

Herpesvirus della carpa Koi (KHV): infezione sperimentale e diagnosi di laboratorio

Koi carp herpesvirus (KHV): experimental infection and laboratory diagnosis

**Anna Toffan¹, Fabio Borghesan¹, Francesco Quaglio²,
Amedeo Manfrin¹, Marta Vascellari¹, Silvia Ormelli¹,
Rosita Quartesan¹, Giuseppe Bovo^{1*}**

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, viale dell'Università, 10 – Legnaro (PD)

² Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria, Università degli Studi di Padova,
Viale dell'Università, 16 – Agripolis – 35020 Legnaro (PD)

RIASSUNTO - L'allevamento della carpa, sia a scopo alimentare che ornamentale, rappresenta una delle attività di acquacoltura più diffuse a livello mondiale. La comparsa dell'herpesvirus della carpa koi, dapprima nelle carpe ornamentali e, più recentemente, nella carpa comune, ha evidenziato l'estrema vulnerabilità della specie *Cyprinus carpio* nei confronti di questo agente virale emergente, identificato per la prima volta in Israele nel 1998. Da allora la malattia si è diffusa in molte aree geografiche, soprattutto a seguito degli scambi commerciali e manifestazioni hobbistiche delle varietà ornamentali e, nel caso delle varietà destinate al consumo e alla pesca sportiva, attraverso il commercio di partite infette ed i reflui delle aziende contaminate. Inoltre non si può escludere che la malattia si sia diffusa anche per le difficoltà diagnostiche che la caratterizzano.

Nel presente lavoro due gruppi di carpe comuni sono state infettate, per via intramuscolare e per bagno, con il ceppo di referenza KHV UK C250, per riprodurre sperimentalmente la malattia. Sui soggetti morti sono stati applicati diversi protocolli diagnostici: isolamento virale, microscopia elettronica, istologia e PCR per valutarne l'efficacia. I risultati ottenuti nel corso di queste prime indagini confermano che il KHV è un virus di difficile isolamento anche su substrati cellulari ritenuti specifici e che il miglior approccio diagnostico, dovrebbe prevedere il ricorso a più tecniche di laboratorio, in attesa di identificare un metodo d'elezione validato a livello internazionale.

SUMMARY - Carp farming represents the most significant aquaculture activity in the world. At present koi herpesvirus disease (KHVD) is considered to be one of the most risky factors affecting populations of common and koi carp. The first outbreak of the disease was reported in 1998 in Israel, since then several cases have been confirmed all over the world both in wild and reared stocks. Commercial trades are the most important factor in spreading KHV; furthermore the lack of a robust diagnostic method may have certainly contributed to the spreading of the disease.

In this paper two sets of common carps were infected with a laboratory reference KHV strain (UK C250) by intramuscular injection and water bath in order to reproduce the disease and provide reference tissues for diagnostic investigations. Different tests were performed on dead fish: viral isolation, electron microscopy, histology and PCR in order to compare the diagnostic efficacy. Our results confirm the problems to isolate KHV and underline the need of multiple techniques approach to the disease before a gold standard technique is standardized at international level.

Key words: KHV, Common carp, Koi carp, *Cyprinus carpio*, Experimental infection.

* Corresponding author: c/o Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Ittiopatologia, viale dell'Università, 10 - 35020 Legnaro (PD), Italia. Tel.: 0039 049 8084248; Fax: 0039 049 8084392; E-mail: gbovo@izsvenezie.it.

INTRODUZIONE

La carpa comune (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758) costituisce una delle specie ittiche maggiormente diffuse e allevate in tutto in mondo, con una produzione annua, in gran parte riferita ai Paesi del sud est asiatico, di oltre 16 milioni di tonnellate (Penman *et al.*, 2005). Tali produzioni rappresentano un'importante fonte di proteine nobili, ad integrazione della dieta estremamente povera di milioni di persone che vivono in quelle aree. La variante ornamentale della carpa comune, nota come carpa koi (*Cyprinus carpio* var. *koi*), è invece apprezzata per gli splendidi colori della livrea che ne fanno una tra le specie ornamentali più note e diffuse con milioni di cultori in tutto il mondo, specialmente in Giappone ed in Israele.

