

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДНІПРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНО-ЕКОНОМІЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ

Біотехнологічний факультет
Спеціальність 207 Водні біоресурси та аквакультура
Другий (магістерський) рівень вищої освіти

Допускається до захисту:
Завідувач кафедри
водних біоресурсів та аквакультури,
д. б. н., проф. _____ Роман НОВІЦЬКИЙ
«_____» _____ 2023 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на здобуття освітнього ступеня «Магістр» на тему:

**Інфекційні захворювання коропових риб в акваріумальному
комплексі фізичної особи Олега Дерези м. Дніпро**

Здобувач
другого (магістерського)
рівня вищої освіти _____ Олег ДЕРЕЗА

Керівник
кваліфікаційної роботи,
д. біол. наук, проф. _____ Роман НОВІЦЬКИЙ

Дніпро–2023

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДНІПРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНО-ЕКОНОМІЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ

Біотехнологічний факультет
Спеціальність 207 «Водні біоресурси та аквакультура»
Кафедра водних біоресурсів та аквакультури
Освітній ступінь – «Магістр»

Затверджую:

Завідувач кафедри
водних біоресурсів та аквакультури,
д. б. н., проф. _____ Роман НОВІЦЬКИЙ
“ _____ ” _____ 2023 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломну роботу здобувачу вищої освіти

Олегу Дмитровичу ДЕРЕЗИ

Тема роботи: **Інфекційні захворювання коропових риб в
акваріумальному комплексі фізичної особи Олега Дерези м.**

Дніпро

Затверджена наказом по університету від “ 20 ” 11. 2023 р. № 3524

1. Термін здачі здобувачем завершеної роботи - грудень 2023 р.
2. Вихідні дані до роботи: Вивчали епізоотичне благополуччя територій на інфектопатологію коропа, ПЛР-діагностику, клінічні ознаки, ефективність лікування.
3. Короткий зміст роботи – перелік питань, що розробляються в роботі: вступ, огляду літератури, матеріал, умови та методики виконання роботи, результати власних досліджень, охорона навколишнього середовища, охорони праці та безпеки в надзвичайних ситуаціях, висновки та пропозицій, список літературних джерел.
4. Перелік графічного матеріалу: таблиць – 1; рисунків – 6.

5. Консультанти по проекту (роботі), із зазначенням розділів проекту, що їх стосуються

Розділ	Консультант	Підпис, дата	
		завдання видав	Завдання прийняв
Охорона праці та безпека у надзвичайних Ситуаціях			

6. Дата видачі завдання _____

Керівник _____ Роман НОВІЦЬКИЙ
(підпис)

Завдання прийняв до виконання _____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Термін виконання етапів роботи	Примітка
1.	Мета і задачі роботи	березень 2023 р.	
2.	Матеріал, мета та методика досліджень	квітень 2023 р.	
3.	Вивчення сучасного стану епізоотичного благополуччя коропів	травень 2023 р.	
4.	Проведення лабораторної діагностики	червень-серпень 2023 р.	
5.	Написання роботи згідно встановлених вимог	вересень-листопад 2023р.	
6.	Підготовка та оформлення доповіді на захист	грудень 2023 р.	
7.	Попередній захист на кафедрі	грудень 2023 р.	

Здобувач
другого (магістерського) рівня вищої освіти _____ Олег ДЕРЕЗА

Керівник кваліфікаційної роботи _____ Роман НОВІЦЬКИЙ

АНОТАЦІЯ

дипломної роботи на здобуття освітнього ступеня другого рівня «Магістр»
здобувача вищої освіти II курсу кафедри водних біоресурсів та аквакультури
денної форми навчання біотехнологічного факультету ДДАЕУ

Олега Дмитровича ДЕРЕЗИ

на тему: **Інфекційні захворювання коропових риб в акваріумальному
комплексі фізичної особи Олега Дерези м. Дніпро**

Дипломна робота представлена на 55 сторінках машинописного тексту, має 1 таблицю, 6 рисунків, список використаної літератури налічує літературних джерел.

Дипломна робота висвітлює 6 основних розділів. Перший розділ вступ, який висвітлює актуальність теми, мету і поставлені задачі.

У другому розділі нами висвітлено сучасний аналіз літературних джерел щодо змін інфектопатології в галузі аквакультури.

У третьому розділі визначено матеріал і методика досліджень, а також наведено нашу схему досліду та умови проведення досліджень.

Власні дослідження, представлені результатами досліду зразків з коропових господарств, лабораторних методів діагностики захворювання представлені в четвертому розділі.

У п'ятому розділі наведено показники економічної ефективності проведених досліджень.

Матеріали шостого розділу дипломної роботи визначені з охорони праці та безпеки в надзвичайних ситуаціях.

ЗМІСТ

ВСТУП	6
1. СУЧАСНИЙ АНАЛІЗ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ ЩОДО ЗМІН ІНФЕКТОПАТОЛОГІЇ В ГАЛУЗІ АКВАКУЛЬТУРИ	10
2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ.....	28
3. ВЛАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	29
3.1. Дослідження зразків з коропових господарств.....	29
3.2. Лабораторні методи діагностики захворювання	41
4. ЕКОНОМІЧНА ЕФЕКТИВНІСТЬ ПРОВЕДЕНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	47
5. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА БЕЗПЕКА В НАДЗВИЧАЙНИХ СИТУАЦІЯХ.....	49
5.1. Дослідження стану охорони праці на виробництві	49
5.2. Вимоги безпеки праці під час виконання роботи	49
5.3. Рекомендації щодо забезпечення безпеки та поліпшення умов праці на виробничих ділянках.....	49
5.4. Дії у надзвичайних ситуаціях.....	50
ВИСНОВКИ І ПРОПОЗИЦІЇ	51
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	52

ВСТУП

Вірус набряку коропа (CEV) – є небезпечним збудником і серйозною проблемою для культури цієї риби. Сонливість кої спровокована патологією зябер, спричиненою зараженням вірусом набряку коропа. Це порушує дихальну, видільну та осморегуляторну функції зябер, що призводить до зниження оксигенації крові та збільшення вмісту CO₂. Це компенсується переходом від кисневозалежного до кисневозалежного метаболізму та обмеженням росту риб, що виражається у зниженні вмісту лимонної кислоти та нуклеотидів у крові.

