

**MASARYKOVA
UNIVERZITA**

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**Parazito-hostitelské
interakce v systému
SVCV a hostitelských
kaprovitých ryb**

Bakalářská Práce

PATRIK RŮŽIČKA

Vedoucí práce: prof. RNDr. Andrea Vetešníková
Šimková, Ph.D.

Oddělení Fyziologie a Imunologie Živočichů
Obor Speciální biologie

Brno 2022

MUNI
SCI

Bibliografický záznam

Autor: Patrik Růžička
Přírodovědecká fakulta
Masarykova univerzita
Oddělení Fyziologie a Imunologie Živočichů

Název práce: Parazito-hostitelské interakce v systému SVCV a hostitelských kaprovitých ryb

Studijní program: Speciální biologie

Vedoucí práce: prof. RNDr. Andrea Vetešníková Šimková, Ph.D.

Rok: 2022

Počet stran: 53

Klíčová slova: Cyprinidae, kapr obecný, viry, SVCV, diagnostika, dynamika infekce, imunita, prevence

Bibliographic record

Author: Patrik Růžička
Faculty of Science
Masaryk University
Section of Animal Physiology and Immunology

Title of Thesis: Parasite-host interactions in the system of SVCV and host cyprinid fish

Degree Programme: Experimental biology

Supervisor: prof. RNDr. Andrea Vetešníková Šimková, Ph.D.

Year: 2022

Number of Pages: 53

Keywords: Cyprinidae, common carp, viruses, SVCV, diagnostics, infection dynamics, immunity, prevention

Abstrakt

Virus jarní viremie kaprů je jedním z mnoha infekčních patogenů typicky napadajících evropské populace kaprovitých ryb. Onemocnění, které vyvolává – jarní viremie kaprů – způsobuje v nakažených populacích výraznou morbiditu a mortalitu, což má výrazné hospodářské i environmentální dopady.

Předložená bakalářská práce formou literární rešerše sumarizuje informace týkající se interakcí systému viru jarní viremie kaprů s hostitelskými kaprovitými rybami. Úvodní část nastiňuje význam akvakultury a s ní souvisejících patogenů nejen v rámci České republiky, ale také z evropského a celosvětového pohledu. První část poskytuje orientační přehled parazitárních onemocnění významně postihujících evropské populace kaprovitých ryb. Následující kapitoly se již zaměřují přímo na virus jarní viremie kaprů. Popisují obecné vlastnosti viru, mechanismy infekce, replikace a šíření, průběh onemocnění a jeho následky. Další část se věnuje genovým a molekulárním interakcím viru a hostitelských buněk, dynamice šíření jarní viremie a laboratorním metodám diagnostiky. K této práci je rovněž přiložena studie realizovaného experimentu, jež se zabývá analýzou množství specifických protilátek vůči viru jarní viremie kaprů u čistých linií selektovaných kaprovitých druhů a jejich hybridních linií s předpokladem potenciálního efektu narušené genetické kompatibility u hybridů.

Cílem bakalářské práce je konsolidovat současné informace týkající se jarní viremie kaprů a odhalit nové souvislosti, které mohou být přínosné z hlediska imunologie a epidemiologie. Získané poznatky pomohou prohloubit znalosti o mechanismech infekce a šíření jarní viremie kaprů, přiblíží genetické a molekulární interakce viru s mechanismy buněčné imunity a přitáhnou větší pozornost k významu a výzkumu tohoto onemocnění.

Abstract

The virus of spring viraemia of carp is one of many infectious pathogens typically infecting European populations of common carp. This disease results in high morbidity and mortality in infected stocks, with significant economic and environmental impacts.

This bachelor thesis summarizes information on interactions of the spring viraemia of carp virus with host cyprinid fish in the form of a literature review. The introduction outlines problems related to pathogens (especially SVCV) in aquaculture relevant for the Czech Republic, but also from a European and global perspective. The first chapter provides an indicative overview of parasitic diseases significantly affecting European cyprinid fish populations. The following chapters focus directly on the spring viraemia of carp virus. They describe the general characteristics of the SVCV, the mechanisms of infection, replication and distribution, and its impact on fish host. The following section deals with gene and molecular interactions between the virus and host cells, the dynamics of the infection of spring viraemia and laboratory methods of diagnosis. This work is also accompanied by an experimental study representing the analysis of specific antibodies during a spring viraemia of carp virus infection in pure lines of selected cyprinid species and their hybrid lines, with the assumption of a potential effect of impaired genetic compatibility in hybrids.

The aim of this thesis is to consolidate current information on spring viraemia of carp and to reveal new relationships that may be useful in terms of immunology and epidemiology. The knowledge gained may increase the understanding of the mechanisms of infection and spread of spring viraemia of carp, shed light on the genetic and molecular interactions of the virus with the mechanisms of cellular immunity and draw more attention to the importance and research of this disease.

ZADÁNÍ
BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Akademický rok: 2021/2022

Ústav:	Přírodovědecká fakulta
Student:	Patrik Růžička
Program:	Experimentální biologie
Obor:	Speciální biologie
Směr:	Experimentální biologie živočichů a imunologie

Ředitel ústavu PřF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje bakalářskou práci s názvem:

Název práce:	Parazito-hostitelské interakce v systému SVCV a hostitelských kaprovitých ryb.
Název práce anglicky:	Host-parasite interactions in the system of SVCV and host cyprinoid fish.
Jazyk závěrečné práce:	čeština

Oficiální zadání:

Cílem bakalářské práce je vypracovat literární rešerši zaměřenou na jarní viremii kaprů (SVCV, Spring viraemia of carp virus), konkrétně na původ, průběh nemoci, patogenitu a mortalitu u hostitelských ryb, dosavadní rozšíření nemoci, metodiky diagnostiky SVCV, a aktuální poznatky hostitelsko-parazitických interakcí ve studovaném systému (včetně literární analýzy molekulárních komponent imunitního systému hostitele s dokumentovanou rolí v případě infekce SVCV na konkrétních hostitelských druzích). V rámci zpracování literární rešerše se student rovněž zaměří na roli hostitelské specifity interakcí parazit-hostitel a roli genetické kompatibility v systémech parazit-hostitel. Student se obeznámí s metodikou realizace experimentů s virovou infekcí u ryb a s detekcí specifických protilátek vůči SVCV jako odpovědi hostitele v případě potenciálního narušení genetické kompatibility patogen-hostitel (využitím hybridního systému kapr obecný x karas stříbřitý).

Literatura: Ahne W, Bjorklund HV, Essbauer S, Fijan N, Kurath G, Winton JR (2002). Spring viraemia of carp (SVC) Dis Aquat Organ 10, 52(3): 261-272. Ashraf U, Lu YA, Lin L, Yuan JF Wang, M, Liu XQ (2016). Spring viraemia of carp virus: recent advances. 2016. Spring viraemia of carp virus: recent advances. J Gen Virol 97: 1037-1051. Liu L, Tu X, Shen Y-F, Chen W-C, et al. (2017). The replication of spring viraemia of carp virus can be regulated by reactive oxygen species and NF-kappaB pathway. Fish Shellfish Immunol 67: 211-217. Wei X, Zheng Li X, Zheng X, et al. (2016). Toll-like receptors and interferon associated immune factors responses to spring viraemia of carp virus infection in common carp (Cyprinus carpio). Fish Shellfish Immunol 55: 568-576. Chen ZY, Liu H, Li ZQ, et al. (2008). Development and characterization of monoclonal antibodies to spring viraemia of carp virus. Vet Immun Immunopath 123: 266-276. Rand DM, Haney RA, Fry AJ (2004) Cytonuclear coevolution: the genomics of cooperation. Trends Evol Ecol 19: 645-653. Yuan JF, Su NA, Wang M, Xie P, Shi ZL, Li LJ (2012). Down-regulation of heme oxygenase-1 by SVCV infection. Fish Shellfish Immunol 32(2): 301-306 Licata JM, Harty RN (2003). Rhabdoviruses and apoptosis. Int Rev Immunol 22(5-6): 451-476. další literatura podle doporučení školitele

Vedoucí práce: prof. RNDr. Andrea Vetešníková Šimková, PhD.

Konzultant: MVDr. Lubomír Pojezdal, Ph.D.

Datum zadání práce: 5. 11. 2020

V Brně dne: 16. 5. 2022

Patrik Růžička, 26. 11. 2020

prof. RNDr. Andrea Vetešníková Šimková, PhD., 26. 11. 2020

RNDr. Pavel Lízal, Ph.D., 27. 11. 2020

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením vedoucího práce s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

V Brně 13. května 2022

.....
Patrik Růžička

Poděkování

Zde bych chtěl poděkovat své vedoucí školitelce prof. RNDr. Andree Vetešníkové Šimkové, Ph.D. za poskytnutí unikátní příležitosti pro vypracování bakalářské práce, a za její ohromnou trpělivost a shovívavost, se kterou mi pomohla tuto práci vytvořit. Dále bych chtěl poděkovat svému konzultantovi panu MVDr. Lubomíru Pojezdalovi, Ph.D. za umožnění mojí návštěvy ve VuVeL, kde jsem získal mnoho nových poznatků. Poté bych chtěl poděkovat MVDr. Stanislavě Reschové, za představení a ukázkou metodické části .

Obsah

Seznam pojmů a zkratk	15
Seznam příloh	16
1 Úvod	17
2 Literární přehled	20
2.1 Přehled významných onemocnění kaprovitých ryb v Evropě.....	20
2.1.1 Virová onemocnění.....	20
2.1.2 Bakteriální onemocnění	21
2.1.3 Onemocnění způsobená eukaryotními organismy.....	22
2.2 Virus jarní viremie kaprů	27
2.2.1 Obecná charakteristika rhabdovirů.....	27
2.2.2 <i>In vitro</i> replikace	28
2.2.3 <i>In vivo</i> replikace.....	28
2.3 Průběh onemocnění jarní viremii kaprů.....	29
2.3.1 Průběh infekce v laboratorních podmínkách.....	29
2.3.2 Enviromentální a hostitelské faktory ovlivňující infekci.....	29
2.3.3 Příznaky jarní viremie kaprů	29
2.3.4 Imunitní komponenty hostitele regulující infekci SVCV.....	31
2.3.5 Geny zapojené do imunitní odpovědi vůči SVCV.....	32
2.4 Dynamika šíření SVCV.....	35
2.5 Diagnostika SVCV	35
2.5.1 Stanovení specifických protilátek SVCV ve vzorcích metodou ELISA	36
2.6 Prevence SVCV	38
3 Závěr	40
Použité zdroje	41
Příloha A Experimentální studie	47
1.1 Úvod.....	47
1.2 Metodika.....	47

OBSAH

1.3	Výsledky.....	48
1.4	Vyhodnocení.....	51

Seznam pojmů a zkratek

EU	- Evropská unie
ELISA	- Enzyme-linked immunosorbent assay
EPC	- Endothelial progenitor cells
HO-1	- Hemoxidáza-1
IL	- Interleukin
INF	- Interferon
IRF	- Transkripční faktor interferonů
ISG	- Interleukiny stimulované geny
MAVS	- Mitochondriální antivirální signalizační protein
NLR	- NOD-like receptory
RLR	- RIG-like receptory
STING	- Stimulační protein interferonových genů
SVC	- Jarní viremie kaprů
SVCV	- Virus jarní viremie kaprů
SVS	- Státní veterinární správa
TBK1	- Tank-binding kináza
TLR	- Toll-like receptory
TRIM	- Tripartite-motif proteinů

Seznam příloh

Přílohy v textu

Příloha A Experimentální studie

47

1 Úvod

Akvakultura a chov ryb má v České republice dlouhou tradici. Mezi nejrozvinutější odvětví patří zejména rybníkářství, jehož tradice sahá až do 12. století. V období středověku bylo rybníkářství tradičně podporováno šlechtickými rody a jako cechová profese se těšilo vysoké popularitě. Největší rozmach zažilo v 16. století s objevem třístupňové metody chovu ryb. V tomto období vznikly podél významných řek rozsáhlé rybníční soustavy. V současnosti se na území České republiky nachází přibližně 21 tisíc rybníků, soustředěných převážně v tradičních rybářských oblastech Třeboňska, Vodňanska, Novohradska, Českobudějovicka a Jindřichohradecka. Velké množství rybníkářských děl spadá pod kulturní či enviromentální ochranu národních i nadnárodních institucí, a mnohé chovy mají pro své ryby celoevropsky chráněná zeměpisná označení.

Česká republika je považována za jedno z předních center rybníkářství ve střední Evropě. Hlavními produkty jsou různé kaprovité ryby, zejména kapr obecný. Mezi další spotřebitelské druhy ryb patří štika obecná, amur bílý a mnoho dalších. Maso kaprovitých ryb se těší vysoké popularitě v potravinářství České republiky, Slovenska, Polska, Maďarska a Chorvatska a je značnou částí středoevropského rybího trhu. Tuzemský a exportní prodej je tak poměrně lukrativní, a tvoří velmi důležitou součást české ekonomiky (obrázek 1). Prostředí okolo rybníků také často poskytuje unikátní ekosystémy a může být rovněž využito i jako rekreační nebo sportovní areály.



Obr. 1: Výlov Velkého rybníka v Jesenici u Rakovníka (převzato z https://commons.wikimedia.org/wiki/File:051027_Rybolov_Jesenice_0010.JPG)

Rybí velkochovy celosvětově čelí mnoha problémům. Jedním z nejvýznamnějších je ohrožení chovných populací různými infekčními nemocemi. V roce 2019 objevila státní veterinární správa na území České republiky 12 ohnisek virových onemocnění, které vedly ke kompletní depopulaci 21 rybníků [1]. Tyto plošné ztráty chovných populací mají devastující dopady na ekonomiku rybníkářství a okolních odvětví. Virová onemocnění jsou proto pozorně sledována veterinárními institucemi.