A partire dal 1997-98 sono stati osservati, inizialmente in popolazioni di carpe koi e in seguito anche in carpe comuni, gravi episodi di mortalità di apparente origine virale (Ariav *et al.*, 1999). Nel corso di alcuni episodi è stato isolato ed identificato un agente eziologico morfologicamente ascrivibile alla famiglia Herpesviridae, in seguito classificato come koi herpesvirus (KHV) (Hedrick *et al.*, 2000; Hoffmann *et al.*, 2004; Schlotfeldt, 2004). Si ritiene che gli scambi internazionali, nonché le frequenti esposizioni e gare legate alla carpa koi, unitamente all'assenza di restrizioni sanitarie ufficiali, rappresentino la causa principale della rapidissima diffusione a livello mondiale della malattia (Hedrick, 1996; Denham, 2003). Questa ipotesi è supportata dall'elevato grado di omogeneità genetica esistente tra i primi ceppi isolati in Israele con quelli isolati in USA (Gilad *et al.*, 2003). La malattia è stata segnalata in: Israele, Germania, Inghilterra, Stati Uniti, Belgio, Olanda, Cina, Malesia, Danimarca, Indonesia, Taiwan, Austria, Francia, Polonia, Lussemburgo, Svizzera e Giappone (Pokorova *et al.*, 2005). Nel nostro Paese, malgrado la comparsa di alcuni episodi fortemente sospetti, la malattia non è ancora stata definitivamente diagnosticata.

Con questo lavoro è stata indotta l'infezione sperimentale in carpe comuni, per verificare direttamente la sintomatologia e le lesioni specifiche; inoltre utilizzando lo stesso materiale patologico si è voluto verificare l'affidabilità diagnostica delle procedure attivate presso il laboratorio.

MATERIALI E METODI

Virus

L'infezione sperimentale è stata eseguita utilizzando un KHV di riferimento (UK C250) gentilmente fornito dal dr. K. Way (CEFAS, Weymouth - UK) e replicato in laboratorio su cellule KF-1 (koi fin).

Pesci

Complessivamente sono stati utilizzate 110 carpe comuni dell'età di 8-9 mesi (peso medio 14 ± 3 grammi). Gli animali provenivano da un impianto situato nella regione Veneto, oggetto di regolare controllo da parte del servizio veterinario ufficiale, nel quale non è mai stata riportata presenza di mortalità o sintomatologia riferita a herpesvirus della carpa koi. Subito dopo l'arrivo in laboratorio su 5 soggetti della partita è stata eseguita un'indagine di controllo, tramite PCR, al fine di escludere un'eventuale infezione sub-clinica da KHV.

I pesci sono stati suddivisi in tre gruppi e stabulati per tutta la durata delle prove in tre distinti acquari di vetro (A, B e C) della capacità di circa 20 litri ciascuno, provvisti di filtro interno con ricircolo dell'acqua. Negli acquari A e B sono stati allocati 30 soggetti per vasca mentre, in un terzo acquario (C) sono stati immessi 50 soggetti utilizzati come controllo. La

temperatura è stata mantenuta a 25°C. Gli animali sono stati alimentati una volta/die con mangime per carpe di formulazione commerciale.

Infezione sperimentale

Il primo gruppo (A) è stato infettato tramite immersione per 120 minuti in acqua a cui era stata aggiunta una sospensione virale (titolo finale 17,5 DICT₅₀/ml). Il secondo gruppo (B) è stato infettato per via intramuscolare, caudalmente al punto di inserzione della pinna dorsale, con 0,1 ml di sospensione virale (titolo 10⁴ DICT₅₀/ml) costituito da surnatante cellulare infetto centrifugato (2.500 rpm per 10 minuti).

I soggetti sono stati monitorati quotidianamente per il rilevamento di eventuali sintomi clinici. I pesci morti e/o agonizzanti sono stati raccolti e sottoposti ad esami di laboratorio. Da ogni singolo soggetto o da un pool di più soggetti, se deceduti lo stesso giorno, sono stati prelevati campioni di branchie, organi interni (rene, milza, cuore e cervello) e porzioni di cute in caso di lesioni evidenti.