Підвищена втрата іонів через пошкоджені зябра викликає гіпонатріємію та гіпокальціємію. Подальше пошкодження клітин ініціює гіперкаліємію. Порушення секреції аміаку викликає гіперамоніємію. Це призводить до зупинки розпаду амінокислот і посилення циклу сечовини, викликаючи збільшення вмісту амінокислот, сечовини та сечової кислоти в крові. Гіпонатріємія та гіперамоніємія можуть бути пов'язані з надходженням води в мозок та імуносупресією, яка проявляється як зниження експресії cd4, casp9, tcr a2 у зябрах і нирках та igtm у зябрах.

Актуальність теми. Зараження зябер звичайного коропа (*Surginus carpio*) поксвірусом під назвою вірус набряку коропа (CEV) стало серйозною проблемою для культури цієї риби. Інфекція пов'язана з гіпертрофією і проліферацією гіллястих епітеліальних клітин, оклюзією міжгаберних внутрішньопластинкових просторів і злиттям вторинних пластинок. Реплікація вірусу в основному виявляється в тканині зябер, а не в інших тканинах коропа, що призводить до патологічних змін, які здебільшого відбуваються в цьому органі. Це робить інфекцію CEV потенційною моделлю для вивчення патологічних ефектів гілкового захворювання у риб.

Географічне розділення культури коропа призвело до існування щонайменше двох відмінних геногруп (I та II) вірусу; звичайні коропи в Європі та Північній Америці заражені геногрупою I, тоді як геногрупа II,

швидше за все, зустрічається в кої з Азії, які поширені по всьому світу завдяки торгівлі декоративною рибою. У ході зараження обома геногрупами у риб може розвинути хвороба з дуже характерними змінами поведінки, демонструючи поступово зростаючу млявість, що призводить до того, що вони лежать на одному боці тіла на дні акваріуму або ставка. Через таку поведінку хвороба називається «сонною хворобою кої» (KSD).

У коропа, ураженого КСД, спостерігаються патологічні зміни зябрової тканини, що може свідчити про порушення дихання. Однак звичайний короп, який страждає від нестачі кисню, часто орієнтується на поверхню води, хапаючи повітря, а не лежить на дні акваріума. Атлантичний лосось, *Salmo salar* і райдужна форель *Oncorhynchus mykiss*, які страждають на амебну хворобу зябер (AGD), викликану амебою *Neoparamoeba perurans*, відчувають патологічні зміни в зябрах, які можна порівняти з тими, що спостерігаються у коропа, ураженого КСД. Вони включають гіперплазію епітеліальних клітин зябрових ниток, інфільтрацію запальних еозинофілів і подальше зменшення функціональної області зябру. Спочатку вважалося, що захворювання зябер, такі як AGD і KSD, спричиняють дихальну недостатність, що підтверджується спостереженням млявості та респіраторного дистресу у хворих риб. Для атлантичного лосося та райдужної форелі гіпотеза про дихальну недостатність як фізіологічний механізм, відповідальний за смертність, пов'язану з AGD, досі не підтверджена. Вважалося, що це пояснюється значною резервною дихальною здатністю у риб, яка може реагувати на гіпоксичні умови шляхом модуляції перфузії зябрових пластинок за допомогою гіпервентиляції і серцево-судинних коригувань. Лососеві, уражені AGD, також демонстрували зниження рН крові (ацидоз) і гіпертензію крові, викликану підвищеним системним опором судин, що було пов'язано з порушенням виведення CO₂. Зменшення плавальної активності, що спостерігається у лососевих, уражених AGD, вважалося комбінованим ефектом зменшення площі поверхні зябер і серцево-судинного компромісу, поміченого в уражених особин.

Однак функції зябер не обмежуються диханням. Зябра також відповідають за іонний баланс і видалення метаболічних відходів катаболізму амінокислот. Нещодавно Chang et al. показали, що патологія, пов'язана з AGD, призвела до змін у морфології та розподілі хлоридних клітин у зябрах атлантичного лосося. Гіперплазія базального епітелію під час прогресування інфекції AGD збігалася з помітним зменшенням кількості Na⁺/K⁺-ATPase позитивних хлоридних клітин і експресії мРНК гена, що кодує цей фермент. Це свідчить про порушення осморегуляторної здатності зябер, уражених AGD. Серйозне порушення осморегуляції також вважалося можливою причиною смерті звичайного коропа, хворого на герпесвірусну хворобу кої (KHVD), спричинену інфекцією карпових герпесвірусом 3 (CyHV-3), і могло бути запропоновано як потенційна причина смертності при КСД також. Було показано, що клінічні ознаки КСД можна вилікувати, тримаючи уражену КСД рибу у воді, що містить 0,5% хлориду натрію.

Дивно, але у риб вплив захворювання зябер на виділення аміаку мало вивчений. Це вважається ще однією важливою функцією зябер, яка може впливати на поведінку та виживання риби. Останнім часом було показано, що інтоксикація зовнішнім аміаком пригнічує вроджений імунітет (розпізнавання патогенів, лізоцим, фагоцитарну та активність комплементу), а також може впливати на склад імуноглобулінів. Ці результати свідчать про те, що порушення секреції аміаку в зябрах, викликане інфекцією, може мати імунологічне значення, яке досі не було досліджено.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було проаналізувати інфекційні захворювання коропових риб в акваріумальному комплексі фізичної особи Олега Дерези м. Дніпро на прикладі вірус набряку коропа (CEV).

Відповідно до поставленої мети вирішувалися наступні *завдання*:

- проаналізувати літературні джерела для написання огляду літератури та визначити актуальність та новизну досліджень;
- провести науковий дослід з вивчення діагностики захворювання риб;

- провести біометричну обробку отриманих даних;
- зробити висновки згідно отриманих результатів досліджень.