Celosvětově se nemocemi ryb zabývá především Světová organizace pro zdraví zvířat (zkrat. OIE) (obrázek 2), která na základě kritérií zahrnujících rozšíření, následky a diagnostické možnosti sestavila seznam významných nemocí, jejichž rozšíření celosvětově sleduje. Při objevení jedné z těchto nemocí v chovu má chovatel povinnost ohlásit výskyt na OIE [2].



Obr. 2: Sídlo Světové organizace pro zdraví zvířat, Paříž
(Autor: Mbzt - Own work, CC BY 3.0,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=18119480>)

Na úrovni Evropské unie (EU) je sledování infekčních nemocí vodních organismů součástí právního rámce pro zdraví zvířat, konkrétně čl. 9 odst. 1 nařízení Evropského parlamentu a Rady EU 2016/429 [3]. Prováděcí nařízení komise EU 2018/1882 pak dále nemoci rozděluje do kategorií A-E. Do kategorie A spadají nákazy, které se v EU běžně nevyskytují a proti kterým je povinné přijmout ihned po zjištění opatření k eradikaci. Do kategorie B se řadí nákazy, které je za účelem eradikace na území EU nutno tlumit ve všech členských státech podle stanovených nařízení. V kategorii C najdeme nákazy rozšířené na území některých EU států a proti kterým je nutné zavést opatření zamezující jejich rozšíření do dalších oblastí. Kategorie D zahrnuje nákazy, proti kterým je nutné přijímat opatření v důsledku jejich rozsáhlého zavlečení na území EU. Kategorie E pak označuje nákazy, jejichž výskyt je na území EU aktivně monitorován [4]. Uvedená kategorizace se vztahuje pouze na nemoci uvedené v seznamu podle Přílohy II nařízení EU 2016/429, který uvádí jediné onemocnění postihující kaprovité ryby a

sice koi herpesvirózu zařazenou do kategorie E. Jarní viremie kaprů se na tomto seznamu nevyskytuje a na celoevropské úrovni tak nepodléhá plošné regulaci. Právní rámec však umožňuje jednotlivým členským státům přijímat vnitrostátní opatření proti šíření infekcí v nařízeních neuvedených. V současnosti jsou tak opatření proti šíření jarní viremie kaprů zavedená v Dánsku, Finsku, Maďarsku, Irsku a Švédsku [5]. Díky opatřením se v těchto oblastech daří bránit rozšíření infekce a lze je tedy považovat za převážně SVCV-prosté.

V rámci České republiky se sledováním infekčních onemocnění ryb zabývá Státní veterinární správa (SVS) (obrázek 3). Veterinární zákon č. 166/1999 Sb. a jeho úpravy definují, které nákazy jsou považovány za nebezpečné. V kategorii akvakulturních onemocnění zákon uvádí infekční hematopoetickou nekrózu (IHN), virovou hemoragickou septikemii (VHS), infekční nekrózu pankreatu (IPN) a infekční anemii lososů (ISA) [6]. Kromě uvedených onemocnění se SVS zabývá i dalšími onemocněními sledovanými na evropské úrovni, například koi herpesviróza (KHV), nebo jarní viremie kaprů (SVCV) [1].



Obr. 3: Sídlo Státní veterinární správy v Domě zemědělské osvěty, Praha

(Autor: Eva Karska - Own work, CC BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=51051211>)

2 Literární přehled

2.1 Přehled významných onemocnění kaprovitých ryb v Evropě

Produkční chovy a rybníky nepředstavují pro ryby přirozené životní podmínky. Ryby jsou často chovány ve vysokých populačních hustotách, kde jsou vystaveny značnému stresu – žijí na omezeném prostoru, ve vodě nízké kvality a v podmínkách nedostatku kyslíku. Toto prostředí vytváří ideální podmínky pro šíření patogenů. Onemocnění ryb lze v naprosté většině případů rozdělit do tří kategorií, podle typu patogenu/parazita, který je způsobuje – bakteriální, virová a způsobená jednobuněčnými nebo mnohobuněčnými organismy. V následujícím přehledu jsou shrnuty nemoci postihující kaprovité ryby v České republice a jiných částech Evropy s uvedením vybraných příkladů.

Tato podkapitola byly vypracována na základě Palíková *et al.* 2019 [7].

2.1.1 Virová onemocnění

Virová onemocnění jsou relativně úzkou, avšak významnou kategorií. Infekce virem spočívá v napadení buněk hostitele a převzetí kontroly nad jejími zásobními látkami a organelami, které jsou využívány pro replikaci viru. Infekční agens virů je takzvaná virová partikule neboli virion. Tento virion je zodpovědný právě za převzetí kontroly nad buněčnými mechanismy. Mimo buňku je virion obklopený proteinovým obalem zvaným kapsida, která je tvořena z podjednotek – kapsomer. Mimo hostitelskou buňku je virus metabolicky inertní, jakmile však pronikne do hostitelské buňky, začíná ihned replikovat svůj genom a další součásti. Tento aktivní proces nazýváme infekce. Základní diagnostika virových onemocnění je založena na pozorování cytopatických efektů na kultivovaných buněčných kulturách, v případě rybích virů jde o specifické kultury odvozené z rybích tkání. Pozitivní výsledek kultivace je vždy nutné ověřit další diagnostickou metodou, např. ELISA, nebo v současnosti často používaná PCR (v různých modifikacích). V chovech kaprovitých ryb se objevuje několik častých virových onemocnění (viz níže).

Edémová nemoc kaprů (Carp Edema Virus Disease) postihuje výhradně kapra obecného a jeho okrasnou variantu koi kapr. Původcem nemoci je virus čeledi Proxiviridae. Poprvé byla nemoc diagnostikována v sedmdesátých letech v Japonsku, koncem dvacátého století se však objevila také v USA a Evropě, odkud se následně rozšířila do Jižní Ameriky. Infekce se šíří vodním prostředím. K propuknutí nákazy stačí i malé množství kontaminované vody, nebo kontakt s kontaminovanými rybolovnými pomůckami. Na vznik a vývoj infekce má rozhodující vliv teplota vody. U koi kaprů se příznaky typicky projevují při teplotách 15-25 °C, kapr obecný však infekci podléhá už

při teplotách 6-10 °C. Nemocné ryby jsou značně letargické, klesají ke dnu nádrže a nepohybují se. U kapra obecného lze pozorovat projevy dušení. Na kůži juvenilních ryb se tvoří eroze a hemoragie s edémem. U dospělců se projevuje enoftalmie, ulcerace úst a báze ploutví, zduřelé žábry a zánět řitního otvoru. Nemoc je často doprovázena sekundárními bakteriálními infekcemi. Cílená léčba se neprovádí, lze ale nasadit antibiotika pro obranu před sekundárními infekcemi.

Puchýřnatost ryb, známá jako „kapří neštovice“, je nemoc v Evropě dokumentovaná již od středověku. Její původce byl identifikován v šedesátých letech jako zástupce čeledi Alloherpesviridae, kapří herpesvirus 1 (Cyprinid Herpesvirus 1, CyHV-1). Ačkoliv je puchýřnatost ryb celosvětově rozšířená, její ekonomický dopad je minimální, protože ryby znehodnocuje pouze vzhledově. Onemocnění u dospělých ryb způsobuje výraznou epidermální hyperplazii, což vede ke tvorbě šedých hlenovitých okrsků na těle a hlavě. Pokud se ryba nakazí už v juvenilním stádiu, mohou se vytvořit trvalé vývojové defekty. Po průběhu prvotní infekce přechází virus do latentní formy a ryba se tak stává na celý život přenašečem. Prvotní infekce a následné recidivy závisí na teplotě okolní vody – příznaky se typicky projevují při poklesu teploty pod 15 °C.

Koi herpesviróza (Koi Herpes Virus Disease) je vážná nemoc postihující kapra obecného a jeho okrasnou variantu, koi kapra. Jejím původcem je kapří herpesvirus 3, (Cyprinid Herpesvirus 3, CyHV-3), zástupce čeledi Alloherpesviridae. Původně byl identifikován v USA a Izraeli, v současnosti je ale rozšířen napříč celou Evropou a Asií. CyHV-3 je vysoce nakažlivý, šíří se vodou, exkrementy i přímým kontaktem. Přenos je možný i skrze kontaminované rybolovné náčiní. Do hostitele virus proniká skrze kůži nebo sliznici měkkého patra. Po úvodní proliferaci se rychle šíří do zbytku těla, a dále se replikuje v žábřích, střevech a kůži. Onemocnění postihuje především žábry, kde způsobuje zánětlivé změny a rozsáhlou nekrózu. Napadá však i další orgány.

Jarní viremie kaprů (Spring Viraemia of Carp) je krvácivé onemocnění postihující kaprovité ryby, především mladé jedince kapra obecného, způsobující vysokou úmrtnost v rybích chovech. Původcem onemocnění je virus jarní viremie kaprů (Spring viraemia of carp virus, SVCV). Rozšíření zahrnuje Evropu, Asii i části Jižní Ameriky. Virus je charakteristický svou vysokou závislostí na teplotě okolní vody, která rozhoduje kromě délky a průběhu nemoci také o tom, zda bude samotná infekce úspěšná.

2.1.2 Bakteriální onemocnění

Původci bakteriální onemocnění jsou zpravidla gramnegativní bakterie, ale objevují se i bakterie grampozitivní. Většina nemocí je způsobována saprofytními bakteriemi,

kteří jsou pouze příležitostnými patogeny ryb. Některá onemocnění jsou také způsobována bakteriemi, které jsou pro ryby primárními patogeny, ty ale častěji způsobují latentní infekce.

Jako **epitheliocystózu** označujeme skupinu nemocí, jejichž původci jsou různé druhy chlamydií a které postihují vysoký počet sladkovodních i mořských druhů ryb. Epitheliocystózy jsou velmi snadno horizontálně přenosné a jsou rozšířené po celé Evropě. Do hostitele pronikají skrze žábry i kůži. Průběh nemoci je benigní, způsobuje ale tvorbu cyst a zduřenin na žábrách.

Erythrodermatitida kaprů (Carp Erythrodermatitis) je zánětlivé ulcerativní onemocnění způsobované řadou bakterií z rodu *Aeromonas*, běžně rozšířené v chovech kapra obecného po celém světě. V chovech se přenáší spolu s klinicky nebo latentně nemocnými jedinci, kontaminovanou vodou, nebo kontaminovaným náčiním. Akutní formy onemocnění způsobují zarudnutí kůže a hromadění tělních tekutin, což vede k otokům. Pro chronickou formu jsou typické vředovité záněty kůže a hloubkové záněty tkání, které mohou vést až k perforaci tělní dutiny.

Kolumnaróza (Columnaris Disease) je onemocnění původem ze Severní Ameriky postihující téměř všechny sladkovodní ryby, zejména v akvakulturách. Jeho původcem je obligátní patogen *Flavobacterium columnare* – gramnegativní tyčinkovitá pohyblivá bakterie tvořící ploché kolonie. Nákaza se šíří přímým kontaktem přes poškozenou kůži nebo žábry. Nakažený jedinec se stává přenašečem a pravidelně bakterie uvolňuje. Na kůži nemocných jedinců se vytváří ploché kožní léze šedé barvy, které mohou i krváčet. Dochází k roztržení ploutví a vypadávání ploutevních paprsků. Na žábrách se mohou vyskytovat šedé okrsky potažené žlutým filmem. Léze a okrsky podléhají nekróze. Vnitřní orgány nemoc nepostihuje, ryby hynou za příznaků udušení.

Jako **edwardsielózy** označujeme širokou skupinou onemocnění způsobovaných gramnegativními tyčinkovitými bakteriemi z rodu *Edwardsiella*. Postihuje mnoho druhů chovných ryb, mezi nimi i zástupce kaprovitých. Do chovných prostředí se bakterie dostávají spolu s nemocnými rybami nebo kontaminovanou vodou. Do hostitele pronikají skrze žábry nebo střevo. Po napadení jedince způsobují řadu nekrotických a zánětlivých změn na kůži i ve vnitřních orgánech, zejména trávicí a vylučovací soustavy.

2.1.3 Onemocnění způsobená eukaryotními organismy

Onemocnění způsobená eukaryotními organismy jsou širokou kategorií, která zahrnuje velké množství nemocí, jejichž původci jsou zpravidla parazitické organismy. Najdeme zde jak mikroskopické, tak makroskopické zástupce.

2.1.3.1 Onemocnění s jednobuněčným původcem

Mezi jednobuněčné parazity kaprovitých ryb se řadí zástupci jak endoparazitičtí, tak ektoparazitičtí. Z endoparazitických zástupců mají největší význam zejména rody *Trypanosoma*, *Cryptobia* a *Trypanoplasma*. Ektoparazitické zástupce lze rozdělit do tří širších skupin. Oportunističtí parazité většinou napadají své hostitele až druhotně, potom co je jejich imunitní systém oslaben jinou infekcí. Do této skupiny patří např. zástupci rodů *Ophryoglena*, *Tetrahymena*, *Hemiophrys* a *Glaucoma*. Další skupinu představují nespecifičtí fakultativní paraziti, jejichž nejběžnějším zástupcem je *Ichthyophthirius multifiliis*. Dalšími zástupci jsou jedinci z rodů *Chilodonella* a *Trichodina*. Třetí skupinou jsou specifičtí fakultativní paraziti, kteří vykazují vysokou preferenci nejen pro určitého hostitele, ale i pro určité místo na těle hostitele, běžně žábry. Najdeme zde některé vysoce specializované zástupce rodů *Trichodina*, kteří nespádají do předchozí skupiny, a zástupce rodu *Tripartiella*. Zvláštní skupinou jednobuněčných patogenů jsou houby taxonů oomycety a myxomycety, které mohou infikovat tkáň hostitele a svým růstem narušit životně důležité funkce [8].

