

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра вірусології

Завідувач кафедри проф. Ірина БУДЗАНІВСЬКА

Протокол №_____ засідання кафедри

Від “_____” _____ 2024 р.

**МОНІТОРИНГ CARP EDEMA VIRUS В РИБОГОСПОДАРСЬКИХ
ПІДПРИЄМСТВАХ ЦЕНТРАЛЬНОЇ ЧАСТИНИ УКРАЇНИ**

Кваліфікаційна робота магістра
денної форми навчання
за спеціальністю Біологія
Морозюк Еліни Миколаївни

Науковий керівник від кафедри
к.б.н., доц. Коротєєва Г. В.

Робота виконана в лабораторії біотехнологій в рибництві Інституту рибного господарства НААН України,
під керівництвом завідуючого лабораторії к.б.н. Рудя Ю.П.

Оцінка захисту роботи

Київ – 2024 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- CEV – Carp Edema Virus (вірус віспи коропа);
- KSD – Koi Sleepy Disease (сонна хвороба коі);
- KHV – Koi herpesvirus (герпесвірусна інфекція коі);
- VHSV - Viral haemorrhagic septicaemia virus (вірус геморагічної септицемії);
- IHNV - Infectious hematopoietic necrosis virus (вірус інфекційного гематопоетичного некрозу);
- SVCV - Spring viraemia of carp virus (вірус весняної віремії коропа);
- ISAV - Infectious salmon anaemia virus (вірус інфекційної анемії лосося);
- FHM - Fathead minnow cell line (епітеліальні клітини товстолобика);
- CCKF - Cyprinus carpio koi fin cell line (клітини плавника коропа звичайного);
- CCB - Common carp brain cell line (клітини мозку коропа звичайного);
- HBF - Horabagrus brachysoma fin cell line (клітини плавника Horabagrus brachysoma);
- GFF – Goldfish fin cell line (клітини плавника золотої рибки);
- AFF - Angelfish fin cell line (клітини плавника риби-ангела);
- НАССР - Hazard Analysis and Critical Control Points;
- RPA - Recombinase polymerase amplification (рекомбіназна полімеразна ампліфікація);
- TBE - Tris-Borate-EDTA buffer;
- PBS - Phosphate-buffered saline (фосфатно-буферний розчин);
- M - маркер ДНК;
- Вр - base pair (пари основ).

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. Carp Edema Virus	6
1.1. Загальна характеристика Carp Edema Virus.....	6
1.2. Географічне поширення Carp Edema Virus.....	8
1.3. Рибне господарство України.....	11
1.4. Клінічна картина обумовлена Carp Edema Virus.....	12
1.5. Протівірусний імунітет.....	14
1.6. Вплив температури та зміни клімату на перебіг CEV-інфекції.....	14
1.7. Вплив зміни клімату та температури води на імунну систему риби та розвиток інфекцій.....	17
1.8. Міграція CEV між країнами внаслідок міжнародної торгівлі рибою.....	23
1.9. Культивування CEV в культурі клітин.....	24
1.10. CEV та можливі ко-інфекції.....	24
1.11. Шляхи передачі CEV.....	25
1.12. Профілактика та лікування хвороб, спричинених CEV.....	26
1.13. Молекулярна діагностика та боротьба з Carp Edema Virus.....	27
РОЗДІЛ 2. Матеріали і методи досліджень	31
2.1. Матеріали	31
2.1.1. Досліджуваний матеріал.....	31
2.1.2. Екстракція ДНК.....	31
2.1.3. Полімеразна ланцюгова реакція.....	31
2.1.4. Гель-електрофорез.....	32
2.2. Методи.....	33
2.2.1. Отримання зразків.....	33
2.2.2. Екстракція ДНК.....	35
2.2.3. Полімеразна ланцюгова реакція.....	35
2.2.4. Гель-електрофорез.....	38
РОЗДІЛ 3. Результати та обговорення	41

3.1. Результати моніторингу СЕУ на коропових господарствах центральної частини України.....	41
3.2. Обговорення результатів.....	44
ВИСНОВКИ.....	50
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	51

ВСТУП

На сьогодні аквакультура є однією з перспективних галузей тваринництва в Україні, яка доволі швидко розвивається. Інтенсифікація цієї галузі в першу чергу асоційована зі зменшенням природних запасів риби та опануванням внутрішніх водних ресурсів. Проте розвиток галузі аквакультури прямо пропорційний збільшенню імпорту заплідненої ікри та риби, що ставить під загрозу саму галузь, адже з імпоротною рибою в країну потрапляють також і нові, емерджентні віруси, які уражують риб та завдають значних економічних збитків.

Віруси риб здатні масово заражати риб в аквакультурі, що може призвести до високих втрат в популяціях та значних економічних збитків. Саме економічні втрати від вірусних захворювань можуть бути суттєвими для галузі аквакультури, адже вони можуть відчутно позначатися на цінах на рибу та вплинути на здатність галузі аквакультури задовольняти попит на рибу.

Для запобігання поширенню вірусів у аквакультурі важливо дотримуватися строгих стандартів гігієни та використовувати належні методи контролю та профілактики.

Слід підкреслити, що коропове рибництво є важливою складовою аграрного сектору центральних областей України. За даними статистики, більше 70% риби, що вирощується в цих регіонах – це короп. Відтак, вірусні захворювання коропа, зокрема спричинені CEV, можуть призвести до значних економічних втрат. Отже, розуміння проблеми та розробка стратегій боротьби з цим вірусом є надзвичайно важливими завданнями для рибного господарства.

Саме тому метою цієї роботи був моніторинг Carp Edema Virus (CEV) в рибогосподарських підприємствах центральної частини України. Для досягнення цієї мети були використані методи діагностики на основі полімеразної ланцюгової реакції та аналіз даних.

РОЗДІЛ 1

CARP EDEMA VIRUS

1.1. Загальна характеристика Carp Edema Virus

Carp edema virus (CEV) належить до родини *Poxviridae* та спричиняє некроз зябер у коропа. Також CEV є збудником сонної хвороби кої (KSD), що в свою чергу призводить до високої смертності коропа звичайного (*Cyprinus carpio*) та декоративного різновиду коропа кої.

Дослідження методом електронної мікроскопії демонструють, що незрілі віріони CEV мають діаметр до 450 нм, а зрілі віріони мають овальну форму та розміри приблизно 400 x 413 нм. Характерною особливістю зрілих віріонів є наявність поверхневих глобул (капсомерів) і щільного ядра у формі гантелі, оточеного мембраною. CEV має дволанцюговий ДНК геном, віріони сферичної, або овальної форми (Рис. 1.1.). [1]

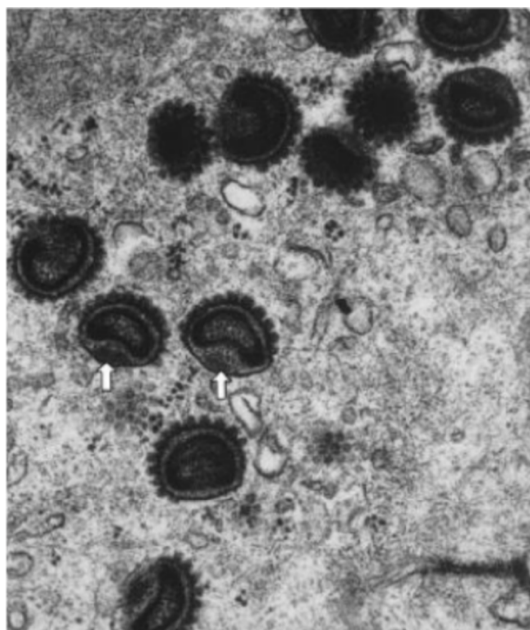


Рис. 1.1. Зображення віріонів Carp Edema Virus зроблене за допомогою електронного мікроскопа [4].

CEV був виявлений лише у звичайного коропа та у його декоративних різновидів, таких як короп кої та короп примара. Жоден інший вид риби не був уражений цим вірусом.

Кількість відомостей про геном CEV наразі є дуже обмеженою, так як вірус є відносно новим та не надто поширеним. На сьогодні описані лише деякі частини геному CEV, розмір його геному залишається невивченим [4]. Більшість філогенетичних досліджень вірусу спираються на послідовність 357 bp вірусного гена р4а, який кодує головний коровий білок. Аналіз цього фрагменту гена розділив ізоляти CEV на три філогенетичні лінії (табл. 1.1.), їх також називають геногрупами [4].

Таблиця 1.1.

Відомості про геногрупи CEV [8]

CEV genogroup	Host	Occurrence
Genogroup I	Common carp	mostly Europe
Genogroup IIa	Koi carp	Asia and Europe
Genogroup IIb	Koi and common carp	mostly Europe

I геногрупа складається з вірусних зразків, отриманих від звичайного коропа у країнах, таких як Великобританія, Німеччина, Польща та Угорщина. Геногрупа I поки що виявляється переважно в європейській аквакультурі. Геногрупа IIa містить виділений вірус від коропа кої з клінічними ознаками KSD, включаючи азійські та європейські ізоляти вірусу. Епідеміологічне розслідування більшості спалахів у Європі вказує на походження риби з Азії, переважно з Японії [4]. Геногрупа IIb включає вірусні ізоляти з кої та звичайного коропа і класифікується за допомогою філогенетичного аналізу між вищезгаданими геногрупами [4].

1.2. Географічне поширення Carp Edema Virus

Вірус набряку коропа (CEV) був першим поксвірусом, який, як відомо, інфікував плавникових риб, зокрема декоративні різновиди звичайного коропа (*Cyprinus carpio*). Про спалахи CEV вперше повідомляється в Японії в 1974 р. [2] [3]. Десятиліттями спалахи CEV реєструвались лише в Японії, переважно навесні та восени при температурі води від 15 °C до 25 °C, переважно тоді, коли рибу переміщали з глиняних ставків до цементованих, але згодом, симптоматика, характерна для CEV почала реєструватися в популяціях кої і у європейських країнах. У риб спостерігалася млявість - характерна клінічна ознака цієї інфекції і тому хворобу назвали «сонною хворобою кої» (KSD). Інші типові патологічні симптоми включали опухлі зябра і ураження шкіри, часто навколо рота та біля основи плавників. Показники смертності сягали 80%, при виключенні наявності інших паразитів, грибів або патогенних бактерій.[4]

Перший спалах в європейських країнах був зареєстрований в Англії в 2013 році, коли з'явилось перше повідомлення про діагностований CEV, потім в Франції та Нідерландах [5]. У наступні роки спостерігалися часті спалахи в Італії [6], Чехії [7], навесні 2014 р. було діагностовано клінічний спалах CEV у кількох популяціях коропа в Німеччині. У більшості випадків були наявні такі клінічні ознаки: млявість, виразка на роті або на бічній стороні тіла, втрата апетиту та запалення заднього проходу (Рис. 1.2. А), набряк або некроз зябер (рис. 1.2. Б), що вражає до однієї третини зябрової тканини.

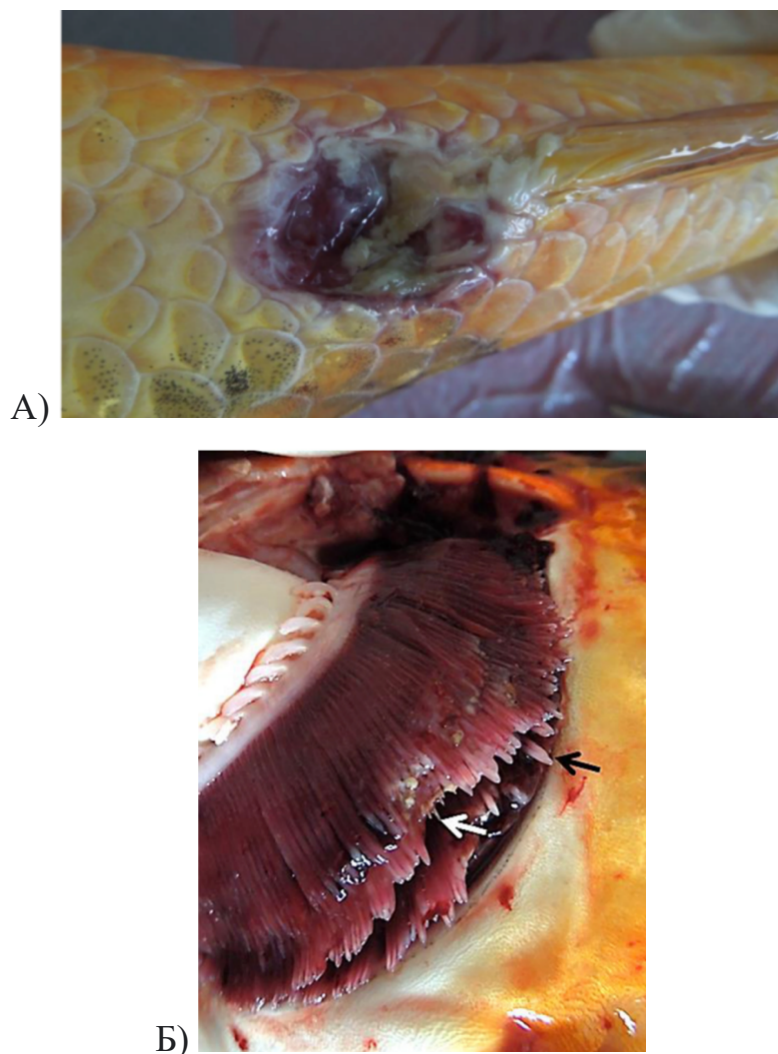


Рис. 1.2. Зображення запалення заднього проходу коропа кої, ураженого SEV (А) та некроз зябер коропа, ураженого SEV (Б).