Об'єкт і предмет дослідження

Об'єктом досліджень виступали коропи внутрішньопородного типу української лускатої породи.

Предметом досліджень були Вірус набряку коропа (CEV) внутрішньопородного типу української лускатої породи, клінічні ознаки захворювання, рівень захворюваності, летальності, епізоотичне благополуччя України, ПЛР-діагностика хвороби.

1. СУЧАСНИЙ АНАЛІЗ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ ЩОДО ЗМІН ІНФЕКТОПАТОЛОГІЇ В ГАЛУЗІ АКВАКУЛЬТУРИ

(огляд літератури)

Вірус набряку коропа (SEV) був вперше виявлений в Японії в 1970-х роках, де він викликав спалахи захворювання, що супроводжувалося високою смертністю серед молоді *Cyprinus carpio* різновиду кої (Murakami, Shitanaka, Toshida, & Matsuzato, 1976). Останніми роками SEV було виділено в Японії з кої, які проявляють сонливість, і це захворювання було названо сонною хворобою кої (KSD). У Європі, у роки після його визначення в Японії, були відзначені випадки KSD у звичайного коропа, а також у кої (Way & Stone, 2013). Під час ПЛР-обстеження SEV у Польщі в 2015–2017 роках інфекцію було виявлено на багатьох фермах у клінічних і безсимптомних випадках у обох сортів коропа (Matras et al., 2017). Незважаючи на те, що вірус присутній в аквакультурі протягом багатьох років, все ще недостатньо знань про фактори передачі вірусу. Його вектори ще не з'ясовані; наприклад, інші види риб, що містяться разом з коропом. Розуміння шляхів, які призвели до передачі вірусу через весь вид *Cyprinus carpio*, є важливим елементом у запобіганні поширенню SEV/KDS. Спосіб горизонтальної передачі вірусів риб може бути прямим (від риби до риби) або переносником, причому основним абіотичним переносником є вода. Проте, гіпотетично, живі переносники, наприклад інші види риб, паразитичні безхребетні та рибоїдні птахи та ссавці, також можуть брати участь у передачі. У доступній літературі бракує публікацій про потенційну роль інших видів риб, які зазвичай утримуються разом із коропом у ставках, як переносників інфекції SEV. Роль різних видів риб як векторів передачі вірусу добре відома у випадках вірусу вірусної геморагічної септицемії (VHSV) та вірусу інфекційного гематопоетичного некрозу (IHNV) (Європейське агентство з безпеки харчових продуктів (EFSA) 2008; Olesen & Vestergård Jørgensen, 1982; Peters & Neukirch, 1986; Bootland & Leong, 1999), і ці знання поступово поширюються на інфекцію, спричинену герпесвірусом кої (KHV) (Bergmann et al., 2009; Kempter et al., 2009; Minamoto et al., 2010), але таких

знань про роль живих переносників інфекції CEV немає. Краще розуміння механізмів передачі сонної хвороби кої є важливим, а знання живих переносників буде корисним для заходів, спрямованих на обмеження поширення вірусу.

Угорщина є важливим виробником коропа з інтенсивними торговими відносинами з фермами в інших районах виробництва коропа в Європі. Коропів у Європі нещодавно виявили інфікованими вірусом набряку коропа (CEV), поксвірусом, який викликає синдром сонної хвороби кої (KSD). Вмираючий короп був зібраний з 17 рибних господарств і рибальських ставків у різних регіонах Угорщини. Гістологічний аналіз зябер цих коропів виявив проліферацію міжшарового епітелію та інфільтрацію еозинофільними клітинами. У 13 із 17 із цих коропів ДНК CEV була виявлена за допомогою КПЦР, а у семи риб — більше 1×10^4 копій послідовностей ДНК, специфічних для вірусу, на 250 нм ДНК, що можна вважати клінічно значущим і причиною захворювання. Філогенетичний аналіз послідовностей показав, що всі три геногрупи CEV були присутні в угорському звичайному коропі, причому геногрупа I була найпоширенішою. Ці результати підтверджують гіпотезу про тривалу присутність CEV у популяціях європейських коропів і припускають, що попередні спалахи KSD не реєструвалися або неправильно діагностувалися. Отже, тестування коропа та КУО на інфекцію CEV слід включити до програм спостереження за захворюванням, щоб запобігти подальшому поширенню цього захворювання.

Вірус набряку коропа (CEV) є збудником сонної хвороби кої (KSD), серйозного захворювання зябер, яке вражає звичайного коропа *Cyprinus carpio* та його декоративну різновид кої. Після нещодавнього виявлення вірусу в різних країнах світу KSD став новою глобальною хворобою коропа. Однак поширеність інфекції в популяціях коропа в певному географічному регіоні не була повністю вивчена. У цьому повідомленні повідомляється про розслідування присутності CEV у популяціях коропа та кої в Німеччині. З цією метою зразки зябер, зібрані у популяції коропа та кої, які страждають на

захворювання зябер, або зібрані для планової перевірки стану їх здоров'я, перевірялися на наявність SEV за допомогою ПЛР. Загалом у 2015 та 2016 роках було досліджено 651 зразок риби з 401 коропа або кої, додатково 118 зразків з попередніх досліджень були включені до експертизи. SEV був виявлений в архівних зразках коропа, датованих 2007 роком, і в зразках кої, датованих 2009 роком. З 2015 по 2016 рік SEV був виявлений у 69% випадків у популяціях коропа, досліджених з основних районів вирощування коропа в Німеччині, і у 41% досліджених випадків з популяцій кої з усієї Німеччини. Клінічний KSD відбувався в основному з квітня по червень у популяціях коропа при температурі води від 8 до 12 °C і в популяціях кої при температурі води від 18 до 22 °C. Більшість риб із клінічно уражених популяцій коропа чи кої містили високі вірусні навантаження понад 10 000 копій SEV-специфічної ДНК на 250 нг ДНК, тоді як зябра риб інших видів риб зі ставків, включаючи золоту рибку, білого амура та європейського окуня, виявили SEV негативний або містив низьке вірусне навантаження. Філогенетичний аналіз виявив наявність кількох варіантів SEV з геногрупи I у коропа та геногрупи II у популяціях кої в Німеччині. Генетично ідентичні ізоляти геногрупи I були виявлені у коропа з різних географічних місць Німеччини та інших європейських популяцій коропа. Деякі німецькі варіанти геногрупи II були ідентичні варіантам, раніше зареєстрованим у кої в азіатських та інших європейських країнах. Наведені тут дані показують, що SEV дуже поширений у німецьких популяціях звичайного коропа та кої та передбачає поширення цього вірусу через інтенсивну торгівлю звичайним коропом та кої без необхідних заходів для зменшення ризику. Оскільки зараження цим вірусом може спричинити серйозне захворювання, діагностику SEV слід включити до програм спостереження за станом здоров'я та моніторингу захворювання.

