm (negative-stained) đã được đo lường là có đường kính 103 – 112 nm, được bao quanh bởi vỏ bao ngoài (envelope) (18, 20, 40). Vỏ bao hạt nhân của virus đã được cắt lát mỏng (thin-sectioned) đã đo được đường kính là 78–84, 80–110 và 110–120 nm (5, 6, 18, 28).

So sánh các di truyền của các dòng KHV phân lập được từ các vùng địa lý khác nhau, bằng các phân tích giới hạn enzyme (restriction enzyme analysis) (12, 16) hay bằng các phân tích kết chuỗi nucleotide (32) đã cho thấy di truyền của các dòng KHV này thực tế là giống nhau. Giống vậy, các polypeptides của các dòng KHV phân lập được từ các vùng địa lý khác nhau đều tương tự nhau, mặc dù một dòng phân lập được từ Israel có thêm hai polypeptide (11, 12). Aoki và cộng sự (2) đã so sánh đầy đủ kết chuỗi di truyền của ba dòng KHV phân lập được từ Nhật Bản, Israel và Mỹ. Các di truyền này cho thấy rất giống nhau ở mức độ kết chuỗi, với dòng của Israel và Mỹ thì gần nhau hơn so với dòng của Nhật Bản. Ba dòng này được giải thích là đã được sinh ra từ hai nhánh (lineage) là nhánh Nhật Bản và nhánh Israel-Mỹ, vốn có nguồn gốc chung.

#### 2.1.2. Sống sót bên ngoài ký chủ

Các nghiên cứu ở Israel cho thấy rằng KHV vẫn còn hoạt tính trong nước trong ít nhất 4 giờ, nhưng không còn hoạt tính đến 24 giờ, ở nhiệt độ nước là 23 – 25°C (28). Các nghiên cứu ở Nhật Bản cho thấy có giảm nhiều về hiệu giá gây nhiễm của KHV trong vòng 3 ngày trong các mẫu nước môi trường và bùn lắng (sediment) ở 15°C. Tuy nhiên, khả năng gây nhiễm vẫn còn đến > 7 ngày khi KHV được để trong các mẫu nước tương tự đã được xử lý tiệt trùng bằng hấp autoclave

hay qua lọc (35). Nghiên cứu này cũng trình bày bằng chứng đối với sự hiện diện của các dòng vi khuẩn trong nước mà có tác động kháng virus. Gần đây hơn đã có báo cáo phát hiện thấy DNA của KHV trong các mẫu nước sông ở nhiệt độ 9 – 11°C, vào 4 tháng trước khi xảy ra một ổ dịch KHVD trong một con sông (17). Tuy nhiên, sự tồn tại của virus có thể được trợ giúp bởi sự hiện diện của các động vật làm trung gian truyền lây và việc phát hiện DNA có thể không luôn là chỉ thị về sự hiện diện của virus gây bệnh.

### 2.1.3. Tính bền bỉ của tác nhân gây bệnh

Virus bị bất hoạt bởi bức xạ UV và nhiệt độ trên 50°C trong 1 phút. Các chất sát trùng sau đây cũng hiệu quả để làm bất hoạt virus: iodophor ở 200 mg lít<sup>-1</sup> trong 20 phút, benzalkonium chloride ở 60 mg lít<sup>-1</sup> trong 20 phút, ethyl alcohol ở 30% trong 20 phút và sodium hypochlorite ở 200 mg lít<sup>-1</sup> trong 30 giây, tất cả đều ở 15°C (22).

### 2.1.4. Vòng đời

Các báo cáo điều tra gần đây cho thấy rằng mang thở là đường vào chủ yếu của virus trong cá chép (9, 13, 24, 29). Tuy nhiên, một thực nghiệm gần đây hơn đã chứng minh da phủ ngoài các vây của cá chép là đường vào chính của KHV (7). Sau khi xâm nhập, virus phân tán từ mang thở và da đến các nội tạng, và đã phát hiện thấy số lượng nhiều DNA của KHV trong các mô thận, lách, gan và ruột (9, 29). Sự lấp ghép và tạo hình của KHV trong các tế bào bị nhiễm đã được mô tả là giống như ở các herpesvirus khác. Một kiểm tra siêu cấu trúc của cá chép được gây nhiễm thực nghiệm đã cho ra bằng chứng về các vỏ bao hạt nhân chưa hoàn chỉnh lẫn hoàn chỉnh được lấp ghép trong nhân và có sự phát triển tiếp của hạt virus trong bào tương của tế bào bị nhiễm (24). Sự tăng tiết chất nhầy là bằng chứng rõ rệt trong các giai đoạn sớm của nhiễm KHV, và đã phát hiện thấy DNA của KHV với mức độ cao trong các mẫu chất nhầy của cá chép được gây nhiễm thực nghiệm (13). Đây là bằng chứng thêm vào cho tác động liên quan đến da trong sinh bệnh học của virus và da là vị trí quan trọng trong thải tiết virus. Sự thải tiết virus qua đường niệu (urine) và phân cũng có thể là các cơ chế quan trọng cho thải tiết virus. Các hàm lượng ADN cao của KHV đã phát hiện được trong các mô của ruột và thận, và virus gây nhiễm đã phát hiện được trong các mẫu phân thu thập từ cá chép đã bị nhiễm (9, 13).

## 2.2. Các yếu tố thuộc về ký chủ

### 2.2.1. Các loài ký chủ có miễn cảm

Bệnh nhiễm KHV xảy ra trong tự nhiên chỉ ghi nhận được trên cá chép thường (*Cyprinus carpio carpio*), cá chép koi (koi carp: *Cyprinus carpio koi*) và cá chép ma (ghost carp: *Cyprinus carpio goi*), và xảy ra ở các lai ghép các loài cá này. Các lai ghép của cá vàng (goldfish) x cá chép thường, sinh ra từ lai giữa cá vàng đực với cá chép thường cái, đã có báo cáo là thể hiện khả năng miễn cảm đối với bệnh nhiễm KHV. mặc dù tỷ lệ tử vong là thấp (5%), khoảng 50% các cá lai này được kiểm tra vào 25 ngày sau khi tiêm xoang bụng với liều cao của KHV, đều đã mang DNA gen di truyền của virus, theo phát hiện bằng phản ứng chuỗi phân tử (polymerase chain reaction – PCR) (19).

### 2.2.2. Các giai đoạn miễn cảm của ký chủ

Tất cả các nhóm tuổi của cá, từ cá thiếu niên (juveniles) trở lên, đều thể hiện có miễn cảm với KHVD (5, 32, 39), nhưng dưới các điều kiện thực nghiệm, cá từ 2,5 – 6 g là có miễn cảm hơn so với cá 230 g (28). Một nghiên cứu ở Nhật Bản cho thấy rằng ấu trùng (larvae) của cá chép (3 – 4 ngày sau khi nở trứng) là có đề kháng đối với bệnh nhiễm KHV, nhưng cùng lứa cá này sẽ có tỷ lệ tử vong 100% khi bị phơi nhiễm với KHV vào 2 tháng sau (21).

### 2.2.3. Các loài hay tiểu quần thể có thiên hướng (khả năng phát hiện bệnh)

Cá chép thường hay các dòng, như cá chép koi hay cá chép ma (cá chép coi x chép thường), là có miễn cảm hơn và thích hợp cho chọn lựa để phát hiện virus, sau đó là mọi cá chép thường lai

có mặt trong nơi lấy mẫu, như cá vàng x chép thường hay cá chép hồng (crucian carp) x chép thường.

#### **2.2.4. Các cơ quan mục tiêu và mô bị nhiễm**

Mang thờ, thận và lách là các cơ quan mà KHV có nhiều nhất trong tiến trình của bệnh phát lộ (13).

#### **2.2.5. Bệnh nhiễm dai dẳng với các cá thể mang trùng suốt đời**

Ở đây chưa rõ có hay không, dưới các điều kiện tự nhiên, các cá thể sống sót với KHVD là bị nhiễm dai dẳng với virus, và nếu có thì có hay không chúng thải tiết virus bao lâu hay chúng lưu giữ virus bao lâu. Một số nghi vấn này đã được điều tra trong cá được gây nhiễm thực nghiệm, ở đây chúng cho thấy virus có thể tồn tại trong cá chép thường bị nhiễm ở nhiệt độ cho phép và sau đó được lưu giữ ở nhiệt độ thấp hơn cho phép (36).

#### **2.2.6. Các trung gian truyền lây (vectors)**

Nước là trung gian vô sinh (abiotic) chủ yếu. Tuy nhiên các động vật trung gian truyền lây (như các loài cá khác, các ký sinh không xương sống, các loài chim săn cá và các loài thú có vú) và các vật dụng (fomites) cũng có liên quan trong quá trình truyền lây.

#### **2.2.7. Các động vật thủy sinh đã biết hay có nghi ngờ mang trùng**

Cá chép bình thường được nuôi chung các loài cá khác trong các hệ thống chăn nuôi đa canh tác, nhưng không quan sát thấy các dấu hiệu bệnh hay tử vong trong các loài khác khi xảy ra các ổ dịch KHVD, dưới các điều kiện đa canh tác bình thường (5, 18, 28, 38). Tuy nhiên, ngược lại với phát hiện ở những nơi khác, dữ liệu thực nghiệm từ Đức cho thấy có mầm cảm của cá vàng và cá trắm cỏ (grass carp) đối với KHV (15). Gần đây, DNA của KHV đã phát hiện thấy trong mô của cá vàng khỏe mạnh sống chung với cá chép koi đã gây bệnh thực nghiệm với KHV và cũng thấy ở cá vàng bị phơi nhiễm tự nhiên trong các trận dịch địa phương tự nhiên do KHV ở cá chép koi (10, 31). Cần có nghiên cứu thêm để xác định virus tồn tại bao lâu trong cá vàng và cũng nghiên cứu thêm nếu cá mang trùng thải tiết ra virus có khả năng sống. Tuy nhiên, ở đây có bằng chứng gia tăng cho thấy rằng cá vàng có khả năng mang trùng tiềm ẩn đối với KHV. Hơn nữa, nếu các phát hiện từ Đức (15) được xác nhận, thì tất cả các loài cá chép cyprinid sẽ cần được coi là có khả năng mang trùng đối với KHV.

