

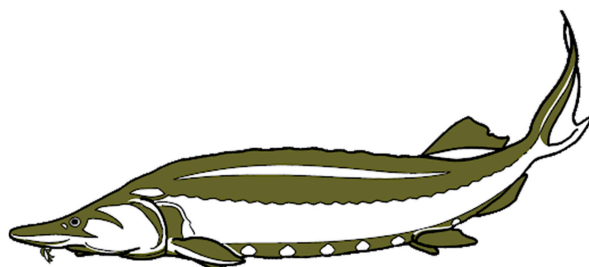


Metoda pro terénní diagnostiku edémové nemoci kaprů (CEVD) na principu LAMP

Funkční vzorek

Mgr. Alena Balážová, Ph.D.

prof. MVDr. Miroslava Palíková, Ph.D.



Metoda pro terénní diagnostiku edémové nemoci kaprů (CEVD) na principu LAMP

Funkční vzorek

Mgr. Alena Balážová, Ph.D.

prof. MVDr. Miroslava Palíková, Ph.D.

**Funkční vzorek je realizačním výstupem výzkumného projektu TAČR:
Národní centrum biotechnologií ve veterinární medicíně (NaCeBiVet)
TN02000017**

Editor:

prof. MVDr. Miroslava Palíková, Ph.D.

Autoři:

Mgr. Alena Balážová, Ph.D.

prof. MVDr. Miroslava Palíková, Ph.D.

© Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

ISBN 978-80-7701-058-0

OBSAH

1	Úvod	4
2	Cíl funkčního vzorku	6
3	Vlastní popis funkčního vzorku	6
	a) Odběr vzorku tkání a eDNA.....	6
	b) Terénní izolace DNA a eDNA	7
	c) Detekce CEV	7
	d) Vyhodnocení výsledku	8
	e) Testování metody	8
4	Srovnání novosti postupů	10
5	Uplatnění funkčního vzorku	10
6	Ekonomické aspekty	10
7	Technické parametry výsledku	11
8	Seznam použité literatury	11
9	Publikace předcházející funkční vzorek	11

1 Úvod

Výskyt virových onemocnění se časem mění, zatímco v minulém století se celkem často vyskytovala jarní virémie kaprů (SVC), v současnosti se nejvíce setkáváme s koi herpesvirózou (KHVD) a s edémovou nemocí kaprů (CEVD), s onemocněními, která jsou si klinickými příznaky i patologickými změnami velmi podobná. Navíc mohou být doprovázena vysokou mortalitou obsádky a potažmo vyššími ekonomickými ztrátami v chovech kaprů a koi kaprů. KHVD stále zůstává nákazou povinnou hlášením, a i když v souvislosti se změnou evropské legislativy se již nepřistupuje k radikálním opatřením, je potřeba rozlišit, o které onemocnění se jedná. I když jde o virová onemocnění, pro které není k dispozici účinná terapie, v praxi je velice důležité provést co nejrychlejší diagnostiku, aby chovatelé věděli, co je příčinou zdravotních problémů ryb a mohli podle toho s rybami nakládat, zamezit dalšímu šíření choroby a snížit tak ekonomické ztráty v chovu.

Edémová nemoc kaprů (CEVD), onemocnění známé rovněž jako spavá nemoc koi kaprů (KSD), se v současnosti vyskytuje prakticky ve všech zemích, kde jsou chováni kapři nebo jejich barevné varianty koi. První zmínky o edémové nemoci kaprů pocházejí ze 70. let 20. století z Japonska. V České republice byl první hromadný úhyn kaprů obecných, u nichž byla zpětně molekulárně detekována přítomnost CEV, zaznamenán v roce 2013. Od té doby bývá na našem území CEV detekován v jarních i podzimních měsících v několika případech ročně.

Původcem onemocnění je virus zařazený do čeledi Poxviridae.