A 15 giorni dall'infezione è stato inoltre prelevato, da ciascuno dei tre acquari, un campione di 5 ml di acqua da sottoporre ad esami di biologia molecolare per la ricerca virale. Infine, al 30° e 40° giorno post-infezione, sono stati prelevati da entrambi i gruppi infettati tre soggetti asintomatici per verificare la persistenza dell'agente virale nei tessuti, anche in seguito alla scomparsa della sintomatologia. Tutti i campioni prelevati sono stati sottoposti ai seguenti esami: isolamento virale su cellule KF-1, microscopia elettronica in colorazione negativa, PCR ed esame istologico.

Isolamento virale

Campioni di tessuto branchiale e cutaneo, prelevati da singoli soggetti o da pool di pesci deceduti nello stesso giorno, sono stati omogeneizzati al mortaio e diluiti 1:5 in terreno Minimum Essential Medium (MEM) con antibiotici (10.000 UI/ml penicillina G, 10 mg/ml streptomycina solfato, 25 µg/ml anfotericina B, 50 mg/ml kanamicina) e addizionato del 10% di siero fetale bovino con 1% di soluzione tampone HEPES. Dopo centrifugazione a 3.000 rpm per 10 minuti i campioni sono stati mantenuti una notte a 4°C e quindi inoculati, in doppio, in monostrati cellulari KF-1 (100 µl/pozzetto). Le piastre contenenti le colture sono state incubate per 7 giorni a 25°C e in assenza di effetto citopatico è stato eseguito un ulteriore passaggio cieco. Il surnatante cellulare dei pozzetti con effetto citopatico è stato sottoposto ad indagine di PCR per l'identificazione virale.

Microscopia elettronica:

I campioni prelevati sono stati omogeneizzati e diluiti (1:5) in soluzione salina PBS, sottoposti a 2-3 cicli di congelamento e scongelamento rapido a -20°C. Il preparato è stato quindi centrifugato a 4.000 rpm per 30 minuti. Il surnatante è stato filtrato attraverso membrana sterilizzante (0,22 µm), depositato su griglie di rame per microscopia elettronica ed ultracentrifugato a 102.000 rpm per 10 minuti. La griglia infine è stata sottoposta a colorazione negativa per 1 minuto con acido sodiofosfotungstico diluito al 2% in acqua distillata. Al termine del procedimento i preparati sono stati esaminati al microscopio elettronico (Philips 208 S) ad ingrandimenti compresi tra 18.000 e 36.000x.

Esame istologico:

L'esame istologico è stato eseguito su sezioni di branchie e cute. Gli organi sono stati fissati in formalina tamponata al 10%. I campioni sono stati successivamente inclusi in paraffina e le sezioni, dello spessore di 4 µm, sono state colorate con ematossilina-eosina (E&E).

Biologia molecolare:

L'estrazione dell'acido nucleico è stata eseguita sottoponendo 0,1 g. di ogni campione, al trattamento con kit commerciale (High Pure PCR template preparation kit - Roche), secondo le indicazioni del produttore. La reazione di PCR è stata sviluppata in un volume di 50 µl (contenente: 10 µl di DNA estratto, 25 nm di MgCl₂, 10 nm di dNTPs, KHV Rev e For in ragione di 20 pmol/µl e 5 UI/µl di Taq Gold), secondo il seguente schema termico: denaturazione iniziale a 95°C per 10 minuti, 30 cicli di amplificazione a 95°C per 30 secondi - 55°C per 30 secondi - 72°C per 1 minuto ed infine elongazione a 72°C per 10 minuti. I primers utilizzati sono specificati in tabella 1.

Primers	Lunghezza del segmento amplificato (pb)	Sequenza (5'-3')
KHV-For	484	-GACGACGCCGGAGACCTTGTG-
KHV-Rev		-CACAAAGTTCAGTCTGTTCTCAAC-
KHV-For-Int	400	-CACATGGGCAGTCCGCTGGC-

Tabella 1 - Primers utilizzati in questo lavoro (Gilad *et al.*, 2002, Anonimo, 2003).
Table 1 - Primers used in this study (Gilad et al., 2002; Anonymous, 2003).

Da 2 µl del primo processo di amplificazione si è proceduto con una seconda amplificazione con impiego della coppia di primer KHV For Int e KHV Rev secondo la tecnica di eminested PCR. Un volume finale di 50 µl (2 µl di DNA, 25 nm di MgCl₂, 10 nm di dNTPs, 20 pmol/µl di KHV For-Int e KHV Rev, 5 UI/µl di Taq Gold) è stato nuovamente sottoposto a termociclazione secondo il seguente schema: denaturazione a 95°C per 10 minuti, 30 cicli di amplificazione a 95°C per 30 secondi - 62°C per 30 secondi - 72°C per 1 minuto, elongazione per 72°C per 10 minuti.