У всіх ставках температура води коливалася від 17 °С до 22 °С. Інші види риб, наприклад золота рибка і осетрові, що мешкали в тих самих ставках, не були інфіковані. [4]

В Україні SEV був вперше зареєстрований 2013 року на рибних господарствах Донеччини. Станом на 2021 рік SEV реєструвався в Харківській, Донецькій, Київській, Львівській, Сумській, Черкаській, Херсонській, Закарпатській та Хмельницькій областях (Рис. 1.4.).

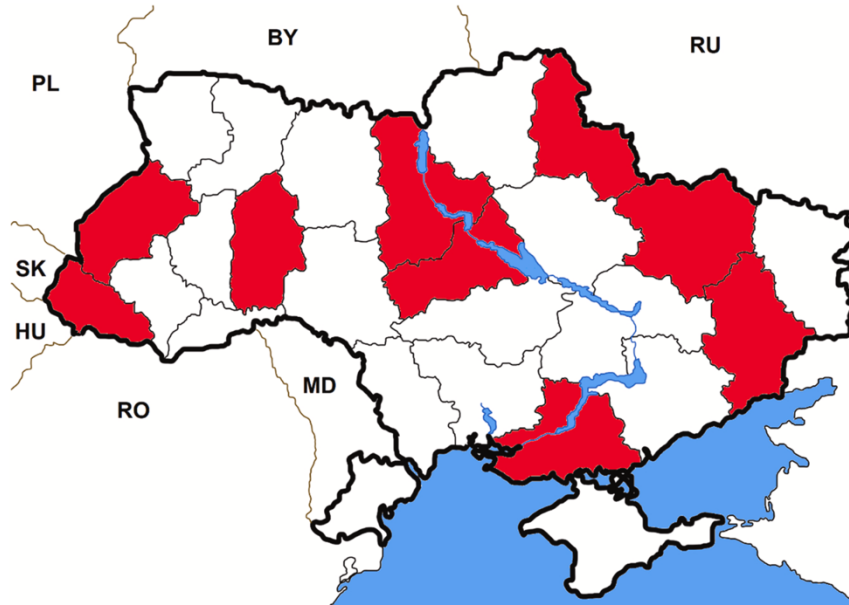


Рис. 1.4. Карта українських регіонів, де був зареєстрований СЕВ. (червоним позначені регіони, де реєструвався СЕВ) [8]

Українські зразки були дуже схожі на зразки з інших європейських країн, таких як Німеччина, Польща чи Угорщина. Слід зазначити, що генетичні відмінності в СЕВ, які поділяють ізоляти на дві геногрупи, також знаходять певне відображення у відмінностях вірулентності щодо різних видів коропа. Звичайний короп азіатського штаму, що походить з річки Амур, видається більш стійким до інфекції обома геногрупами [8]. Вид *Cyprinus carpio* природно поширений у водах Східної Європи та Західної Азії в річках, що стікають до Чорного, Каспійського та Аральського морів [9]. Короп зі Східної та Південно-Східної Азії, який раніше також ідентифікувався як *C. carpio*, нещодавно був ідентифікований як генетично відмінний від європейської популяції [10] [11] і визнаний як *C. rubrofuscus* [9]. Генетичні аналізи підтверджують появу звичайного коропа у Східній Азії [12], звідки він поширився до Євразії [11]. Однак західні популяції в річках Дунай і Дон були відокремлені від східних популяцій в басейні Амура і Китаї під час численних плейстоценових зледенінь [13]. Наразі СЕВ геногрупи I в основному виявлено

в європейських популяціях коропа, включаючи Україну, але також у коропа з іранських вод, пов'язаних з Каспійським морем [14]. Розподіл SEV геногрупи I, таким чином, збігається з розповсюдженням європейського звичайного коропа, що свідчить про спільну еволюцію вірусу цієї геногрупи з цим різновидом коропа.

Дослідження географічних кордонів між різними геногрупами вірусів може допомогти пояснити еволюцію вірусу та його появу [15]. Примітно, що навіть на найбільш східному кордоні в Ірані ізоляти геногрупи I мали значні генетичні відмінності залежно від місця виявлення вірусу. У провінції Хузестан у Перській затоці ізоляти значно відрізнялися від ізолятів у провінціях Гілан і Мазандаран поблизу Каспійського моря [14]. Віруси в цих провінціях були більш схожі на європейські ізоляти. Результати, які пов'язують ці ізоляти з іншими із таких країн-виробників коропа, як Німеччина, Угорщина чи Польща, показують, що внутрішньоконтинентальна торгівля сприяє поширенню вірусу з геногрупи I.

1.3. Рибне господарство України

Сучасна аквакультура демонструє високі темпи розвитку та забезпечує постачання приблизно 40% рибних продуктів у світі. У контексті збільшення населення світу, аквакультура є однією з найбільш перспективних напрямів харчової промисловості, яка може задовольнити потреби у корисному тваринному білку без ушкодження природних рибних запасів [29].

Однак, наслідки виникнення захворювань у більшості видів риб можуть коштувати рибному сектору до 20% від вартості продукції. Хвороби риб відіграють одну із важливих ролей, як обмежувальний фактор у виробництві риби. Найкращий спосіб боротися з хворобами – запобігати інфекційним спалахам. Крім того, необхідно проводити правильну діагностику та економічно прийнятні методи профілактики та лікування.

Багато небезпечних інфекційних захворювань риб, що підлягають ретельному моніторингу, зазначені у законодавстві ЄС [30]. Не існує ефективного лікування або вакцин для цих захворювань, і їх контроль є обов'язковим для запобігання спалахів інфекцій. Через тісний контакт з навколишнім середовищем, взаємозалежність між природньою та вирощеною рибою спричиняє складну епізоотичну ситуацію в рибництві. Ідентифікація та характеристика інфекційних захворювань повинна бути забезпечена завдяки збільшенню використання сучасних технологічних досягнень та досвіду в галузі рибництва й ветеринарії. Найбільш дієвим методом боротьби з поширенням захворювань риб є запобігання виникненню епізоотій через процедури спостереження та запровадження цільових профілактичних заходів [31].

Основною метою сучасних досліджень є визначення шляхів спостереження за інфекційними захворюваннями риб, використовуючи молекулярно-біологічні методи. Аналіз можливості попередження та поширення захворювань риб відповідно до стратегії ЄС щодо здоров'я тварин дозволяє вирішити цю проблему шляхом розробки та тестування діагностичних тест-систем й таким чином вивчення екології патогенів з різних територій [30].

1.4. Клінічна картина обумовлена Carp Edema Virus

Короп, інфікований CEV, має характерні симптоми: це млявість, або «сонна» поведінка, при якій уражена риба пересувається близько до поверхні води або стінок водойми та важка патологія зябер, що супроводжується розворотом зябрових ниток, гіперплазією, запаленням, також часто спостерігається надмірне утворення слизу на шкірі та зябрах.

Важливо зазначити, що млявість і пошкодження зябер можуть бути викликані широким спектром інфекцій і факторами навколишнього середовища. Таким чином, масова загибель риби потребує детальних

лабораторних досліджень, обстеження та комплексної оцінки умов аквакультури та якості води [2].

Отже, симптоми, які можна спостерігати у інфікованого CEV коропа, включають:

1. Зміни в зябрах - одним з найпомітніших симптомів є ураження зябер. Вони можуть набувати блідого або темно-червоного кольору, часто вкриті слизом. Зябра можуть бути знебарвленими та некротичними.
2. Млявість та апатія - заражені риби стають млявими, малорухливими та апатичними. Вони часто втрачають інтерес до корму.
3. Апноє - риби часто плавають біля поверхні води або близько до аераторів, демонструючи затруднене дихання. Це пов'язано з ураженням зябер та їхньою нездатністю ефективно здійснювати газообмін.
4. набряки тіла - відмічається загальний набряк тіла, особливо в області голови та зябрових кришок.
5. Зміни в поведінці - риби можуть демонструвати атипову поведінку, таку як плавання на боці або крутіння на одному місці.
6. Ураження шкіри та плавців - можливі ушкодження шкіри та плавців, включаючи виразки та ерозії. Це може бути результатом вторинних бактеріальних інфекцій, що часто супроводжують вірусну інфекцію, спричинену CEV.

1.5. Протівірусний імунітет

Реплікація CEV відбувається в цитоплазмі клітини, викликаючи пермісивну інфекцію, змінюючи протівірусну дію імунної системи господаря, зокрема вроджену імунну відповідь [1]. Протівірусний імунітет може бути присутнім в організмі ще до вірусної інфекції, яка, як відомо, індукується інтерферонами, що вивільняються імунними клітинами в організмі, що призводить до обмеження реплікації вірусу або до запобігання подальшому вторгненню в клітини господаря. Температура є важливим фактором, який впливає на реплікацію вірусу у риб. Відповідно до методу, який практикують деякі виробники кої переважно в Азії, штучне підвищення температури води може обмежити поширення CEV шляхом індукування протівірусного імунітету. Це впливає на тяжкість перебігу інфекції у риб, шляхом зниження реплікації вірусу та збільшення ефективності імунної відповіді господаря.[1]

1.6. Вплив температури та зміни клімату на перебіг CEV-інфекції

Навіть незначне підвищення температури впливає на життєвий цикл, фізіологію, поведінку, поширення та структуру популяцій водних біоресурсів, зокрема риб. Останні дослідження свідчать, що деякі збудники інфекційних хвороб риб поширюються значно швидше із зростанням температури. Зміна клімату сприяє їх розповсюдженню як у морських, так і у прісноводних ареалах. Зокрема, підвищення температури води може розширити діапазон хвороб. Водні біоресурси мають високу кумулятивну смертність при інфекційних захворюваннях, а патогени швидко прогресують, і ці явища можуть бути посилені зміною клімату, що призведе до географічного розповсюдження вірулентних збудників до ареалів рибальства та аквакультури, загрожуючи значній частині світового виробництва та продовольчій безпеці. [27]

Зміни клімату впливають на продуктивність систем аквакультури та збільшують чутливість риб до захворювань [18]. Швидка імунна відповідь та розмноження збудників хвороб часто залежать від температури води, що проявляється як співвідношення сприятливої температури та прояв клінічних ознак захворювання. Ці дані становлять основний інструмент для виявлення загроз, що несуть ендемічні та екзотичні захворювання. Підвищення температури води змістить рівновагу на користь або хазяїна, або збудника, змінивши частоту епізоотій та їх розповсюдження. [27]

Риби є пойкилотермними організмами, тому на їхню фізіологію, включаючи імунну відповідь, безпосередньо впливає температура навколишнього середовища [20]. Патогени також мають оптимальні температурні інтервали для репродукції. Для багатьох захворювань (наприклад, фурункулез, герпесвірусна інфекція, весняна віремія коропа) температура є ключовим чинником можливості розвитку гострої інфекції та високої смертності, або ж імунітет буде спроможний боротися та сприятиме одужанню. Підвищення температури води посилить інтродукцію не лише нових видів гідробіонтів, а й екзотичних збудників, що походять з регіонів з вищим термічним показником навколишнього середовища.

Таблиця 1.2.