Piscinoodinióza, česky známá také jako „obrněnkovitost“, je závažné ektoparazitické onemocnění způsobované obrněnkou *Piscinoodinium pillulare*. Ačkoliv postihuje především tropické akvarijní druhy, jedním z mála vnímavých druhů mírného pásma je právě kapr obecný. Obrněnky se přichytávají na kůži a žábry ryb, kde vytváří velké shluky. Na přichyceném epitelu pak způsobují hyperplazii a fokální nekrózy. Nemocné ryby jsou pohublé a ztrácí přirozenou pigmentaci.

Ichthyoftirióza, nazývaná také „krupička“, je onemocnění kůže a žaber způsobené parazitickými nálevníky druhu *Ichthyophthirius multifiliis*. Ichthyoftirióza v minulosti postihovala hlavně kapra obecného, v současnosti je ale jeví jako hostitelsky nespecifická. Nálevníci se přichytávají na epitel kůže a žaber, kde poškozují epiteliální buňky, kterými se následně živí, což vede k nekróze a odumírání epitelů. Přichycené nálevníky je možné pozorovat pouhým okem jako bílé tečky na povrchu těla ryby. Při silném napadení dochází k roztřepení ploutví a nadprodukcí kožního hlenu. Poškozeny jsou také některé vnitřní orgány, zejména trávicí soustavy.

Chilodonelóza je onemocnění způsobované parazitickými nálevníky rodu *Chilodonella*. Postihuje všechny druhy sladkovodních ryb, nejčastějším hostitelem jsou právě kaprovité ryby. Nálevníci se přichytávají na kožní a žaberní epitel, kde vyztuženým ústním ústrojím perforují stěny epiteliálních buněk a vysávají jejich obsah. Napadení jedinci mají výrazně zvýšenou produkci pokožkového hlenu. Žaberní lístky se slepují dohromady a přichází tak o respirační povrch. V pokročilých stádiích se žaberní tkáň rozpadá úplně a ryba hyne.

Trichodinózy jsou ektoparazitická onemocnění způsobovaná nálevníky ze skupiny Oligohymenophora, zejména pak zástupci rodu *Trichodina*. Vyskytují se kosmopolitně ve sladké i slané vodě a jsou značně hostitelsky nespecifické. Šíří se běžně vodním prostředím. Přisedají na epitel ryb, který pak s pomocí ostrých zoubků umístěných na příchytém disku obrušují a konzumují. Jsou zpravidla považováni za ektokomenzály, při masivní nákaze však mohou značně oslabit napadené jedince, které jsou pak náchylné k různým druhotným infekcím.

Jako **kokcidiózy** označujeme skupinu onemocnění způsobovaných parazitickými kokcidiemi. V České republice se jedná zejména o kokcidie rodu *Epieimeria*. Specifická pro kapra obecného je pak *Goussia carpelli*. Kokcidie jsou intracelulární parazité, které během svého vývoje poškozují napadené buňky. Toto poškození vede k dystrofickým a nekrotickým změnám, a různým zánětům v napadených orgánech. Nejčastěji jsou napadeny orgány trávicí soustavy. Onemocnění má zpravidla chronický průběh a první příznaky se objevují teprve v pokročilých stádiích.

Branchiomykóza je onemocnění žaber sladkovodních ryb způsobované oomycety rodu *Branchiomyces*. Výskyt byl popsán u mnoha druhů, včetně kaprovitých – kapra obecného a karase zlatého. Oomycety se zachycují v žábrách ryb, kde při správných podmínkách vyklíčí a začnou vytvářet mycelium, které se rozrůstá v žaberních cévách. To vede k poruchám cirkulace, které vyústí v ischemickou nekrózu žaberní tkáně. Ryby tak hynou v důsledku selhání osmoregulace za příznaků dušení. Mortalita dosahuje až 50 %.

Trypanosomózy jsou skupinou nemocí způsobovaných bičíkovci rodu *Trypanosoma*, kteří parazitují ve tkáních a v krvi napadených hostitelů. Byly pozorovány u mnoha druhů ryb, mimo jiné u kapra obecného a karase stříbřitého. Běžným vektorem přenosu trypanosom jsou pijavky. Onemocnění má zpravidla chronický průběh, bičíkovci se po napadení prudce rozmnoží v krevním oběhu, což často vede k úhynu jedinců. Následuje chronická fáze, kdy se bičíkovci přestávají rozmnožovat a ukrývají se do vnitřních orgánů. Ryby se v chronické fázi jeví jako zdravé, může však kdykoliv dojít k prudkému relapsu. Napadení jedinci jsou anemičtí, mají tmavé zbarvení těla a nepřijímají potravu.

Dermocystidóza je onemocnění postihující zpravidla kůži a žábry napadených ryb. Bylo pozorováno u řady druhů, mimo jiné u kapra obecného a karase obecného. Způsobují jej trubénky rodu *Dermocystidium*, které přisedají na kůži a žábry, kde vytváří masivní cysty vystupující nad povrch okolní tkáně. Cysty se tvoří převážně na žábrách, kůži a ploutvích, mohou se ale objevit i jinde, například v oku. Masivní napadení jedince může vést k narušení funkčnosti žaber, což má za následek obtížné dýchání.

2.1.3.2 Onemocnění s mnohobuněčným původcem

Mnohobuněční parazité ryb jsou širokou skupinou organismů zcela přizpůsobených parazitickému způsobu života. Častou vlastností zástupců této skupiny je složitý ontogenetický vývoj, procházející velkým množstvím různorodých larválních stádií, která mohou během vývoje měnit hostitele. Dobře známí jsou zejména zástupci kmene Platyheminthes ze tříd Monogenea, Cestoda a Trematoda. Dále se k nim řadí zástupci kmenů Arthropoda, Nematoda, Nematomorpha a Acanthocephala. Významnými jsou rovněž zástupci třídy Hirudinea. Skupinu uzavírají nově zařazení zástupci podkmene Myxozoa.

Myxozoa jsou fylogeneticky řazena mezi žahavce. Zástupci této skupiny se vyznačují složitými životními cykly, vysokou orgánovou specificitou a širokým spektrem hostitelů. Kaprovité ryby parazitují především zástupci rodu *Myxolobus*, zejména druhu *M. basilamellaris* a *M. dispar*. Plazmodia těchto jedinců svým usazením vyvolávají deformaci a atrofii žaberních lístků, což má za následek závažné poškození respiračního aparátu hostitele. Mimo rod *Myxolobus* byly u kaprovitých ryb pozorovány také druhy *Thelohanellus nikolskii*, který způsobuje vážnou deformaci ploutevních prsků, nebo *Sphaerospora dykova*, který napadá vylučovací soustavu.

Monogenea představuje třídu ploštěnců, kteří zpravidla ektoparaziticky napadají studenokrevné obratlovce, zejména ryby. Výjimečně parazitují také na korýších, hlavonožcích a savcích. Při napadení ryby parazitují na kůži, ploutvích, žábrách a v ústní a žaberní dutině. Někteří zástupci pronikají i hlouběji do těla a parazitují ve střevě, močovodu či krevním řečišti. Charakteristickým znakem monogeneí je v zadní části umístěný přichycovací orgán, tzv. haptor. Mezi jednotlivými taxony se haptor často liší a slouží k identifikaci. Na kaprovi obecném parazitují někteří zástupci rodu *Dactylogyrus*, např. *D. extensus*, *D. vastator* a *D. anchoratus*, napadající žábrý, nebo zástupci rodu *Gyrodactylus* *G. katharineri* a *G. cyprini*, kteří se přichytávají na žábrý, ploutve a povrch těla. Mimo výše uvedené parazity, kapra obecného často napadá cizopasník *Eudiplozoon nipponicum*, který se přichytává na žaberní lupínky. Mezi zástupce napadající jiné druhy kaprovitých ryb se řadí další druhy rodu *Dactylogyrus*, např. *D. hypohthalmichthys*, *D. lamellatus*, *D. ctenopharyngodonis* či *D. macracanthus*, nebo také *Gyrodactylus tincae*.

Trematoda jsou velkou skupinou parazitických ploštěnců, vyskytujících se u sladkovodních i mořských ryb. Vyznačují se nepřímými vývojovými cykly, během kterých mění hostitele. Parazitují téměř ve všech orgánech, nejčastěji v trávicím systému. Kaprovité ryby jsou napadány např. larválním stádiem rodu *Diplostomum*, které se lokalizuje v očních ryby a způsobuje poruchy zraku a orientace. U kapra obecného se specificky vyskytuje druh *Sanguinicola inermis*, jehož jedinci se rozmnožují v krevním řečišti, kde mohou způsobovat ucpaní cév a poruchy cirkulace. Dalším příkladem jsou

larvy druhu *Posthodiplostomum cuticola*, které se zanořují pod kůži a obalují se melaninem, což vede k tvorbě tmavých skvrn na těle napadené ryby.

Cestoda je jednou z nejznámějších skupin parazitických ploštěnců. Zástupci jsou obligátní paraziti. Charakteristickým znakem je ztráta střeva. Jeho funkce je nahrazena povrchovými útvarů – tzv. mikrotrichy, které zajišťují přísun živin. Další typický znak je přichycovací orgán na předním konci těla – tzv. scolex. Tvar a stavba scolexu se používají jako identifikační znaky. Mají zpravidla poměrně úzkou hostitelskou specificitu. Kaprovité ryby napadá zejména druh *Schyzocotyle acheilognathi*, který svým přichycením způsobuje nekrotizaci střevní sliznice a ve vysokém počtu může ucpat celé střevo. Mezi další druhy napadající kaprovité ryby patří např. *Khawia sinensis* nebo *Atractolytocoestus huronensis*. Cestoda nejsou v současné době považovány za příliš významné patogeny.

Nematoda je velmi početnou skupinou patřící do superskupiny Ecdysozoa. Na rozdíl od ostatních skupin zde najdeme parazitické i neparazitické zástupce suchozemské, sladkovodní i mořské. Většina hlístic má v přední části těla ústní otvor, který zároveň slouží k přichycení k hostitelské tkáni. Na základě jeho stavby se identifikují jednotlivé druhy. Specifický pro kapra obecného je např. *Philometroides cyprini*, který parazituje na krvi hostitele a svou migrací v těle způsobuje záněty a překrvení. Kaprovité ryby také napadá druh *Philometroides sanguineus*.

Acanthocephala jsou relativně malou a ze současného pohledu nevýznamnou skupinou. Charakteristická je pro ně přítomnost zatažitelného chobotku s háčky, tzv. proboscis, zajišťující příjem potravy a podílející se na metabolismu. Parazitují na vnitřní stěně střeva. Kaprovité ryby běžně napadají druhy *Neoechinorhynchus rutili* či *Pomphorhynchus laevis*.

Hirudinea jsou velice známou skupinou ektoparazitů ve vodním prostředí. Pomocí mohutného ústního ústrojí se přichytí na hostitele, chitinovou čelistí proříznou jeho kůži a sají krev. V současnosti jsou zástupci Hirudinea vzácní, zejména v návaznosti na nízkou kvalitu vody ve většině chovných nádrží. Na kaprovi obecném cizopasí např. *Piscicola geometra*.

Kmen **Arthropoda** představuje nejpočetnější skupinu organismů na zemi. Z hlediska onemocnění ryb jsou podstatní zejména parazitické členové podkmene Crustacea. Jejich tělo bývá pokryté pevnou kutikulou a členěné do článků, které vytváří tři hlavní tělesné části – hlavu, hrud' a zadeček. Charakteristická je pro ně furka na posledním článku těla. Kaprovité ryby u nás nejčastěji napadá *Ergasilus sieboldi*, který se pevně přichycuje na žaberní lístky a narušuje tak jejich funkci. Často dochází také k žaberním infekcím. Mezi další druhy napadající kaprovité ryby patří např. *Lernaea cyprinacea*

nebo *Argulus foliaceus*, kteří parazitují rovněž na žábřácích. U *Argulus foliaceus* se také předpokládá, že může sloužit jako vektor pro další patogeny, včetně jarní viremie kaprů.

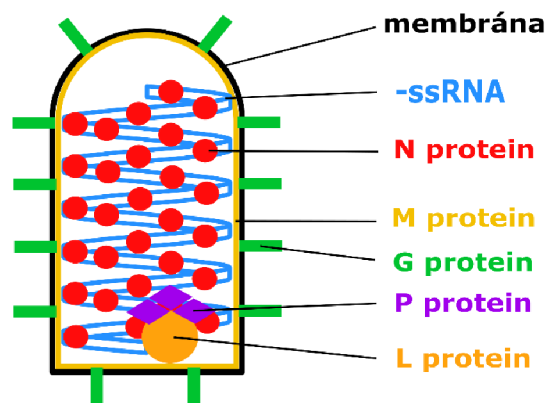
2.2 Virus jarní viremie kaprů

Virus jarní viremie kaprů, angl. spring viraemia of carp virus (SVCV), je jedním z mnoha infekčních patogenů tradičně napadajících evropské populace kaprovitých ryb, zejména kapa obecného (*Cyprinus carpio*), karase obecného (*Carassius carassius*), amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*), tolstolobika bílého (*Hypophthalmichthys molitrix*), tolstolobce pestrého (*Hypophthalmichthys nobilis*) a další. Výjimečně může napadat i jiné čeledi ryb [9]. Onemocnění způsobuje v nakažených populacích výraznou morbiditu a mortalitu, což má výrazné hospodářské i environmentální dopady [10, 11]. OIE označuje SVCV za významné onemocnění [2].

SVCV je rozšířený především v Evropě a na blízkém východě, ale má vysoký potenciál pro globální rozšíření. Nejprve byl objeven v Jugoslávii v roce 1971, odkud se rychle rozšířil do Francie, států bývalého Československa a bývalého Sovětského svazu a posléze i do zbytku Evropy. V posledních letech byla rovněž zaznamenána expanze do Severní Ameriky (USA) a Asie s nálezy v Koreji a Číně [9].