L'amplificato finale è stato infine sottoposto ad elettroforesi su gel di agarosio in presenza di etidio bromuro con funzione di marker.

RISULTATI**Sintomatologia**

I primi segni clinici, sempre associati a lesioni cutanee, si sono manifestati, in entrambi i gruppi infettati, a partire dal 7°-8° giorno post infezione e si sono protratti rispettivamente fino al 15° giorno nel gruppo A e fino al 20° giorno nel gruppo B.

La malattia si manifestava inizialmente con il rallentamento dei movimenti natatori. In seguito sono comparse lesioni cutanee a carattere erosivo in entrambi i gruppi infettati. Tali lesioni sono state riscontrate prevalentemente in prossimità del sito di inoculo, nelle carpe infettate per via intramuscolare. Nei soggetti sottoposti ad infezione per bagno le ulcere erano diffuse sul dorso, sui fianchi e nel peduncolo caudale (foto 1). I danni tissutali si manifestavano inizialmente con una lieve soffiatura emorragica, seguita da lepidortosi circoscritta ed infine necrosi ulcerativa della cute fino ad interessare, nei casi più gravi, la

muscolatura sottostante. In alcuni soggetti le lesioni di minore gravità regredivano fino a completa guarigione. All'aggravarsi delle erosioni cutanee seguiva la morte dei soggetti.

In alcuni individui si osservavano: comparsa di nuoto irregolare, dimagrimento, apatia e morte, pur in assenza di lesioni apparenti.

All'esame anatomopatologico si osservavano inoltre emorragie a carico delle branchie ed ipertrofia del rene anteriore.

Il gruppo di controllo non ha manifestato alcun sintomo significativo per l'intera durata della prova.

Indagine virologica

L'indagine virologica in coltura ha permesso l'isolamento dell'agente infettante esclusivamente dai campioni prelevati dal gruppo B a 8 giorni post-infezione. Da questi campioni è stato possibile reisolare il virus sia dalle branchie che dal pool d'organi. Nei campioni prelevati successivamente, così come nei campioni di acqua, l'isolamento è risultato negativo (Tabella 2).

Giorni post-infezione	Isolamento su KF-1			PCR			Microscopia Elettronica		
	Pool organi	branchie	cute	Pool organi	branchie	cute	Pool organi	branchie	cute
10	-	-	ne	+	+	+	-	-	+
12	-	-	ne	+	+	ne	-	-	ne
30	-	-	ne	+	+	ne	-	-	ne
40	-	ne	ne	-	-	ne	ne	ne	ne

Legenda : + = positivo ; - = negativo ; ne =non eseguito

Tabella 2 - Risultati relativi ai campioni del gruppo A (infezione per bagno).
Table 2 - Results from samples belonging to group A (bath infection).

Microscopia elettronica

L'esame dei campioni condotto mediante microscopia elettronica ha consentito di osservare la presenza di particelle virali morfologicamente riferibili ad *Herpesvirus*, sia dalle branchie che dal pool d'organi delle carpe infettate del gruppo B, prelevate all'ottavo e al dodicesimo giorno post-infezione (Tabella 3).

Per quanto riguarda il gruppo A, l'esame è risultato positivo solo nel campione di cute, prelevato al decimo giorno post-infezione.

Giorni post-infezione	Isolamento su KF-1		PCR		Microscopia Elettronica	
	Pool organi	branchie	Pool organi	branchie	Pool organi	branchie
8	+	+	ne	+	+	+
12	-	-	+	+	+	+
20	-	-	+	+	ne	ne
30	-	-	+	+	ne	ne
40	-	-	-	-	ne	ne

Legenda : + = positivo ; - = negativo ; ne = non eseguito

Tabella 3 - Risultati relativi ai campioni del gruppo B (infezione intramuscolo).
Table 3 - Results from samples belonging to group B (intramuscular infection).

Esame istologico

L'esame istologico della cute, prelevata da soggetti con lesioni macroscopiche (gruppo A), ha messo in evidenza la presenza di iperemia dei vasi del derma e degenerazione vacuolare delle cellule dell'epidermide e acantosi (Foto 2).