Вплив температурного фактору на розвиток ДНК-вмісних вірусів, що зустрічаються в аквакультурі України [27]

Патоген / Pathogen	Хвороба / Disease	Оптимальна температура / Optimal temperature	Як впливає зміна клімату / How climate change is affecting
<i>Cyprinid herpesvirus-3</i> (СyHV-3), Koi herpesvirus (KHV) (<i>Herpesviridae</i>). Включено до списку МЕБ / Included to the OIE-listed diseases	Герпесвірусна хвороба коропа / Koi herpes virus disease (KHVD)	16–28°C	Зустрічається в тропічних та помірних широтах; коропа є найбільш чутливим видом; захворювання залежить від температури і розвивається за широкого діапазону при 16–25°C; відсутність захворюваності спостерігається при температурі нижче 13°C та понад 30°C. Високий ризик розвитку та поширення захворювання в Україні за рахунок підвищення середньорічної температури та імпорту риби / Occurs in tropical and temperate latitudes; carp is the most sensitive species; the disease depends on temperature and develops over a wide range at 16–25°C; no morbidity is observed at temperatures below 13°C and above 30°C. High risk of development and spread of the disease in Ukraine due to rising average annual temperature and fish imports.
<i>Carp Edema Virus</i> (CEV) (<i>Poxviridae</i>)	Вісна коропа / Carp edema virus disease (CEVD), Koi sleepy disease	15–23°C	Вірус стає більш активним і викликає захворювання при теплих температурах весною та влітку, але захворювання виявляють майже цілий рік, навіть при температурі до 3°C; ендемічне захворювання для України, поширення вірусу неконтрольоване з рибопосадковим матеріалом / The virus becomes more active and causes disease at warm temperatures in spring and summer, but the disease is detected almost all year round, even at temperatures up to 3°C; endemic disease for Ukraine, the spread of the virus is uncontrolled with fish transportation.
<i>Acipenser Iridovirus European</i> (AcIV-E) (<i>Iridoviridae</i>)	Іридовірусна інфекція осетрових / Sturgeon iridoviral disease	12–20°C	Найбільш характерні спалахи при температурі 15–20°C; епізоотії трапляються влітку і восени, коли температура води стає стабільною або знижується повільно; гостра інфекція спостерігається у віці 0+ та 1+; шість видів є чутливими; діапазон сприятливих температур для розвитку інфекції розшириться / The most characteristic outbreaks can occur at temperature between 15–20°C; epizootics occur in summer and autumn, when the water temperature becomes stable or decreases slowly; acute infection is observed at the age of 0+ and 1+; six species are sensitive; the range of favorable temperatures for the development of infection will expand.

Віруси зазвичай мають встановлені температурні діапазони, при яких вони стають більш активними та викликають захворювання (Табл.1.3.). Для багатьох вірусів саме потепління навесні та влітку є тригером. Зміна температури води в діапазон від 15 до 25 °C навесні призводить до сильних спалахів, які ініціюють млявість коропів, змушуючи їх лежати на дні ставка. Якщо їх потривожити, риба почне плавати, перш ніж знову повернутися до сплячого стану на дні.

Таблиця 1.3.

Географічне поширення CEV за різні періоди за різних температур води

Country	Water temperature	Persistence duration (years)
Japan	19- 24 °C	1986
North American countries	Low temperature	1996-2015 (in various states)
Czech Republic	13-15 °C	2013-16
France	Outbreaks in winter and May or July	2013-15
Germany	17-22 °C	Numerous linked (first case in koi in 2009) and unlinked cases (2014-2016)
Italy	13-16 °C 2010 case; 6-7 °C and 23 °C also.	Several outbreaks in 2015 and 2016
Austria	7-15 °C	2014
Netherlands	6-7°C (2010 case); 20-23 °C	2015/2016
Poland	16-19 °C	2015 and 2017
Switzerland	January with high mortality.	2016
UK	Greater than 16 °C in juveniles; 6-9 °C in adult carps.	2009-2016
India	19-24 °C	2015
China	24 °C	2015 -2017
Hungary	Winter and early Spring	2016-2017
Serbia	9-15 °C	2017

Масова смертність відбувається протягом наступних двох тижнів після інфікування. При підвищенні температури до 28 °C. спостерігалось значне зниження захворюваності та смертності. Ці дані вказують на те, що температура діє як важливий фактор, що сприяє виникненню спалахів захворювань у популяціях риб, шляхом модулювання імунної системи. CEV створює небажаний шок для фізіологічного стану організму, відстрочуючи час акліматизації в новому середовищі. [4]

1.7. Вплив зміни клімату та температури води на імунну систему риби та розвиток інфекцій

Нормальне функціонування імунної системи спостерігається за літньої температури води для більшості видів риб. Значні температурні відхилення води відносно фізіологічного оптимуму можуть спричинити стрес, підвищити сприйнятливість до інфекції та смертність. Лососеві є стенотермними (толерантні до вузького діапазону температур), а коропові — евритермними (толерантні до широкого діапазону температур). Температура понад 13–16°C є стресовою для лососевих, що призводить до неоптимальних темпів росту,

зниження активності та вищого ризику захворювання [27]. Популяції, що зазнають стресу, більш схильні до ураження умовно-патогенними збудниками, такими як *Aeromonas sp.* та *Flavobacterium sp.* Також важлива швидкість підвищення температури, що негативно впливатиме на імунну систему [27].

Щорічна тривалість спалахів герпесвірусної інфекції у коропових, ймовірно, зростатиме упродовж більш тривалого періоду кожного року. Ризиком у поширенні CyHV-3 (KHV) є також імпорт риби, свідченням чого є стрімке поширення вірусу у ЄС за останні 15 років [15]. При вищій температурі води хвороби, як правило, зустрічаються лише влітку, зокрема KHV, що розвивається за температури вище 15°C і нижче 29°C. Такі інфекції можуть мати більш тривалі періоди передачі, починаючи раніше навесні і закінчуючи пізніше восени. Підвищення температури води безумовно впливає на емерджентний вірус віспи коропових (CEV) [25].

Зміна клімату в першу чергу змінює рівень загрози, пов'язаної з найбільш небезпечними збудниками, внесеними до списку МЕБ. Ризик вірусної геморагічної септицемії (VHSV), вірусного інфекційного гематопоетичного некрозу (IHNV) та весняної віремії коропа (SVCV) зменшиться, оскільки інфікування, як правило, відбувається лише тоді, коли температура води становить нижче 17°C. Підвищення температури може бути перевагою для коропівництва, що полягатиме в двох аспектах — тривалішому періоду фізіологічних температур та інгібуванні рабдовірусної інфекції. Холоднолюбиві види, такі як форель, навпаки, зазнають негативного впливу в процесі вирощування, але, з іншого боку швидке підвищення температури виявиться несприятливим для розвитку геморагічної септицемії та інфекційного гематопоетичного некрозу.

Здатність збудника до мутації дозволить йому швидко реагувати на нові можливості, створені зміною клімату, такі як встановлення нових видів-хазяїв [24]. Еволюція збудника знижує видовий бар'єр, тому нові штами, найімовірніше за все, розширять свій ареал хазяїв. РНК-вмісні віруси

(наприклад, родина Orthomyxoviridae), мають вищий рівень мутації порівняно з іншими вірусами і, таким чином, більш ймовірно призведуть до появи нових захворювань або викликатимуть інфекцію у нових господарів. Яскравим прикладом цього є вірус інфекційної анемії лосося (ISAV), який щонайменше двічі еволюціонував від природного авірулентного предка [25].

Патогени, що передаються горизонтально, особливо чутливі до зміни клімату, оскільки їм доводиться виживати короткий період часу за межами організму хазяїна, перш ніж заразити нового. Однак, даних про виживання збудників поза організмом хазяїна при різних температурах недостатньо. Показано, що виживання VHSV у морській воді негативно корелює із підвищенням температури води [26]. Аналогічно, IHNV та SAV (Togaviridae) довше виживають у навколишньому середовищі при нижчих значеннях температури води [27].

Вищі показники температури знижують рівень розчиненого кисню та збільшують швидкість розкладання органічних речовин. Концентрація поживних речовин підвищить рівень евтрофікації та частоту «цвітіння» водоростей. Зниження швидкості річкового потоку (наприклад, у періоди невеликої кількості опадів) може знизити якість води за рахунок підвищеного вмісту забруднювачів. Токсичність загальних забруднювальних речовин (наприклад, фосфорорганічних сполук та важких металів) за високих температур, як правило, зростає. Відомо, що значні опади в короткі терміни перевантажують потужність очисних споруд, і неочищені стічні води можуть потрапляти в річки, що призводить до раптових падінь концентрації розчиненого кисню та масштабні загибелі риби. Підвищене окиснення може посилити розповсюдження патогенів та дію забруднювачів [22].

Погана якість води може скоротити популяції гідробіонтів, які є важливими в трофічних ланцюгах. Нестача їжі разом із швидкою деградацією середовища існування (погана якість води та гідродинамічні зміни) можуть, зокрема, зменшити щільність популяції лососевих, а отже, знизити швидкість передачі збудника. Або навпаки, повільні річкові потоки влітку (які

спостерігатимуться під час посух) перешкоджатимуть поверненню вгору за течією мігруючих видів риб, що йдуть на нерест. Отже, «скупчуючись у повільній воді» риби застануть умови, що сприяють поширенню патогенів та їх репродукції. Високі значення температури у верхніх шарах та гіпоксія у нижніх шарах озер можуть призвести до вищої щільності риб у лімітованій ділянці, де умови оптимальні для збільшення швидкості передачі збудника [27].

Захворювання — результат взаємодії збудника та навколишнього середовища. Температура води впливає на всі елементи тріади захворювання. Найголовніше, що взаємодія між імунною відповіддю та реплікацією збудника залежить від температури.

Збудник і хазяїн матимуть оптимальний температурний діапазон відповідно до реплікації та імунної відповіді. Підвищення температури води буде по-різному корисним для збудника чи хазяїна, зміщуючи результат у напрямку захворювання та смертності чи імунітету та одужання [27].

Таким чином, взаємодія «хазяїн-патоген» є найважливішим для оцінки ризику і його необхідно враховувати для кожної комбінації. Ряд ендемічних захворювань, таких як ерсініоз, бактеріальна септицемія, бактеріальна хвороба нирок, проліферативна хвороба нирок та іхтіофтіріоз, наймовірніше, зустрінатимуться частіше. Підвищення температури та погіршення якості води в навколишньому середовищі негативно вплинуть на лососевих та підвищать їх сприйнятливості до хвороб більшою мірою, ніж у коропових та осетрових, збільшивши ризик появи захворювань у природніх та штучних популяціях. Швидкість розмноження бактерій зростає з підвищенням температури води, що збільшує рівень небезпеки, а отже, сприятиме розвитку епізоотій. Зміна клімату може негативно вплинути на сприйнятливості хазяїв через підвищення температури води та опосередковано через зниження якості води. Бактерії є стійкими до високих температур тому ймовірність змін у їхній життєдіяльності з підвищенням температури є низькою.

Таблиця 1.4.

Причини, шляхи та наслідки зміни клімату для емерджентних захворювань риб [27]

Причини / Reasons	Шляхи / Ways	Наслідки / Consequences				
		Нове емерджентне захворювання / New emerging disease	Новий хазяїн / New host	Нова локація/ підвищена дистрибуція / New location/ increased distribution	Поширеність / контакт-ознізність / Prevalence / contagiousness	Гострий перебіг інфекції / Новий патогенез / Acute infection / new pathogenesis
Інтродукція патогену / Pathogen introduction	Зміна клімату сприятиме появі нових шляхів та/або підвищить частоту проникнення збудників існуючими маршрутами / Climate change will promote the emergence of new routes and / or increase the frequency of penetration of pathogens along existing routes		x	x		
Мутації, швидкість реплікації, вірулентність та велика кількість збудника / Mutations, replication rate, virulence and large number of pathogens	Потенціал збудника розвиватися при використанні нових можливостей, наданих зміною клімату, та вплив температури на швидкість розмноження й вірулентність / The potential of the pathogen to develop using the new opportunities provided by climate change and the impact of temperature on the rate of reproduction and virulence	x	x			
Чутливість хазяїна / Host sensitivity	Стрес для хазяїна та вплив кліматичних змін на його сприйнятливості / Stress for the host and the impact of climate change on its susceptibility			x	x	x
Взаємодії патоген-хазяїн / Pathogen-host interactions	Вплив зміни клімату на взаємодію хазяїна та збудника (в результаті чого відбудуться зміни в ознаках хвороби) / The impact of climate change on the interaction of the host and the pathogen (resulting in changes in the symptoms of the disease)			x	x	x
Вектори, проміжні та альтернативні хазяї / Vectors, intermediate and alternative hosts	Вплив зміни клімату на переносників, проміжних та альтернативних господарів / Impact of climate change on vectors, intermediate and alternative hosts			x	x	
Контакт між тваринами та їх переміщення / Contact between animals and their movement	Вплив зміни клімату на контакти між тваринами (через зміни в міграції, переміщенні та змішуванні різних популяцій) / Impact of climate change on contact between animals (due to changes in migration, displacement and mixing of different populations)			x	x	
Екологічні маршрути / Ecological pathways	Вплив зміни клімату на екологічні шляхи поширення збудника (наприклад, донні відклади або вода) / Impact of climate change on the ecological pathways of the pathogen (eg bottom sediments or water)			x		

Зміна температури вплине на аквакультуру, збільшуючи ризик спалаху хвороб внаслідок послаблення імунної відповіді, зменшення стійкості риб, розповсюдження паразитів та патогенних мікроорганізмів. Аквакультура характеризується значно більшим видовим різноманіттям, порівняно з тваринництвом, отже, вплив кліматичних змін на неї є значно складнішим. Крім того, у виробничих технологіях тваринництва та рибництва можуть застосовуватись різні умови контролю епізоотій [27].