Звичайний короп, *Cyprinus carpio*, є важливою рибою для внутрішньої аквакультури та іхтіофауни Європи та Азії (ЕС, 2012). Його кольоровий різновид, кої, також дуже популярний як декоративна рибка. Німеччина є одним з найбільших виробників звичайного коропа в континентальній Європі,

а також є важливим ринком для декоративної риби. Незважаючи на свою популярність, звичайний коропа страждає від кількох проблем зі здоров'ям, спричинених інфекційними агентами, які серйозно впливають на виробництво та торгівлю коропом. Серед цих хвороб герпесвірусна хвороба кої (KHVD), спричинена інфекцією карповидного герпесвірусу 3 (CyHV-3), вважалася найбільшою загрозою для коропа та кої протягом приблизно 20 років (МЕБ, 2019). Ризик занесення цієї інфекції в поголів'я коропа вважався настільки серйозним, що Всесвітня організація охорони здоров'я тварин (МЕБ, 2019) класифікувала цей патоген як хворобу, що підлягає повідомленню. Однак зосередження уваги на CyHV-3 могло призвести до ігнорування інших вірусних патогенів протягом багатьох років, прикладом чого є вірус набряку коропа (CEV).

CEV є ДНК-вірусом, що належить до родини *Rohoviridae*. В основному він інфікує зябра звичайного коропа та його декоративного різновиду, кої (Adamek, Oschilewski, et al., 2017; Ono et al., 1986), викликаючи гіпертрофію клітин гілкового респіраторного епітелію, злиття вторинних зябрових пластинок, набряк зябер і некроз зябер (Adamek, Oschilewski та ін., 2017; Miyazaki та ін., 2005). Вважається, що ці патологічні зміни викликають респіраторний дистрес і летаргічну поведінку з наступною смертю внаслідок аноксії (Miyazaki et al., 2005). Окрім летаргії, уражену рибу часто можна побачити лежачою на дні акваріуму на одній стороні тіла (Adamek, Oschilewski та ін., 2017). Тому хвороба називається «сонною хворобою кої» (KSD). Цікаво, що клінічні ознаки та смертність можна запобігти та зменшити шляхом додавання солі у воду для зберігання (Miyazaki et al., 2005). Спалахи захворювання зі значною смертністю (до 80%) спостерігалися в популяціях кої при температурі 15-25 °C, тоді як хвороба була описана у звичайного коропа при нижчому діапазоні температур від 6 до 9 °C. C (Way et al., 2017).

KSD, викликаний інфекцією CEV, спочатку був виявлений у популяції кої в Японії в 1970-х роках (Murakami et al., 1976). Відтоді вірус був виявлений у декоративних кої та коропа в Північній Америці (Hedrick та ін., 1997; Lovy

та ін., 2018), у багатьох європейських країнах, включаючи Великобританію (Way & Stone, 2013), Нідерланди та Франція (Haenen та ін., 2016 ; Haenen та ін., 2014), Австрія (Lewisch та ін., 2015), Німеччина (Jung-Schroers та ін., 2015), Польща (Matras та ін., 2017), Угорщина (Adamek та ін., 2018), Чехії та Словаччини (Matějčková та ін., 2020), Сербії (Radosavljević та ін., 2018), Італії (Marsella та ін., 2021) та Хорватії (Zrnčić та ін., 2020), а також в Азії, крім Японії та Китаю (Luo et al., 2020 ; Zhang et al., 2017), Індії (Swaminathan et al., 2016) і Таїланду (Pikulkaew et al., 2020). Незважаючи на те, що вірус присутній у європейських популяціях кої та коропа, його поширеність і вірулентність недостатньо вивчені. SEV не реплікується в жодній із стандартних культур клітин, що використовуються для виявлення вірулентних вірусів коропа, а методи на основі ПЛР для виявлення вірусоспецифічної ДНК усіх генетичних варіантів були розроблені лише нещодавно (Adamek, Matras та ін. , 2017 ; Matras та ін., 2017). Таким чином, у попередні роки кілька спалахів захворювань у популяціях коропа, пов'язаних з патологією зябер, залишалися нез'ясованими та ймовірно могли бути спричинені SEV. Таким чином, у цьому дослідженні коропів і кої з усієї Німеччини, які страждають на захворювання з патологією зябер, яка не була пов'язана з відомим вірусним патогеном, зокрема з інфекцією СуНВ-3, бактеріальними або паразитарними патогенами, було перевірено на наявність SEV. Крім того, до обстеження були включені зразки популяцій коропа та кої, надані для планового медичного огляду без будь-яких ознак захворювання. Додаткову інформацію про випадки, включаючи спостережувані ознаки захворювання, смертність або температуру води, запитували у формі опитування.