Le lesioni istologiche, osservate a livello branchiale, nei soggetti prelevati da entrambi i gruppi, comprendevano: iperplasia dell'epitelio branchiale da moderata a grave, fino a totale fusione delle lamelle (Foto 3) e, nei casi più gravi, necrosi con sfaldamento cellulare con esposizione dell'asse cartilagineo; edema delle lamelle, talvolta accompagnato da congestione; telangiectasie ed emorragie; ipertrofia delle cellule mucipare; infiammazione con presenza di linfociti, plasmacellule, cellule a granuli eosinofili e "rodlet cells".

Inoltre, le cellule epiteliali erano caratterizzate da nuclei ipertrofici con presenza di corpi inclusi (Foto 4). Questi ultimi sono stati riscontrati esclusivamente nei prelievi effettuati all'8° giorno p.i. (gruppo B). Nei prelievi dei giorni successivi è stato possibile osservare una progressiva ipertrofia dei nuclei delle cellule dell'epitelio e del tessuto connettivo alla base dei filamenti branchiali, con aspetto marcatamente spongioso (Pikarsky *et al.* 2004), in assenza di corpi inclusi.

Biologia molecolare

L'indagine eseguita tramite tecnica eminested PCR è risultata positiva per KHV in tutti i campioni prelevati fino al 30° giorno p.i. (Tabella 2 e 3).

I campioni di acqua prelevati dalle tre vasche, a quindici giorni post-infezione, sono risultati negativi.