Антропогенна діяльність, евтрофікація та глобальне потепління вважаються основними причинами розповсюдження захворювань риб [27]. Очікується, що на відносини «хазяїн-паразит» впливатимуть численні чинники, такі як розширення діапазону патогенів, посилення вірулентності, зниження імунного статусу хазяїна та збільшення частоти спалахів хвороби (табл. 1.4.).

Усі життєві процеси, що проходять в організмі риб, тісно пов'язані із зовнішнім середовищем і знаходяться під його безпосереднім впливом. Серед

різноманіття абіотичних та біотичних чинників зовнішнього середовища, що впливають на організм риби та виникнення її хвороб, найбільше значення мають температурний, газовий і сольовий режими води, коливання її рівня, течія, віковий і видовий склад іхтіоценозу, полікультури, щільність популяції чи посадки риби під час вирощування, наявність інфекційних чи інвазійних збудників у водному середовищі.

Разом з ґрунтом ложа водойм, бактеріями, нижчими рослинами, безхребетними кормовими організмами, вода впливає на рибу, зокрема на процеси їх дихання, травлення, кровотворення і кровообіг, нервову систему, розмноження, ріст та розвиток. Тому, для нормальної життєдіяльності риби та підтримки на певному рівні життєстійкості їх організму у водоймах, слід створювати оптимальні зоогігієнічні умови, що забезпечили б його нормальний фізіологічний та імунологічний статус.

При вирощуванні різних видів риби слід враховувати їх температурні оптимуми, знати наслідки дії на їх організм високих і низьких температур, значного їх коливання.

Як вже було описано вище, від температури води залежить не тільки ріст і розвиток риби, але і характер прояву та перебігу захворювань, оскільки вона впливає на розвиток та чисельність збудників хвороб, імунофізіологічний стан організму риби, що в свою чергу визначає динаміку епізоотичного процесу. Підвищення температури прискорює і ускладнює перебіг більшості інфекційних хвороб риби. Є також і окремі інфекції риби (наприклад вірусна геморагічна септицемія форелі), розвиток яких спостерігається за відносно низьких температур води - 10-12°C, а аеромонози, запалення плавального міхура, бронхіомікоз - за температури 20-25°C. Крім того, висока температура води (вище 30°C) може викликати пригнічення життєвих функцій і сповільнення росту риби, масову її загибель [33].

1.8. Міграція Carp Edema Virus між країнами внаслідок міжнародної торгівлі рибою

Важливою причиною масової смертності та захворюваності коропа є неконтрольована торгівля рибою між країнами. Якщо риба, яка заражена вірусом, експортується в іншу країну, вона може стати джерелом зараження для місцевих популяцій риб. Існують міжнародні правила та стандарти для торгівлі рибою, що містять вимоги щодо стану здоров'я та безпеки риби, а також процедури для мінімізації ризику передачі вірусів та інших хвороб. Однак, якщо цих правил не дотримуватись, можуть виникати проблеми з контролем за розповсюдженням вірусів та інших захворювань, які матимуть негативний вплив на галузь аквакультури в країнах-експортерах та країнах-імпортерах.

Одним з важливих засобів для мінімізації ризику передачі вірусів риб внаслідок торгівлі є впровадження ефективної системи визначення походження риби та контролю за її міжнародним переміщенням. Це може включати вимогу наявності сертифікатів про здоров'я риби та документації, що засвідчує правильне використання методів дезінфекції та профілактики захворювань. Крім того, уряди країн можуть співпрацювати для розробки та впровадження загальних міжнародних стандартів та регуляторних правил, що містять вимоги щодо здоров'я та безпеки риби в торгівельних операціях між країнами. [7] Це допоможе забезпечити відповідність експортованої риби міжнародним стандартам. Таким чином, контрольована торгівля рибою та виконання міжнародних стандартів та регуляцій можуть бути ефективними способами для мінімізації ризику передачі вірусів риб та інших захворювань та забезпечення безпеки та стійкості галузі аквакультури в усьому світі. [7]

1.9. Культивування Carp Edema Virus в культурі клітин

Нещодавно в експериментальних дослідженнях були спроби застосувати різноманітні лінії клітин для виділення CEV, включаючи клітини товстолобика (FHM), плавника кої (ССКФ), мозку звичайного коропа (ССВ), плавника *Horabagrus brachysoma* (НВФ), плавника золотої рибки (GFF), плавника риби-ангела (AFF) і багато інших клітинних ліній. Однак цитопатичний ефект не був виявлений в жодній із зазначених вище клітинних ліній, і виділити вірус не вдалося. Це робить виділення та очищення CEV у великих кількостях досить складним завданням. Таким чином, наразі неможливо культивувати CEV шляхом накопичення вірусу в культурі клітин, через нечутливість наявних культур клітин до CEV. [4].

Існує кілька можливих причин, через які Carp Edema Virus (CEV) поки не може бути культивованим на клітинних культурах:

1. Специфічність рецепторів клітин: CEV може мати високу специфічність до рецепторів на поверхні клітин, які можуть бути присутні тільки в організмі риб. Деякі віруси потребують саме живих організмів для свого росту і розмноження.
2. Природна варіабельність: CEV варіабельний і чутливий до змін в середовищі, що ускладнює його культивування в контрольованих умовах.

У зв'язку з цими факторами, культивування CEV на клітинних культурах може бути вкрай важким завданням, і наразі немає стандартного методу для його успішного культивування.

1.10. CEV та можливі ко-інфекції

У нещодавньому дослідженні визначали зв'язок між CEV та іншими патогенами (паразити і бактерії, присутні на зябрах, шкірі або внутрішніх органах при ураженні CEV). В ході експерименту досліджували зразки з Німеччини та Угорщини, в яких була підтверджена наявність коінфекції CEV

та *Flavobacteria*. Дослідники прийшли до висновку, що *Flavobacterium branchiophilum* є можливим копатогеном інфекції CEV, але CEV є етіологічним збудником KSD, в той час як *Flavobacterium branchiophilum* не є необхідним чинником для розвитку KSD [4]. Результати недавнього дослідження виявили *Flavobacterium succinicans* і *Flavobacterium sasangense* як переважаючих бактеріальних копатогенів у риби, інфікованої CEV [4]. Результати дослідження свідчать про те, що найбільше ДНК флавобактерій було в зябрах, а також в плавниках і нирках. У Кореї *Flavobacterium granulii* довгий час ідентифікували як основну колонію у риб, які вмирали внаслідок інфікування CEV [17].

Зниження виділення муцину в зябрах і кишечнику інфікованого CEV звичайного коропа викликає важкі пошкодження слизової оболонки у. Це сприяє підвищенню сприйнятливості ураженого вірусом коропа до вторинної бактеріальної інфекції [4]. У випадку CEV інфікованої риби, *Flavobacteria* використовує слабкі місця коропа і використовує зябра як точка входу. [16]

1.11. Шляхи передачі CEV

CEV передається через водне середовище в дикій природі або в акваріумах. Вірус виділяється із зябер зараженої риби та забруднює воду, в якій знаходяться як заражені, так і здорові риби. Згодом вірус осідає на зябра здорових риб, оскільки зябра служать точкою входу, таким чином інфікуючи рибу вірусом. Є припущення, що можуть існувати й інші біотичні переносники CEV, наприклад, інші види риб; риб'ячі воші або рибоїдні птахи, які мігрують від однієї ділянки води до іншої в пошуках їжі, але наразі доказів цьому немає. В лабораторних дослідах, вірус CEV передається через спільне проживання інфікованих і здорових риб у одній водоймі або інюкуляцією здорової риби CEV-позитивного гомогенату зябрової тканини інфікованої риби.[2]

1.12. Профілактика та лікування хвороб, спричинених Carp Edema Virus

Найбільш використовуваним методом профілактики CEV-інфекції є внесення профілактичних солей у воду в концентрації 0,5 % (5 г/л). Їх вносять у воду ставка або басейну [17]. Іншим методом профілактики CEV є коригування температури води, внаслідок чого вірус стає неактивним. Цей метод не знищує вірус в CEV -інфікованих рибах, але пригнічує його реплікацію. На сьогодні ще не розроблені ліки від CEV-інфекції, а тому внесення профілактичних солей у воду ставка або басейну є лише симптоматичним лікуванням при KSD, але воно також не знищує вірус [21]. Цей метод використовувався з моменту реєстрації перших випадків KSD в Японії. Основна користь симптоматичного лікування сіллю полягає в тому, що сіль полегшує осмотичний стрес, викликаний ураженням зябер і шкіри, але не ліквідує вірус в CEV-інфікованій рибі [19] [21]. Коли заражена риба перебуває на пізній стадії хвороби, лікування сіллю може бути неефективним [21].

У риб, що вижили, CEV зберігається в популяції протягом через деякого часу навіть після зникнення клінічних ознак. Дослідження [22], показали, що через 5 місяців після зникнення симптомів KSD, CEV став негативним у риби, що вижила. ПЛР не виявила CEV у вилученій з зябрової тканини коропа ДНК. Для визначення точного періоду, протягом якого риба залишається носієм CEV після одужання, потрібні додаткові дослідження.

Належні способи дотримання гігієни в аквакультурах (біозахист ферми) мають за мету запобігти поширенню хвороби в водних фермах незалежно від їх розміру [24]. Як правило, програми біозахисту радять фермерам закуповувати матеріал (запліднена ікра, дорослі особини) від зареєстрованих постачальників, які притримуються заходів біозахисту щодо поголів'я, вільного від хвороб. Фермер повинен стежити за тим, щоб не було змішування тварин з різних ферм-постачальників під час транспортування. Як тільки товар прибув на ферму, його потрібно помістити на карантин і контролювати протягом певного періоду, щоб переконатися, що поголів'я не уражене

інфекціями і запобігти поширенню інфекційних захворювань по господарству [25]. Це також стосується SEV-уражених риб, які навіть після успішного симптоматичного лікування, все ще можуть передати SEV здоровим рибам, оскільки SEV інактивований, але не ліквідований. Застосування HACCP (аналіз небезпек і Critical Control Point) стратегії в зонах вирощування риби може значно допомогти в профілактиці SEV, при поширенні від інфікованої до здорової риби через фоміти. Застосування HACCP в даному випадку вимагає ідентифікації та контролю небезпеки (SEV) шляхом усунення перехресного забруднення. Це здійснюється за допомогою належного очищення та дезінфекції рибного середовища існування: руки та захисний одяг персоналу; вантажно-розвантажувальне обладнання та спорядження; перевірка якості води у накопичувальних резервуарах та/або ставках; огорожа та сітки ставків для усунення контакту з чужорідними організмами (наприклад, птахи, які можуть поширити SEV під час переміщення від одного ставка до іншого).

1.13. Молекулярна діагностика та боротьба з Carp Edema Virus

Вірусні захворювання призводить до найбільших економічних втрат при культивуванні об'єктів аквакультури в усьому світі. На відміну від бактеріальних інфекцій, які можна лікувати антибіотиками, вірусні захворювання практично не лікуються. Для боротьби з вірусними захворюваннями риб використовують профілактичні заходи, такі як вакцинація та своєчасна діагностика. Спалахи захворювань, спричинених вірусами, відбуваються навіть в країнах з добре розвинутою аквакультурою. Необхідно проводити постійний моніторинг популяцій цінних видів риб, які культивуються в рибогосподарських підприємствах України. Для цього треба використовувати методи молекулярної діагностики, а саме ПЛР. Крім діагностики вірусів риб, метод ПЛР додатково дозволяє визначати генотип ізольованих штамів вірусів та їхнє можливе походження.