Спочатку повідомлялося, що SEV походить від різних популяцій декоративних кої в Японії (Ono et al., 1986 ; Oyamatsu et al., 1997), США (Hedrick et al., 1997) і в кількох європейських країнах (Way et al. , 2017). Однак нещодавно цей вірус був ідентифікований у популяціях коропа, вирощеного на фермах, у Китаї, головному світовому виробнику коропа (Luo та ін., 2020 ; Zhang та ін., 2017), а також у кількох великих європейських виробників, таких

як Польща (Matras). та ін., 2017), Угорщини (Adamek, Baska та ін., 2018), Чеської Республіки та Словаччини (Matějčková та ін., 2020), Сербії (Radosavljević та ін., 2018), Італії (Marsella та ін., 2021), Хорватії (Zrnčić та ін., 2020) та Німеччини (Bachmann & Keilholz, 2016). За винятком Японії, де присутність SEV більш інтенсивно вивчалася на фермах у кількох регіонах країни (Oyamatsu et al., 1997), інші звіти описують спалахи захворювання в одній популяції або в обмеженій кількості популяцій, і не включають оцінку поширення та впливу інфекції на вирощування коропа чи торгівлю кої. Дане дослідження охоплює приблизно 651 зразок риби, що походить із загального 401 випадку, наданого для діагностики захворювання протягом періоду приблизно. два роки з регіонів по всій Німеччині. Наявність SEV-специфічної ДНК була підтверджена в значній частині цих зразків. Незважаючи на те, що зразки не були зібрані відповідно до скоординованого плану, результати підкреслюють, що SEV присутній у багатьох популяціях як кої, так і вирощеного коропа по всій Німеччині. Крім того, аналіз архівних зразків коропа з попередніх досліджень щодо присутності СуHV-3 або зразків декоративних кої, підозрюваних на інфікування СуHV-3, показав, що SEV вже був присутній у популяціях коропа чи кої в Німеччині кілька разів. років до того, як його вперше виявили в 2014 році (Jung-Schroers et al., 2015). Важливо, що вірус був виявлений у зразках зябер кої або коропа, зібраних під час підозрілих спалахів КHVVD, які були визнані негативними на СуHV-3. Оскільки SEV і СуHV-3 викликають подібні клінічні ознаки проліферативного захворювання зябер, наші результати показують, що в деяких випадках інфекцію SEV можна було сплутати з КHVVD, спричиненою СуHV-3-інфекцією (Adamek et al., 2019).

Скринінг більшої кількості зразків, зібраних протягом двох наступних років (2015–2016), також дав певні ознаки сезонного характеру присутності SEV-інфекції та захворювання, пов'язаного з цим збудником. Зокрема, у коропа, вирощеного на фермах, SEV часто виявляли у зразках, поданих навесні та на початку літа, протягом квітня – червня, а другий пік припадав на жовтень

та листопад. Це співвідноситься зі спостереженнями на фермах щодо подій смертності в популяціях коропа в цю пору року, що відбуваються в кінці періоду сплячки та ранньої фази зростання, коли температура води підвищується (Bachmann & Keilholz, 2016; Way & Stone, 2013 ; Zrnčić) . та ін., 2020). У багатьох випадках етіологія цих «зимових вбивств» або «весняних втрат» досі залишалася невиясненою, зокрема тому, що інфекцію CyHV-3 або весняну вірусемію коропа (SVCV) можна було виключити (Zrnčić et al., 2020). Важливо, що скринінг архівних зразків синдрому весняної смертності коропа (SCMS), описаного у Великобританії в 1980-х і 1990-х роках, показав високу поширеність CEV (Way et al., 2017) . Крім того, у Нідерландах випадки SCMS були пов'язані з CEV (Haenen et al., 2016). Завдяки поточним результатам гіпотеза про те, що інфекція CEV може сприяти невирішеним втратам навесні, додатково підтверджується спостереженням, що більшість клінічних випадків, пов'язаних з CEV, спостерігалися в популяціях коропа при температурі від 8 до 12 °C. Цю температуру води часто вимірюють у коропових ставках у Німеччині у квітні та на початку травня, коли відбуваються ці випадки смертності.

На відміну від двофазної моделі CEV-позитивних випадків на коропових фермах навесні та восени у декоративних кої, CEV-позитивні зразки були в основному виявлені в зразках, поданих з квітня по серпень. Більша частка позитивних зразків спостерігалася в квітні, але інфекція також регулярно виявлялася в зразках, поданих у період з травня по липень. Коли враховували інформацію про температуру води під час відбору проб, клінічне захворювання, пов'язане з інфекцією CEV, виникало у декоративних кої частіше при температурі води від 18 до 22°C, яку вимірюють у ставках у Німеччині на початку літа. Таким чином, ці дані свідчать про те, що клінічні прояви захворювання, пов'язані з інфекцією CEV, відбуваються у коропа при нижчій температурі порівняно з декоративними кої. Це може бути пов'язано з біологічними відмінностями між варіантами CEV геногрупи I, які в основному виявляються у вирощеного коропа (Way et al., 2017), та ізолятами геногрупи

П, які в основному реєструються у декоративних коі (Way et al., 2017).). Однак у цьому дослідженні жодного зразка коропа не було подано протягом липня, а кілька зразків лише у серпні. На відміну від цього, протягом 2017 і 2020 років у кількох популяціях коропа в Саксонії також спостерігалися втрати, пов'язані з SEV (Беттчер, особисті спостереження). Ці особисті спостереження та виявлення SEV у двох зразках у серпні, які в цьому дослідженні були зібрані від клінічно ураженого коропа, вказують на те, що вирощений короп також може бути клінічно інфікований SEV при вищій температурі. На відміну від аквакультури коропа, більшість коі продають для зариблення садових ставків наприкінці весни, на початку літа. Тому розвиток клінічної картини захворювання може спостерігатися частіше в цей період. Однак, щоб з'ясувати сезонну появу захворювання, пов'язаного з SEV, потрібен буде систематичний збір зразків. Подібним чином будуть потрібні подальші експериментальні дослідження, щоб проаналізувати кореляцію між температурою та реплікацією, а також вірулентністю SEV з різних геногруп, оскільки цей аспект неможливо перевірити виключно на основі польових зразків.