2.2.1 Obecná charakteristika rhabdovirů

SVCV je v současnosti řazen do čeledi Rhabdoviridae. Carter *et al.* [12] uvádí, že rhabdoviry jsou celosvětově rozšířené a napadají širokou škálu hostitelů, zahrnující savce, ryby, hmyz i rostliny. Jejich název pochází z řeckého slova „*rhabdos*“, v překladu „tyčka“. Nejvěrněji tomuto popisu odpovídají rhabdoviry napadající rostliny, druhy napadající zvířata mají tvar spíše zaobleného kuželu, v literatuře často přirovnávaný ke tvaru náboje. Virion rhabdovirů je fosfolipidovou membránou enkapsulovaný útvar složený z negativní jednořetězcové RNA (-ssRNA) a zpravidla pěti druhů proteinů (obrázek 4) [12].



Obr. 4: Ilustrace virionu rhabdoviru (Autor: Patrik Růžička, upraveno podle Virology: principles and applications. 2nd ed.; John B. Carter; 2013)

Nukleoprotein (N) vytváří nukleokapsid s helikální symetrií o průměru zhruba 50 nanometrů obklopující RNA. Kromě formace nukleokapsidu hraje N protein roli také při modulaci transkripce [10]. RNA a N protein společně tvoří ribonukleoproteinový komplex, se kterým jsou asociovány dva další proteiny – fosfoprotein (P) a „large“ protein (L). L protein odvozuje svůj název ze skutečnosti, že relativně k ostatním virálním proteinům je znatelně větší – jeho kódující gen zabírá téměř polovinu z celého virálního genomu [12]. Jde o multifunkční protein, aktivní zejména při transkripci. Úzce spojeny s L proteinem jsou P proteiny, aktivní rovněž při transkripci, kdy s L proteinem vytváří komplex aktivující polymerázovou aktivitu [11]. Ribonukleotidový komplex je pokrytý další helikální vrstvou matrix proteinu (M), který mimo udržování strukturální integrity virionu hraje roli také při inhibici exprese buněčných genů [10]. Glykoprotein (G) ve formě trimerických jehlic ukotvených v M proteinové vrstvě vyčnívá skrze membránu na povrch virionu, kde zajišťuje vazbu na buněčné receptory a následnou indukci virální endocytózy [12].

2.2.2 *In vitro* replikace

Ahne *et al.* [10] uvádí, že optimální teplota pro *in vitro* replikaci SVCV je 20 až 25 °C. Nejvhodnější jsou buněčná kultivační média odvozená z kaprovitých ryb. Virus vytváří v permisivních buňkách dobře definované plaky. První dceřiné viry jsou přítomny 4 až 6 hodin po infekci, celý růstový cyklus pak trvá 8 až 10 hodin. SVCV je schopen replikace i v kuřecích embryonálních fibroblastech a savčích či plazích buňkách. Morfologické změny infikovaných buněk se manifestují po 36 hodinách od nákazy a zahrnují ztrátu tělesného objemu, krvácení a tvorbu apoptických tělísek. V průběhu dalších 40 hodin projde 70% nakažených buněk apoptózou. Infekčnost SVCV selhává v prostředí s pH nižším než 3, nebo vyšším než 12, v přítomnosti lipidových rozpouštědel a při teplotě nad 56°C. Virus lze inaktivovat působením formalinu, chloru, jodu, hydroxidu sodného, UV zářením, γ -radiací, nebo částečně cyklickým zamrazováním.

2.2.3 *In vivo* replikace

Podle Lakshmi *et al.* [13] hrají nejdůležitější roli ve virální patogenezi SVCV strukturální proteiny G a M. M protein způsobuje apoptózu buněk hostitele a inhibuje transkripční mechanismy, což napomáhá šíření viru do okolních buněk. G protein obstarává vstup genetické informace do hostitelské buňky prostřednictvím virální endocytózy.

Licata *et al.* [14] dále uvedli, že apoptóza infikovaných buněk probíhá zajímavým způsobem. Exkluze trypanovou modří na infikovaných buňkách ukázala, že nedochází k porušení membránové integrity. M protein SVCV místo toho útočí na DNA informaci hostitelské buňky a způsobuje její fragmentaci. Rychlost průběhu apoptózy je tak

možné inhibovat podáním proteinásových inhibitorů, například lidského endogenního inhibitoru cysteinových proteáz, které zabraňují fragmentaci DNA.

2.3 Průběh onemocnění jarní viremii kaprů

2.3.1 Průběh infekce v laboratorních podmínkách

Ahne *et al.* [10] odkazuje na dříve provedené experimenty demonstrující systém přenosu a infekce SVCV využitím specifických patogenů prostých („specific pathogen free“, SPF) jedinců kapra obecného. Jedinci o váze 30 až 50 g byli při 13 °C infikováni patogenem SVCV vypuštěným do vody. Infekce byla nejprve detekována v žábách, což naznačuje, že právě žábry jsou prvním místem vstupu do těla ryby. Po čtyřech dnech se SVCV rozšířil do krevního oběhu a různých orgánů. Jedenáct dní po infekci bylo pozorováno vylučování SVCV z gastrointestinálního traktu skrze exkrementy – tímto způsobem pronikají patogeny do vodního prostředí a šíří se v populaci ryb. K prvním klinickým příznakům onemocnění, například otoky vnitřních orgánů, záněty pobřišnice a tenkého střeva nebo vnitřní krvácení, docházelo mezi osmi a jedenácti dny po infekci. Ke smrti ryb způsobené SVCV došlo dvacet dní po infekci. V jedincích, kteří přežili, patogeny setrvaly až deset týdnů – tito jedinci se pak stali přenašeči onemocnění.

2.3.2 Enviromentální a hostitelské faktory ovlivňující infekci

Jak uvádí Palíková *et al.* [7], SVC se vyznačuje svou závislostí na teplotě okolní vody jako podmiňujícím faktoru úspěšné infekce. Optimální pro průběh infekce jsou teploty 10 až 17°C. Mimo teplotní optimum dochází k prodloužení inkubační doby a snížení závažnosti vyvolaného onemocnění. Právě délka inkubační doby je na teplotě přímo závislá. Při teplotě nižší než 5 °C infekce stále probíhá, avšak se značně utlumenými příznaky. Při teplotě přesahující 23 °C pak dochází k úhynu plůdků. Na průběh onemocnění má vliv také věk hostitele. Nejvíce vnímaví jsou mladí jedinci do jednoho roku, u kterých dosahuje mortalita až 70%. U starších jedinců je mortalita nižší, okolo 30%.

Podpůrný efekt má pro rozvoj infekce jednoznačně environmentální stres. Onemocnění se šíří rychleji ve znečištěné vodě a v přeplněných chovech [15].

2.3.3 Příznaky jarní viremie kaprů

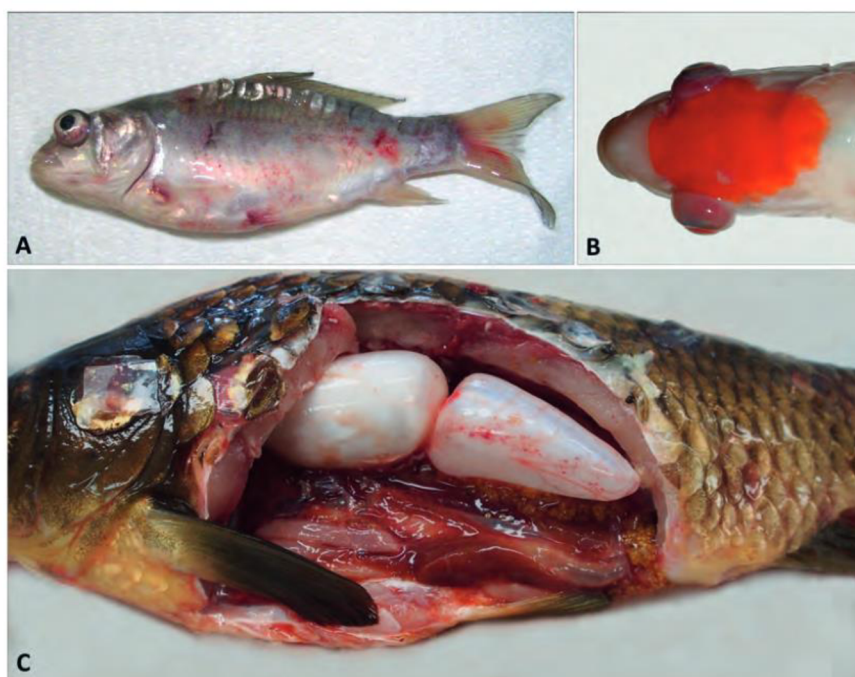
Jako klinické příznaky uvádí Palíková *et al.* [7] ztmavnutí povrchu těla, anémie žaber, vysunutí oční bulvy z očníce (exoftalmus) a celkové zvětšení tělní dutiny. Nemocné ryby jsou apatické a vykazují ztrátu reflexů, často se shlukují u břehů nebo kolem přítoků vody. Důsledkem onemocnění jsou hromadné úhyny především mladých kaprů, v menší míře i ostatních druhů ryb.

Palíková *et al.* [7] dále uvádí patologické příznaky, které se projevují řadou histopatologických změn. Na první pohled nejvýraznější bývají četná kožní krvácení na různých místech povrchu těla (obrázek 5 A,B). SVC dále způsobuje výrazný otok všech orgánů a hromadění tekutiny v tělní dutině. Nejvíce pozměněnou strukturou bývá často jaterní tkáň. Onemocnění vyvolává v játrech nadměrnou infiltraci bílých krvinek a silné otoky. Kombinace těchto dvou faktorů vede k narušení struktury cévních stěn a v pozdějších fázích k jejich kompletní nekrotizaci. V jaterním parenchymu pak dochází k multifokálním nekrózám, degeneraci tukové tkáně a nadměrnému hromadění krve.

Ačkoliv mikroskopicky je nejvíce narušena jaterní tkáň, makroskopicky jsou patologie zjevné spíše na plynovém měchýři, kde onemocnění způsobuje narušení kontinuity epitelální laminy a vnitřní krvácení do submukózy (obrázek 5 C) [10]. Ve velmi akutních případech může onemocnění zasáhnout i nervovou soustavu a periferní nervy [16].

SVC postihuje všechny orgány hostitele. Následuje výčet nevýznamnějších patologických změn postihujících orgány jiné než játra a plynový měchýř podle Palíkové *et al.* [7]:

- V pankreatu byly pozorovány nehnisavé otoky a multifokální nekrózy.
- V parietální a viscerální seróze pobřišnice docházelo k častým zánětům.
- Lymfatické uzliny byly extrémně roztažené a vyplněné odumřelou organickou hmotou, makrofágy a lymfocyty.
- Ve střevech byly pozorovány otoky okružního svalstva a odlupování epitelových buněk sliznice, následované atrofií střevních klků.
- Ve slezině bylo pozorováno nadměrné hromadění krve a zvýšená proliferace buněk retikuloendothelia.
- V ledvinách docházelo k ucpávání tubulů, vakuolizaci a hyalinní degradaci.
- V srdci docházelo k degeneraci srdeční svaloviny a otoku perikardu.



Obr. 5: Fotografie ryb postižených SVCV (Převzato z Palíková *et al.*, 2019)

2.3.4 Imunitní komponenty hostitele regulující infekci SVCV

Imunitní signální dráhy jsou regulovány skupinou cytokinů zahrnující např. interferony (IFN) a interleukiny (IL). Ačkoliv jsou cytokiny klíčové pro kontrolu infekcí, jejich přílišná exprese může vést ke vzniku závažných patologických změn [17]. Jako negativní regulátor cytokinů funguje supresor cytokinové signalizace 3 (SOCS3), jehož nadměrná exprese má na IFN a IL značné inhibiční účinky [18]. V imunitním systému ryb nakažených SVCV je exprese SOCS3 výrazně vyšší, což poukazuje na jeho roli při regulaci imunitní odpovědi na virovou infekci [11].

Hemoxigenáza 1 (HO-1) je cytoprotektivní enzym chránící tělo před oxidativním stresem vyvolaným záněty. Nízká exprese HO-1 vede k chronickým otokům a silnější zánětlivou reakci [11]. Podle Yuan *et al.* [19] je u ryb nakažených SVCV pozorována snížená exprese HO-1. To naznačuje, že SVCV vyvolává v rybách oxidativní stres, což vede k poškození tkání. Toho dosahuje tvorbou volných kyslíkových radikálů. Lze předpokládat, že jde o mechanismus ochrany napadené buňky před vniknutím dalšího, cizího patogenu. Yuan *et al.* [19] dále uvádí, že vysoká hladina kyslíkových radikálů však působí nepříznivě i na SVCV samotný a snižuje rychlost replikace. Naopak snížením množství kyslíkových radikálů se rychlost replikace zvyšuje.

Podle Liu *et al.* [20] je v buňkách přirozeně přítomná skupina transkripčních faktorů NF-kappaB zodpovědná mimo jiné za expresi genů důležitých pro zánětlivou odpověď. Správným podnětem by mohly být NF-kappaB stimulovány k nadprodukci volných kyslíkových radikálů, čehož by bylo možné využít pro regulaci replikace SVCV.

Ashraf *et al.* [11] uvádí, že SVCV po nákaze hostitele indukuje skrze svůj G protein buněčnou autofagii. Autofagní dráhu virus využívá pro zajištění vlastní replikace eliminací mitochondriální DNA poškozené při prvotní infekci, což zvyšuje životaschopnost nakažených buněk. K indukci dochází modulací ERK/mTOR signální dráhy, specificky utlumením aktivity mTOR proteinu.

2.3.5 Geny zapojené do imunitní odpovědi vůči SVCV

Do imunitní odpovědi proti SVCV je zapojené velké množství molekul z několika signálních drah. Nejvýznamnějšími signálními dráhami v případě obrany proti SVCV jsou Toll-like receptor (TLR) dráha [21] a RIG-I-like receptor (RLR) dráha (obrázek 6) [11]. Tabulka 1 poskytuje rychlý přehled jednotlivých komponentů signálních drah.