Virus byl prozatím detekován pouze ve tkáních kapra obecného (*Cyprinus carpio*) a jeho barevné variety koi, u nichž, s ohledem na klinické příznaky, je onemocnění označováno jako spavá nemoc koi kaprů (KSD).

Zatímco u kaprů dochází k propuknutí infekce často při teplotě vody mezi 6–10 °C, u koi kaprů je onemocnění diagnostikováno především při teplotě vody mezi 15–25 °C. Onemocnění propukne často v souvislosti se stresem z přepravy, případně spojeným s rozdílnou teplotou vody a bývá doprovázeno velmi charakteristickými změnami chování.

Ryby jsou apatické, ztrácí únikový reflex (obr. 1) a často se vyskytují u vodní hladiny, kde lapají po vzduchu. U koi kaprů ryby často leží na dně jezírka. Typická je vysoká mortalita dosahující až 100 %. Virus se množí zejména v žábrech, kde se většinou vyskytují i hlavní patologické změny. Změny na žábřácích mohou být velmi pestré, od zvýšeného zahlnění, zduření až po přítomnost rozsáhlých nekrotických lézí (obr. 2). Kromě postižení žaber může být patrný enoftalmus, lokální zvýšená tvorba kožního hlenu, přítomnost kožních lézí a celkový edém. Onemocnění se často vyskytuje



Obr. 1.: Klinické příznaky typické pro CEVD u kaprů obecných: shromažďování u břehů, ztráta únikového reflexu.



Obr. 2.: Při onemocnění vyvolaném Carp Edema Virem (CEV) jsou nejvíce postiženy žábry, na nichž bývají přítomny nekrotické léze v různém rozsahu, často sekundárně zaplísňené.

jako multifaktoriální spolu s přidruženými virovými, bakteriálními či parazitárními infekcemi. V několika případech došlo ke snížení ztrát po terapeutických zásazích zaměřených na přítomné koinfekce. Ryby s progresivní patologií žaber ztrácejí schopnost udržovat stálé vnitřní prostředí. To má za následek těžkou metabolickou poruchu v důsledku zhoršené respirační a vylučovací funkce žaber. V závislosti na poruše iontové rovnováhy se zdá, že přidání NaCl (0,5 %) do vody, (metoda, kterou již desítky let používají japonští chovatelé koi kaprů), pomůže nemocným rybám zlepšit osmotické podmínky vnitřního prostředí.

Vzhledem k tomu, že se dosud nedaří virus izolovat na běžně používaných tkáňových kulturách, diagnostika je založena na detekci virové DNA pomocí molekulárních metod, konvenční, nested nebo real-time PCR z žaberní tkáně.

V rámci prevence CEV by měly být uplatňovány podobné přístupy jako u koi herpesvirózy (KHVD), to znamená nákup ryb z důvěryhodných zdrojů, karanténa nově přivezených ryb, dezinfekce nádrží a rybolovného nářadí, nepřehušťování obsádek a udržování ryb v dobré kondici. Výsledky výzkumných studií rovněž potvrzují, že plemena rezistentnější vůči KHV budou vykazovat vyšší odolnost i vůči CEV. Chovatelé koi kaprů v Japonsku jako prevenci propuknutí onemocnění CEV v důsledku stresové zátěže (transport, zhoršená kvalita vody) používají dlouhodobou koupel ryb v 0,5% roztoku kuchyňské soli.

2 Cíl funkčního vzorku

Pro diagnostiku onemocnění je potřeba včasná detekce původce. K této detekci lze využít i rychlých diagnostických molekulárních metod přímo v terénu. Tyto metody nejsou v současné době v ČR využívány pro diagnostiku onemocnění v chovech ryb. Cílem funkčního vzorku je optimalizace primerů pro detekci viru způsobujícího edémovou nemoc kaprů (CEVD) metodou loop-mediated isothermal amplification (LAMP) včetně provedení testů specifity a citlivosti postupu. Dílčím cílem je detekce virové DNA nejenom rybách, ale i v prostředí pomocí environmentální DNA (eDNA), což představuje neinvazivní metodu detekce. Konečným cílem je vytvoření protokolu celkového postupu od odběru vzorku, izolace DNA, analýzy až do vyhodnocení výsledku. Součástí funkčního vzorku je ověření metody s terénními vzorky.