Вірус віспи коропа (CEV) у Європі був вперше виявлений в 2013 році, де спричинив спалахи з високим ступенем смертності на коропових господарствах. Інфекція на багатьох господарствах була виявлена як у клінічних так і у безсимптомних варіантах. Хоча вірус був присутній в аквакультурі упродовж багатьох років, все ще не вистачає даних щодо факторів передачі вірусу. Його векторами є інші види риб, що утримуються разом коропом. Краще розуміння механізмів передачі вірусу та перелік векторів є важливим і корисним у заходах, спрямованих на обмеження поширення вірусу [4]. Тому ідентифікація вірусу як у коропа, так і у інших коропових видів в аквакультурі України є необхідною.

Підвищення температури води впливає на емерджентний вірус (CEV). Сьогодні це захворювання шириться у Європі, а в Україні є підтвердження, що даний збудник циркулює в коропових господарствах вже понад 10 років. До CEV чутливі короп та товстолоб. Вірус стає більш активним і викликає захворювання при теплих температурах весною та літом, але захворювання виявляють майже цілий рік, навіть при температурі до 3 С. Захворювання ендемічне для України, поширення вірусу здійснюється неконтрольовано з неперевіраним рибопосадковим матеріалом.

Оскільки більшість природних випадків ураження CEV супроводжуються вторинними бактеріальними інфекціями, збудниками яких метод виявлення має бути дуже специфічним і чутливим. Виявлення CEV можливе за допомогою наступних методів: клінічне спостереження CEV (характерна симптоматика), методи виявлення на основі полімеразної ланцюгової реакції (PCR) та на основі рекомбіназної полімеразної ампліфікації (RPA) [4].

Для діагностики вірусу CEV переважно використовують напівгніздову ПЛР [5]. Позитивна реакція в першому раунді свідчить про гострий перебіг інфекційного процесу та високий титр вірусу в тканинах. При позитивному результаті в другому раунді можна стверджувати про хронічну інфекцію. Для відбору зразків найкращими органами є зябра.

Вірусні захворювання риб – це економічно важливий аспект рибного господарства. Попри високу значимість епізоотій в рибництві, на сьогоднішній день бракує достатньо інформації про механізми патологічного процесу, передачі, фактори вірулентності та імуногенності більшості вірусів риб. Тому заходи профілактики та попередження захворювання, до яких відноситься експрес-діагностика, є єдиним доступним та актуальним способом боротьби з вірусними захворюваннями в умовах сучасної аквакультури [32].

Згідно з директивами Європейського Союзу основним напрямком боротьби з інфекційними хворобами риб має бути попередження захворювання, профілактика та вирішення проблеми резистентності до протимікробних препаратів. У законодавстві України діяльність з дотримання санітарно-гігієнічних норм та профілактичної роботи зі здоров'я риб ґрунтується на Законах України «Про аквакультуру», «Про рибне господарство, промислове рибальство та охорону водних біоресурсів», «Про ветеринарну медицину». Рибне господарство України відіграє значну роль у забезпеченні населення продовольством, галузей національної економіки – сировиною, а також у відтворенні природних ресурсів та підвищенні зайнятості населення.

Поруч з діагностикою вірусів, гостро виникає питання визначення вірулентності ізолятів. У вирішенні цієї проблеми допомагає аналіз нуклеотидної послідовності вірусних генів. Тільки за наявності нуклеотидних послідовностей вірусів та їх геномів, остаточно стане можливим вивчення патогенезу захворювання. Риба, без зовнішніх ознак захворювання, може бути носієм вірусу і поширювати його всередині популяції. Хронічні або латентні інфекції можуть проявлятися під дією стресових факторів навколишнього середовища, а в умовах сучасної інтенсивної аквакультури такий ризик є досить поширеним. Тому виявлення вірусів в популяціях об'єктів аквакультури – це важливий крок в контролі інфекційних захворювань. Порівняно із стандартними вірусологічними методами, ПЛР значно швидша у

виконанні, тому ця методика є важливим інструментом в діагностиці вірусних захворювань риб.

З огляду на все більш поширене явище резистентності до антибіотиків, основним напрямком боротьби з хворобами риб має бути попередження захворювання і профілактика. Першими кроками в цьому мають бути суворе виконання правил ведення аквакультури, а саме дотримання санітарно-епідеміологічних норм, щільності посадки риби та якість води. Вакцини та пробіотики – також багатообіцяючі напрямки. Перспективним є культивування видів риб, стійких до патогенів і може бути використане як альтернатива. Інформація про патогенез дозволить розробляти нові методи боротьби з інфекційними захворюваннями, які будуть економічно вигідні та безпечні як для навколишнього середовища, так і для об'єктів аквакультури.

В діагностиці інфекційних захворювань риб найбільш популярним різновидом ПЛР є мультиплексна реакція (мПЛР). Використання методу мПЛР дозволяє ідентифікувати одразу декілька вірусів в одному зразку, взятого безпосередньо від риби. До того ж цей різновид ПЛР зменшує затрати на реагенти для реакції та скорочує час на ідентифікацію кожного збудника завдяки використанню специфічних наборів олігонуклеотидів[37].

Отже, захист об'єктів аквакультури від інфекційних захворювань є актуальною проблемою в сучасному рибництві. Незважаючи на певні успіхи, досягнуті в останні роки при розробленні заходів профілактики та лікування, інфекційні хвороби риб залишаються досить поширеними і наносять значні економічні збитки.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали

2.1.1. Досліджуваний матеріал – нирки, селезінка, головний мозок та зябра коропа (*Cyprinus carpio*)

Для проведення досліджень відбирали зразки у звичайних коропів (*Cyprinus carpio*) які мали характерну для CEV симптоматику, в трьох рибних господарствах Київської, Черкаської та Полтавської областей. У коропа відбирали зябра, нирки, мозок та селезінку.

2.1.2. Екстракція ДНК

Геномну ДНК екстрагували за допомогою Quick-DNA Miniprep Kit (ZYMO RESEARCH) відповідно до інструкції виробника для екстракції ДНК із тканин.

2.1.3. Полімеразна ланцюгова реакція

Для отримання ПЛР-продуктів кінцеву ПЛР проводили за допомогою набору PCR Kit (ZYMO RESEARCH) згідно з інструкцією виробника. Ампліфікація здійснювалася в два етапи – перший з праймерами CEV, другий з праймерами CEV intr (праймери F та R). Реакційна суміш ПЛР містила наступне: 12.5 мкл Mix + 2 мкл F+R +2 мкл DNA + 8.5 мкл H₂O вільної від нуклеази (загалом 25 мкл). (Табл. 2.1.)

Таблиця 2.1.

ПЛР-праймери для виявлення CEV [1]

Sl. No.	Fragment Name	Nested Primers	Primer sequences	PCR conditions	Expected band size
11.	5'-UTR	CEV F1	5'-GCTGTTGCAACCA-3'	Initial denaturation: 95 °C - 3min for 40 cycles. Denaturation: 95 °C – 30 s Annealing: 60 °C - 30 s, Extension: 72 °C - 30 s followed by a final extension step at 72 °C for 10 min.	548 bp
		CEV R1 1 st step PCR	5'-TGCAGGTTGCTCCTAATCCT-3'		
		CEV F2	5'-GCTGCTGCACTTTTAGGAGG-3'	Initial denaturation: 95 °C - 3min for 40 cycles. Denaturation: 95 °C – 30 s Annealing: 48 °C – 30 s Extension: 72 °C - 30s followed by a final extension step at 72 °C for 10 min.	181 bp
		CEV R2 2 nd step PCR	5'-TGCAAGTTATTTTCGATGCCA-3'		
2.	Partial 4a gene	CEV For B	5'-ATGGAGTATCCAAAGTACTTAG-3'	Initial denaturation: 95 °C - 3 min for 40 cycles. Denaturation: 95 °C – 30 s Annealing: 55 °C - 30 s Extension: 72°C- 30s, followed by a final extension step at 72 °C for 10 min	528 bp
		CEV rev J 1 st step PCR	5'-CTCTTCACTATTGTGACTTTG-3'		
		CEV ForB-int	5'-GTTATCAATGAAATTTGTGTATTG-3'	Initial denaturation: 95 °C - 3 min for 40 cycles. Denaturation: 95 °C – 30 s Annealing: 55 °C - 30 s Extension: 72 °C- 30s, followed by a final extension step at 72 °C for 10 min	478 bp
		CEV RevJ-int 2 nd step PCR	5'-TAGCAAAGTACTACCTCATCC-3'		

2.1.4. Гель-електрофорез

Для візуалізації результатів використовували ДНК-маркери для електрофорезу CSL-MDNA-100BP, камеру для горизонтального гелю електрофорезу, кювету для заливки гелю, гребінки для створення лунок, транслюмінатор (ультрафіолетовий лайтбокс), латексні рукавички, буфер трис-борат-ЕДТА (ТБЕ), агарозу, бромистий етидій, бромфеноловий синій.

2.2. Методи

2.2.1. Отримання зразків - розтин риби *Cyprinus carpio*

Розтину піддають свіжі труп (зябра без ознак розкладення) і живих риб з клінічними ознаками захворювання. Живих риб потрібно усипити шляхом руйнування спинного мозку голкою чи розрізом у ділянці потилиці.

Зябра оголяють видаленням зябрової кришки ножицями. Ножицями відрізають 2-3 дужки і відбирають їх у пробірку.[26]

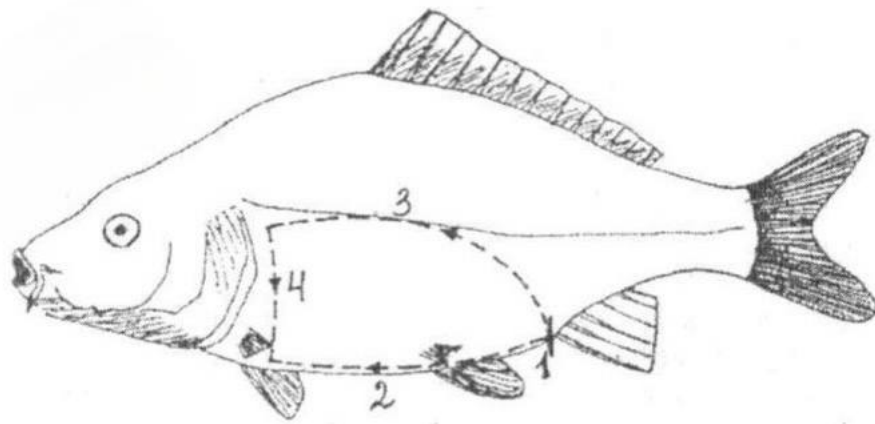


Рис.2.1. Розтин риби, контури розрізу черевної стінки.

Черевну порожнину розтинають за допомогою чотирьох розрізів, показаних на Рис.2.1. Перший поперечний розріз черевної стінки роблять попереду анального отвору, вставляють тупий кінець ножиць і роблять другий розріз уздовж білої лінії. Третій - напівмісяцевий розріз, що проходить по рівню бокової лінії або по реберній дузі, і четвертий - проводять по краю зяберної порожнини або зяберної кришки, відсікають черевну стінку, оголяючи внутрішні органи .

Розрізи роблять обережно, щоб не пошкодити внутрішні органи. Спочатку проглядають черевну порожнину, звертаючи увагу на вміст, наявність рідини (транссудат чи ексудат, кількість, колір, консистенція) або газу, крупних паразитів, зовнішній вигляд внутрішніх органів.