Gen	Typ	Dráha	Reference
LGP2	RLR	RIG-like	[24]
MAVS	Protein	RIG-like	[25]
MDA5	Enzym	RIG-like	[23]
NLRX1	NLR	RIG-like	[27]
RIG-I	RLR	RIG-like	[23]
STING	Protein	RIG-like	[26]
TRAF6	Protein	RIG-like	[25]
MYD88	STAP	Toll-like	[21]
TLR2	TLR	Toll-like	[21]
TLR7	TLR	Toll-like	[21]
finTRIM	ISG	Toll-like, RIG-like	[33]
IFN Φ 1-4	IFN	Toll-like, RIG-like	[29]
IL10	Cytokin	Toll-like, RIG-like	[21]
IL1 β	Cytokin	Toll-like, RIG-like	[21]
IL6	Cytokin	Toll-like, RIG-like	[21]
IRF3	IRF	Toll-like, RIG-like	[21]
IRF7	IRF	Toll-like, RIG-like	[21]
ISG15	ISG	Toll-like, RIG-like	[21]
MX1	ISG	Toll-like, RIG-like	[31]
TBK1	Kináza	Toll-like, RIG-like	[22]
Viperin	ISG	Toll-like, RIG-like	[32]

Tab. 1: Přehled genů zapojených do imunitní odpovědi vůči SVCV (Autor: Patrik Růžička)

Prvním krokem v iniciaci imunitní odpovědi je rozpoznání virálních elementů. V případě TLR dráhy jsou klíčové receptory TLR2 a TLR7, specializované na detekci extracelulární patogenní ssRNA [21]. Oba receptory jsou tzv. MYD88-dependentní – využívají adaptorový protein MYD88 k přenosu signálu z receptoru dál. Dráha pokračuje aktivací proteinu TRAF6, který indukuje aktivaci tank-binding kinázy 1 (TBK1) [22].

RLR dráha začíná u RIG-I, MDA5 a LGP2 receptorů, které jsou zaměřené na detekci intracelulární patogenní RNA [11]. RIG-I a MDA5 oba disponují DExD/H box RNA helikázovou doménu rozpoznávající virální RNA a N-terminální kaspázovou aktivační a rekruční doménou (CARD) doménou, která aktivuje mitochondriální antivirální signálační protein (MAVS) [23]. LGP2 nedisponuje CARD doménou. Dokáže se však navazovat na virální RNA a kumuluje se v infikovaných buňkách. Tyto vlastnosti mu propůjčují funkci jako regulátor aktivity RIG-I a MDA5, kterým brání v rozpoznávání navázané RNA [24]. V kombinaci tak tyto tři proteiny zajišťují správnou a přiměřenou aktivaci MAVS.

MAVS je klíčový protein RLR dráhy. Exprimuje se na povrchu mitochondrií a skrze protein TRAF6 indukuje aktivaci TBK1 [25]. Zvláštní součástí intracelulární detekce RLR dráhy je stimulační protein interferonových genů (STING). Ačkoliv je považován primárně za součást drah detekující DNA, recentní studie ale demonstrovaly, že při náběhu SVCV se STING aktivuje a pomáhá přenášet signály pocházející z RIG-I a MDA5, čímž zesiluje aktivaci MAVS [26]. Naproti tomu jako regulátor aktivity MAVS funguje člen skupiny NOD-like receptorů (NLR) NLRX1, který při koexpresi s MAVS silně inhibuje jeho aktivitu prostřednictvím své NACHT domény [27].

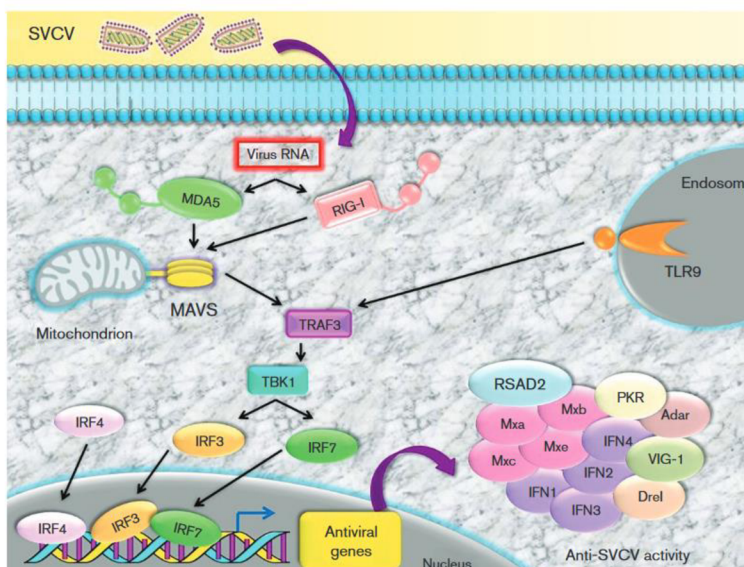
Setkání signálačních drah u TBK1 vytváří důležitou redundanci. Patogeny ve snaze obejít imunitní systém buňky často narušují posloupnost signálů a brání tak aktivaci konečné imunitní odpovědi. Například N-protein SVCV po proniknutí do buňky cílí právě na MAVS a inhibuje jeho aktivitu, čímž přerušuje celou RLR dráhu [28]. Imunitní odpověď je však stále možné aktivovat skrze TLR dráhu.

TBK1 má v imunitní odpovědi velmi důležitou roli jako hlavní systém indukce a regulace transkripčních faktorů interferonů (IRF) [22]. Pro TLR a RLR dráhy jsou klíčové zejména IRF3 a IRF7. Jejich hlavní rolí je iniciace transkripce antivirálních genů uvnitř jádra buňky a kontrola aktivity v počátcích imunitní odpovědi [21].

Jádro, upozorněné na přítomnost patogenů příchodem transkripčních faktorů, pokračuje imunitní odpověď transkripcí a uvolněním cytokinů, které zprostředkovávají autokrinní, parakrinní a endokrinní signalizaci. Cytokiny můžeme rozdělit na dvě

podskupiny – interferony (INF) a interleukiny (IL). Interferony plní mnoho různých rolí při regulaci imunitního systému. Signalizují skrze JAK/STAT dráhu a indukují expresi interferony stimulovaných genů (ISG). U ryb najdeme unikátní skupinu interferonů IFN ϕ , v rámci níž rozlišujeme subtypy 1-4. Všechny IFN ϕ dokáží spouštět antivirální reakci buňky, avšak signalizují rozdílnými receptorovými řetězci [29]. Interleukiny jsou molekuly zodpovědné za spouštění zánětlivých reakcí a mezibuněčnou regulaci imunitního systému aktivací různých navazujících kaskád. Při infekci SVCV byla pozorována přítomnost zejména IL1 β , IL6 a IL10 [21].

Konečným krokem signálních drah jsou ISG. Mají širokou škálu funkcí, které používají pro boj s patogeny, mimo jiné např. upozornění neinfikovaných buněk, zastavení virální replikace, udržení patogenu uvnitř buňky a další [30]. V případě zde uvedených drah patří mezi důležité ISG např. ISG15, MX1, viperin či finTRIM. ISG15 slouží jako značka pro buněčné proteiny a mediátor interferonové odpovědi [21]. Funkce MX1 v současnosti není zcela objasněna, recentní studie ale prokázaly, že jeho exprese vede ke značnému útlumu cytopatického efektu [31]. Viperin, specificky jeho varianta vyskytující se v rybách viperin_sv1 je významný antivirální protein, který pracuje jako mediátor antivirální aktivity regulující proteinovou expresi RIG-I a svojí katalytickou aktivitou významně přispívá k obraně vůči infekci [32]. Člen skupiny tripartite-motif proteinů (TRIM), pro ryby specifický finTRIM, specificky protein FTR36 dokáže významně inhibovat infekci SVCV a pomáhá regulovat IFN odpověď [33].



Obr. 6: Diagram průběhu signální dráhy v reakci na infekci SVCV (Převzato Ashraf *et al.*, 2016)

2.4 Dynamika šíření SVCV

SVCV se šíří horizontálně, se schopností velmi rychle infikovat velké množství jedinců v dané populaci. Vertikální přenos není pravděpodobný, nelze ho však zcela vyloučit [7]. SVCV zůstává při teplotách 4 až 10 °C infekční déle než čtyři týdny ve vodním prostředí, a téměř šest týdnů v bahnitěm substrátu. Podle Ahne *et al.* [10] mohou mít některé druhy kaprovitých ryb průběh onemocnění zcela asymptomatický a bez patologických změn, často se ale následně stávají rezervoáry SVCV. Autoři rovněž uvádějí možnost přenosu SVCV skrze pijavice a různé rybožravé ptáky. Dalším potenciálním vektorem by podle autorů mohli být i vodní členovci.

2.5 Diagnostika SVCV

Nejzákladnější metodou diagnostiky SVCV je vizuální zhodnocení příznaků onemocnění. Kromě fyzických příznaků lze také pozorovat změny v chování – jedinci jsou značně letargičtí, mají zpomalené reakce, nebrání se odchyty a často se shlukují kolem přítoků do vodní nádrže [10]. Podezření na výskyt nákazy musí být vždy co nejrychleji potvrzeno laboratorní analýzou.

V laboratoři je SVCV běžně kultivován na buněčných liniích EPC (endothelial progenitor cell) a FHM (fathead minnow) při teplotě 20 °C [7]. V kultivovaných vzorcích lze následně pozorovat cytopatologické změny a přítomnost SVCV potvrdit běžnými serologickými metodami, jako jsou imunofluorescenční assay, imunoperoxidázová assay, virus neutralizační test a metoda ELISA [11]. SVCV má při serologickém testování často křížové reakce s jinými rhabdoviry, a každý pozitivní serologický nálezn musí být vždy potvrzen molekulárními metodami, např. využitím RT-PCR s následnou nested PCR [34], nebo využitím polyklonálních protilátek [35]. Elektronovou mikroskopií lze také identifikovat typický tvar virové částice [7].

Kromě těchto tradičních přístupů jsou v současnosti zkoumány i modernější metody. Shivappa *et al.* [36] se zaměřil na možnost využití RT-LAMP analýzy, která s pomocí čtyř setů specializovaných primerů detekuje SVCV na základě přítomnosti nukleotidových sekvencí virových G a M proteinů. Hlavní výhodou této metody je relativní jednoduchost a rychlost. V porovnání s nested RT-PCR také poskytuje téměř shodnou specificitu a umožňuje detekci i v nízkých koncentracích vzorku.

Recentním přístupem v diagnostice SVCV je detekce biomolekul. Oligonukleotidy mohou být v koloidním roztoku hybridizovány se zlatými nanočásticemi, čehož lze využít pro vytvoření specifické hybridizační sondy, která přímo detekuje SVCV [37]. Tato

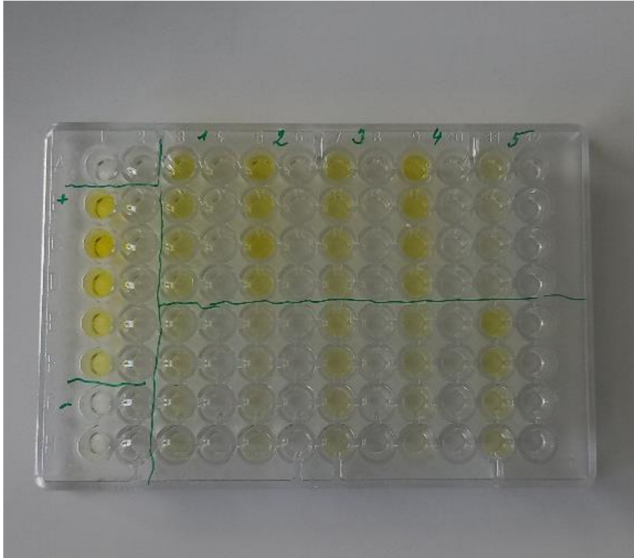
metoda je vysoce specifická a oproti metodám založeným na PCR nevyžaduje předchozí amplifikaci virové RNA. Test lze tedy provést ve výrazně kratším čase a bez nutnosti využití PCR termocykleru [11].

2.5.1 Stanovení specifických protilátek SVCV ve vzorcích metodou ELISA

Metoda ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) je nejběžněji používanou serologickou diagnostickou metodou. Jak popisuje Crowther *et al.* [38], princip této metody spočívá v postupném navazování protilátek na připravený buněčný substrát, které pak reakcí s dalšími složkami mění barvu. Výsledné vzorky jsou pak spektrofotometricky analyzovány. Metoda se provádí na tzv. GAMA destičkách (obrázek 7), které mají 96 jamek pro dávkování vzorků.