3 Vlastní popis funkčního vzorku

a) Odběr vzorku tkání a eDNA

K přípravě vzorku stačí velmi malé množství tkáně, která může být odebrána i z živé ryby a nijak zásadně ji nepoškodí. Sterilními nůžkami odstříháme cca 1 cm dlouhý kousek jednoho žaberního lístku a přemístíme do zkumavky (objem odebrané tkáně je okolo 0.2 cm³). Větší množství tkáně není žádoucí, protože komplikuje následnou izolaci DNA.

Environmentální DNA je detekována z filtrů, přes které manuálně pomocí stříkačky protlačíme co největší množství vody, alespoň 350–400 ml. Konkrétně se jedná o mikrobiologické filtry SVHVL10RC s velikostí pórů 0.45 µm s PVDF membránou a Luer vstupem/výstupem (MilliporeSigma).

Membrána mikrobiologického filtru se rychle zanáší, proto u kalné či jinak částicemi znečištěné vody nejprve zbavíme vodu nečistot přelitím přes filtrační papír (grade 4), nebo jemné sítko. Membránu posléze vyndáme z filtru (je potřeba jej „rozlousknout“ kleštěmi) a celou použijeme k izolaci DNA.

b) Terénní izolace DNA a eDNA

Pokud izolujeme DNA v laboratoři, lze standardně využít izolaci pomocí komerčního kitu. Tato metoda je ale v terénních podmínkách nepoužitelná pro svou náročnost na čas a vybavení. V terénu se k izolaci obvykle používá činidlo PrepMan™ Ultra (ThermoFisher Scientific, USA), kdy odebraný kousek tkáně zalijeme 50 µl chemikálie a vaříme 10 minut. Takto vyizolované vzorky rybí tkáně ovšem často obsahují inhibitory, které zpomalují nebo zastavují amplifikaci DNA. Tuto inhibici nelze omezit přidáním bovinního sérového albuminu. Proto je nutné vzorky vyizolované v PrepMan ještě před vyšetřením naředit, ideálně 100x, aby se inhibitory rozředily.

Abychom se v terénu obešli bez ředění, lze rybí tkáň pouze rozvařit po dobu 10 minut v 500 µl destilované vody. Takto získaný vzorek již není třeba ředit.

Izolace z filtrů probíhá obdobně, tedy buď vaření (10 minut) v PrepMan nebo v 500 µl destilované vody.

c) Detekce CEV

Metoda LAMP pracuje se třemi páry primerů. Použité primery (Cano et al. 2021) cílí na úsek *p4A* genu o délce 224 bp, jejich sekvence a koncentrace v reakci udává tabulka č. 1. Pro přípravu směsi primerů používáme všechny primery v základní koncentraci 100 µM.

Abychom získali výsledné koncentrace uvedené v tabulce 1, musíme je ředit dle tohoto postupu: Pro získání 100 µl pracovního roztoku směsi primerů,

Tab. 1: *Sekvence a koncentrace použitých primerů.*

název primeru	sekvence	koncentrace v reakci
F3	CCAGATTGGGTTGAAACATG	0.2 µM
B3	GCAAAGTACTACCTCATCAA	0.2 µM
FIP	CTTGCTCTAGTCTAGGATTGTAAGTCTTGAGGAAT	0.8 µM
BIP	GTCTTGTCAAAGACAGACATCTGTTGACACAATCCAGAACAAG	0.8 µM
Loop-F	ATTGCGGAATTCTAGATCAG	0.4 µM
Loop-B	GGATTCTTTCCAGAACATAAC	0.4 µM

kteřou budeme dále používat, je nutné smíchat PCR-grade vodu v objemu 88.8 µl s 0.8 µl primeru F3, 0.8 µl primeru B3, 1.6 µl primeru Loop-F, 1.6 µl primeru Loop-R, 3.2 µl primeru FIP a 3.2 µl primeru BIP.