### **2.3. Mô hình bệnh**

#### **2.3.1. Các cơ chế truyền lây**

Kiểu truyền lây của KHV là truyền lây ngang, nhưng truyền lây “có liên quan đến trứng” (thường gọi là truyền lây “dọc”) thì hiện nay không thể bỏ qua. Truyền lây ngang có thể là trực tiếp (cá đến cá) hay qua trung gian, nước là trung gian vô sinh chính. Các nguồn tàng trữ của KHVD là cá bị nhiễm thể hiện lâm sàng và các mang trùng ẩn chứa virus trong cá nuôi nhốt, chăn thả hay hoang dã. Virus có độc lực được thải tiết qua phân, đường niệu, mang thờ và chất nhày của da. Dưới các điều kiện thực nghiệm, virus gây nhiễm được đã được thải tiết liên tục trong thời gian dài ở cá chép thương bị nhiễm, trong nhiệt độ 16°C, thời gian thải tiết ra virus ngắn hơn ở 23°C hay 28°C (44). Tiến trình bệnh có thể là nhanh chóng, đặc biệt ở các nhiệt độ tối ưu (23 – 25°C), nhưng chậm hơn ở nhiệt độ dưới 23°C. Bệnh có thể xuất hiện trong 3 ngày sau khi cho cá khỏe mạnh vào một hồ có chứa cá bị bệnh (41), nhưng các điều tra khác đã báo cáo là 8 – 21 ngày mới phát hiện thấy bệnh lộ ra ở cá đưa vào (5, 18).

#### **2.3.2. Lưu hành bệnh**

Ở đây không có các quan sát được công bố về lưu hành virus trong cả các quần thể hoang dã lẫn chăn nuôi của cá chép. Ở đây có bằng chứng từ các thử nghiệm thực nghiệm về tồn tại của virus trong cá chép được gây nhiễm ở nhiệt độ cho phép và sau đó được tàng trữ ở một nhiệt độ thấp

hơn cho phép (36, xem Đoạn 2.2.5). Tuy nhiên, trong các thực nghiệm khác ở cùng một nghiên cứu (36), các nhà điều tra cho rằng không có cá nào bị nhiễm dai dẳng sau khi phát bệnh do KHV. Trong các nghiên cứu khác, DNA của virus đã phát hiện thấy trong cá chép không phát bệnh, bởi phân tích PCR, trong nhiệt độ 13°C, và cho thấy khả năng là cá bị nhiễm sống sót ở các nhiệt độ thấp có thể đóng vai trò là các nguồn tàng trữ của virus (13).

### **2.3.3. Phân bố địa lý**

Sau các báo cáo ban đầu về KHVD ở Israel và Đức (5, 28), giới hạn địa lý của bệnh trở nên lan rộng. Bệnh đã phát tán đến nhiều quốc gia trên thế giới, chủ yếu qua giao thương cá chép koi, trước khi có được hiểu biết về bệnh và các phương cách phát hiện bệnh. Bệnh hiện nay xảy ra, hoặc đã được ghi nhận trong cá nhập khẩu vào, ở ít nhất 22 quốc gia khác nhau. Ở Châu Âu bao gồm Austria, Belgium, Denmark, France, Italy, Luxembourg, The Netherlands, Poland, Switzerland và Anh Quốc (4, 8, 16, 33). Ở Châu Á, Trung Quốc (Hong Kong) (16) và Đài Loan (40), Indonesia (37), Japan (32), Hàn Quốc (Rep. of) (6), Malaysia (16, 23, 25), Singapore (ở cá nhập khẩu từ Malaysia) và Thái Lan (ở cá nhập khẩu từ Đức, 16). Các nơi khác, Nam Phi (16) và Mỹ (14, 18, 39) đã có báo cáo hiện diện của KHVD. Hình như là virus hiện diện trong nhiều quốc gia khác, nhưng đã không có nhận diện hay báo cáo.

### **2.3.4. Tỷ lệ tử vong (mortality) và tỷ lệ mắc bệnh (morbidity)**

Tỷ lệ mắc bệnh của các quần thể bị nhiễm có thể là 100%, và tỷ lệ tử vong 70 – 80% (5, 41), nhưng tỷ lệ tử vong có thể cao đến 90 hay 100% (5, 40). Nhiễm phụ và vẩy nhiễm vi khuẩn và/hoặc nhiễm ký sinh thường thấy ở cá chép bị bệnh và có thể ảnh hưởng đến tỷ lệ tử vong và thể hiện ra các dấu hiệu (16).

### **2.3.5. Các yếu tố môi trường**

Các mô hình bệnh bị chi phối bởi nhiệt độ nước, độc lực của virus, lứa tuổi và tình trạng sức khỏe của cá, mật độ quần thể và các yếu tố gây stress (như vận chuyển, đẻ trứng, chất lượng nước kém). Bệnh là phụ thuộc vào nhiệt độ nước, xảy ra từ 16 đến 25°C (8, 18, 28, 32, 39, 40). Dưới các điều kiện thực nghiệm, bệnh đã gây ra tỷ lệ tử vong cao ở 28°C (13), nhưng tỷ lệ tử vong không cao ở 29 hay 30°C (20, 27), lẫn ở 13°C (13). Tuy nhiên, DNA của virus đã phát hiện được trong cá bằng PCR ở 13°C, và có thể là cá bị nhiễm sống sót ở các nhiệt độ thấp có thể là các nguồn tàng trữ cho virus (13).

## **2.4. Kiểm soát và phòng ngừa**

Các phương pháp kiểm soát và phòng ngừa KHVD sẽ chủ yếu là dựa vào tránh phơi nhiễm đối với virus, kèm theo các thực hành vệ sinh tốt và an toàn sinh học. Điều này là có thể ở các trang trại nhỏ được cung cấp nước từ suối hay hồ ao và có một hệ thống an toàn để ngăn ngừa cá xâm nhập trang trại qua đường nước thải thoát.

### **2.4.1. Sử dụng vaccin**

Một vaccin an toàn và hiệu quả hiện nay không sẵn có rộng rãi. Tuy nhiên, virus nhược độc (attenuated) đã được sử dụng để chủng ngừa cho cá chép và có bảo hộ cho cá đối với thử thách bằng virus (27, 30). Chế phẩm vaccin này có kích thích kháng thể kháng với virus (26), nhưng độ dài bảo hộ thì chưa biết. Vaccin này hiện nay được cấp phép sử dụng tại Israel và đã được sử dụng rộng rãi trong các trang trại nuôi cá chép khắp quốc gia này. Các kết quả nghiên cứu ở Nhật Bản đã thể hiện rằng việc cấp đường miệng một loại vaccin dựa vào liposome có chứa KHV đã làm bất hoạt là có hiệu quả trong bảo hộ cho cá chép đối với bệnh nhiễm KHV (43).

### **2.4.2. Hóa trị liệu**

Không áp dụng.

### **2.4.3. Kích thích miễn dịch (immunostimulation)**

Hiện nay không có thông tin về sử dụng tác nhân kích thích miễn dịch (immunostimulants) để kiểm soát KHVD ở cá chép. Tuy nhiên đây là lĩnh vực nghiên cứu được quan tâm.

#### **2.4.4. Giống có đề kháng**

Đã có thể hiện khác biệt về đề kháng với KHVD trong các dòng cá chép khác nhau (34) và các nghiên cứu khác đã cho thấy rằng đề kháng là theo lứa tuổi (28). Trong các nghiên cứu giống đề kháng, con cháu của lai giống giữa hai dòng cá chép thuần dưỡng với một dòng cá chép hoang dã được đem thử nghiệm bằng thực nghiệm hay gây nhiễm tự nhiên. Tỷ lệ sống sót thấp nhất đã đạt khoảng 8%, nhưng tỷ lệ sống sót của dòng có đề kháng nhất đạt 61 – 64% (34).

#### **2.4.5. Tái đàn với các loài có đề kháng**

Các ổ dịch tự nhiên của KHVD đã không được báo cáo trong các loài cá chép ăn cỏ thường được chăn nuôi trang trại, bao gồm cá chép bạc (silver carp: *Hypophthalmichthys molitrix*), cá trắm cỏ (grass carp: *Ctenopharyngodon idella*), và cá chép đầu to (bighead carp: *Aristichthys nobilis*). Các loài cá chép ăn cỏ thường được nuôi lớn trong đa canh tác với cá chép thường, nhưng không có dấu hiệu bệnh hay tử vong nào quan sát thấy trong các loài này, kể cả dưới các điều kiện đa canh hay sau khi thực nghiệm sống chung với cá bị bệnh, hay cho phơi nhiễm trực tiếp với virus (27, 33, 37, 38). Các lai ghép của cá chép thường cũng thể hiện là khả năng cho phương cách kiểm soát để ngăn ngừa các tổn thất lớn bởi KHVD. Các nghiên cứu trên một quần thể lai ghép của cá vàng đực x cá chép cái thường cho thấy có đề kháng với KHVD (19). Các lai ghép này thể hiện phát triển nhanh chóng và có thể hiện hình thái giống nhất với thế hệ cha mẹ. Tuy nhiên, DNA của KHV đã phát hiện thấy bằng PCR trong các cá lai sống sót, cho thấy rằng chúng có khả năng mang trùng đối với virus (19).

#### **2.4.6. Các tác nhân chặn đứng bệnh (blocking agents)**

Không áp dụng.

#### **2.4.7. Sát trùng trứng và ấu trùng**

Việc sát trùng trứng có thể đạt được bằng xử lý với iodophor. KHV đã thể hiện là bị bất hoạt bởi iodophor ở 200 mg lít<sup>-1</sup> trong 30 giây ở 15°C (22).