TAVOLA 1 – TABLE 1

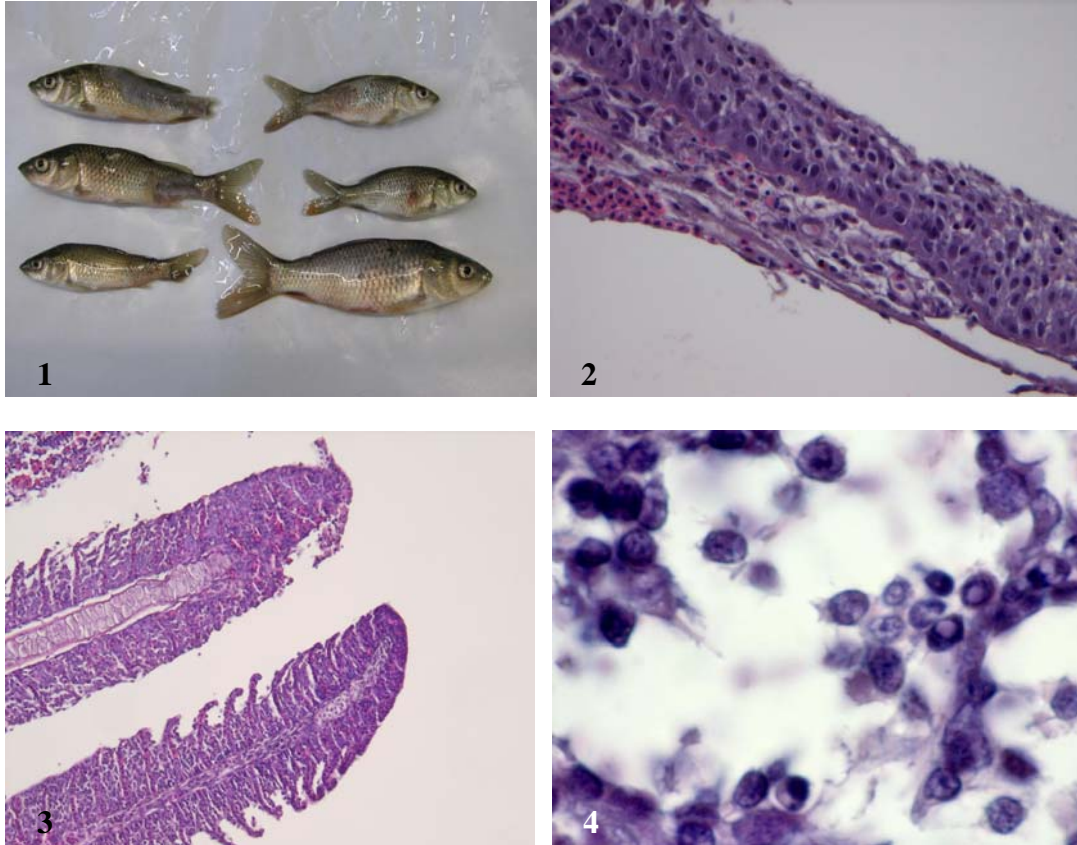


Foto 1 - Lesioni cutanee di varia gravità in soggetti infettati gruppo A. Foto 2 - Iperemia dei vasi del derma e degenerazione vacuolare delle cellule dell'epidermide. E.E., 40x. Foto 3 - Grave iperplasia dell'epitelio branchiale con totale fusione delle lamelle, sfaldamento cellulare ed esposizione dell'asse cartilagineo. E.E., 10x. Foto 4 - Nuclei ipertrofici con presenza di corpi inclusi nelle cellule dell'epitelio branchiale. E.E., 100x.

Figure 1 - Skin lesions in fishes of group A. Figure 2 - Hyperemic vessels in derma and vacuolar degeneration in epithelial cells. H&E, 40x. Figure 3 - Severe hyperplasia of the respiratory epithelium with obliteration of the interlamellar space, necrosis, and cellular sloughing off with exposure of cartilaginous axis. H&E, 10x. Figure 4 - Hypertrophic nuclei and inclusion bodies in gill epithelium. H&E, 100x.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il koi herpesvirus è considerato un patogeno emergente, in conseguenza della sua recente comparsa e rapida diffusione, associata all'elevato grado di virulenza, sia nei confronti della carpa koi che della carpa comune. La variabilità dei segni clinici, l'elevata mortalità e le difficoltà riscontrate nell'isolamento del virus, hanno richiesto un approfondimento delle conoscenze attuali sulla malattia, nonché un miglioramento delle tecniche diagnostiche disponibili. Con il presente lavoro si è voluto riprodurre, in condizioni sperimentali,

l'infezione causata da KHV in carpe comuni, con lo scopo di osservare direttamente i principali segni clinici e contribuire allo studio della patogenesi della malattia, confrontando anche l'efficacia delle diverse tecniche diagnostiche utilizzate presso il laboratorio.

La comparsa di segni clinici evidenti in carpe di circa 15 grammi esposte all'infezione sperimentale, conferma la suscettibilità alla malattia anche di soggetti giovani se pur, probabilmente, in minor grado rispetto agli adulti, come suggerito in precedenza (Gilad *et al.*, 2003). L'infezione infatti ha prodotto una mortalità non molto elevata, pari al 26,6% nel gruppo A e al 16,6% nel gruppo B. La maggior mortalità rilevata nel gruppo dei soggetti infettati per immersione potrebbe indicare nella via transcutanea la modalità naturale di penetrazione del patogeno e di trasmissione della malattia.

Gli esami di laboratorio hanno confermato le difficoltà riportate da altri autori soprattutto per quanto riguarda l'isolamento su colture cellulari (Pokorova *et al.*, 2005). Anche nella nostra indagine infatti, è stato possibile osservare un'attiva replicazione virale in cellule con comparsa di effetto citopatico, esclusivamente nei campioni prelevati a 8 giorni post infezione, mentre tutti i restanti campioni pur se positivi alla PCR sono risultati negativi all'isolamento.

L'esame mediante microscopia elettronica ha consentito di evidenziare l'agente virale esclusivamente in campioni di branchie e pool d'organi prelevati in ottava e dodicesima giornata p.i., dal gruppo infettato tramite iniezione intramuscolare. Pertanto anche la microscopia elettronica, come del resto atteso, ha evidenziato una scarsa sensibilità diagnostica, anche se ad oggi resta la metodica più rapida per poter confermare, anche se solo dal punto di vista morfologico, un sospetto clinico di KHV.

L'esame istologico può essere considerato un valido strumento di supporto diagnostico in quanto le lesioni necrotiche riscontrabili in sede branchiale e in particolar modo la presenza di corpi inclusi intranucleari possono essere considerate caratteristiche dell'infezione da Herpesvirus.