У популяціях обох різновидів звичайного коропа клінічні ознаки, пов'язані з інфекцією SEV, включали патологію зябер, як-от набряк зябер і некроз зябер, апатію та анорексію. У цьому дослідженні також повідомлялося про інші клінічні ознаки у хворих коропів, вирощених на фермах, або декоративних коі. Тим не менш, вони не були суттєво пов'язані з наявністю інфекції SEV. У популяціях коропа або коі з високим вірусним навантаженням клінічні ознаки та смертність спостерігалися у більшій частині риби. На відміну від популяцій із менш ніж 10^3 SEV-специфічними копіями ДНК, де клінічні ознаки захворювання були зареєстровані лише в невеликій частині зразків, популяції, які були ПЛР-позитивними з копіями вірусу 10^4 і вище, страждали від клінічного захворювання або смертність більшою мірою. Зокрема, у коропа, вирощеного на фермах, розвиток хвороби був пов'язаний із високим навантаженням SEV-специфічних ДНК-последовностей у зябрах. Тому, зокрема у коропа, SEV слід розглядати як основну причину

захворювання. Ця точка зору підтверджується результатами попередніх експериментальних інфекцій, проведених Oyamastu et al. (Oyamatsu et al., 1997) і Adamek et al. (Adamek, Oschilewski та ін., 2017). В обох дослідженнях клінічне захворювання та смертність могли бути викликані у неактивних зразків шляхом внутрішньочеревної ін'єкції зябрового гомогенату хворих зразків або спільного проживання з хворим коропом. Ці експериментальні дослідження також підкреслили, що коропа або декоративні кої, які страждають на інфекцію SEV, були сприйнятливі до вторинних інфекцій патогенними бактеріями, такими як флавобактерії (Adamek, Teitge та ін., 2018). Однак, коли бактеріальна інфекція була очищена за допомогою лікування антибіотиками, клінічне захворювання, спричинене SEV, також не могло бути ліквідовано (Adamek, Teitge та ін., 2018). Це підкреслює вірулентність інфекції SEV для коропа та декоративних кої. Для того, щоб зрозуміти важливість інфекції SEV для вирощування коропа та поширення цього патогену в популяції коропа, потрібне систематичне дослідження.

У європейській аквакультурі коропа риба різних видів місцевої рибної фауни мігрує у виробничі ставки чи водойми для зимівлі або вирощується в полікультурі з коропом. Сюди входять види карпових, такі як лин (*Tinca tinca*), товстолоб (*Hypophthalmichthys nobilis*) або білий амур (*Ctenopharyngodon idella*), краснопінка (*Scardinius erythrophthalmus*) і плотва (*Rutilus rutilus*), а також європейський окунь (*Perca fluviatilis*), судак (*Sander lucioperca*) або північна щука (*Esox lucius*). Крім того, золота рибка (*Carassius auratus*) і золотий язв (*Leuciscus idus*) часто продаються разом з кої та містяться як декоративні риби в садових ставках. Експериментальні дослідження раніше підтвердили, що клінічно уражені кої або звичайний коропа здатні передавати інфекцію наивному коропу шляхом спільного проживання (Adamek, Oschilewski та ін., 2017). Це може припустити, що клінічно уражені кої або коропа виділяють інфекційні частинки вірусу, які, у свою чергу, можуть передати інфекцію також зразкам інших видів риб. У поточному дослідженні зразки зябер різних видів риб, які мешкали в одній водоймі з клінічно

ураженими кої або коропом, були проаналізовані на наявність SEV-специфічних послідовностей ДНК. У цих зразках ДНК SEV або не було знайдено, або було виявлено лише низьку кількість копій. Порівнянні результати були отримані в масштабному експериментальному дослідженні (Matras et al., 2019), в якому рибу різних видів риби утримували разом із коропом, позитивним за ПЛР на SEV. У цьому попередньому дослідженні у зразках зябер також було виявлено відсутність або дуже низький рівень SEV-специфічної ДНК (рівні Cq від 34 до 43) (Matras et al., 2019). Крім того, SEV-специфічну ДНК не вдалося виявити у зразках зябер різних видів риб із природного озера в Міннесоті, США, де спостерігалася пов'язана з SEV смертність коропа (Tolo et al., 2021). ДНК SEV також не вдалося виявити у зразках зябер інвазивного круглого бичка (*Neobobius melanostomus*) з різних місць у Польщі та Німеччині (Jin et al., 2020). Зокрема, результати дослідження Матраса (Matras et al., 2019) і наявні дані свідчать про те, що SEV в першу чергу інфікує коропа та кої і що реплікація вірусу, швидше за все, не відбувається в інших видах риб. Таким чином, згідно з нашою оцінкою, риба інших видів, ніж короп, може відігравати лише незначну роль у поширенні SEV через пасивну передачу вірусу.

Порівняння нуклеотидних послідовностей фрагмента гена P4a SEV, ампліфікованого ПЛР, використаного в цьому дослідженні, показало, що кої та короп були ПЛР-позитивними для різних генетичних варіантів SEV, як було встановлено в попередніх дослідженнях (Matras et al., 2017; Way та ін., 2017). Загалом, дві геногрупи SEV зі значним ступенем генетичної різниці 6–10% між лініями були виявлені у кої та коропа (Matras та ін., 2017; Way та ін., 2017). Ізоляти кої та коропа, отримані в нашому дослідженні, можна розділити на ці дві основні геногрупи, в яких можна розпізнати кілька генетичних варіантів. Згідно з попередніми дослідженнями, ізоляти німецького вірусу з кої, кластеризовані з генетичними варіантами SEV геногрупи II, з кої та коропа з Азії та ізоляти з вирощеного коропа, кластеризовані з варіантами геногрупи I. Варіанти геногрупи I раніше були знайдені в Європі вирощували коропа, але

також повідомлялося у водах США (Lovy та ін., 2018 ; Padhi та ін., 2019). Нещодавно була запропонована додаткова геногрупа III для ізолятів CEV з Австрії (Soliman et al., 2019). У поточному аналізі жоден із ізолятів не був класифікований до запропонованої геногрупи III. Крім того, ми не змогли відтворити результати Soliman et al. (Соліман та ін., 2019). Однак, як уже описано Zrnčić et al. (Zrnčić et al., 2020), ми виявили, що для послідовностей, які належать до новопропонованої геногрупи III і депоновані в GenBank, нуклеотидні послідовності були введені в зворотному порядку. Таким чином, існування запропонованої геногрупи III є сумнівним і має бути підтверджено секвенуванням інших більших фрагментів геному CEV.