#### **2.4.8. Các thực hành chăn nuôi thông thường**

Các biện pháp an toàn sinh học sẽ bao gồm đảm bảo rằng cá mới đưa vào là từ các nguồn sạch bệnh và thiết lập hệ thống cách ly mà cá mới nhập có thể đưa vào chung với cá chỉ điểm (sentinel) ở các nhiệt độ cho phép để phát hiện KHVD. Đàn cá này sau đó được cách ly trong tối thiểu 4 tuần đến 2 tháng trước khi chuyển đến vị trí nuôi bình thường để nhập chung với cá trong trang trại. Các biện pháp vệ sinh trong trang trại sẽ tương tự như được khuyến áp dụng đối với SVC và bao gồm sát trùng trứng, thường xuyên sát trùng hồ nuôi, sát trùng bằng hóa chất cho thiết bị trang trại, quản lý cá cẩn thận để tránh stress và tiêu hủy an toàn đối với cá chết.

### **3. Lấy mẫu**

#### **3.1. Chọn lựa các cá thể lấy mẫu**

Tất cả các nhóm tuổi của cá chép đều thể hiện miễn cảm với KHVD, tuy nhiên, cá non tuổi hơn đến 1 năm tuổi thường có miễn cảm hơn đối với bệnh lâm sàng và được khuyến cho lấy mẫu. Tính thích hợp của các mẫu cá được chọn trong một ổ dịch nghi ngờ KHVD sẽ tùy thuộc vào xét nghiệm chẩn đoán được áp dụng. Cá chép hấp hối hay mới chết thể hiện các dấu hiệu lâm sàng điển hình của bệnh là thích hợp cho xét nghiệm bởi hầu hết các xét nghiệm được mô tả trong Đoạn 4. Các xác cá thể hiện các dấu hiệu về phân hủy mô có thể chỉ thích hợp cho các phương pháp dựa vào PCR. Giống vậy, các mẫu thu thập từ cá thể hiện khỏe mạnh, trong một quần thể có

nghe bệnh, có thể chỉ xét nghiệm được một cách tin cậy bởi các phương pháp dựa vào PCR nhạy hơn.

### **3.2. Bảo quản các mẫu để gửi đi**

Cá nguyên con sẽ được gửi đến phòng thí nghiệm còn sống hay giết chết và đóng gói riêng biệt trong các vật chứa vô trùng được niêm kín. Tuy nhiên, thích hợp nhất và khuyến khích nên thu thập các mẫu cơ quan từ cá ngay sau khi chúng đã được chọn tại cơ sở sản xuất cá. Cá nguyên con hay các mẫu cơ quan sẽ được gửi đến phòng thí nghiệm trong các vật chứa làm lạnh hay ướp nước đá. Tránh đông lạnh đối với cá hay phủ tạng thu thập làm mẫu. Tuy nhiên, nếu chỉ nhận được mẫu cá hay phủ tạng đông lạnh, thì các mẫu này chỉ thích hợp cho các phương pháp xét nghiệm dựa vào PCR. Các mẫu nhỏ của mô cũng có thể được gửi đi trong bảo quản bằng alcohol (như 80 – 100% ethanol) để xét nghiệm bằng các phương pháp dựa vào PCR.

### **3.3. Gom chung (pooling) các mẫu**

Khi xét nghiệm cá bệnh lâm sàng bằng các phương pháp dựa vào PCR, đặc biệt nếu có cố gắng để phân lập virus, nên tránh gom chung các mẫu hay chỉ giới hạn đến tối đa là hai con cá mỗi mẫu gom. Với xét nghiệm để giám sát sức khỏe bằng các phương pháp dựa vào PCR, mẫu gom chung sẽ giới hạn tối đa năm con cá mỗi mẫu gom.

### **3.4. Các cơ quan hay mô tốt nhất**

Khi xét nghiệm cá bị bệnh lâm sàng bằng các phương pháp dựa vào PCR, và đặc biệt nếu có cố gắng để phân lập virus, khuyến khích nên lấy mẫu ở các mô của mang thở, thận và lách. Virus có nhiều nhất trong các mô này trong quá trình bệnh bộc lộ (13). Khi xét nghiệm cá nhiễm bệnh cận lâm sàng, có biểu hiện khỏe mạnh, bằng các phương pháp dựa vào PCR, khuyến khích cũng bao gồm ruột và não trong mẫu thu thập.

### **3.5. Các mẫu/mô không thích hợp**

Xác cá chết thể hiện dấu hiệu rất tiến triển của phân hủy có thể không thích hợp đối với bất kỳ phương pháp xét nghiệm nào.

## **4. Các phương pháp chẩn đoán**

Chẩn đoán về KHVD trong cá bệnh lâm sàng có thể đạt được bằng nhiều phương pháp. Phân lập bằng tế bào nuôi cho KHV hiện nay không được coi là nhạy vì đã có các phương pháp dựa vào PCR để phát hiện DNA của KHV. Virus chỉ phân lập được trên một số loại tế bào nuôi và các loại tế bào nuôi này khó quản lý. Kết quả là việc phân lập virus trong tế bào nuôi là phương pháp chẩn đoán không tin cậy đối với KHVD (16). Các phương pháp miễn dịch học, giống như các phương pháp áp dụng cho chẩn đoán bệnh nhiễm virus huyết mùa xuân ở cá chép (spring viraemia of carp – SVC) (như các xét nghiệm miễn dịch huỳnh quang [immunofluorescence – IF] hay xét nghiệm phân tích hấp phụ miễn dịch kết hợp enzyme [enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA]), có thể thích hợp cho nhận diện nhanh và chẩn đoán KHVD, nhưng đã không được báo cáo, so sánh đánh giá rộng rãi. Cho đến hiện nay, do các xét nghiệm đã có đánh giá đã sẵn có, chẩn đoán về KHVD sẽ chỉ dựa vào chỉ một kiểm tra mà có kết hợp của hai đến ba xét nghiệm (16).

### **4.1. Các phương pháp chẩn đoán thực địa**

#### **4.1.1. Các dấu hiệu lâm sàng**

Trong một ổ dịch KHVD ở đây sẽ có gia tăng một cách đáng kể tỷ lệ tử vong trong quần thể. Tất cả các nhóm lứa tuổi của cá đều thể hiện có mắc cảm với KHVD, tuy nhiên dưới điều kiện thực nghiệm, cá non hơn đến 1 năm tuổi thì mắc cảm hơn đối với bệnh. Trong kiểm tra kỹ hơn đối với cá thể cá, các dấu hiệu điển hình bao gồm biến màu hay đỏ ửng ở da, cũng có thể có cấu trúc xù xì, biểu bì tróc ra từng đám hay từng mảng, chất nhầy sinh ra quá nhiều hay quá ít trên da và

mang thở, biến màu nhạt đi ở mang thở. Các dấu hiệu đại thể khác bao gồm lổm mắt (enophthalmia: mắt trũng sâu) và xuất huyết trên da và gốc các vây, và loét ở vây.

#### 4.1.2. Các biến đổi tập tính

Cá trở nên lờ đờ, tách ra khỏi bầy và đến nơi có nguồn nước chảy vào hay các thành hồ nuôi và ngáp thở ở mặt nước. Một số cá có thể gặp phải mất thăng bằng và mất định hướng, nhưng chúng cũng có thể thể hiện các dấu hiệu của cường vận động.

### 4.2. Các phương pháp lâm sàng

#### 4.2.1. Bệnh tích đại thể (gross pathology)

Ở đây không có các bệnh tích đại thể là bệnh tích học (pathognomonic lesion). Kết luận chẩn đoán phải chờ đến khi phát hiện DNA của virus hay phân lập ra virus và nhận diện. Tuy nhiên, bệnh tích đại thể thực chất nhất là thấy ở mang thở và có thể khác nhau về mức độ, từ các mảng hoại tử nhạt màu đến biến màu lan rộng, hoại tử nặng nề và viêm. Kiểm tra thêm có thể phát hiện loét ở phiến sơ cấp của mang thở, tan chảy ở phiến thứ cấp, và sưng ở các chót của phiến mang thở sơ cấp và thứ cấp. Các bệnh tích bên trong khác là có vị trí khác nhau và thường không có trong trường hợp tử vong đột ngột. Các bệnh tích đại thể khác đã được báo cáo bao gồm viêm dính trong xoang bụng với có hay không màu bất thường của các cơ quan bên trong (nhạt hơn hay đậm hơn). Thận hay gan có thể sưng, và các cơ quan này có thể thể hiện các điểm xuất huyết (petechial haemorrhagic). Sự hiện diện của các bệnh tích đại thể cũng có thể phức tạp thêm do cá chết, đặc biệt là ở cá chép thường, mà cùng bị nhiễm bởi các ngoại ký sinh khác, như *Argulus* sp., *Chilodonella* sp., *Cryptobia* sp., *Dactylogyrus* sp., *Gyrodactylus* sp., *Ichthyobodo* sp., *Ichthyophthirius* sp., *Trichodina* sp., và các monogeneans khác ở mang thở, cũng như nhiều loài vi khuẩn, đặc biệt là *Flavobacterium columnare* ở các nhiệt độ nước ấm hơn.

#### 4.2.2. Hóa chất dùng trong lâm sàng (clinical chemistry)

Không có thông tin.

#### 4.2.3. Bệnh tích vi thể (microscopic pathology)

Mô bệnh học (histopathology) của bệnh có thể không đặc hiệu và biến thiên, nhưng viêm và hoại tử ở các mang thở được coi là đặc điểm thực chất. Mang thở cũng thể hiện tăng sinh (hyperplasia) và teo (hypertrophy) ở biểu bì của mang cá, và có thể thấy có tan chảy của phiến mang thở thứ cấp (secondary lamellae) và kết dính của các sợi mang thở (gill filaments). Hoại tử mang thở, giới hạn từ các vùng nhỏ hoại tử của các tế bào biểu bì của phiến mang thở thứ cấp đến hoàn toàn mất đi phiến mang thở. Các tế bào biểu bì của mang cá và các tế bào bạch cầu (leucocytes) có thể có chủ yếu là nhân trương to, nhiễm sắc thể dịch ra viền để cho ra dạng “đầu tròn” và thấy có các thể vùi nội nhân nhạt màu rải rác. Viêm, hoại tử và các thể vùi trong nhân cũng quan sát thấy trong các cơ quan khác (từng cơ quan hay nhiều cơ quan), đặc biệt là thận, nhưng cũng có trong lách, tụy tạng, gan, não, ruột và biểu bì vùng miệng.