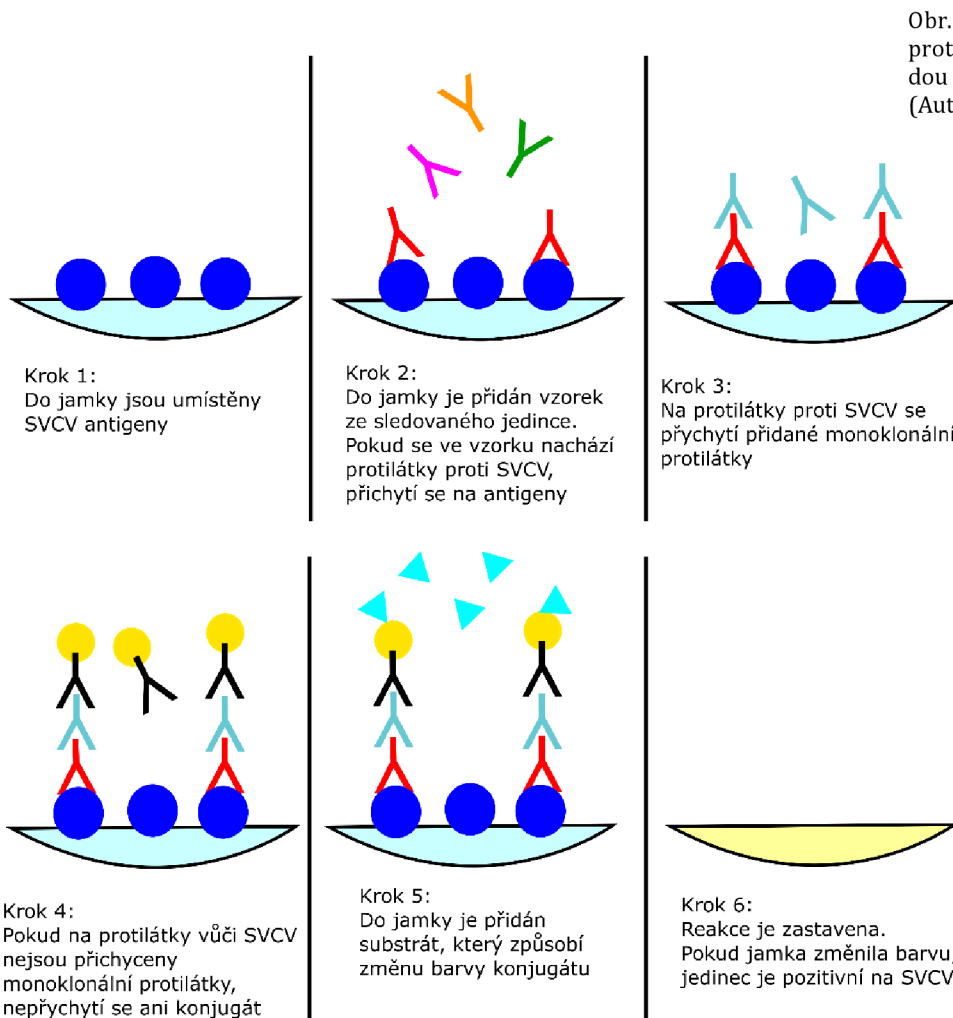
Pro detekci specifických protilátek SVCV lze využít variantu metody ELISA, tzv. sandwich-ELISA. Následující popis postupu byl vypracován na základě kombinace konzultace a demonstrace s MVDr. Reschovou a informací uvedených ve článku Reschová *et al.* [39]. V prvním kroku jsou dna jamek nanášeny buňky exprimující známý antigen proti SVCV. Buňky jsou poté 30 minut blokovány zalitím v 5% roztoku fosfátem pufovaného fyziologického roztoku s přidáním polysorbátu 20 (PBST), což pomáhá zvýšit specifitu. Po vymytí jsou do jamek nanášeny naředěné vzorky krevního séra odebrané z testovaných ryb. Destička je poté 1 hodinu inkubována ve vlhké komůrce při 37°C. Po inkubaci jsou do každé jamky nanášeny komerčně připravené monoklonální protilátky MoA CIg a destička je opět inkubována 1 hodinu ve stejných podmínkách. Po druhé kultivaci je do každé jamky nanášen tzv. konjugát RAMIgG/Px, obsahující protilátky s navázaným enzymem a destička je opět 1 hodinu inkubována za stejných podmínek. Mezi každým předchozím krokem je destička promyta roztokem PBST. Po poslední inkubaci je do každé jamky nanášen substrát ve formě jednosložkového roztoku Tetramethylbenzidin (TMB). V tomto kroku začíná chromatická reakce a vzorky v jamkách získávají azurově modrou barvu. Tato reakce musí být po 10 minutách zastavena přidáním 1M roztoku kyseliny sírové do každé jamky. Zbarvení jamek se tímto změní na žluté. Absorbance vzorků je změřena na spektrofotometru při vlnové délce 450 nm.

Na desce musí být kromě vzorků připraveny také blank a pozitivní i negativní kontrolní séra.



Obr. 7: Fotografie GAMA destičky ihned po dokončení metody ELISA.
(Autor: Patrik Růžička)

Mechanismus metody sandwich-ELISA je založený na vzájemném navázání jednotlivých protilátek. Na antigeny prezentované buňkami na dně jamek se navazují protilátky vůči SVCV obsažené ve vzorku z nemocné ryby. Na tyto protilátky se navazují přidání monoklonální protilátky, na které se pak navazují protilátky přítomné v konjugátu. Na protilátkách v konjugátu je navázaný enzym, který umožňuje reakci měnící barvu vzorku. Dále je přidán substrát, který reakcí s přítomným enzymem vyvolá změnu zbarvení jamky. Tato reakce musí být zastavena přidáním roztoku kyseliny sírové, aby absorbance vzorků zůstala při analýze konstantní. V případě že jde o negativní vzorek, nedojde k prvotnímu navázání protilátek na antigen prezentující buňky a následně ani k navázání všech ostatních. Po přidání substrátu tak není přítomen enzym, se kterým probíhá reakce a jamka zůstane čirá. Intenzita zbarvení pak odpovídá množství protilátek v jamce. Proces je vizuálně znázorněn diagramem v obrázku 8.



Obr. 8: Diagram stanovení specifických protilátek vůči SVCV ve vzorcích metodou sandwich-ELISA.
(Autor: Patrik Růžička)

2.6 Prevence SVCV

Ahne *et al.* [10] uvádí, že nejdůležitějším faktorem rozhodujícím o závažnosti onemocnění SVCV je teplota vody, ve které se ryba nachází. Teploty nad 20°C ve většině případů zajišťují schopnost ryby vytvářet dostatečné množství interferonů a protilátek pro ochranu proti infekci. V chovech s regulovaným prostředím je tudíž možné propuknutí onemocnění zabránit jednoduchým zvýšením teploty vody. Pro otevřené chovy v tropických a subtropických pásmech nepředstavuje SVC nebezpečí, jelikož teplota vody je zde přirozeně dostatečně vysoká.

V místech, kde SVC není rozšířený se při objevení nákazy běžně přistupuje k eradikaci celého chovu s cílem zabránit vniknutí viru do vodních toků. V mírném pásmu je prevence v otevřených chovech značně složitější, zejména ve východní Evropě, kde je virus tak rozšířený, že nákaza chovů je zpravidla nevyhnutelná [40]. V menších moderních farmách je stále možné v omezené míře regulovat teplotu, a především kvalitu

vody, což pomáhá omezit intenzitu propuknutých nálezů. Ve velkých chovech, jako jsou chovné rybníky v České republice, nejsou běžné metody prevence dostačující. Regulace teploty zde není prakticky možná a spojení s ostatními vodními systémy umožňuje snadnou migraci přenašečů a vzájemnou kontaminaci mezi chovnými a volnými hejny [10].

Jedním z přístupů k prevenci jsou podle Ahne *et al.* [10] selekce, hybridizace a genetická manipulace kaprů s cílem vytvořit linii odolnou vůči SVCV. Tento přístup má dlouhou tradici zejména v Rusku, odkud pochází tzv. Krasnodarská varianta kapra obecného [41]. Data o efektivnosti rezistence těchto linií jsou však v současnosti nedostatečná, a žádná linie dosud nebyla relevantně otestována.

Další možností je hledání efektivních metod imunoprolaxe. Ačkoliv již byla vyvinuta DNA vakcína, která je experimentálně vysoce efektivní, z důvodu vysokých produkčních a regulačních nákladů není komerčně využívána [40]. Intraperitoneální a orální vakcinace aktivním virem může však v jedincích vytvořit značnou rezistenci k opětovanému nakažení. Vakcína by ideálně měla být podána na podzim, při teplotě vody nad 19°C.

Bylo rovněž experimentálně prokázáno, že plasmidová DNA kódující glykoprotein SVC dokáže v očkovaných jedincích navodit nespecifickou imunitní reakci proti infekční hematopoetické nekróze [10]. Ačkoliv již existují DNA vakcíny s velmi vysokou účinností, žádná z nich zatím nedosáhla celosvětové komerční distribuce [42].

Jako modernější metoda je zkoumána metoda doručení antigenů do těla jedince s využitím bakterií rodu *Lactobacillus* jako vektoru. V roce 2015 Cui *et al.* [43] provedli studii geneticky upravených bakterií *Lactobacillus plantarum*, které společně exprimovaly G protein SVCV a ORF81 protein koi herpesviru. Cílem studie bylo posoudit použitelnost této bakterie pro vytvoření ochranné imunity u kapra po orální inokulaci. Na očkované jedince kapra obecného vykazovali efektivní ochranu 71%, jedinci koi kapra pak 53 %. Obě formy kapra vykazovaly značně zvýšenou hladinu imunoglobulinu M [43]. V současné době byla již vakcína založená na této metodě úspěšně vyvinuta. Nachází se však stále ve fázi vyhodnocování efektivity a není dostupná k obecnému využití [44].

3 Závěr

V bakalářské práci jsou formou literární rešerše shrnuty recentní poznatky v oblasti problematiky nákazy užitkových kaprovitých ryb virem jarní viremie kaprů. Práce upozorňuje na důležitost problematiky jarní viremie kaprů jako významného onemocnění kaprovitých ryb z hlediska výzkumného i hospodářského.

Samotná práce poskytuje pohled na postavení viru jarní viremie kaprů mezi ostatními patogeny kaprovitých ryb a podává obecné informace o viru a jeho vlastnostech. Popisuje základní mechanismy infekce hostitele, replikace a šíření. Hlavní zaměření je však na genové a molekulární interakce viru s hostitelskými buňkami. Je poskytnut přehled buněčných signálních drah zapojených do imunitní odpovědi vůči SVCV a jednotlivých molekul zapojených do signalizačních mechanismů. Dále jsou popsány metody diagnostiky se zaměřením na metody detekce specifických protilátek. Rovněž jsou uvedeny některé moderní možnosti prevence z pohledu tradiční vakcinace, či hybridizace více odolných jedinců. K práci je rovněž přiložena analýza realizovaného experimentu popisujícího detekci protilátek vůči SVCV a porovnávající efektivnost imunitního systému vůči infekci u čistých linií dvou druhů kaprovitých ryb a hybridních linií.

Výzkum v oblasti SVCV je v současné době do jisté míry přehlížen. Téma je do budoucna velice perspektivní nejen z hlediska studia rhabdovirů, ale také z pohledu zkoumání imunitního systému ryb. Výsledky získané v tomto směru mohou najít výrazné uplatnění v akvakultuře a rybím hospodářství. Mezi témata budoucího výzkumu se značným potenciálem patří rozvoj technologií hybridizace ve směru produkce chovaných linií více odolných vůči patogenům. Navazující výzkum by se tak mohl zabývat např. hledáním hybridních linií kaprovitých ryb, jež jsou vysoce odolná vůči běžným patogenům, přičemž její produkce zůstává dostatečně vysoká pro komerční chov.

Použité zdroje

- [1] STÁTNI VETERINÁRNÍ SPRÁVA ČESKÉ REPUBLIKY. Výroční zpráva Státní veterinární správy za rok 2019. *Státní veterinární správa* [online]. 8. březen 2020 [vid. 2022-04-03]. Dostupné z: <https://www.svscr.cz/vyrocní-zpráva-statni-veterinarni-spravy-za-rok-2019/>
- [2] WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). *Aquatic Animal Health Code*. 22. vyd. 2019. ISBN 978-92-95108-96-7.
- [3] *Regulation (EU) 2016/429 of the European Parliament and of the Council of 9 March 2016 on transmissible animal diseases and amending and repealing certain acts in the area of animal health ('Animal Health Law') (Text with EEA relevance)* [online]. 9. březen 2016 [vid. 2022-04-03]. Dostupné z: <http://data.europa.eu/eli/reg/2016/429/oj/eng>
- [4] *Commission Implementing Regulation (EU) 2018/1882 of 3 December 2018 on the application of certain disease prevention and control rules to categories of listed diseases and establishing a list of species and groups of species posing a considerable risk for the spread of those listed diseases (Text with EEA relevance.)* [online]. 3. prosinec 2018 [vid. 2022-04-03]. Dostupné z: http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2018/1882/oj/eng
- [5] *Commission Implementing Decision (EU) 2021/260 of 11 February 2021 approving national measures designed to limit the impact of certain diseases of aquatic animals in accordance with Article 226(3) of Regulation (EU) 2016/429 of the European Parliament and of the Council and repealing Commission Decision 2010/221/EU (notified under document C(2021) 773) (Text with EEA relevance)* [online]. 11. únor 2021 [vid. 2022-04-03]. Dostupné z: http://data.europa.eu/eli/dec_impl/2021/260/oj/eng
- [6] INFO@AION.CZ, AION CS-. 166/1999 Sb. Veterinární zákon. *Zákony pro lidi* [online]. [vid. 2022-04-03]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1999-166/zneni-20220201>
- [7] PALÍKOVÁ, Miroslava, Veronika PIAČKOVÁ, Stanislav NAVRÁTIL, Eliška ZUSKOVÁ, Ivana PAPEŽÍKOVÁ, Jitka KOLÁŘOVÁ, Ľubomír POJEZDAL, Iva DYKOVÁ, Tomáš SCHOLZ, Milan GELNAR, Zdeňka SVOBODOVÁ, Eva ŘEHULKOVÁ, Jan MAREŠ, Helena MODRÁ, Radim BLAŽEK, Tomáš VESELÝ, JIHOČESKÁ UNIVERZITA, a FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD. *Nemoci a chorobné stavy ryb*. 2019. ISBN 978-80-7514-085-2.
- [8] BEHRMANN-GODEL, Jasminca. Disease Agents and Parasites of Carp. In: Constanze PIETSCH a Philipp HIRSCH, ed. *Biology and Ecology of Carp* [online].