Reakční směs pro 1 jamku sestává z 10 µl ISO-004 mastermixu (OptiGene, Velká Británie), 5 µl směsi primerů a 5 µl izolovaného vzorku. K samotné detekci je využíván přístroj Genie II (OptiGene, Velká Británie), který je nastaven na 65 °C po dobu 40 minut. Následuje analýza teploty nasedání v rozmezí 70 a 98 °C.

Vzorky je vhodné testovat vždy v duplikátech, tedy ve dvou jamkách, aby se zabránilo falešně negativním výsledkům. Každá detekce musí obsahovat jak pozitivní, tak negativní kontrolu, abychom měli kontrolu správnosti výsledku. Jako pozitivní kontrolu lze využít sekvenčně potvrzený izolát CEV nebo uměle vyrobený fragment DNA s patřičnou sekvencí nukleotidů (např. gBlock, IDT). Jako negativní kontrola se používá PCR-grade voda.

d) Vyhodnocení výsledku

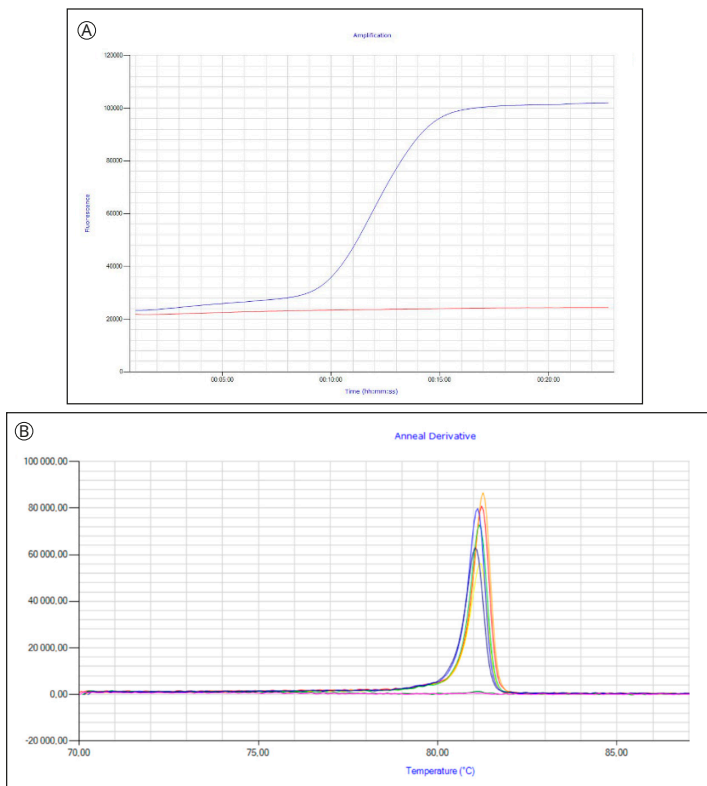
Používaný přístroj sám v reálném čase odečítá fluorescenci ve vzorku a tím přítomnost cílového úseku DNA. Za pozitivní lze považovat vzorek, u něhož dojde k amplifikaci v průběhu 25 minut a fluorescence vykazuje typickou křivku esovitého tvaru (viz obr. 3A). Během této doby lze zaznamenat 10^3 virálních kopií ve vzorku, což je považováno za limit této metody (Cano et al. 2021).

Po skončení samotné analýzy ještě probíhá tzv. analýza teploty nasedání, která zjišťuje, při jaké teplotě se na sebe opětovně váží oddělená vlákna DNA. Tato teplota musí u zkoumaného vzorku odpovídat teplotě pozitivní kontroly (okolo 81.5 °C), s možnou odchylkou do 1 °C, Grafické vyjádření musí mít jeden zřetelný vrchol bez nežádoucího šumu okolo (viz obr. 3B). V případě vzorků, kdy si nejsme jistí správností výsledku, je právě analýza teploty nasedání rozhodujícím faktorem, který určí, zda může být vzorek považován za pozitivní.