#### 4.2.4. Tiêu bản ướt (wet mounts)

Không áp dụng.

#### 4.2.5. Tiêu bản khô (smears)

KHV đã nhận diện được trong các mẫu ép (imprint) từ gan, thận và não của cá bị nhiễm, qua xét nghiệm miễn dịch huỳnh quang (immunofluorescence – IF). Các mức độ cao của IF thấy ở thận và virus có thể phát hiện được bằng IF trong mẫu ép của thận vào 1 ngày sau khi gây nhiễm (29, 34).

#### 4.2.6. Soi kính hiển vi điện tử (electron microscopy)/bệnh tích tế bào (cytopathology)

Việc phát hiện các hạt virus bằng kính hiển vi chuyển điện tử (transmission electron microscopy – TEM) đối với các mô của cá chép bệnh lâm sàng là phương pháp chẩn đoán không tin cậy. Các mảnh mô của mang và thận được cố định trong glutaraldehyde sẽ được lấy mẫu từ cá chép bị nhiễm nặng nề ( $> 10^6$  hạt virus). Các kết quả tốt nhất đã thu được từ lấy mẫu một số cá trong một quần thể bị nhiễm ở các giai đoạn khác nhau của bệnh nhiễm. Điều này giúp cho đảm bảo rằng một số mẫu mô là lấy từ các cá thể bị nhiễm nặng nề.

### 4.3. Các phương pháp phát hiện và nhận diện tác nhân gây bệnh

Trong đoạn này, không phải tất cả các phương pháp đều được thể hiện thành chi tiết vì ở đây không có so sánh và đánh giá rộng rãi cho các phương pháp phát hiện và nhận diện KHV. Trong trường hợp này, sẽ có một mô tả ngắn về các phương pháp hiện có đã được công bố. Các khuyến cáo về phương pháp sẽ dựa vào xét nghiệm thêm và đánh giá và dữ liệu có thêm từ các phòng thí nghiệm đã phát triển ra các phương pháp này, để quyết định rằng phương pháp là “phù hợp với mục đích”.

#### 4.3.1. Các phương pháp phát hiện trực tiếp

KHV đã phát hiện được trong các mẫu ép tươi (touch imprint) của gan, thận và não của cá bệnh, bằng miễn dịch huỳnh quang (IF). Các mức độ cao của IF thấy ở thận và virus có thể phát hiện được bằng IF trên mẫu ép tươi của thận vào 1 ngày sau khi bị nhiễm (29, 34). Kháng nguyên của virus cũng đã phát hiện được trong các mô bị nhiễm bằng phương pháp nhuộm miễn dịch ô xy hóa (immunoperoxidase staining). Kháng nguyên của virus đã phát hiện được lúc 2 ngày sau khi bị nhiễm ở thận, và cũng quan sát thấy ở mang thớ và gan (29). Tuy nhiên, việc phát hiện KHV bằng nhuộm màu miễn dịch (immunostaining) phải được diễn giải cẩn thận, do các tế bào nhuộm màu dương tính có thể là kết quả của phản ứng chéo với virus có huyết thanh học có liên quan (như CyHV-1) hay một protein không phải của virus (29). Một phương pháp cho phát hiện trực tiếp KHV từ mẫu ép tươi của thận, bằng xét nghiệm kháng thể huỳnh quang gián tiếp (indirect fluorescent antibody test – IFAT) được mô tả chi tiết dưới đây.

Các phương pháp dựa vào ELISA cho phát hiện trực tiếp kháng nguyên của KHV trong các mô bị nhiễm đều đang được phát triển trong một số phòng thí nghiệm trên thế giới, nhưng không có phương pháp được đánh giá nào được công bố rộng rãi. Hiện nay, đã có một phương pháp ELISA đã công bố và đã được phát triển ở Israel để phát hiện KHV trong chất tiết của cá (phân) (9).

Phương pháp được áp dụng phổ biến nhất cho phát hiện KHV một cách trực tiếp trong các mô của cá là áp dụng các xét nghiệm phân tích dựa vào PCR đặc hiệu đối với KHV.

##### 4.3.1.1. Các phương pháp dùng kính hiển vi (microscopic methods)

###### 4.3.1.1.1. Tiêu bản ướt (wet mounts)

Không áp dụng.

###### 4.3.1.1.2. Tiêu bản khô (smears)/mẫu ép tươi (imprints)

###### 4.3.1.1.2.1. Xét nghiệm kháng thể huỳnh quang gián tiếp trên mẫu ép tươi của thận

i) Lấy huyết hoàn toàn cho cá.

ii) Tạo mẫu ép tươi của thận trên các phiến kính sạch hay ở đáy của các giếng của phiến plastic dùng nuôi tế bào.

iii) Để mẫu ép tươi khô trong không khí trong 20 phút.



iv) Rửa một lần với dịch muối đệm phosphate 0,01 M (phosphate buffered saline – PBS), pH 7,2, sau đó rửa nhanh ba lần với acetone lạnh (bảo quản ở -20°C) cho các phiến kính hay dùng hỗn hợp của 30% acetone/70% ethanol, cũng ở -20°C, cho các phiến plastic.

v) Để hợp chất làm cố định này phản ứng trong 15 phút. Một thể tích 0,5 ml/2 cm<sup>2</sup> giếng là đủ cho các mẫu ép trong phiến plastic nuôi tế bào.

vi) Để các mẫu ép đã cố định này khô trong không khí trong ít nhất 30 phút và xử lý ngay hay bảo quản đông lạnh ở -20°C.

vii) Tái hợp nước cho các mẫu ép bằng bốn bước rửa với dung dịch PBS 0,01 M, pH 7,2, có chứa 0,05% Tween 20 (PBST), và đổ bỏ hoàn toàn dịch đệm này sau lần rửa cuối cùng.

viii) Chuẩn bị một dung dịch của kháng thể đã tinh lọc hay huyết thanh kháng KHV pha trong PBS 0,01 M, pH 7,2, có chứa 0,05% Tween 20 (PBST), ở độ pha loãng thích hợp (mà đã được pha trước đó hay được pha sẵn từ nhà cung cấp).

ix) Kết khối (block) với 5% sữa tách béo hay 1% albumin huyết thanh bò, pha trong PBST trong 30 phút ở 37°C.

x) Rửa bốn lần bằng PBST.

xi) Xử lý các mẫu ép bằng dung dịch kháng thể (đã chuẩn bị từ bước viii) trong 1 giờ ở 37°C trong buồng ẩm và không để xảy ra bốc hơi. Một thể tích là 0,25 ml/2 cm<sup>2</sup> mỗi giếng là đủ cho mẫu ép trong các phiến plastic nuôi tế bào.

xii) Rửa bốn lần với PBST.

xiii) Xử lý các mẫu ép trong 1 giờ ở 37°C với dung dịch của hợp chất kháng thể kháng globulin miễn dịch (kháng với kháng thể đã sử dụng ở bước xi) được kết hợp với fluorescein isothiocyanate (FITC) và chuẩn bị theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các kháng thể kết hợp với FITC này thường là kháng thể từ thỏ hay từ dê.

xiv) Rửa bốn lần với PBST.

xv) Cho PBS vào ở 0,5 ml/2 cm<sup>2</sup> mỗi giếng để xử lý các mẫu ép trong phiến plastic và kiểm tra ngay, hay đặt lên các phiến kính bằng lam kính (cover-slip) cùng với glycerol saline có pH 8,5 trước khi quan sát bằng kính hiển vi.

xvi) Kiểm tra dưới tia UV, sử dụng kính hiển vi với thị kính x 10 và vật kính x 20 – 40, có khẩu độ hội tụ lần lượt là > 0.65 và > 1,3. Phải có các đối chứng dương tính và âm tính để cho ra các kết quả qua mong muốn để so sánh với mọi quan sát khác.

#### *4.3.1.1.3. Các lát cắt đã cố định*

Phương pháp được mô tả trong Đoạn 4.3.1.1.2 nêu trên cũng thích hợp cho phát hiện kháng nguyên của KHV trong các lát cắt mô đã làm thấm nhập paraffin, đã được cố định trong 10% formaline có đệm trung hòa (neutral buffered formalin – NBF). Tuy nhiên, các lát cắt đã khử paraffin, đã được tái hợp nước trong PBS, có thể cần phải được xử lý thêm để bột lộ kháng nguyên mà có thể bị che lấp bởi quá trình làm cố định mô. Một xử lý thông thường là ủ các lát cắt với 0,1% trypsin pha với PBS ở 37°C trong 30 phút. Sau đó rửa các lát cắt trong PBS lạnh trước khi tiến hành đến các bước viii – xvi trong Đoạn 4.3.1.1.2 nêu trên.

LƯU Ý: Để phát hiện trực tiếp kháng nguyên virus bằng IFAT hay hóa miễn dịch mô bào, các mô sẽ được cố định trong 24 – 48 giờ trong 10% NBF và sau đó chất làm cố định được thay thế bằng 70% ethanol để bảo quản lâu dài.

#### **4.3.1.2. Phát hiện, phân lập và nhận diện tác nhân gây bệnh**

#### 4.3.1.2.1. Tế bào nuôi cấy

Chẩn đoán KHVD trong cá bệnh lâm sàng có thể thực hiện được bằng phân lập virus trong tế bào nuôi. Tuy nhiên, virus chỉ phân lập được giới hạn trong một số loại tế bào nuôi và các tế bào này có thể khó tính. Cũng vậy, phân lập bằng tế bào nuôi thì không nhạy như các phương pháp dựa vào PCR đã được công bố, để phát hiện DNA của virus, nên nuôi cấy phân lập không được cho là phương pháp chẩn đoán có tin cậy đối với KHVD (16).