Було показано, що торгівля декоративною рибою є суттєвим фактором поширення інших заразних рибних вірусів до Європи. Імпортні віруси були пов'язані з епізоотіями важкої смертності, наприклад CyHV-3 у кої в кількох європейських країнах (Haenen та ін., 2004), Cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) у золотих рибок у Німеччині та Нідерландах (Adamek та ін., 2017; Ito та ін., 2017) або інфекційний вірус некрозу селезінки та нирок (ISKNV) у кількох видів декоративних риб у Німеччині (Jung-Schroers та ін., 2016). При детальному розгляді варіантів CEV, виділених у кої та коропа в цьому дослідженні, було виявлено, що кілька варіантів геногрупи II згруповані разом з ізолятами, зареєстрованими у кої в Японії чи Китаї. Наш філогенетичний аналіз показав, що ізоляти з того самого варіанту або з близькоспоріднених варіантів були раніше зареєстровані у кої також у Польщі, Великобританії чи Угорщині. У дослідженні CEV-позитивні кої були виявлені в запасах декоративної риби оптових і роздрібних торговців. Крім того, у попередньому дослідженні CEV геногрупи II було виявлено у восьми з 12 партій кої з Азії, головним чином у зразках без клінічних ознак (Adamek et al., 2016). Це підкреслює, що припущення про те, що CEV може поширюватися через торгівлю кої, є правильним, і що ці ізоляти представляють азіатські варіанти, які імпортуються до Європи, включаючи Німеччину, через міжнародну торгівлю кої. Подальші варіанти геногрупи II були зареєстровані в кількох непов'язаних випадках у

різних регіонах по всій Німеччині, а також у Великобританії та Польщі протягом усього періоду дослідження. Наявність ізолятів одного генетичного варіанту у кої з різних географічних місць і протягом різних років свідчить про те, що ці випадки пов'язані між собою імпортом з тих самих джерел в Азії або внутрішньоєвропейськими торговими відносинами.

Варіанти CEV з геногрупи I наразі обмежені популяціями вирощеного коропа в Європі (Zrnčić та ін., 2020), за винятком кількох випадків, коли ізоляти геногрупи I були зареєстровані у звичайного коропа у водах США (Lovy та ін., 2018 ; Падхі та ін., 2019). Це може бути пов'язано з тим, що короп був завезений в США з Німеччини в 19 столітті. Геногрупа CEV I могла бути інтродукована в той час або під час кількох пізніших інтродукція звичайного коропа з Європи до США (Lovy et al., 2018). Філогенетичний аналіз ізолятів CEV геногрупи I з коропа, отриманих у цьому дослідженні, показав, що генетично ідентичні ізоляти були отримані з популяцій коропа в різних регіонах Німеччини та з коропа в кількох європейських країнах, таких як Польща, Великобританія чи Угорщина (Adamek, Baska та ін., 2018; Matras та ін., 2017; Way та ін., 2017). Наявність ідентичних ізолятів у цих різних випадках свідчить про те, що ці випадки можуть бути пов'язані, найімовірніше, через торговельні відносини між розводниками коропів та поширення за відсутності програм спостереження за вірусними інфекціями для цих партій.

Тим часом, важче співвіднести конкретні варіанти CEV із подіями смертності в популяціях кої чи коропа. Наприклад, ізолят KSD-178-16 з геногрупи II викликав високу захворюваність і смертність. Однак він поділився послідовністю з кількома ізолятами з 2010 по 2016 роки з різних регіонів Німеччини, з яких повідомлялося про низьку захворюваність і смертність. Подібним чином ізоляти KSD 118-16 і KSD-122-16 викликали високу смертність у популяціях коропа в Саксонії та Тюрінгії, тоді як додаткові ізоляти з ідентичною послідовністю нуклеотидів не були пов'язані з серйозними клінічними ознаками. Це свідчить про те, що більш серйозні клінічні ознаки не можуть бути спричинені певними варіантами з підвищеною

вірулентністю, але можуть бути спричинені всіма варіантами CEV залежно від конституції риби та умов утримання. Донедавна була відома нуклеотидна послідовність короткого сегмента гена, що кодує р4а, і її можна було ампліфікувати та вирівняти в поточному дослідженні. Тим часом стали доступними великі частини повної послідовності генома ізоляту CEV з кої (Mekata et al., 2021), які можна було використати для більш ретельного аналізу генів, які, можливо, сприяють вірулентності. Крім того, смертність також може залежати від генетичного складу популяції коропа (Adamek, Oschilewski та ін., 2017) або зараження додатковими патогенами (Adamek, Teitge та ін., 2018). Експерименти зі співжиттям CEV-інфікованого коропа з наивним коропом різних штамів продемонстрували, що CEV може передаватися від хворого до раніше неінфікованого коропа та може викликати важке захворювання у зразків певних штамів (Adamek, Oschilewski та ін., 2017) , тоді як інші штами були набагато менш сприйнятливі до розвитку захворювання. Це також було показано для інших вірусів у звичайного коропа, включаючи СуHV-3 і SVCV (Adamek, Matras, et al., 2019; Dixon et al., 2009; Piačková et al., 2013). Тим не менш, CEV слід розглядати як серйозний інфекційний агент, а не умовно-патогенний мікроорганізм, що вражає ослаблені зразки.