- 0 vyd. B.m.: CRC Press, 2015 [vid. 2022-02-10], s. 119–148. ISBN 978-0-429-17135-2. Dostupné z: doi:10.1201/b18547-11
- [9] FREDERICK S.B. KIBENGE a MARCOS GODOY DR. *Aquaculture Virology* [online]. London: Academic Press, 2016. ISBN 978-0-12-801573-5. Dostupné z: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=nlebk&AN=1144196&site=ehost-live>
- [10] AHNE, W., H. V. BJORKLUND, S. ESSBAUER, N. FIJAN, G. KURATH a J. R. WINTON. Spring viremia of carp (SVC). *Diseases of Aquatic Organisms* [online]. 2002, **52**(3), 261–272 [vid. 2020-12-17]. ISSN 0177-5103, 1616-1580. Dostupné z: doi:10.3354/dao052261
- [11] ASHRAF, Usama, Yuanan LU, Li LIN, Junfa YUAN, Min WANG a Xueqin LIU. Spring viraemia of carp virus: recent advances. *Journal of General Virology* [online]. 2016, **97**(5), 1037–1051 [vid. 2020-12-17]. ISSN 0022-1317, 1465-2099. Dostupné z: doi:10.1099/jgv.0.000436
- [12] CARTER, John B., 1944-. *Virology : principles and applications*. 2nd ed. Chichester: Wiley, 2013. ISBN 978-1-119-99142-7.
- [13] LAKSHMI, Bestha, Shameer SYED a Viswanath BUDDOLLA. Chapter 10 - Current Advances in the Protection of Viral Diseases in Aquaculture With Special Reference to Vaccination. In: Viswanath BUDDOLLA, ed. *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry* [online]. B.m.: Academic Press, 2019 [vid. 2022-02-10], s. 127–146. ISBN 978-0-12-816328-3. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-816328-3.00010-6
- [14] LICATA, Jillian M. a Ronald N. HARTY. Rhabdoviruses and Apoptosis. *International Reviews of Immunology* [online]. 2003, **22**(5/6), 451–476 [vid. 2020-12-17]. ISSN 08830185. Dostupné z: doi:10.1080/08830180305217
- [15] SNIESZKO, S. F. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes*. *Journal of Fish Biology* [online]. 1974, **6**(2), 197–208 [vid. 2022-05-06]. ISSN 1095-8649. Dostupné z: doi:10.1111/j.1095-8649.1974.tb04537.x
- [16] DE BISHNU, P. a Amiya K. BANERJEE. RHABDOVIRUSES (RHABDOVIRIDAE): Ungrouped Mammalian, Bird and Fish Rhabdoviruses. In: Allan GRANOFF a Robert G. WEBSTER, ed. *Encyclopedia of Virology (Second Edition)* [online]. Oxford: Elsevier, 1999, s. 1541–1544. ISBN 978-0-12-227030-7. Dostupné z: doi:10.1006/rwvi.1999.0252

- [17] JULKUNEN, Ilkka, Timo SARENEVA, Jaana PIRHONEN, Tapani RONNI, Krister MELÉN a Sampsa MATIKAINEN. Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression. *Cytokine & Growth Factor Reviews* [online]. 2001, **12**(2), 171–180 [vid. 2022-04-24]. ISSN 1359-6101. Dostupné z: doi:10.1016/S1359-6101(00)00026-5
- [18] YOSHIMURA, Akihiko, Tetsuji NAKA a Masato KUBO. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nature Reviews Immunology* [online]. 2007, **7**(6), 454–465 [vid. 2022-04-24]. ISSN 1474-1741. Dostupné z: doi:10.1038/nri2093
- [19] YUAN, Junfa, Nian SU, Min WANG, Ping XIE, Zhengli SHI a Lijuan LI. Down-regulation of heme oxygenase-1 by SVCV infection. *Fish & Shellfish Immunology* [online]. 2012, **32**(2), 301–306 [vid. 2020-12-17]. ISSN 1050-4648. Dostupné z: doi:10.1016/j.fsi.2011.11.019
- [20] LIU, Lei, Xiao TU, Yu-Feng SHEN, Wei-Chao CHEN, Bin ZHU a Gao-Xue WANG. The replication of spring viraemia of carp virus can be regulated by reactive oxygen species and NF- κ B pathway. *Fish & Shellfish Immunology* [online]. 2017, **67**, 211–217 [vid. 2020-12-17]. ISSN 1050-4648. Dostupné z: doi:10.1016/j.fsi.2017.05.068
- [21] WEI, Xinxian, Xiao Zheng LI, Xiaocong ZHENG, Peng JIA, Jinjin WANG, Xianle YANG, Li YU, Xiujie SHI, Guixiang TONG a Hong LIU. Toll-like receptors and interferon associated immune factors responses to spring viraemia of carp virus infection in common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish & Shellfish Immunology* [online]. 2016, **55**, 568–576 [vid. 2020-12-17]. ISSN 1050-4648. Dostupné z: doi:10.1016/j.fsi.2016.05.043
- [22] YAN, Chuanzhe, Jun XIAO, Jun LI, Hui CHEN, Ji LIU, Chanyuan WANG, Chaoliang FENG a Hao FENG. TBK1 of black carp plays an important role in host innate immune response against SVCV and GCRV. *Fish & Shellfish Immunology* [online]. 2017, **69**, 108–118 [vid. 2022-05-09]. ISSN 1050-4648. Dostupné z: doi:10.1016/j.fsi.2017.08.016
- [23] LOO, Yueh-Ming a Michael GALE. Immune Signaling by RIG-I-like Receptors. *Immunity* [online]. 2011, **34**(5), 680–692 [vid. 2022-05-09]. ISSN 1074-7613. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2011.05.003
- [24] XIAO, Jun, Jun YAN, Hui CHEN, Jun LI, Yu TIAN a Hao FENG. LGP2 of black carp plays an important role in the innate immune response against SVCV and GCRV. *Fish & Shellfish Immunology* [online]. 2016, **57**, 127–135 [vid. 2022-05-09]. ISSN 1050-4648. Dostupné z: doi:10.1016/j.fsi.2016.08.031
- [25] LU, Long-Feng, Shun LI, Xiao-Bing LU a Yong-An ZHANG. Functions of the two zebrafish MAVS variants are opposite in the induction of IFN1 by targeting IRF7.

- Fish & Shellfish Immunology* [online]. 2015, **45**(2), 574–582 [vid. 2020-12-17]. ISSN 1050-4648. Dostupné z: doi:10.1016/j.fsi.2015.05.019
- [26] LU, Liang, Xu WANG, Sizhong WU, Xuejiao SONG, Ziqi ZOU, Xinchu XIE, Jun XIAO, Song CHEN a Hao FENG. Black carp STING functions importantly in innate immune defense against RNA virus. *Fish & Shellfish Immunology* [online]. 2017, **70**, 13–24 [vid. 2022-05-09]. ISSN 1050-4648. Dostupné z: doi:10.1016/j.fsi.2017.08.037
- [27] SONG, Xuejiao, Wanzhen LI, Xinchu XIE, Ziqi ZOU, Jing WEI, Hui WU a Hao FENG. NLRX1 of black carp suppresses MAVS-mediated antiviral signaling through its NACHT domain. *Developmental & Comparative Immunology* [online]. 2019, **96**, 68–77 [vid. 2022-05-09]. ISSN 0145-305X. Dostupné z: doi:10.1016/j.dci.2019.03.001
- [28] LU, Long-Feng, Shun LI, Xiao-Bing LU, Scott E. LAPATRA, Nu ZHANG, Xu-Jie ZHANG, Dan-Dan CHEN, Pin NIE a Yong-An ZHANG. Spring Viremia of Carp Virus N Protein Suppresses Fish IFN ϕ 1 Production by Targeting the Mitochondrial Antiviral Signaling Protein. *The Journal of Immunology* [online]. 2016, **196**(9), 3744–3753 [vid. 2022-05-09]. ISSN 0022-1767, 1550-6606. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.1502038
- [29] FALCO, A., M. FORLENZA a G. F. WIEGERTJES. Identification of common carp IFNs ϕ and analysis of their antiviral activity against SVCV. *Fish & Shellfish Immunology* [online]. 2013, **34**(6), 1705–1706 [vid. 2022-05-09]. ISSN 1050-4648. Dostupné z: doi:10.1016/j.fsi.2013.03.210
- [30] SCHNEIDER, William M., Meike Dittmann CHEVILLOTTE a Charles M. RICE. Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annual review of immunology* [online]. 2014, **32**, 513–545 [vid. 2022-05-09]. ISSN 0732-0582. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120231
- [31] XIAO, Jun, Jun YAN, Hui CHEN, Jun LI, Yu TIAN, Luosheng TANG a Hao FENG. Mx1 of black carp functions importantly in the antiviral innate immune response. *Fish & Shellfish Immunology* [online]. 2016, **58**, 584–592 [vid. 2022-05-09]. ISSN 1050-4648. Dostupné z: doi:10.1016/j.fsi.2016.10.002
- [32] GAO, Yan, Chen LI, Lin SHI, Fang WANG, Jing YE, Yuan-An LU a Xue-Qin LIU. Viperin_{sv1} promotes RIG-I expression and suppresses SVCV replication through its radical SAM domain. *Developmental & Comparative Immunology* [online]. 2021, **123**, 104166 [vid. 2022-05-09]. ISSN 0145-305X. Dostupné z: doi:10.1016/j.dci.2021.104166
- [33] CHEN, Bo, Shitian HUO, Wanmeng LIU, Fang WANG, Yuanan LU, Zhen XU a Xueqin LIU. Fish-specific finTRIM FTR36 triggers IFN pathway and mediates

- inhibition of viral replication. *Fish & Shellfish Immunology* [online]. 2019, **84**, 876–884 [vid. 2022-05-09]. ISSN 1050-4648. Dostupné z: doi:10.1016/j.fsi.2018.10.051
- [34] KOUTNÁ, M., T. VESELY, I. PSIKAL a J. HULOVÁ. Identification of spring viraemia of carp virus (SVCV) by combined RT-PCR and nested PCR. *Diseases of Aquatic Organisms* [online]. 2003, **55**(3), 229–235 [vid. 2020-12-17]. ISSN 0177-5103, 1616-1580. Dostupné z: doi:10.3354/dao055229
- [35] CINKOVA, Katerina, Stanislava RESCHOVA, Pavel KULICH a Tomas VESELY. Evaluation of a polyclonal antibody for the detection and identification of ranaviruses from freshwater fish and amphibians. *Diseases of Aquatic Organisms* [online]. 2010, **89**(3), 191–198 [vid. 2020-12-17]. ISSN 0177-5103, 1616-1580. Dostupné z: doi:10.3354/dao02198
- [36] SHIVAPPA, R B, R SAVAN, T KONO, M SAKAI, E EMMENEGGER, G KURATH a J F LEVINE. Detection of spring viraemia of carp virus (SVCV) by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in koi carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Diseases* [online]. 2008, **31**(4), 249–258 [vid. 2022-04-25]. ISSN 1365-2761. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2761.2007.00894.x
- [37] SALEH, Mona, Hatem SOLIMAN, Oskar SCHACHNER a Mansour EL-MATBOULI. Direct detection of unamplified spring viraemia of carp virus RNA using unmodified gold nanoparticles. *Diseases of Aquatic Organisms* [online]. 2012, **100**(1), 3–10 [vid. 2022-04-25]. ISSN 0177-5103, 1616-1580. Dostupné z: doi:10.3354/dao02484
- [38] CROWTHER, John R. *ELISA: Theory and Practice*. B.m.: Springer Science & Business Media, 1995. ISBN 978-1-59259-529-7.
- [39] RESCHOVA, S., D. POKOROVA, Z. NEVORANKOVA, J. HULOVA a T. VESELY. Detection of spring viraemia of carp virus (SVCV) with monoclonal antibodies. *Veterinární Medicína* [online]. 2008, **52**(No. 7), 308–316 [vid. 2020-12-17]. ISSN 03758427, 18059392. Dostupné z: doi:10.17221/2043-VETMED
- [40] FREDERICK S.B. S. B. KIBENGE a MARCOS GODOY DR. 18.4 Spring Viremia of Carp Virus. In: *Aquaculture Virology* [online]. London: Academic Press, 2016. ISBN 978-0-12-801573-5. Dostupné z: <http://ezproxy.muni.cz/login?url=https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,cookie,uid&db=nlebk&AN=1144196&lang=cs&site=eds-live&scope=site>
- [41] KIRPICHNIKOV, V. S., Ju. I. ILYASOV, L. A. SHART, A. A. VIKHMAN, M. V. GANCHENKO, A. L. OSTASHEVSKY, V. M. SIMONOV, G. F. TIKHONOV a V. V. TJURIN. Selection of Krasnodar common carp (*Cyprinus carpio* L.) for resistance to

- dropsy: principal results and prospects. *Aquaculture* [online]. 1993, **111**(1), Genetics in Aquaculture IV, 7–20 [vid. 2022-05-06]. ISSN 0044-8486. Dostupné z: doi:10.1016/0044-8486(93)90020-Y
- [42] EMBREGTS, Carmen W. E., Dimitri RIGAUDEAU, Tomáš VESELÝ, Dagmar POKOROVÁ, Niels LORENZEN, Jules PETIT, Armel HOUEL, Malte DAUBER, Heike SCHÜTZE, Pierre BOUDINOT, Geert F. WIEGERTJES a Maria FORLENZA. Intramuscular DNA Vaccination of Juvenile Carp against Spring Viremia of Carp Virus Induces Full Protection and Establishes a Virus-Specific B and T Cell Response. *Frontiers in Immunology* [online]. 2017, **8** [vid. 2022-05-06]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.01340>
- [43] CUI, Li-Chun, Xue-Ting GUAN, Zhong-Mei LIU, Chang-Yong TIAN a Yi-Gang XU. Recombinant lactobacillus expressing G protein of spring viremia of carp virus (SVCV) combined with ORF81 protein of koi herpesvirus (KHV): A promising way to induce protective immunity against SVCV and KHV infection in cyprinid fish via oral vaccination. *Vaccine* [online]. 2015, **33**(27), 3092–3099 [vid. 2021-05-23]. ISSN 0264-410X. Dostupné z: doi:10.1016/j.vaccine.2015.05.002
- [44] ZHANG, Chen, Sheng GUO, Zhao ZHAO, Zi-Rao GUO, Rui MA, Gao-Xue WANG a Bin ZHU. Surface display of spring viremia of carp virus glycoprotein on *Lactococcus lactis* and its protection efficacy in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish & Shellfish Immunology* [online]. 2020, **104**, 262–268 [vid. 2022-05-06]. ISSN 1050-4648. Dostupné z: doi:10.1016/j.fsi.2020.06.021
- [45] ŠIMKOVÁ, Andrea, Kristína CIVÁŇOVÁ a Lukáš VETEŠNÍK. Heterosis versus breakdown in fish hybrids revealed by one-parental species-associated viral infection. *Aquaculture* [online]. 2022, **546**, 737406 [vid. 2022-04-03]. ISSN 0044-8486. Dostupné z: doi:10.1016/j.aquaculture.2021.737406

Příloha A Experimentální studie

1.1 Úvod

Studie předložená v bakalářské práci byla realizována v návaznosti na experiment s SVCV infekcí prováděný prof. RNDr. Andreou Vetešníkovou Šimkovou, Ph.D. [45]. Cílem studie předložené v bakalářské práci bylo srovnat tvorbu specifických protilátek ve vztahu k infekci SVCV u kapra obecného (druh vnímavý k infekci SVCV), karase stříbřitého (druh rezistentní k infekci SVCV), a dvou vybraných hybridních linií reprezentujících jednu F1 generaci a jednu generaci zpětných kříženců („backcross“ generace).