*Các lớp tế bào nuôi (cell line) sẽ sử dụng:* KF-1 hay CCB

*Chiết xuất ra virus*

Áp dụng phương pháp được mô tả trong Chương 2.3.0, Đoạn A.2.2.2.

*Cấy gây nhiễm (inoculation) vào các đơn lớp tế bào*

i) Trước khi cấy gây nhiễm cho tế bào nuôi, các huyền dịch mô cơ quan gom chung có thể được xử lý với các chất kháng sinh như nêu trong Chương 2.3.0, Đoạn A.2.2.1 và A.2.2.2.

ii) Nếu tác động gây động tế bào (cytotoxic effect) quan sát thấy sau khi cấy vào huyền dịch đã được xử lý chất kháng sinh, thì lọc ít nhất 1 ml dịch phù nổi của huyền dịch cơ quan qua lọc cellulose acetate cỡ 0,45  $\mu\text{m}$  (hay lọc cỡ tương tự có màng ít kết bám protein).

iii) Để cấy trực tiếp, chuyển một thể tích thích hợp huyền dịch đã xử lý kháng sinh hay đã lọc lên các lớp tế bào đã nuôi được 24 – 48 giờ trong các bình nuôi flask hay các phiến nhiều giếng. Cấy vào ít nhất 5  $\text{cm}^2$  của lớp tế bào với 100  $\mu\text{l}$  dịch phù nổi đã lọc. Cách khác, tạo thêm độ pha loãng gấp mười lần của dịch phù nổi qua lọc pha với môi trường nuôi tế bào, đã được đệm ở pH 7,6 và được bổ sung 2% huyết thanh phôi bê (fetal calf serum – FCS), và để hấp phụ trong 0,5 – 1 giờ ở 18 – 22°C. Sau đó, không trút bỏ dịch cấy, thêm vào một thể tích thích hợp môi trường nuôi tế bào (1 – 1,5 ml/5  $\text{cm}^2$  cho bình nuôi flask), và ủ ở 20 đến 25°C.

LƯU Ý: Khi sử dụng các phiến nhiều giếng, ủ dưới khí quyển  $\text{CO}_2$  sẽ duy trì được pH trong quá trình ủ.

*Theo dõi quá trình ủ cấy*

i) Theo dõi tiến trình gây nhiễm trong các đối chứng dương tính và các tế bào nuôi cấy khác bằng kiểm tra hàng ngày với kính hiển vi ở độ phóng đại x 40 – 100 trong 14 ngày. Khuyến nên sử dụng kính hiển vi phản quang (phase-contrast microscope).

ii) Duy trì pH của môi trường nuôi tế bào ở từ 7,3 đến 7,6 trong quá trình ủ cấy. Điều này có thể đạt được bằng thêm vào môi trường nuôi tế bào dịch đệm bicarbonate vô trùng hay môi trường HEPES có đệm (HEPES-buffered medium: HEPES = N-2-hydroxyethyl-piperazine-N-2-ethanesulfonic acid) cho các bình nuôi cấy flask có nắp đậy kín.

iii) Nếu xuất hiện tác động gây bệnh tích tế bào (cytopathic effect – CPE) trong các mẻ cấy này với các độ pha loãng của dịch phù nổi, các phương pháp nhận diện sẽ được tiến hành ngay (xem Đoạn 4.3.1.2.2 dưới đây).

iv) Nếu không phát triển CPE trong các mẻ cấy (mặc dù có tiến triển CPE bình thường trong các đối chứng có virus), cấy truyền tiếp các mẻ cấy trong 14 ngày. Nếu virus đối chứng không phát triển được CPE, xét nghiệm phải được lặp lại với các lớp tế bào mới có miễn cảm với các lô mới của mẫu.

*Phương pháp cấy truyền tiếp (subcultivation)*

i) Chuyển các lượng dịch của môi trường nuôi tế bào từ tất cả các mẻ cấy đã được cấy bằng dịch phù nổi của huyền dịch mẫu, lên các lớp tế bào nuôi mới.

ii) Cấy vào các lớp tế bào đơn mới này như mô tả ở Đoạn 4.3.1.2.1 phần trên, bước iii.

iii) Ủ và theo dõi như mô tả trong Đoạn 4.3.1.2.1 phần trên.

Nếu không phát hiện thấy CPE, xét nghiệm có thể tuyên bố là âm tính.

#### *Nhận diện để xác nhận (confirmatory identification)*

Phương pháp tin cậy nhất cho xác nhận nhận diện của một CPE là bằng PCR, sau đó là các phân tích kết chuỗi của sản phẩm PCR. Các phương pháp PCR được khuyến áp dụng để nhận diện KHV là giống như các phương pháp được khuyến áp dụng cho phát hiện trực tiếp trong mô của cá (Đoạn 4.3.1.2.3 dưới đây). Để xác nhận cuối cùng, các sản phẩm của PCR có kích thước đúng sẽ được nhận diện là có nguồn gốc từ KHV bằng các phân tích kết chuỗi (xem Đoạn 4.3.1.2.3 dưới đây).

#### *Xác nhận bằng PCR*

i) Chiết xuất DNA từ dịch phù nổi của mẻ tế bào cấy virus, sử dụng bộ kit chiết xuất DNA thích hợp. Một thí dụ cho chiết xuất DNA, áp dụng phương pháp chiết xuất dựa vào muối (tác nhân DNAzol® reagent) được mô tả dưới đây trong Đoạn 4.3.1.2.3.1.

ii) DNA chiết xuất được sau đó được đem khuếch đại bằng các giao thức PCR như mô tả dưới đây trong Đoạn 4.3.1.3.1.1. Các sản phẩm PCR đã khuếch đại được sau đó có thể được hiển thị trên keo và được phân tích kết chuỗi như được mô tả trong Đoạn 4.3.1.2.3.

#### *4.3.1.2.2 Các phương pháp phát hiện kháng nguyên dựa vào kháng thể*

Các phương pháp dựa vào xét nghiệm phân tích hấp phụ miễn dịch kết hợp enzyme (enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA) để phát hiện trực tiếp kháng nguyên của KHV trong các mô bị nhiễm còn đang trong phát triển ở một số phòng thí nghiệm, và các phương pháp này cũng có thể thích hợp cho xác nhận nhận diện về KHV. Hiện nay, một phương pháp ELISA đã được công bố hiện sẵn có và đã được phát triển ở Israel để phát hiện KHV trong chất tiết của cá (phân cá) (9).

Các phương pháp nhận diện virus mà dựa vào tạo nên tế bào nuôi cấy bị nhiễm KHV (như các xét nghiệm IFAT, miễn dịch ô xy hóa [immunoperoxidase] và trung hòa huyết thanh [serum neutralisation]) đều không được khuyến áp dụng. Điều này là do virus phát triển chậm và không chuẩn xác trong các tế bào nuôi cấy.

#### *4.3.1.2.3. Các phương pháp phân tử*

Với các phương pháp PCR một lần (single-round PCR) đã được công bố, chi tiết về các giao thức nêu dưới đây hiện nay được coi là nhạy nhất cho phát hiện DNA của KHV trong các mẫu mô tươi từ cá chép bệnh lâm sàng. Các giao thức này có thể cũng phát hiện đến các mức độ cận lâm sàng (subclinical) của virus. Phương pháp thứ nhất sử dụng bộ đoạn mồi TK (TK primer set) được phát triển bởi Bercovier và cộng sự ở Hebrew University-Hadassah Medical School của Israel (3). Phương pháp thứ nhì được phát triển bởi Yuasa và cộng sự ở Viện nghiên cứu Quốc gia về Thủy sản (National Research Institute of Aquaculture – NRIA), Watarai, Mie, Nhật Bản (45) và là một cải tiến từ giao thức đã được phát triển và công bố của Gray và cộng sự (14). Nếu mẫu mô thể hiện bằng chứng phân hủy thì nên sử dụng các bộ đoạn mồi nhắm đến các vùng ngắn hơn của gen di truyền, như các bộ đoạn mồi được phát triển bởi Hutoran và cộng sự (20). Cách khác, các bộ đoạn mồi mở rộng có thể được cải tiến đến các kết chuỗi mục tiêu ngắn hơn trong gen di truyền của KHV.

Giao thức chuẩn bị mẫu nêu chi tiết dưới đây áp dụng phương pháp chiết xuất dựa vào muối (salt-based extraction: sử dụng tác nhân DNAzol® reagent) để chiết xuất DNA của KHV. Đây là giao thức dễ dàng áp dụng, thời gian ngắn mà cũng tương đối rẻ tiền so với một số bộ kit. Các phòng thí nghiệm không quen với DNAzol® hay các tác nhân chiết xuất dựa vào muối khác có thể tìm

kiểm các phương pháp kém tin cậy nhưng trong tầm tay. Tuy nhiên có nhiều bộ kit chiết xuất DNA, dựa vào muối và dựa vào sinh khối silica (salt-based and silica-matrix based) sẵn có trong thương mại (các nhà sản xuất quen thuộc gồm Roche, Qiagen và Invitrogen) mà sẽ cho ra DNA chất lượng cao thích hợp cho sử dụng trong các giao thức PCR.