Потім обережно дістають внутрішні органи, необхідні для лабораторного дослідження – селезінку та нирки, та поміщають їх у пробірку. [26]

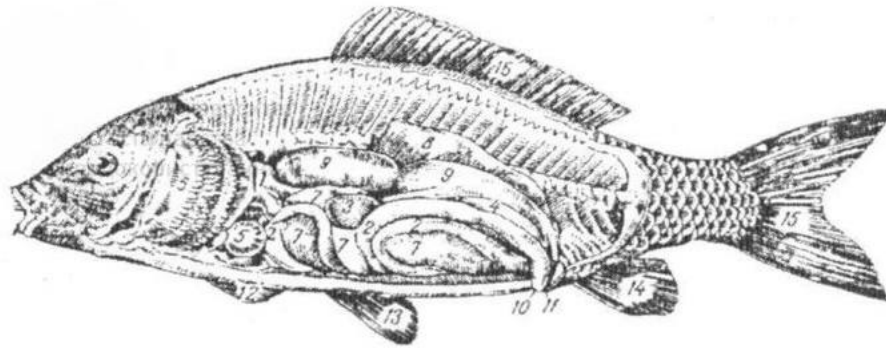


Рис. 2.2. Топографія внутрішніх органів коропа:

1- стравохід; 2 - кишечник; 3 - жовчний міхур; 4 - гонади; 5 - серце; 6 - зябра; 7 - гепатопанкреаз; 8 - нирки; 9 - плавальний міхур; 10 - анальний отвір; 11- статевий отвір; 12 - грудні плавники; 13 - черевні плавники; 14 - анальний плавник; 15 - хвостовий плавник; 16 - спинний плавник середній і задній відділи.

Селезінка лежить на передньому відділі кишечника, стрічкоподібна, темно-червоного кольору. Нирки лежать уздовж хребта у вигляді стрічки темно-червоного кольору.

Черепну коробку розтинають за допомогою чотирьох розрізів, із яких два бокових проходять від носових ямок до потиличної ділянки, третім поперечним відсікають кришку біля носових ямок, а четвертим - у ділянці потилиці [26]. Головний мозок видаляють і переносять у пробірку. Виділені органи ретельно гомогенізують у попередньо охолодженій у морозильній камері керамічній ступці, потім розводять стерильним PBS буфером, беручи в реакцію 100 мкл. Зразки перевіряли на наявність специфічних послідовностей SEV за допомогою ПЛР.

2.2.2. Екстракція ДНК

Геномну ДНК екстрагували за допомогою Quick-DNA Miniprep Kit (ZYMO RESEARCH) відповідно до інструкції виробника для екстракції ДНК із тканин: додавали 400 мкл буфера геномного лізису до 100 мкл гомогенізованих зразків: розведених PBS буфером (4:1). Перемішували 4-6 секунд на вортексі, потім залишили на 5-10 хвилин при кімнатній температурі. Далі переносили отриману суміш у збірну пробірку з Zymo-Spin PCR та центрифугували 10 000 об/хв протягом однієї хвилини. Після чого видаляли збірну пробірку та переміщували Zymo-Spin PCR у нову збірну пробірку. Далі додавали 200 мкл буфера для попереднього промивання ДНК і знову центрифугували при 10 000 об/хв протягом однієї хвилини. Потім додавши 500 мкл g-ДНК промивного буфера ще раз центрифугували при 10 000 об/хв протягом однієї хвилини. Далі перенесли суміш в чисту мікроцентрифужну пробірку, додали ≥ 50 мкл буфера для елюції ДНК і інкубували 2-5 хвилин при кімнатній температурі. Для елюції ДНК центрифугували на максимальній швидкості протягом 30 секунд. Елюйовану ДНК використовували для подальшої ПЛР. Швидкість елюції ДНК залежить від рівня рН і температури. Тому важливо контролювати, щоб рН був $>6,0$.

2.2.3. Полімеразна ланцюгова реакція

Метод ПЛР ґрунтується на виявленні у матеріалі специфічних фрагментів ДНК (РНК) різноманітних біооб'єктів, їх вибіркового синтезі до концентрації, за якої їх легко детектувати, і подальшому визначенні продуктів реакції ампліфікації - ампліконів. ДНК - унікальний носій генетичної інформації у всіх існуючих на Землі організмів, за винятком РНК-вмісних вірусів.

Унікальна властивість ДНК полягає в і здатності подвоюватися після розплітання спіралі та розходження ниток ДНК. Подвоєння ДНК (реплікація) здійснюється (за принципом комплементарності) ензимом ДНК-полімеразою.

Для того, щоб ензим розпочав свою роботу, потрібна наявність початкового дволанцюгового фрагмента ДНК. Такий фрагмент утворюється за взаємодії короткого одноланцюгового фрагмента ДНК - праймера з комплементарною ділянкою відповідного ланцюга батьківської ДНК. Реплікація відбувається на двох нитках ДНК, але нарощуються вони в протилежних напрямках. У результаті реплікації з однієї дволанцюгової молекули ДНК утворюється дві дволанцюгові, кожна з яких містить один ланцюг від материнської молекули ДНК та другий, дочірній, - новосинтезований. Цикл реплікації ДНК включає три основні стадії:

- 1) розплітання спіралі ДНК і розходження ланцюгів (денатурацію);
- 2) приєднання праймерів;
- 3) добудову дочірнього ланцюга ДНК.

У ПЛР вказані процеси здійснюються в пробірці у циклічному режимі. Перехід від однієї стадії реакції до іншої досягається зміною температури інкубованої суміші [28].

Для проведення ПЛР необхідно мати:

- 1) два синтетичних олігонуклеотидних праймери (довжиною приблизно по 20 нуклеотидів), які комплементарні до ділянок ДНК із протилежних ланцюгів, що фланкують послідовність – мішень (праймери обмежують фрагмент ДНК, який буде мільйони разів скопійований ензимом та ДНК-полімеразою, що приєднується до 3'-кінців праймерів для добудови їх заданої довжини (в декілька сотень пар основ));
- 2) ДНК-мішень;
- 3) термостабільну ДНК-полімеразу, яка не втрачає активності при температурі 95 °С;
- 4) чотири дезоксирибонуклеотиди;
- 5) буферну систему для ефективної роботи ДНК-полімерази, що обов'язково містить іони магнію.

Розробка праймерів для ПЛР є однією з найвідповідальніших ланок у проведенні діагностики. Потрібно підібрати такий фрагмент молекули ДНК,

який би відрізнявся генетичною консервативністю і був би присутній тільки в досліджуваному гені. При цьому довжина такого фрагмента повинна становити 15-30 нуклеотидів. Виконати таку роботу допомагають спеціальні комп'ютерні програми, що використовують інформацію про нуклеотидну послідовність відомих мікроорганізмів або генів людини. Отримати цю інформацію можна з міжнародних комп'ютерних банків даних (Gen bank, EMBL). Синтез праймера по заданій послідовності нуклеотидів не є технічно складним і здійснюється в автоматичних синтезаторах [28].

З основних етапів проведення ПЛР обов'язково слід виділити три:

- 1) підготовку проби біоматеріалу, тобто виділення ДНК або РНК;
- 2) власне полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР-ампліфікацію);
- 3) детекцію продукту ПЛР (ампліфікованої нуклеїнової кислоти) [28].

Під час нашого дослідження програма ампліфікації включала початкову денатурацію при 95 °С протягом 5 хв, а потім 45 циклів денатурації при 95 °С протягом 30 с, відпалу при 55 °С протягом 30 с і елонгації при 72 °С протягом 30 с.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) є одним із найточніших методів діагностики вірусних інфекцій. Напівгніздова ПЛР (nested PCR) є вдосконаленим варіантом стандартної ПЛР, що включає два раунди ампліфікації з використанням двох наборів праймерів. Ця методика забезпечує високу чутливість та специфічність діагностики, що особливо важливо для виявлення низьких концентрацій вірусу.

1. Перший раунд напівгніздової ПЛР:

- Позитивна реакція в першому раунді ПЛР свідчить про гострий перебіг інфекційного процесу. Це означає, що в тканинах риби є високий титр вірусу, що вказує на активну реплікацію SEV і значне пошкодження тканин. Такий результат є ознакою того, що наразі триває гостра фаза інфекції.[27]

2. Другий раунд напівгніздової ПЛР:

- Позитивна реакція лише у другому раунді ПЛР свідчить про хронічну інфекцію. У цьому випадку концентрація вірусу в тканинах є нижчою, і вірус

знаходиться у стані персистенції. Хронічна інфекція може бути менш очевидною, оскільки клінічні симптоми можуть бути слабше виражені або відсутні.[27]

Для проведення напівгніздової ПЛР важливо правильно обрати органи для відбору зразків. Зябра є одними з першочергових органів, які уражаються під час інфекції SEV, і в них часто спостерігається висока концентрація вірусу. Це робить зябра ідеальним матеріалом для аналізу та забезпечує високу достовірність результатів.

У інфікованих SEV риб часто спостерігаються вторинні бактеріальні інфекції. Це пов'язано з тим, що вірусні інфекції можуть послаблювати імунну систему риби, роблячи її більш вразливою до бактеріальних патогенів. Вторинні інфекції можуть ускладнювати перебіг захворювання та погіршувати загальний стан риби, сприяючи підвищеній смертності та економічним збиткам.

Напівгніздова ПЛР є ефективним методом діагностики Carp Edema Virus (SEV), дозволяючи не лише виявити наявність вірусу, але й визначити стадію інфекції (гостру або хронічну). Правильний відбір зразків, зокрема зябер, є ключовим для отримання достовірних результатів. Вторинні бактеріальні інфекції, часто спостережувані у інфікованих риб, підкреслюють необхідність комплексного підходу до лікування та профілактики SEV.

2.2.4. Гель-електрофорез

Електрофорез в агарозному гелі – це метод, який слугує для розділення макромолекул на основі їх розміру, електричного заряду й інших фізичних властивостей. Рухомою силою електрофорезу є напруга між електродами, розташованими на початку та кінці гелевої пластини, в товщі якої під впливом електричного поля мігрують заряджені частинки. Властивості цих частинок або молекул (розмір, заряд та ін.) визначають, наскільки швидко електричне поле може переміщати їх через драглеподібне середовище. За допомогою

стандартного методу електрофорезу в агарозному гелі, можна ідентифікувати фрагменти ДНК. Для цього як маркер застосовують референтний ген, за розташуванням якого визначають наявність такого самого в продуктах ПЛР. Локалізація референтного гену в гелі так само може бути визначена шляхом фарбування бромистим етидієм, – флуоресцентним інтеркалярним барвником, в низьких концентраціях. Референтний ген може бути ідентифікатором сировини, з якої отримано ДНК.[27]

Проведення електрофоретичного дослідження включає в себе: приготування робочого 10 x TBE (218 г трис; 10 г борної кислоти; 9,3 г EDTA).

Далі розчиняємо компоненти в 1,9 л дистильованої води. рН показник доводимо до 8,3 сухою борною кислотою або розчином NaOH. Об'єм розчину розводимо до 2 л дистильованою водою. З робочого розчину готуємо 1×TBE в об'ємі, достатньому для заповнення камери для електрофорезу та приготування гелю. Додаємо до 1×TBE агарозу в кількості, необхідній для отримання 0,45 %-го - 0,75 %-го розчину та нагріваємо на водяній бані до повного розчинення агарози. Потім охолоджуємо суміш приблизно до 50 °С. За час охолодження потрібно заклеїти краї кювети для гелю клейкою стрічкою. Додаємо до розчину агарози бромистий етидій до кінцевої концентрації 0,5 мкг/мл та обережно перемішуємо, уникаючи виникнення в гелі пухирців повітря. Теплу агарозу необхідно влити в кювету для гелю і рівномірно розподілити її в кюветі. Потім вертикально вставляємо гребінку так, щоб її зубчики не торкалися дна кювети приблизно на 1,5 мм. Залишаємо кювету з агарозним гелем на 30 хв, потім обережно видаляємо гребінку та клейку стрічку. Кювету з гелем помістили в камеру для електрофорезу, яка має необхідну кількість 1×TBE з бромистим етидієм в кінцевій концентрації 0,5 мкг/мл. [27]

Наступним кроком є підготовка до електрофорезу зразків досліджуваної ДНК, тобто змішування з буфером для нанесення (5:1). Далі обережно вносимо в лунку досліджувану та маркерну ДНК (CSL-MDNA-100BP). Для підвищення точності визначення розміру фрагменту ДНК, маркерну ДНК

вносять з обох боків від досліджуваної. В нашому випадку, необхідно перевірити чи вдалося виділити ДНК з біологічного матеріалу, тому в гель з бромідом вносимо 20 нанограмів проби ДНК. Для візуалізації продуктів ПЛР використовують 20 мікролітрів проби ДНК. Підключаємо електроди горизонтальної камери для електрофорезу до джерела живлення та виконуємо електрофоретичне розділення фрагментів ДНК при градієнті напруженості 1-3 В на 1 см гелю протягом 1 год.