1.2 Metodika

Pro potřeby studie byli odchyceni jedinci *C. carpio*, *C. gibelio* a jejich přirozeně se vyskytující hybridní F1 generace. Odchyt byl proveden v Hlohoveckém rybníku, který se nachází v Lednicko-valtickém areálu. Odchycení jedinci byli převezeni do chovného prostoru. U všech F1 hybridů byla potvrzena přítomnost mtDNA *C. gibelio*. Hybridní jedinci byli identifikováni na základě meristických znaků a využitím molekulárních markerů [45].

Odchycení jedinci byli rozděleni podle pohlaví do provzdušňovaných kádí. Přídáním komerčně vyrobeného hypofyzárního hormonu a následným zvýšením teploty byla pak stimulována ovulace a spermiogeneze. Vyprodukované oocyty a spermie byly odebrány a použity pro umělé oplodnění. Bylo připraveno celkem 9 linií, relevantní pro tuto práci jsou 4 linie vzniklé kombinacemi uvedenými v tabulce 1.

Samice	Samec	Linie
<i>C. carpio</i>	<i>C. carpio</i>	<i>C. carpio</i>
<i>C. gibelio</i>	<i>C. gibelio</i>	<i>C. gibelio</i>
<i>C. gibelio</i>	<i>C. carpio</i>	F1
<i>C. carpio</i>	F1	Backcross

Tabulka 1: Linie studované pro tvorbu specifických protilátek vůči SVCV

Získaní potomci byli odchováni do věku dvou let. V době analýzy specifických protilátek dosahovali celkové délky uvedené v tabulce 2.

Linie	Průměrná délka (mm)	Směrodatná odchylka
<i>C. carpio</i>	101,59	5,38
<i>C. gibelio</i>	83,27	6,61
F1	91,31	6,14
Backcross	92,78	4,89

Tabulka 2: Tělesné rozměry pokusných jedinců

Jedinci z různých linií byli poté umístěni do provzdušňovaných akvárií s teplotou vody 20°C. Z každé linie bylo hodnoceno 10-15 jedinců. Všechna akvária měla objem vody 90 l. Ryby byly v průběhu experimentu krmeny zmrazenými žábřonážkami rodu *Artemia* a komerčním krmivem typu suché granule a vločky značky „Tetra Min“.

Každý jedinec byl intraperitoneálně infikován SVCV (infekční dávka 1,9E+08 TCID50/ml). Infekční dávka byla určena tak, aby dostatečně aktivovala imunitní systém nakaženého jedince, ale zároveň omezila virem způsobenou mortalitu. Každému jedinci bylo z kaudální cévy odebráno 50 µl krve v časových intervalech uvedených v tabulce 3.

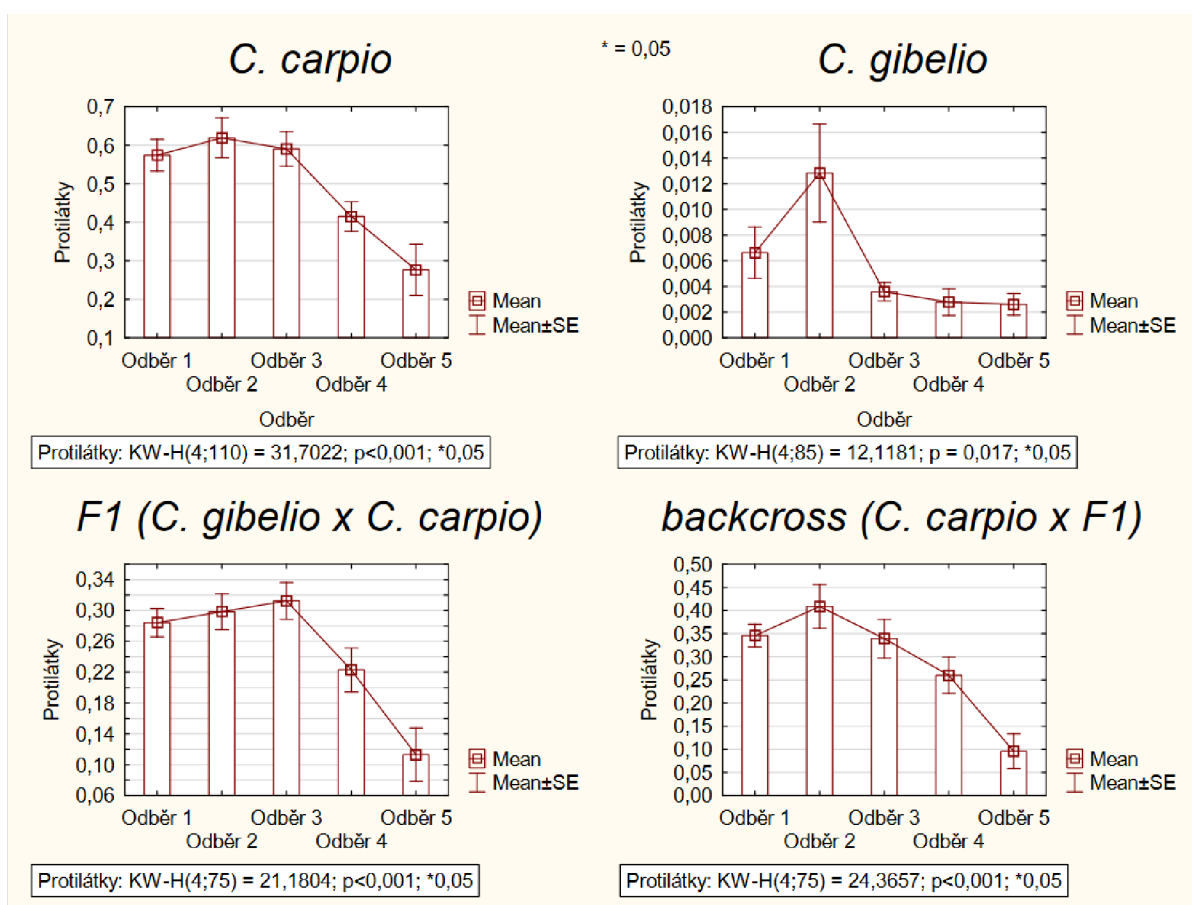
Číslo odběru	Počet dnů od infekce
Odběr 1	20
Odběr 2	35
Odběr 3	50
Odběr 4	100
Odběr 5	200

Tabulka 3: Časové intervaly jednotlivých odběrů

Odebrané vzorky byly analyzovány metodou ELISA v souladu s postupem popsaným v kapitole 2.5.1.

1.3 Výsledky

Spektrofotometrií bylo určeno množství protilátek v každém jedinci v jednotlivých odběrech. Naměřené průměrné množství protilátek u každé linie při každém odběru je uvedeno v grafu 1. Efekt odběru na změnu protilátek byl analyzován využitím Kruskal-Wallis testu.



Graf 1: Množství naměřených protilátek u jednotlivých linií v čase

Následně bylo provedeno mnohonásobné porovnání statisticky významné odlišnosti mezi jednotlivými odběry. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 4-7.

<i>C. carpio</i>	Odběr 1	Odběr 2	Odběr 3	Odběr 4	Odběr 5
Odběr 1		1,000000	1,000000	0,141723	0,000340
Odběr 2	1,000000		1,000000	0,049955	0,000068
Odběr 3	1,000000	1,000000		0,100024	0,000197
Odběr 4	0,141723	0,049955	0,100024		0,906541
Odběr 5	0,000340	0,000068	0,000197	0,906541	

Tabulka 4: Mnohonásobné porovnání odběrů u *C. carpio* (*0,05)

POUŽITÉ ZDROJE

<i>C. gibelio</i>	Odběr 1	Odběr 2	Odběr 3	Odběr 4	Odběr 5
Odběr 1		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
Odběr 2	1,000000		0,421088	0,037196	0,032536
Odběr 3	1,000000	0,421088		1,000000	1,000000
Odběr 4	1,000000	0,037196	1,000000		1,000000
Odběr 5	1,000000	0,032536	1,000000	1,000000	

Tabulka 5: Mnohonásobné porovnání odběrů u *C. gibelio* (*0,05)

F1	Odběr 1	Odběr 2	Odběr 3	Odběr 4	Odběr 5
Odběr 1		1,000000	1,000000	0,844053	0,011872
Odběr 2	1,000000		1,000000	0,519579	0,005407
Odběr 3	1,000000	1,000000		0,177538	0,001015
Odběr 4	0,844053	0,519579	0,177538		1,000000
Odběr 5	0,011872	0,005407	0,001015	1,000000	

Tabulka 6: Mnohonásobné porovnání odběrů u F1 generace (*0,05)

backcross	Odběr 1	Odběr 2	Odběr 3	Odběr 4	Odběr 5
Odběr 1		1,000000	1,000000	1,000000	0,003259
Odběr 2	1,000000		1,000000	0,269979	0,000068
Odběr 3	1,000000	1,000000		1,000000	0,004207
Odběr 4	1,000000	0,269979	1,000000		0,221992
Odběr 5	0,003259	0,000068	0,004207	0,221992	

Tabulka 7: Mnohonásobné porovnání odběrů u backcross generace (*0,05)

U jednotlivých linií byla zaznamenána různá intenzita charakteristických příznaků onemocnění SVCV. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 8.

Linie	Procento jedinců s danou intenzitou příznaků			
	žádné	mírné	střední	vysoké
<i>C. carpio</i>	40,9%	13,6%	31,8%	13,6%
<i>C. gibelio</i>	100,0%	0%	0%	0%
F1 linie	100,0%	0%	0%	0%
Backcross linie	0%	60,0%	20,0%	20,0%

Tabulka 8: Procentuální zastoupení intenzity příznaků

1.4 Vyhodnocení

Na základě procentuálního vyjádření intenzity příznaků v tabulce 4 je zřejmé, že karas obecný a F1 generace hybridů nevykazují příznaky nemoci. Naopak, kapr obecný a generace zpětných kříženců vykazovali mírné, střední a vysoké příznaky nemoci. Tvorba specifických protilátek je znázorněna v grafu 1. Křivka procházející aritmetickým průměrem naměřené hodnoty protilátek u každého odběru ukazuje vývoj nemoci v čase. Do jisté míry jsou si grafy jednotlivých linií podobné. Na každém můžeme vidět krátké počáteční zvýšení hladiny protilátek, maximum a pozvolný pokles. Zaznamenány byly výrazné rozdíly v hladině protilátek mezi jednotlivými liniemi. Větší množství protilátek v těle naznačuje silnější reakci imunitního systému, což lze interpretovat jako vyšší vnímavost k nemoci a nutnou intenzivnější imunitní reakci. Nejméně protilátek bylo detekováno u *C. gibelio*, nejvyšší hladinu protilátek pak vykazovali jedinci *C. carpio*. Linie F1 hybridů a backcross hybridů se pak pohybovaly mezi hladinou protilátek naměřenou pro *C. carpio* a *C. gibelio*. F1 linie hybridů měla hladinu protilátek nižší než linie backcross hybridů.

Z výše uvedených informací vyplývá, že nejméně náchylný k infekci SVCV je *C. gibelio*. Naopak nejvíce náchylný je *C. carpio*. Jedinci linie F1 hybridů jsou vůči infekci téměř stejně odolní jako *C. gibelio*. Z toho lze usuzovat na hybridní heterozii u F1 generace. Linie zpětných kříženců (backcross hybrid) byla pak k nemoci náchylnější než F1, ale méně náchylná než *C. carpio*.

Pro ověření významnosti efektu odběru na hladinu protilátek SVCV byla pro každou z linií aplikován neparametrický Kruskal-Wallis test, jelikož data nemají normální rozložení. Byl prokázán statisticky významný efekt odběru na hladinu protilátek u každé ze studovaných linií ($p < 0.05$).

Z výsledků analýzy vyplývá, že SVCV je geneticky nejvíce kompatibilní s *C. carpio* a nejméně s *C. gibelio*. S narůstající proporcí genů *C. carpio* v genomu hybridů, se zvyšuje náchylnost k nemoci a tvorba specifických protilátek jako odpověď na infekci.