#### 4.3.1.2.3.1. Phát hiện trực tiếp bằng PCR

##### *Chuẩn bị mẫu và chiết xuất DNA bằng sử dụng tác nhân DNAzol®*

Chiết xuất virus từ các mô cơ quan sẽ được thực hiện theo phương pháp được mô tả trong Chương 2.3.0, Đoạn A.2.2.2.

i) Cho 100  $\mu$ l huyền dịch mô (1/10 [w/v]) vào ống vi ly tâm (microcentrifuge) dung tích 1,5 ml có chứa 1 ml tác nhân DNAzol®.

ii) Trộn nhẹ nhàng bằng đảo ngược ống năm lần và để yên ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, sau đó ly tâm ở 10.600 **g** trong 10 phút với máy vi ly tâm.

iii) Lấy ra 1 ml dịch phù nổi cho vào một ống vi ly tâm mới có chứa 0,5 ml ethanol.

iv) Trộn nhẹ nhàng bằng đảo ngược ống năm lần và để yên ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, sau đó ly tâm ở 18.000 **g** trong 30 phút bằng máy vi ly tâm.

v) Loại bỏ dịch phù nổi và rửa phần trầm lắng với 250  $\mu$ l dung dịch 70% ethanol pha với nước loại dùng cho xét nghiệm phân tử (molecular biology grade water).

vi) Ly tâm các mẫu AND này trong 5 phút ở 18.000 **g**.

vii) Loại bỏ ethanol bằng sử dụng ống hút pipette và để phần trầm lắng khô trong không khí, bằng cách đặt nghiêng ống và để miệng ống mở, trong 5 phút.

viii) Tái hòa tan phần trầm lắng trong 50  $\mu$ l nước loại dùng cho xét nghiệm phân tử, đã làm ấm trước đến 60°C, và ủ ở 60°C trong 5 phút. Các mẫu AND này có thể được bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng.

##### *Các lưu ý chung*

PCR có khuynh hướng cho ra các kết quả dương tính sai và âm tính sai. Do đó, từng xét nghiệm và chiết xuất mô phải được bao gồm một đối chứng âm tính để loại trừ vấy nhiễm. Để giảm thiểu nguy cơ vấy nhiễm, các ống hút có đầu tránh tạo khí dung sẽ được sử dụng cho tất cả các mẫu và các bước chuẩn bị PCR. Ngoài ra, tất cả các PCR phải được chuẩn bị trong một khu vực sạch mà tách biệt với khu vực dùng để thực hiện khuếch đại và điện di. Điều này sẽ giảm thêm được nguy cơ về các kết quả dương tính sai do vấy nhiễm.

##### *Giao thức 1 (với các đoạn mồi Bercovier TK)*

i) Với từng mẫu, chuẩn bị một hỗn hợp chính (master mix) chứa:

10 $\mu$ l	Dịch đệm phản ứng (reaction buffer) (đậm độ $\times 10$ )
5 $\mu$ l	MgCl <sub>2</sub> (25 mM stock)
0.5 $\mu$ l	dNTPs (25 mM mix)
0.5 $\mu$ l	Đoạn mồi chiều đi (forward primer: 100 pmol $\mu$ l <sup>-1</sup> stock)
0.5 $\mu$ l	Đoạn mồi chiều về (reverse primer: 100 pmol $\mu$ l <sup>-1</sup> stock)
0.25 $\mu$ l	DNA polymerase 500 $\mu$ (5 $\mu$ / $\mu$ l)
30.75 $\mu$ l	Nước loại dùng cho xét nghiệm phân tử (molecular biology grade water)
Các đoạn mồi Bercovier TK:	
Chiều đi =	5'-GGG-TTA-CCT-GTA-CGA-G-3'
Chiều về =	5'-CAC-CCA-GTA-GAT-TAT-GC-3'

Kích thước sản phẩm = 409 bp

Với từng mẫu, chia 47,5  $\mu$ l vào ống vi ly tâm vách mỏng dung tích 0,5 ml. Phủ lên bề mặt hỗn hợp với hai giọt dầu khoáng.

ii) Thêm vào 2,5  $\mu$ l DNA chiết xuất được. Bảo quản phần DNA còn lại ở  $-20^{\circ}\text{C}$ .

iii) Đặt các ống vào máy gia nhiệt chu kỳ (thermal cycler) và chạy chương trình sau:

1 chu kỳ với: 5 phút ở  $94^{\circ}\text{C}$ ;  
40 chu kỳ với: 1 phút ở  $95^{\circ}\text{C}$   
1 phút ở  $55^{\circ}\text{C}$   
1 phút ở  $72^{\circ}\text{C}$

Một bước duỗi dài (extension) cuối cùng trong 10 phút ở  $72^{\circ}\text{C}$ .

iv) Điện di (electrophoresis) các thể tích 20  $\mu$ l của sản phẩm PCR trên keo agarose đã được nhuộm ethidium bromide (4% agarose khi phân tách các sản phẩm khuếch đại nhỏ hơn 300 bp), điện di ở 120 V trong 20 phút và hiển thị dưới tia UV. Sẽ bao gồm thang độ thích hợp để đo phân tử khối trên keo, để xác định kích thước của sản phẩm PCR.

v) Các sản phẩm có kích thước đúng sẽ được xác nhận là có nguồn gốc từ KHV bằng các phân tích kết chuỗi (sequence analysis).

#### *Giao thức 2 (với các đoạn mỗi cải tiến của Gray Sph /Yuasa)*

i) Với từng mẫu, chuẩn bị một hỗn hợp chính có chứa:

2  $\mu$ l Dịch đệm phản ứng (reaction buffer đậm độ  $\times 10$ )  
1.6  $\mu$ l dNTPs (2.5 mM mix)  
0.2  $\mu$ l Đoạn mỗi chiều đi (forward primer: 50 pmol  $\mu$ l $^{-1}$  stock)  
0.2  $\mu$ l Đoạn mỗi chiều về (reverse primer: 50 pmol  $\mu$ l $^{-1}$  stock)  
0.1  $\mu$ l DNA polymerase  
14.9  $\mu$ l Nước loại dùng cho phản ứng phân tử (molecular biology grade water)

(LƯU Ý: hàm lượng cuối cùng của  $\text{MgCl}_2$  trong hỗn hợp chính là 2 mM)

Các đoạn mỗi Gray Sph:

Chiều đi = 5'-GAC-ACC-ACA-TCT-GCA-AGG-AG-3'

Chiều về = 5'-GAC-ACA-TGT-TAC-AAT-GGT-CGC-3'

Kích thước sản phẩm = 292 bp

Với từng mẫu, chia 19  $\mu$ l vào ống vi ly tâm vách mỏng dung tích 0,2 ml. Phủ lên bề mặt hỗn hợp hai giọt dầu khoáng.

ii) Thêm vào 1  $\mu$ l DNA chiết xuất được.

iii) Đặt các ống vào máy gia nhiệt chu kỳ và thực hiện chương trình sau:

1 chu kỳ với: 30 giây ở  $94^{\circ}\text{C}$   
40 chu kỳ với: 30 giây ở  $94^{\circ}\text{C}$   
30 giây ở  $63^{\circ}\text{C}$   
30 giây ở  $72^{\circ}\text{C}$

Một bước duỗi dài cuối cùng trong 7 phút ở  $72^{\circ}\text{C}$ .

iv) Thêm 3  $\mu$ l dịch đệm chạy đậm độ  $\times 6$  vào từng sản phẩm PCR và đem 7  $\mu$ l hỗn hợp này đi điện di trên keo agarose 2% đã nhuộm ethidium bromide, điện di ở 120 V trong 20 phút và quan sát dưới tia UV. Một thang độ thích hợp dùng để đo phân tử khối sẽ bao gồm trên keo để xác định kích thước của sản phẩm PCR.

v) Các sản phẩm có kích thước đúng sẽ được xác nhận là có nguồn gốc từ KHV, bằng các phân tích kết chuỗi.

## Phân tích kết chuỗi nucleotide cho các sản phẩm PCR

Các sản phẩm PCR được trích ly ra khỏi keo và được làm tinh khiết, sử dụng một bộ kit thương mại cho tinh lọc keo (như GeneClean®, Q-BIOgene, UK). Các sản phẩm đơn lẻ, tinh khiết, sau khi tinh lọc được đem phân tích kết chuỗi một cách trực tiếp với các đoạn mồi được sử dụng trong khuếch đại ban đầu. Cách khác, các sản phẩm PCR kém tinh khiết hơn được sao chép bằng sử dụng một trung gian sao chép TA (như pGEM T, Promega) và cả hai dòng DNA đều được phân tích kết chuỗi, sử dụng các bộ đoạn mồi tổng hợp M13. Quá trình khuếch đại, sao chép và phân tích kết chuỗi được thực hiện thành nhân đôi để giảm thiểu các lỗi có khả năng đưa vào bởi Taq polymerase. Sau đó các phản ứng kết chuỗi được phân tích trong máy phân tích gen (Genetic Analyser) và thứ tự sắp xếp kết chuỗi được tính ra bởi phần mềm máy tính thích hợp (như phần mềm Sequencher™ 4.0, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA). Các phòng thí nghiệm xét nghiệm mà không có thiết bị phân tích kết chuỗi được khuyến khích sử dụng các phòng thí nghiệm thương mại mà có dịch vụ phân tích kết chuỗi. Các phòng thí nghiệm xét nghiệm sẽ theo các hướng dẫn được cung cấp bởi dịch vụ phân tích kết chuỗi đã chọn để gửi đến các mẫu xét nghiệm.

### 4.3.2. Các phương pháp huyết thanh học

Tình trạng miễn dịch của cá là yếu tố quan trọng sau khi phơi nhiễm với KHV, với cả miễn dịch không đặc hiệu (chất cản nhiễm interferon) lẫn miễn dịch đặc hiệu (các kháng thể trong huyết thanh, miễn dịch quan trung gian tế bào) đều có các vai trò quan trọng trong bệnh nhiễm herpesvirus. Bệnh lâm sàng xảy ra chủ yếu ở các nhiệt độ nước từ 18°C và cao hơn, khi đáp ứng miễn dịch của ký chủ là tối ưu. Cá chép bị nhiễm sản sinh ra các kháng thể kháng virus, và các xét nghiệm ELISA đã được công bố sẽ dựa vào phát hiện các kháng thể này ở độ pha loãng cao của huyết thanh (1, 26, 30, 36). Kháng thể đã phát hiện thấy trong huyết thanh ở 3 tuần sau khi gây bệnh thực nghiệm và tồn tại trong cá sống sót đến 1 năm sau khi bị nhiễm tự nhiên (1, 30, 36).