Для аналізу результатів необхідно вийняти шпателем агарозний гель, перенести його на транслюмінатор та в ультрафіолетовому світлі проаналізувати результати розділення фрагмента з ДНК.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Результати моніторингу SEV на коропових господарствах центральної частини України

SEV-специфічні послідовності ДНК були виявлені в 2-х досліджених рибних господарствах Київської та Черкаської областей (табл. 3.1.). Слід також зазначити, що для виділення ДНК окрім зябер використовувалися також пули органів (нирки, мозок, селезінка), тоді як вірус уражує переважно зябра і найбільше в них накопичується [4], що може впливати на недостатню концентрацію вірусу у зразках, для його ідентифікації.

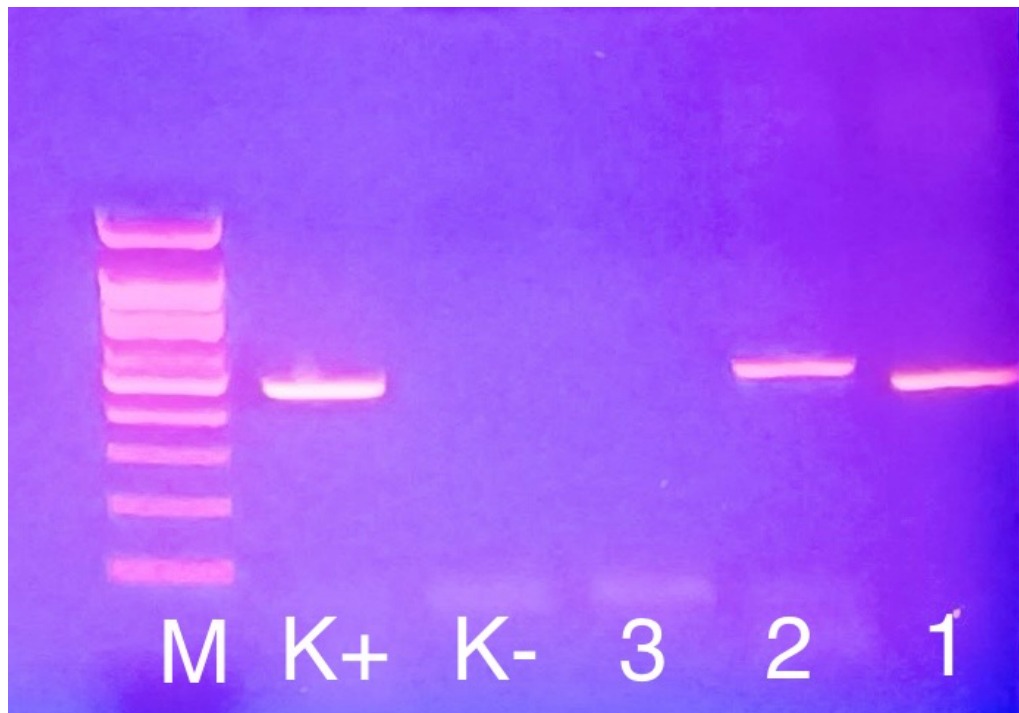


Рис. 3.1. Електрофореграма ПЛР з продуктами гену 4а (коровий білок), розмір очікуваного продукту – 478 bp:
М - маркер ДНК (100 bp); 1 - зразок «Bila Tserkva fish farm»; 2 – зразок «Zhashkiv fish farm»; 3 – зразок «Poltavarybgosp»; K⁺ - позитивний контроль; K⁻ - негативний контроль.

Таблиця 3.1.

Детальний опис відібраних зразків коропа звичайного (*Cyprinus carpio*)

№	Назва господарства	Дата відбору зразків	Назва риби	Вік особин	Симптоми	Летальність, %	ПЛР крок 1	ПЛР крок 2	Наявність інших вірусів
1	«Bila Tserkva fish farm», Київська область	03/2024	Короп	1+	Млявість та сонна поведінка	10-15	-	+	Ні
2	«Zhashkiv fish farm», Черкаська область	04/2024	Короп	1+	Млявість та некроз зябер	20-25	-	+	SVCV
3	«Poltavyrbgosp» Полтавська область	03/2024	Короп	0+	Відсутні	0-5	-	-	Ні

При дослідженні зразків з господарства «Bila Tserkva fish farm» в Київській області SEV-специфічні послідовності ДНК були виявлені у коропа методом ПЛР у другому раунді, що може свідчити про хронічний перебіг хвороби, відповідно до даних наукової літератури [27]. У коропа спостерігали млявість та некроз зябер, летальність складала 10-15%, наявність інших вірусів не підтверджена. При дослідженні зразків з господарства «Zhashkiv fish farm» в Черкаській області SEV-специфічні послідовності ДНК були виявлені у коропа методом ПЛР також у другому раунді, що може свідчити про хронічний перебіг хвороби. У коропа спостерігали млявість та типовий симптом у вигляді «запалих очей», летальність складала 20-25%, також було ідентифіковано наявність супутньої інфекції – риба була уражена вірусом весняної віремії коропа (Таблиця 3.1.).

На рисунках 3.2. та 3.3. можна побачити типові симптоми SEV, які ми і спостерігали у коропів з досліджуваних господарств – некроз зябер та «запали очі».



Рис. 3.2. Зображення некрозу зябер коропа, ураженого СЕV, культивованого на господарстві «Віла Тсерква fish farm».



Рис. 3.3. Зображення «запалих очей» у хворого коропа, культивованого на господарстві «Zhashkiv fish farm».

До типових симптомів віспи коропа належать:

- Летаргічна або «сонна» поведінка.
- Бліді, набряклі та некротичні зябра, виразкові ураження та набряк шкіри, «запалі очі» та анорексія.

3.2. Обговорення результатів

У господарстві «Poltavarybgosp» в Полтавській області Carp Edema Virus не був діагностований методом ПЛР, хоч і було помічене підвищення летальності рибної популяції, тому важливо враховувати, це явище може бути викликане широким спектром інфекцій і факторами навколишнього середовища і потребує детальних лабораторних досліджень, обстеження та комплексної оцінки умов аквакультури та якості води. Результати показали, що CEV наявний в зразках з 2-х господарств («Bila Tserkva fish farm» та «Zhashkiv fish farm») з 3-х досліджуваних, що дорівнює 66% від загальної кількості досліджених зразків. Найвищий рівень поширеності виявлено у рибогосподарських підприємствах, які знаходяться поруч з промисловими зонами і можна припустити, що ці господарства мають вищий рівень забруднень у воді.

Крім того, виявлено, що в господарстві «Poltavarybgosp» в Полтавській області, де проводиться регулярна профілактична обробка води сольовими розчинами, Carp Edema Virus не виявлено. Це свідчить про те, що регулярні заходи з профілактики можуть бути ефективними для зниження рівня поширеності вірусу серед коропів у господарствах.

Незважаючи на те, що Carp Edema Virus не є небезпечним для людей, його наявність в рибах може призвести до значних втрат для коропових господарств через зменшення виробничого потенціалу. Тому дослідження виявлення Carp Edema Virus є важливим для забезпечення безпеки рибного господарства та збереження його економічної стійкості.

Загальні результати досліджень свідчать про те, що забезпечення якості води та профілактичні заходи є ключовими факторами для зниження ризику поширення Carp Edema Virus серед коропів у господарствах.

Дослідження показали, що CEV є поширеним вірусом серед коропів у господарствах центральної частини України. Виявлення вірусу може мати

кореляцію з рівнем забруднення води та може призвести до втрат для господарств через зменшення виробничого потенціалу.

SEV-інфекція є руйнівною для організму коропа та призводить до величезних матеріальних збитків і додатково загрожує як постачанню продовольства, так і навколишньому середовищу. Тому вкрай важливо знайти альтернативні методи, які не тільки запобігають поширенню SEV, але й повністю знищують цей вірус в інфікованій рибі. Carp edema virus наразі вивчений недосконало, тому необхідні подальші дослідження для повного розуміння механізмів SEV, що дозволить просунутися в розробці ефективних експрес методів для якісного та кількісного визначення SEV. Згодом це допоможе швидко виявити та запобігти SEV у диких популяціях кої та звичайного коропа. SEV демонструє клінічні ознаки, подібні до клінічних ознак у риб, хворих на KHV [1]. Тому, часом навіть професійні співробітники можуть поставити хибний діагноз, якщо вони не застосовують методи молекулярної діагностики.[34].

Для уникнення розповсюдження SEV та профілактики вірусної інфекції у риб слід враховувати певні фактори: потрібно контролювати температуру води, потенційно інфіковану рибу варто утримувати після карантину в окремих резервуарах, щоб уникнути поширення вірусу [45]. У разі легких інфекцій, (0,3-0,5% летальності) з максимальним обмеженням 3% можна застосовувати метод соляних ванн з подальшим регулярним моніторингом [24]. Хоча лікування сольовим розчином зменшує осмотичний стрес, уповільнюючи поширення вірусу, воно не гарантує ліквідації вірусу в рибному поголів'ї [29]. Досить важливими профілактичними заходами залишаються проморожування, висушування та дезінфекція дна водойми [20]. Риб також необхідно регулярно перевіряти на наявність вторинної інфекції або звичайних паразитів, адже є дані про те, що SEV може спричиняти імуносупресію, внаслідок чого короп уражується вторинними інфекціями.

Якість води чи ненайважливішим параметром, який необхідно перевіряти постійно, включаючи рівень рН, розчинений кисень, а також нітрати, нітроти

та аміак [21]. Гігієнічний догляд за резервуарами, аераторами та їх фільтрами також необхідний, оскільки вони можуть бути місцем розмноження для звичайних патогенів. Слід уникати перегодовування, щоб запобігти агрегації вторинних інфекційних агентів із залишків їжі, що потрапили на дно акваріуму або ставка, що також впливає на якість води. Уникнення надмірних запасів — ще одна потенційна стратегія запобігання вірусним інфекціям. Для успішного лікування захворювання необхідно добре розуміти збудника в таких аспектах, як механізм зараження, філогенетичний статус, чутливість до антибіотиків, антимікробних пептидів і природних молекул.

Результати досліджень Carp Edema Virus у коропових господарствах центральних областей України підкреслюють важливість проведення профілактичної обробки водойм від вірусів. Профілактична обробка водойм від вірусів є ефективним інструментом для зниження ризику поширення інфекцій серед рибного поголів'я. Цей процес включає в себе застосування різних стратегій, таких як:

Очищення та дезінфекція водойм: проведення регулярних заходів щодо очищення та дезінфекції води може знизити концентрацію вірусів і забруднюючих речовин[35].

Моніторинг якості води: регулярний контроль якості води дозволяє вчасно виявляти забруднення та інші небезпеки, які можуть спричинити поширення вірусів [36].

Для зниження чисельності і концентрації інфекційних збудників в водоймах в рибних господарствах рекомендується використовувати водний розчин солі (NaCl). Рекомендується використовувати чисту, не йодовану кухонну сіль або морську сіль без додаткових хімічних домішок. 5%-ний розчин кухонної солі, діє як гіпертонічний засіб стосовно тканинних рідин організму риб, а також виявляє лікувальну та загальну стимулюючу дію.

Піддавати профілактичній обробці слід рибу усіх видів та вікових груп, які вирощуються у господарстві:

плідники - перед нерестом;

молодняк - під час пересадки у літньо-маточні стави;

однорічки - під час пересадки у нагульні стави;

усю рибу восени.

Сольові ванни для обробки коропа та білого амура застосовують за температури води 6-17°C, для білих і строкатих товстолобиків - не вище 15°C. Також необхідно забезпечити належну аерацію водойми під час обробки. Це допоможе розподілити сіль рівномірно та гарантуватиме необхідний рівень кисню для риб.

Обробка за вищих температур може призвести до загибелі риби, а проведення її за низької температури не дає потрібного ефекту - більшість збудників залишаються живими. За концентрації 5% тривалість обробки сольових ванн - 5 хв. У разі зниження концентрації тривалість обробки відповідно зростає. Після внесення розчину необхідно уважно спостерігати за поведінкою та станом риби. Якщо наявні ознаки стресу або погіршення стану (наприклад, млявість, утруднене дихання), необхідно припинити обробку і знизити концентрацію солі шляхом часткової заміни води. [33]

Результати проведеного дослідження щодо моніторингу Carp Edema Virus (CEV) у рибогосподарських підприємствах центральної частини України показали наявність цього патогену у двох з трьох досліджуваних господарств, в Київській та Черкаській областях. Це свідчить про значне поширення вірусу у регіоні, що має суттєві наслідки для галузі рибництва.