V případě, že jeden ze vzorků v duplikátu vyjde pozitivní a druhý negativní, je potřeba tento vzorek otestovat ještě jednou. Pokud nefungovala pozitivní kontrola nebo naopak vyšla pozitivně i kontrola negativní, je potřeba zopakovat celý postup analýzy.

e) Testování metody

Tato metoda byla úspěšně testována v terénních podmínkách při outbrea-ku CEVD v chovném rybníku v roce 2024 a byla publikována (Palíková et al. 2025). Ryby, které vykazovaly pozitivní výsledek, byly následně otestovány

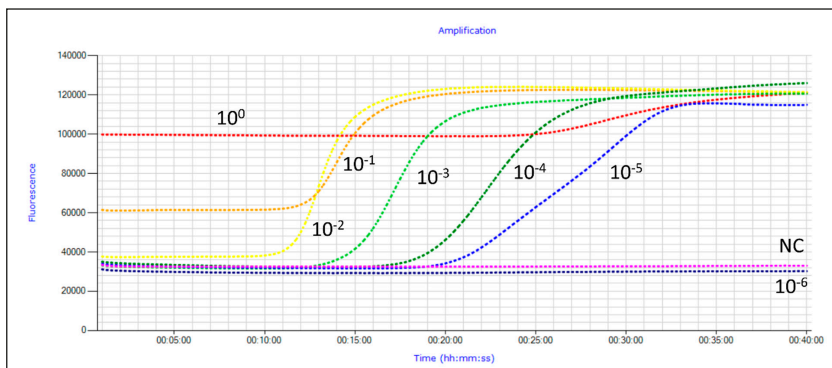


Obr. 3.: A) správný esovitý tvar křivky fluorescence (modře) a žádná amplifikace u negativní kontroly (červeně). B) správně proběhla analýza teploty nasedání – vrcholy pozitivní kontroly a vzorků jsou v rozmezí 1 °C a jasně ohraničené.

také real-time PCR, která se běžně k detekci využívá (Matras et al. 2017), a výsledky obou metod si vzájemně odpovídaly. Pozitivní výsledky byly získány také z čerstvě uhynulého kadáveru, zatímco několik dní starý kadáver již nebylo možné ani real-time PCR ani touto metodou otestovat, pravděpodobně kvůli rozkladným procesům. To jasně ukazuje limity této molekulární metody, kterou lze využít pouze u živých nebo čerstvě uhynulých ryb.

Isoláty z filtrů (jak pomocí PrepMan, tak vody) daly také pozitivní výsledky a zdá se tedy, že při velké virové zátěži na lokalitě je možné použít i detekci pomocí eDNA, bez nutnosti invazivního odběru tkáně.

Pro ověření citlivosti metody jsme použili pozitivní vzorek izolovaný pomocí PrepMan a vytvořili ředici řadu 10^0 – 10^{-6} . Spolehlivý záchyt viru jsme pozorovali až do ředění 10^{-5} (viz obr. 4).



Obř. 4.: Výřsledky ověření citlivosti metody pomocí ředící řady pozitivního vzorku izolovaného chemikálií PrepMan. Je zde vidět záchyt až po ředění 10^{-5} , a také potlačení reakce způsobené příliš koncentrovanými inhibitory v neředěném vzorku (červená linie) a pouze 10^{-1} ředěném vzorku (oranřžová linie). Při doporučeném ředění 10^{-2} tento problém odpadá.

4 Srovnání novosti postupů

Metoda rychlé molekularní detekce virů obecně není v praxi v ČR dosud u ryb využívána, proto zavedení této metody představuje nový diagnostický postup umožňující rychlou detekci viru způsobujícího CEVD přímo v terénu.