Huyết thanh từ cá chép koi chứa các kháng thể kháng KHV đã thể hiện có phản ứng chéo, ở mức độ thấp, với CyHV-1, là một chỉ thị thêm cho sự liên quan gần gũi giữa các virus này. Bằng chứng về các phản ứng chéo đã chứng minh được trong ELISA thuận nghịch (reciprocal ELISA) và các phân tích thấm thấu cầu Tây (Western blot analyses) đối với huyết thanh từ cá chép koi bị nhiễm bởi CyHV-1 hay KHV (1). Các nhà chẩn đoán virus học cũng sẽ lưu ý rằng cá mới được cấp vaccin kháng KHV có thể có xét nghiệm dương tính trong các ELISA phát hiện kháng thể.

Việc phát hiện các kháng thể có thể chứng minh là một phương pháp có giá trị về nhận biết phơi nhiễm trước đó đối với KHV trong cá có biểu hiện khỏe mạnh, và cho đến khi các phương pháp dựa vào PCR đã được phát triển mà có khả năng phát hiện một cách tin cậy virus tồn tại trong cá đã bị phơi nhiễm, thì các xét nghiệm dựa vào kháng thể có thể vẫn là công cụ giám sát duy nhất. Tuy nhiên, do chưa đủ hiểu biết về các đáp ứng huyết thanh học của cá đối với virus gây nhiễm, việc phát hiện các kháng thể của cá đối với các virus vẫn chưa được chấp nhận là phương pháp theo dõi để làm thủ tục cho xác định tình trạng nhiễm virus của các quần thể cá. Việc đánh giá một số kỹ thuật huyết thanh học đối với một số bệnh do virus ở cá sẽ gia tăng trong tương lai gần, hướng đến việc áp dụng huyết thanh học ở cá được chấp nhận rộng rãi hơn cho các mục đích theo dõi sức khỏe.

## 5. So sánh các xét nghiệm theo mục đích áp dụng

Các phương pháp hiện nay sẵn có cho giám sát mục tiêu (targeted surveillance) và chẩn đoán đối với KHV được liệt kê trong Bảng 5.1. Ký hiệu sử dụng trong Bảng gồm: a = phương pháp là được khuyến áp dụng vì các lý do về sự sẵn có, tính tiện dụng, có độ nhạy và tính đặc hiệu của chẩn đoán; b = phương pháp là phương pháp chuẩn với độ nhạy và tính đặc hiệu tốt cho chẩn đoán; c = phương pháp đã áp dụng trong một số hoàn cảnh, nhưng chi phí, tính chính xác, hay các yếu tố khác làm giới hạn nhiều ứng dụng của các phương pháp này; và d = phương pháp hiện nay không khuyến áp dụng cho mục đích này. Ở đây có một số vấn đề như tính thích hợp liên quan đến các tiêu chí về độ tin cậy, độ nhạy, tính đặc hiệu và tính tiện dụng. Mặc dù không phải tất cả các xét nghiệm được liệt kê trong nhóm a hay b đều được trải qua thể thức chuẩn hóa và đánh giá,

nhưng bản chất thủ tục của các xét nghiệm này và thực tế là đã được áp dụng rộng rãi mà không cho ra các kết quả nhầm lẫn, đã làm cho các xét nghiệm này được chấp nhận.

**Bảng 5.1. Các phương pháp cho giám sát tập trung và chẩn đoán**

Phương pháp	Giám sát tập trung				Chẩn đoán ban đầu	Chẩn đoán xác nhận
	Ấu trùng (larvae)	Sau ấu trùng (post larvae)	Thiếu trùng (juveniles)	Trưởng thành (adults)		
Các dấu hiệu đại thể	d	d	c	c	c	d
Trực tiếp soi kính hiển vi quang học	d	d	c	c	c	d
Mô bệnh học (histopathology)	d	c	c	c	c	c
Phân lập trong tế bào nuôi	d	d	d	d	c	d
Soi kính hiển vi chuyển điện tử	d	d	d	d	c	c
Các xét nghiệm phân tích phát hiện virus dựa vào kháng thể	d	d	c	c	c	b
Thăm dò DNA tại phòng thí nghiệm (DNA probes – <i>in situ</i> )	d	d	c	c	b	c
PCR	d	d	b	b	a	a
Phân tích kết chuỗi (sequence)	NA	NA	NA	NA	NA	a
Các xét nghiệm phân tích phát hiện kháng thể (huyết thanh học)	d	d	c	b	d	d
Phân tích sinh học (bioassay)	NA	NA	NA	NA	NA	NA

PCR = phản ứng chuỗi phân tử (polymerase chain reaction); NA = Không áp dụng.

## 6. (Các) khuyến cáo cho giám sát tập trung để tuyên bố sạch đối với bệnh do herpesvirus ở cá chép koi

Giám sát tập trung sẽ dựa vào theo dõi thường xuyên các vị trí có các loài có mẫn cảm. Các vị trí sẽ được theo dõi khi các nhiệt độ nước đạt đến các mức độ mà cho phép phát triển bệnh (> 17°C) và không sớm hơn 3 tuần sau khi các nhiệt độ nước đã đạt đến. Mọi cá chết, hay cá thể hiện tập tính bất thường, mà tìm thấy trong các vị trí này, sẽ được lấy mẫu và xét nghiệm, áp dụng các xét nghiệm nhạy nhất sẵn có (như PCR). Hiện nay không có các phương pháp khuyến áp dụng cho xét nghiệm các quần thể khỏe mạnh của cá có mẫn cảm để tuyên bố là sạch bệnh đối với KHV. Tuy nhiên, nhiều phòng thí nghiệm phát triển điều tra thêm về các phương pháp dựa vào phân tử để gia tăng độ nhạy (như PCR thời gian thực [real-time PCR] hay PCR kết ổ [nested PCR]) và phát hiện được một cách tin cậy các mức độ thấp của DNA của virus tồn tại. Các xét nghiệm phân tích này có thể chứng minh thích hợp tốt cho các chương trình giám sát. Cách khác, việc phát hiện các kháng thể có thể chứng minh là phương pháp có giá trị để nhận biết phơi nhiễm trước đó đối với KHV trong cá thể hiện bình thường. Việc đánh giá các xét nghiệm phân tích miễn dịch enzyme (enzyme immunoassay) để phát hiện kháng thể đối với KHV sẽ gia tăng trong tương lai, dẫn đến việc áp dụng các xét nghiệm phân tích này được chấp nhận rộng rãi hơn cho các mục đích theo dõi sức khỏe.

## 7. Kết hợp tiêu chí chẩn đoán

### 7.1. Định nghĩa trường hợp nghi ngờ

Sẽ có nghi ngờ là KHV nếu hội đủ ít nhất một trong tiêu chí sau đây:

- i) Sự thể hiện các dấu hiệu lâm sàng điển hình của KHVD trong một quần thể cá có mẫn cảm.
- ii) Thể hiện mô bệnh học điển hình, trong các lát cắt mô, là thực chất của KHVD.

iii) Có CPE điển hình quan sát thấy trong tế bào nuôi cấy có miễn cảm, mà không nhận diện tác nhân gây bệnh tích.

iv) Một kết quả dương tính đơn lẻ từ một xét nghiệm chẩn đoán như IFAT trên mẫu mô ép (imprint) hay PCR như được mô tả trong Đoạn 4.3.1 phần trên.

v) Sự di chuyển cá từ vị trí mà sự hiện diện của KHV đã được xác nhận, hay có nghi ngờ, do có thể hiện bệnh lâm sàng, sang các vị trí chưa có nghi ngờ KHV.

vi) Thiết lập được các liên kết dịch tễ học đến các vị trí đã xác nhận KHV.

vii) Đã phát hiện được kháng thể kháng với KHV.

LƯU Ý: Khi các vị trí đã được nhận ra là nghi ngờ dưới tiêu chí v) và vi), việc xét nghiệm KHV sẽ chỉ được tiến hành nếu các nhiệt độ nước đã đạt đến các mức độ mà cho phép phát triển được bệnh (> 17°C). Nếu các nhiệt độ nước là dưới các mức độ cho phép phát triển bệnh, thì mẫu cá còn sống có thể được đặt vào các nhiệt độ cao hơn (lý tưởng là 20 – 24°C) và được xét nghiệm vào 14 – 21 ngày sau.

## 7.2. Định nghĩa các trường hợp được xác nhận

Tiêu chí sau đây sẽ hội đủ cho xác nhận KHV:

i) Tỷ lệ tử vong, các dấu hiệu lâm sàng và các biến đổi bệnh tích thực chất của bệnh do KHV (Đoạn 4.2) và phát hiện có KHV bằng một hay nhiều phương pháp sau đây:

- a) Phát hiện KHV bằng PCR theo các phương pháp được mô tả trong Đoạn 4.3.1.2.3.
- b) Phát hiện KHV trong các mô xử lý bằng các phương cách của kháng thể đặc hiệu kháng KHV (như IFAT trên mẫu mô ép theo mô tả trong Đoạn 4.3.1.1.2);
- c) Phân lập và nhận diện KHV trong tế bào nuôi từ ít nhất một mẫu từ bất kỳ cá nào trong vị trí, như mô tả trong Đoạn 4.3.1.2.1.

ii) Khi không có tử vong hay dấu hiệu lâm sàng, thì phát hiện bằng một trong các phương pháp sau:

- d) Phát hiện và xác nhận KHV bằng PCR theo các phương pháp mô tả trong Đoạn 4.3.1.2.3;
- e) Các kết quả dương tính từ hay xét nghiệm chẩn đoán riêng biệt như mô tả phần trên.