Виявлення CEV у 66,7% досліджених господарств є тривожним сигналом. Вірус віспи коропа (Carp Edema Virus) є небезпечним патогеном, який може призводити до значних втрат серед коропа, особливо серед молодих особин. Це може спричинити економічні втрати через зниження продуктивності та необхідність вжиття заходів для боротьби з інфекцією.

Результати дослідження можуть вказувати на кілька ключових факторів, що сприяють поширенню CEV:

1. Відсутність належних заходів біобезпеки: недотримання санітарно-гігієнічних норм та заходів біобезпеки може сприяти поширенню вірусу між господарствами.
2. Переміщення риби: транспортування риби між господарствами без належного контролю може бути джерелом поширення інфекції.
3. Відсутність моніторингу: нестача регулярного моніторингу та своєчасного виявлення інфекцій може призводити до їх поширення.

Для зниження ризику подальшого поширення CEV необхідно впровадити ряд заходів:

1. Покращення біобезпеки: господарства повинні впроваджувати строгі заходи біобезпеки, включаючи контроль доступу, дезінфекцію обладнання та транспортних засобів, а також проведення санітарних заходів.
2. Розширення моніторингу: регулярний моніторинг рибогосподарських підприємств допоможе вчасно виявляти та контролювати спалахи CEV.
3. Освіта та підвищення обізнаності: власники та працівники рибогосподарських підприємств повинні бути поінформовані про ризики та методи профілактики CEV.

Проведене дослідження підкреслює необхідність удосконалення підходів до контролю та профілактики Carp Edema Virus у рибогосподарських підприємствах центральної частини України. Виявлення вірусу у більшості досліджених господарств вказує на необхідність негайних дій для запобігання подальшому поширенню інфекції та мінімізації її негативного впливу на рибну галузь.

Отже, можна дійти висновку, що хоч вірус віспи коропа і можна контролювати в умовах рибного господарства (шляхом регулювання температури води та додавання NaCl), проте жоден з вищеперерахованих методів не ліквідує вірус, а лише пригнічує його активність. Саме тому

важливо рухатись в напрямку створення вакцини від вірусу віспи коропа, яка унеможливить інфікування коропа цим вірусом.

На сьогодні риба забезпечує близько 20% тваринного білка для 3 млрд людей. Взявши до уваги досвід найбільш розвинених країн світу Україна формує нові засади розвитку вітчизняної аквакультури. Саме запровадження новітніх високотехнологічних форм аквакультури у поєднанні з регулярним проведенням тестування на наявність вірусів та створення ефективних методів специфічної профілактики вірусних інфекцій є запорукою її успіху.

ВИСНОВКИ

1. Проведено дослідження методом ПЛР на наявність Carp Edema Virus у трьох корошових господарствах центральних областей України.
2. Встановлено, що Carp Edema Virus наявний у 2 з 3 досліджених корошових господарств - Bila Tserkva fish farm та Zhashkiv fish farm, у інфікованих риб спостерігались такі симптоми як: некроз зябер та млявість/сонна поведінка.
3. Визначено, що у більшості особин коропа з неблагополучних щодо CEV господарствах («BilaTserkva fish farm» та «Zhashkiv fish farm») на момент дослідження був хронічний перебіг хвороби.
4. Виявлено, що 2 корошових господарства, які є CEV-позитивними, знаходяться в безпосередній близькості до промислових зон, що може впливати на якість води, а відтак і на загальну гігієну водойм та здоров'я коропа. Отже, виявлення вірусу може мати кореляцію з рівнем забруднення води.
5. Показано, що профілактична обробка водойм, контроль за водним середовищем та дотримання правил гігієни в рибництві значно знижують ризик інфікування коропа.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Divya Pragyana, Vertika Bajpai, Kirity Suman, Jyotirmaya Mohanty and Pramoda Kumar Sahoo - *A review of current understanding on carp edema virus (CEV): A threatful entity in disguise.*
2. Hosoya H. *Effect of NaCl solution bath to a disease of juvenile color carp accompanied by mass mortality, arising at rainy season*
3. Ono SI, Nagai A, Sugai N. *A histopathological study on juvenile color carp, Cyprinus carpio, showing edema. Fish Pathology.* 1986;
4. Verena Jung-Schroers, Mikolaj Adamek, Felix Teitge, John Hellmann, Sven Michael Bergmann, Heike Schütze, Dirk Willem Kleingeld, Keith Way, David Stone, Martin Runge, Barbara Keller, Shohreh Hesami, Thomas Waltzek, and Dieter Steinhage - *Another potential carp killer?: Carp Edema Virus disease in Germany.*
5. Haenen OLM, Way K, Stone D, Engelsma MY. *Koi Sleepy Disease (KSD) door' Carp Edema Virus': eerste detectie in Nederlandse koi. Aquacultuur.* 2013
6. Pretto T, Abbadi M, Panzarin V, Quartesan R, Manfrin A, Toffan A. *Carp edema virus (CEV): first detection in Italy. In: 17th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, Abstract and poster.* 2015
7. Vesely T, Pokorova D, Reschova S, Piackova V. *Detection of carp edema virus in common carp (Cyprinus carpio) and koi in the Czech Republic. In 17th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, Abstract and poster.*
8. Yuriy Rud, Olga Zaloilo, Leonid Buchatsky, Marek Matras, Dieter Steinhagen, Mikolaj Adamek - *Carp edema virus in Ukraine*
9. *Handbook of European Freshwater Fishes* by Maurice Kottelat, Jörg Freyhof
10. Dong et al – 2015 - *Journal of Fish Diseases*

11. *PCR–RFLP analysis of the mitochondrial ND-3/4 and ND-5/6 gene polymorphisms in the European and East Asian subspecies of common carp (Cyprinus carpio L.)* Riho Gross , Klaus Kohlmann , Petra Kersten
12. *Mitochondrial DNA analysis reveals cryptic large-scale invasion of non-native genotypes of common carp (Cyprinus carpio) in Japan* – K. Mabuchi, H. Senou
13. Berg, L.S., 1949, *Freshwater Fishes of the U.S.S.R and Adjacent Countries.*
14. Z. Ziafati Kafi, H. Najafi, M. Alishahi, H. Rahmat, A. Ghalyanchilangeroudi - *Detection and phylogenetic analysis of carp edema virus in common carp (Cyprinus carpio) in Iran;*
15. O. Pybus, A.J. Tatem, P. Lemey - *Virus evolution and transmission in an ever more connected world*
16. *Carp edema virus a rising threat to global carp population* - Xolani Phaya, Jing-Xiang Zhou, Zhuo Yu Wang, Hao Wang, Jie Liang
17. Aslam, Z., (2005). *Flavobacterium granuli sp. nov., isolated from granules used in a wastewater treatment plant.*
18. M. Adamek, F. Teitge, I. Baumann, V. JungSchroers, S.M. Bergmann, M. Ganter, D. Steinhagen - *Koi sleepy disease as a pathophysiological and immunological consequence of a branchial infection of common carp with carp edema virus.*
19. M. Baud, L. Pallandre, F. Almeras, L. Maillet, D. Stone, L. Bigarré - *Genetic diversity of the carp oedema virus in France*
20. Z. Dong, N.H. Nguyen, W. Zhu - *Genetic evaluation of a selective breeding program for common carp Cyprinus carpio conducted from 2004 to 2014*
21. Lovy, S.E. Friend, L. Al-Hussinee, T.B. Waltzek - *First report of carp edema virus in the mortality of wild common carp Cyprinus carpio in North America*
22. R.P. Hedrick, D.B. Antonio, R.J. Munn - *Poxvirus like agent associated with epizootic mortality in juvenile koi (Cyprinus carpio)*
23. M. Adamek, F. Teitge, D. Steinhagen - *Quantitative diagnostics of gill diseases in common carp: not as simple as it seems*

24. K. Way, O. Haenen, D. Stone, M. Adamek, S.M. Bergmann, L. Bigarre, N.D. Iserens, M. El-Matbouli, M.C. Gjessing, V. Jung, T. Waltzek - *Emergence of carp edema virus (CEV) and its significance to European common carp and koi Cyprinus carpio*
25. Т. Полтавченко – *Водні біоресурси України*
26. С. Тарасюк, О. Васильченко, Ю. Глушко – *Молекулярна біотехнологія*
27. Ю. П. Рудь, О. В. Залоїло, Л. П. Бучацький, І. І. Грициняк - *ВПЛИВ ЗМІНИ КЛІМАТУ НА ІНФЕКЦІЙНІ ЗАХВОРЮВАННЯ РИБ*
28. О.М. Олещук, А.Є. Мудра, Н.Б. Зозуляк – *ПЛР-діагностика: принципи, досягнення, перспективи*
29. *World Development Report: 2013*
30. *The European Commission – 2019*
31. Ю. П. Рудь, Л. П. Бучацький, Н. Й. Тушницька, І. І. Грициняк – *Молекулярна діагностика вірусних хвороб риб*
32. Y. Rud, O. Zaloilo, L. Buchatsky, I. Hrytsyniak – *The impact of climate change on fish infectious diseases.*
33. Гриневич Н.Є., Слюсаренко А.О., Хом'як О.А., Присяжнюк Н.М., Михальський О.Р., Трофимчук А.М., Жарчинська В.С., Павуско З.А., - *Іхтіопатологія*
34. Buchatskyi, L.P., Rud, Yu.P. Zaloilo, O.V., Zaloilo, I.A. (2018) – *сучасні методи біотехнології в рибництві*
35. OIE Aquatic Animal Health Code (the 22nd edition of the Aquatic Code 2019) - *WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2019*
36. Rud, Yu.P., Buchatskyi, L.P. (2016) – *молекулярне визначення інфекційних захворювань риб*
37. World Bank. *Fish to 2030: Prospects for Fisheries and Aquaculture* (English). Agriculture and Environmental Services Discussion Paper
38. Ashraf, U., Lu, Y., Lin, L., Yuan, J., Wang, M., Liu, X. (2016) - *Spring viraemia of carp virus: recent advances.*

39. Lee, C.-S., & O'Bryen, P. J. (2003). *Biosecurity in aquaculture production systems: World Aquaculture Society*.
40. Lovy, J., Friend, S., Al-Hussinee, L., & Waltzek, T. (2018). *First report of carp edema virus in the mortality of wild common carp *Cyprinus carpio* in North America. Diseases of aquatic organisms*
41. Stevens, B. N., Michel, A., Liepnieks, M. L., Kenelty, K., Gardhouse, S. M., Groff, J. M., Waltzek, T. B., & Soto, E. (2018). *Outbreak and Treatment of Carp Edema Virus*.
42. Reverter, M., Sarter, S., Caruso, D. et al. *Aquaculture at the crossroads of global warming and antimicrobial resistance // Nat Commun*. 2020. V.11. P. 1870. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15735-6>
43. Mallick A., Panigrahi A.K. *Effect of temperature variation on disease proliferation of common fishes in perspective of climate change // International Journal of Experimental Research and Review*. 2018. Vol. 16. P. 40–49.
44. Kumar, V., Roy, S., Barman, D. and Kumar, A. *Immunoserological and molecular techniques used in fish disease diagnosis: A mini review // International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*. 2014. V.1(3). P. 111–117
45. Zrnčić S, Oraić D, Zupčić IG, et al. *Koi herpesvirus and carp edema virus threaten common carp aquaculture in Croatia // J Fish Dis*. 2020. P. 1–13. <https://doi.org/10.1111/jfd.13163>
46. Leung, T. L. F. & Bates, A. E. *More rapid and severe disease outbreaks for aquaculture at the tropics: implications for food security // J. Appl. Ecol*. 2013. V.50. P. 215–222.
47. Perry, A. L., P. J. Low, J. R. Ellis, and J. D. Reynolds. *Ecology: climate change and distribution shifts in marine fishes // Science*. 2005. V.308. P. 1912–1915.
48. Brander, K. M. *Global fish production and climate change // Proc. Natl. Acad. Science U S A* 2007

49. Gallana, M., Ryser-Degiorgis, M. P., Wahli, T. Segner, H. *Climate change and infectious diseases of wildlife: altered interactions between pathogens, vectors and hosts* // *Current Zoology*. 2013. V.59. P. 427–437
50. Ficke A.D., Myrick C.A. & Hansen L.J. *Potential impacts of global climate change on freshwater fisheries* // *Rev. Fish Biol. Fish.* 2007. V. 17 (4). P. 581.