Infine, le indagini eseguite tramite PCR hanno confermato l'elevata sensibilità di questa metodica nell'identificazione di KHV. Infatti la tecnica utilizzata (eminest) ha consentito di evidenziare la presenza del genoma virale in tutti i soggetti sintomatici, deceduti e agonizzanti, nonché nei tessuti di animali asintomatici fino al 30° giorno p.i. La PCR ha infatti evidenziato una positività nel 36,6% dei soggetti del gruppo A e nel 26,6% dei soggetti nel gruppo B. La maggiore positività alla PCR, riscontrata nel gruppo infettato tramite immersione, concorda con quanto già ipotizzato relativamente alla via di penetrazione del patogeno e suggerisce l'esistenza di un meccanismo di replicazione virale più efficace quando l'ospite viene esposto all'infezione seguendo una modalità naturale piuttosto che una via artificiale. Il riscontro del DNA virale in animali apparentemente sani, ripropone inoltre la problematica relativa allo status di portatore asintomatico (Gilad *et al.*, 2004).

I campioni di acqua prelevati a 15 giorni post infezione ed analizzati tramite PCR non hanno evidenziato la presenza di DNA virale. La limitata resistenza del virus nell'ambiente acquatico, è in accordo con quanto riportato e descritto da Kasai *et al.*, 2005.

In conclusione, si ritiene che la PCR, possa rappresentare un valido strumento per la diagnosi di KHV, soprattutto in considerazione della scarsa sensibilità delle colture cellulari attualmente disponibili. E' assolutamente necessario tuttavia, prevedere la standardizzazione e validazione del metodo, a livello internazionale, prima di estenderne l'utilizzo, soprattutto in previsione del recepimento della nuova direttiva europea direttiva 2006/88/CE del 24/10/2006 che inserisce il KHV nell'elenco delle patologie soggette a denuncia obbligatoria.

BIBLIOGRAFIA

- Anonimo (2003). *Proceeding of "EU Workshop on diagnostic techniques with special emphasis on carp diseases" Weymouth, UK, Giugno 2003.*
- Ariav R., Tinman S. & Bejerano I. (1999). First report of newly emerging viral diseases of *Cyprinus carpio* species in Israel. In: *Proceedings 9th International Conference EAAP, Rhodes, Greece, 19-24 September 1999.*
- Denham K. (2003). Koi herpesvirus in wild fish (letter). *Vet. Rec.*, 18: 507.
- Gilad O., Yun S., Andree K.B., Adkison M.A., Zlotkin A., Bercovier H., Eldar 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, 2: 101-108.
- 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: 2661-2668.
- Gilad O., Yun S., Zagmutt-Vergara F.J., Leutenegger C.M., Bercovier H. & Hedrick R.P. (2004). Concentration of koi herpesvirus (KHV) in tissue of experimentally infected *Cyprinus carpio koi* as assessed by real time TaqMan PCR. *Dis. Aquat. Org.*, 60: 179-189.
- Hedrick R.P. (1996). Movement of pathogens with the international trade of live fish: problems and solutions. *Rev. Sci. Tech.*, 15: 523-531.
- Hedrick R.P., Gilad O., Yun S., Spangerberg J.V., Marty G.D., Nordhausen R.W., Kebus M. J., & Eldar 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.
- Hoffman R.W., El-Matbouli M. & Soliman H. (2004). Detection and isolation of KHV in continental Europe. In: *Report of International Workshop on koi herpesvirus, 12-13 February 2004, London, 11 [www.defra.gov.uk/science/Publications/Default.asp].*
- Kasai H., Shimizu T., Muto Y. & Yoshimizu M. (2005) Survivability of koi herpesvirus (KHV) in environmental waters as well as physical and chemical inactivation. *Book of abstracts 12th International Conference E.A.F.P., 11-16 September 2005, Copenhagen, Denmark: P17.*
- Penman D.J., Gupta M.V. & Dey M.M. (2005). Carp genetic resources for aquaculture in Asia. *WorldFish Center Technical Report 65. The WorldFish Center, Penang, Malaysia: 152 pp.*
- 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.*, 17: 9544-9551.
- Pokorova D., Vesely T., Piackova V., Reschova S. & Hulova J. (2005). Current knowledge on koi herpesvirus (KHV): a review. *Vet. Med.-Czech*, 50, 5: 139-147.
- Schlotfeldt H-J. (2004). Severe losses of common carp in Germany due to Koi Herpesvirus (KHV). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 24, 5: 216-217.