## 8. Tham khảo

1. ADKISON M.A., GILAD O. & HEDRICK R.P. (2005). An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to the koi herpesvirus (KHV) in the serum of koi *Cyprinus carpio*. *Fish Pathol.*, **40**, 53–62.
2. AOKI T., HIRONO I., KUROKAWA K., FUKUDA H., NAHARY R., ELDAR A., DAVISON A.J., WALTZEK T.B., BERCOVIER H. & HEDRICK R.P. (2007). Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide. *J. Virol.*, **81** (10), 5058–5065.
3. BERCOVIER H., FISHMAN Y., NAHARY R., SINAI S., ZLOTKIN A., EYNGOR M., GILAD O., ELDAR A. & HEDRICK R.P. (2005). Cloning of the koi herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis. *BMC Microbiol.*, **5**, 1–9.
4. 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.



5. BRETZINGER A., FISCHER-SCHERL T., OUMOUNA M., HOFFMANN 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.
6. CHOI D.L., SOHN S.G., BANG J.D., DO J.W. & PARK M.S. (2004). Ultrastructural identification of a herpes-like virus infection in common carp *Cyprinus carpio* in Korea. *Dis. Aquat. Org.*, **61**, 165–168.
7. COSTES B., STALIN RAJ V., MICHEL B., FOURNIER G., THIRION M., GILLET L., MAST J., LIEFFRIG F., BREMONT M. & VANDERPLASSCHEN A. (2009). The major portal of entry of koi herpesvirus in *Cyprinus carpio* is the skin. *J. Virol.*, **83**, 2819–2830.
8. DENHAM K. (2003). Koi herpesvirus in wild fish. *Vet. Rec.*, **153**, 507.
9. DISHON A., PERELBERG A., BISHARA-SHIEBAN J., ILOUZE M., DAVIDOVICH M., WERKER S. & KOTLER M. (2005). Detection of carp interstitial nephritis and gill necrosis virus in fish droppings. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 7285-7291.
10. EL-MATBOULI M., SALEH M. & SOLIMAN H. (2007) Detection of cyprinid herpesvirus type 3 in goldfish cohabiting with CyHV-3-infected koi carp (*Cyprinus carpio koi*). *Vet. Rec.*, **161**, 792-793.
11. GILAD O., YUN S., ADKISON M.A., WAY K., WILLITS N.H., BERCOVIER H. & HEDRICK R.P. (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**, 2661–2667.
12. GILAD O., YUN S., ANDREE K.B., ADKISON M.A., ZLOTKIN A., BERCOVIER H., ELДАР A. & HEDRICK R.P. (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.
13. GILAD O., YUN S., ZAGMUTT-VERGARA F.J., LEUTENEGGER C.M., BERCOVIER H. & HEDRICK R.P. (2004). Concentrations of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio koi* as assessed by real-time TaqMan PCR. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 179–187.
14. GRAY W.L., MULLIS L., LAPATRA S.E., GROFF J.M. & GOODWIN A. (2002). Detection of koi herpesvirus DNA in tissues of infected fish. *J. Fish Dis.*, **25**, 171–178.
15. HAENEN O. & HEDRICK R.P. (2006). Koi herpesvirus workshop. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* (Section 2: Workshops), **26** (1), 26–37.
16. HAENEN O.L.M., WAY K., BERGMANN S.M. & ARIEL E. (2004). The emergence of koi herpesvirus and its significance to European aquaculture. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **24**, 293–307.
17. HARAMOTO E., KITAJIMA M., KATAYAMA H. & OHGAKI S. (2007). Detection of koi herpesvirus DNA in river water in Japan. *J. Fish Dis* , **30**, 59–61.
18. HEDRICK R.P., GILAD O., YUN S., SPANGENBERG J.V., MARTY G.D., NORDHAUSEN R.W., KEBUS M.J., BERCOVIER H. & ELДАР A. (2000). A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. *J. Aquat. Anim. Health*, **12**, 44–57.
19. HEDRICK R.P., WALTZEK T.B. & McDOWELL T.S. (2006). Susceptibility of koi carp, common carp, goldfish and goldfish x common carp hybrids to cyprinid herpesvirus-2 and herpesvirus-3. *J. Aquat. Anim. Health*, **18**, 26–34.
20. 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.

21. ITO T., SANO M., KURITA J., YUASA K. & IIDA T (2007). Carp larvae are not susceptible to koi herpesvirus. *Fish Pathol.*, **42**, 107–109.
22. KASAI H., MUTO Y. & YOSHIMIZU M. (2005). Virucidal effects of ultraviolet, heat treatment and disinfectants against koi herpesvirus (KHV). *Fish Pathol.*, **40**, 137–138.
23. LATIFF F.A. (2004). Current status of transboundary fish diseases in Malaysia: occurrence, surveillance, research and training. *In: Transboundary Fish Diseases in Southeast Asia: Occurrence, Surveillance, Research and Training*, Lavilla-Pitogo C.R. & Nagasawa K., eds. SEAFDEC Aquaculture Department, Tigbauan, Iloilo, Philippines, pp. 131–157.
24. MIYAZAKI T., KUZUYA Y., YASUMOTO S., YASUDA M. & KOBAYASHI T. & (2008). Histopathological and ultrastructural features of koi herpesvirus (KHV)-infected carp *Cyprinus carpio*, and the morphology and morphogenesis of KHV. *Dis. Aquat. Org.*, **80**, 1–11.
25. MUSA N., LEONG N.K. & SUNARTO A. (2005). Koi herpesvirus (KHV) – an emerging pathogen in koi. *Colloquium on Viruses of Veterinary and Public Health Importance, Bangi, Malaysia*, 146–147.
26. PERELBERG A., ILOUZE M., KOTLER M. & STEINITZ M., (2008). Antibody response and resistance of *Cyprinus carpio* immunized with cyprinid herpes virus 3 (CyHV-3). *Vaccine*, **26**, 3750–3756.
27. PERELBERG A., RONEN A., HUTORAN M., SMITH Y. & KOTLER M. (2005). Protection of cultured *Cyprinus carpio* against a lethal viral disease by an attenuated virus vaccine. *Vaccine*, **23**, 3396–3403.
28. 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. *Israeli J. Aquaculture*, **55**, 5–12.
29. PIKARSKY E., RONEN A., ABRAMOWITZ J., 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.
30. RONEN A., PERELBERG A., ABRAMOWITZ J., HUTORAN M., TINMAN S., BEJERANO I., STEINITZ M. & KOTLER M. (2003). Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*. *Vaccine*, **21**, 4677–4684
31. SADLER J., MARECAUX E. & GOODWIN A.E. (2008). Detection of koi herpesvirus (CyHV-3) in goldfish, *Carassius auratus* (L.), exposed to infected koi. *J. Fish Dis.*, **25**, 171–178.
32. SANO M., ITO T., KURITA J., YANAI T., WATANABE N., MIWA S. & IIDA T. (2004A). First detection of koi herpesvirus in cultured common carp *Cyprinus carpio* in Japan. *Fish Pathol.*, **39**, 165–167.
33. SCHLOTTFELDT H.F. (2004). Severe losses of common carp in Germany due to Koi Herpesvirus (KHV). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **24**, 216–217.
34. SHAPIRA Y., MAGEN Y., ZAK T., KOTLER M., HULATA G. & EVAVI-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.
35. SHIMIZU T., YOSHIDA N., KASAI H. & YOSHIMIZU M. (2006). Survival of koi herpesvirus (KHV) in environmental water. *Fish Pathol.*, **41**, 153–157.
36. ST-HILAIRE S., BEEVERS N., WAY K., LE DEUFF R.M., MARTIN P. & JOINER C. (2005). Reactivation of koi herpesvirus infections in common carp *Cyprinus carpio*. *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 15–23.

37. SUNARTO A., RUKYANI A. & ITAMI T. (2005). Indonesian experience on the outbreak of koi herpesvirus in koi and carp (*Cyprinus carpio*). *Bull. Fish. Res. Agency*, Supplement No. 2: 15–21.
38. TAKASHIMA Y., WATANABE N., YANAI T. & NAKAMURA T. (2005). The status of koi herpesvirus disease outbreaks in Lake Kasumigaura and Kitaura. *Bull. Fish. Res. Agency*, Supplement No. 2: 65–71.
39. TERHUNE J.S., GRIZZLE J.M., HAYDEN K. & MCCLENAHAN S.D. (2004). First report of koi herpesvirus in wild common carp in the Western Hemisphere. *Fish Health Newsletter.American Fisheries Society, Fish Health Section*, **32**, 8–9.
40. TU C., WENG M.C., SHIAU J.R. & LIN S.Y. (2004). Detection of koi herpesvirus in koi *Cyprinus carpio* in Taiwan. *Fish Pathol.*, **39**, 109–110.
41. WALSTER C. (1999). Clinical observations of severe mortalities in koi carp, *Cyprinus carpio*, with gill disease. *Fish Vet. J.*, **3**, 54–58.
42. WALTZEK T.B., KELLEY G.O., STONE D.M., WAY K., HANSON L., FUKUDA H., HIRONO I., AOKI T., DAVISON A.J. & HEDRICK R.P. (2005). Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family *Herpesviridae*. *J. Gen. Virol.*, **86**, 1659–1667.
43. YASUMOTO S., KUZUYA Y., YASUDA M., YOSHIMURA T. & MIYAZAKI T. (2006). Oral immunization of common carp with a liposome vaccine fusing koi herpesvirus antigen. *Fish Pathol.*, **41**, 141–145.
44. YUASA K., ITO T. & SANO M. (2008). Effect of water temperature on mortality and virus shedding in carp experimentally infected with koi herpesvirus. *Fish Pathol.*, **43**, 83–85.
45. YUASA K., SANO M., KURITA J., ITO T. & IIDA T. (2005). Improvement of a PCR method with the Sph 1–5 primer set for the detection of koi herpesvirus (KHV). *Fish Pathol.*, **40**, 37–39.

\*

\*       \*

NB: There are OIE Reference Laboratories for Koi herpesvirus disease (see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE Web site for the most up-to-date list: [www.oie.int](http://www.oie.int))