5 Uplatnění funkčního vzorku

Popsaný funkční vzorek přinese potenciál uplatnění zejména v chovech kaprového hospodářství vyžadujících rychlou diagnostiku onemocnění pro provedení včasných opatření vedoucích k rychlému potvrzení diagnózy a ke snížení ekonomických ztrát a bude primárně využíván v rámci nabízených služeb pracoviště Zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství na MENDELU.

6 Ekonomické aspekty

Funkční vzorek má přímý ekonomický přínos pro pracoviště na Ústavu zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství, protože mohou ve svých službách nabídnout identifikaci původce CEVD. Ekonomický přínos pro pracoviště bude představovat zisk z provedených vyšetření. Výřsledky vyšetření mohou pak pomoci při zavádění preventivních opatření, v zabránění šíření původce v chovu a v časném použití podpurné léčby proti případným koinfekcím, což v konečném důsledku chovatelům sníží vzniklé ekonomické ztráty. Chovatel tak může ušetřit desítky až sta tisíc korun ročně

(v závislosti na typu postižené obsádky). Náklady na zavedení metodiky do praxe se týkají pořízení spotřebního materiálu a chemikálií na provedení LAMP. Jiné náklady spojené s nákupem drobného hmotného majetku nutného na provedení metody (pipety, apod.) nejsou zahrnuty, neboť jsou v současnosti standardním vybavením laboratoře. Náklady na materiál na vyšetření jednoho vzorku podle uvedené metodiky jsou 300 Kč. V případě využití na jiných pracovištích je nutné ještě započíst pořizovací cenu přenosného detekčního přístroje.

7 Technické parametry výsledku

Výsledný funkční vzorek je protokol k diagnostice CEV za využití isothermální amplifikace DNA v přenosném přístroji od odběru vzorku, izolace DNA, samotné analýzy a vyhodnocení výsledku. Postup byl ověřen s terénními vzorky. Tento postup nebyl dosud komerčně využit.

Kontaktní osoba: prof. MVDr. Miroslava Palíková, Ph.D., Ústav zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství, Mendelova univerzita v Brně, e-mail: miroslava.palikova@mendelu.cz

8 Seznam použité literatury

- I. Cano, J. Worswick, B. Mulhearn, D. Stone, G. Wood, J. Savage, R. Paley. A seasonal study of koi herpesvirus and koi sleepy disease outbreaks in the United Kingdom in 2018 using a pond-side test. *Animals*, 2021: 11:459, doi: 10.3390/ani11020459.
- M. Matras, E. Borzym, D. Stone, K. Way, M. Stachnik, J. Maj-Paluch, et al. Carp edema virus in polish aquaculture – evidence of significant sequence divergence and a new lineage in common carp *Cyprinus carpio* (L.). *J Fish, DiS.*, 2017: 40:319–25, doi: 10.1111/jfd.12518.

9 Publikace předcházející funkční vzorek

- A. Balážová, M. Palíková. Lamp assay designed for screening eDNA and fish tissue samples for CEVD. The 1st meeting of the central and eastern European EAFF branches. 4th to 6th December 2024 Křtiny, Czech Republic, p. 28. ISBN 978-80-7701-005-4.
- M. Palikova, A. Balazova, L. Pojezdal, I. Papezikova, I. Mikulíková, I. Toulouva, J. Motlova, J. Pikula. Outbreak of Carp Edema Virus Infection in Overwintering Fish. *Frontiers in Veterinary Science*, 2025: 1532861.

Název: Metoda pro terénní diagnostiku edémové nemoci kaprů (CEVD)
na principu LAMP – funkční vzorek

Autoři: Mgr. Alena Balážová, Ph.D.
prof. MVDr. Miroslava Palíková, Ph.D.

Editor: prof. MVDr. Miroslava Palíková, Ph.D.

Vydala: Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

Tisk: Vydavatelství Mendelovy univerzity v Brně,
Zemědělská 1, 613 00 Brno

Vydání: první, 2025

Náklad: 80 ks

Počet stran: 12

ISBN 978-80-7701-058-0