Дані цього повідомлення показують відносно високу присутність CEV у популяціях кої та коропа в різних регіонах Німеччини та що інфекція може бути пов'язана зі спалахами важкої хвороби. В даний час KHVD, викликана СуHV-3, вважається найнебезпечнішим патогеном для коропа (МЕБ, 2019). Згідно з офіційною статистикою Федерального науково-дослідного інституту здоров'я тварин (Friedrich-Loeffler-Institut) у Німеччині, у 2015 та 2016 роках було зареєстровано 67 та 53 спалахи KHVD відповідно (TSIS-TierSeuchenInformationsSystem, 2021). Незважаючи на те, що дані про присутність CEV у кої та коропа в цьому дослідженні були зібрані на іншій основі, ніж записи в офіційній статистиці щодо захворювання, яке підлягає повідомленню, дані можуть свідчити про подібне широке поширення CEV та СуHV-3 у коропа. і популяції кої в Німеччині. З іншого боку, результати зі

Сполученого Королівства показують набагато вищу присутність СуHV-3 порівняно з CEV у звичайному коропа (Сапо та ін., 2021). У Хорватії, як наслідок заходів щодо пом'якшення наслідків, зосереджених на СуHV-3, цей патоген був успішно ліквідований у популяціях коропа, тоді як CEV наразі спричиняє смертність хорватських запасів коропа (Zrnčić та ін., 2020). Єдиним позитивним фактом для KSD є легкість лікування клінічних ознак цього захворювання у декоративних риб шляхом додавання у воду солі. На жаль, такий підхід неможливо реалізувати при інтенсивному вирощуванні коропа у великих ґрунтових водоймах чи природних озерах. Крім того, це може призвести до стійких субклінічних інфекцій, які можуть збільшити поширення вірусу. Однак наразі не з'ясовано, чи зберігається CEV в інфікованих зразках або як інфекція залишається в популяціях. Ці проблеми необхідно досліджувати в експериментальних дослідженнях і шляхом уважного спостереження за постраждалими польовими популяціями.

Зразки риби, спочатку зібрані місцевими ветеринарами на фермах для вирощування звичайного коропа та коропа кої в Польщі між 2013 і 2015 роками в рамках програми спостереження за KHV, коли температура води була між 16 і 26 °C, а також були перевірені на CEV за допомогою qPCR. Частковий 478-нуклеотидний фрагмент гена 4a згодом був створений із 17 зразків qPCR-позитивних коропів *Syringus carpio* з 36 ферм, протестованих протягом періоду. Вирівнювання та аналіз послідовностей виявили присутність CEV у Польщі як у звичайного коропа, так і на фермах коропа кої, а філогенетичний аналіз розподілив польські послідовності CEV на три різні геногрупи. Лінія, яка включає оригінальні послідовності, отримані від коропа кої в Японії (геногрупа II), включала послідовності як коропа кої, так і коропа звичайного, а друга лінія (геногрупа I) містила послідовності лише коропа звичайного. Третя лінія (геногрупа III), яка була більш тісно пов'язана з геногрупою II, також складалася з послідовностей лише звичайного коропа. Останній представляє лінію CEV, раніше не описану в літературі.

Під час ПЛР-обстеження CEV у Польщі в 2015–2017 роках вірус було

виявлено на багатьох фермах як у клінічних, так і безсимптомних випадках, а також у коропа кої (*Cyprinus carpio*). Для того, щоб оцінити потенційну роль носія видів риб, які поділяють ті самі місця існування з коропом, було проведено експериментальне випробування. Дослідження проводили на зразках уклейки (*Alburnus alburnus*), карася (*Carassius carassius*), окуня європейського (*Perca fluviatilis*), європейського коропа (*Carassius gibelio*), плотви (*Rutilus rutilus*) і лина (*Tinca tinca*), які мешкали разом із SEV-інфікованим коропом. дали позитивні результати. Ці види риб експериментально співжили з SEV-інфікованим коропом при температурі $16^{\circ}\text{C} \pm 1$. Матеріал із мозку, зябер, селезінки, нирок, кишечника та шкіри досліджували на наявність SEV ДНК. Подібні дослідження були проведені з неінфікованою рибою, призначеною для контролю. Зразки перевіряли на SEV методом КПЦР.

Вірус набряку коропа (SEV) і вірус герпесу кої (KHV) викликають велике занепокоєння у звичайних розводчиків коропів і ентузіастів кої в усьому світі. Віруси викликають захворювання, які мають схожі зовнішні ознаки; таким чином їх важко відрізнити клінічно. У дослідженні автори розробили та оптимізували швидкі та точні одно- та мультиплексні ізотермічні діагностичні інструменти на основі рекомбіназної полімеразної ампліфікації (RPA) для виявлення та диференціації SEV та KHV. Аналіз було об'єднано з вимірювальною смужкою бічного потоку, щоб забезпечити візуальне виявлення продуктів ампліфікації та спростити аналіз після ампліфікації. Обидва аналізи SEV- і KHV-RPA були специфічними для цільового вірусу. Нижні межі виявлення аналізів були подібні до встановлених діагностичних ПЛР-тестів на віруси. Метод підготовки зразків був оптимізований, щоб усунути потребу в повній екстракції ДНК із тканин риби. Орієнтовний час виконання цих аналізів RPA від отримання зразка до отримання результату становить 50 хвилин у порівнянні з 10 і 7 годинами для тестів SEV- і KHV-PCR відповідно. Аналіз можна проводити в польових умовах, щоб покращити скринінг риби та зменшити поширення цих вірусів і, таким чином, покращити

промисловість звичайного коропа та кої.

Звичайний короп (*Cyprinus carpio*) є дуже важливим видом риби для тепловодної аквакультури в Україні. Усі коропові ферми підлягають програмі спостереження на наявність герпесвірусу кої (KHV), який спричиняє смертельну хворобу під назвою герпесвірус кої (KHVD). Однак немає спостереження за іншими важливими вірусними патогенами, такими як вірус набряку коропа (CEV), збудник сонної хвороби кої (KSD). Під час регулярного тестування в рамках програми епіднадзора ХВД ми одночасно досліджували зразки на CEV. Скринінг вказав на можливі спалахи ХВД та КСД. Протягом 2017 року KHV спалахнув на ізольованій території, і незабаром після цього була успішно виконана програма з ліквідації KHV. Однак протягом 2018 і 2019 років навесні в озерах у південній частині України відбулося ще дві смертності. Зразки з обох подій виявилися позитивними на CEV. Епідеміологічне розслідування підтвердило занесення в одне з озер інфікованих коропів із зараженої ферми. Щоб запобігти поширенню CEV у відкритих водоймах, надзвичайно важливо запровадити тестування CEV перед переміщенням риби або проводити регулярне тестування всіх коропових ферм в країні для визначення поширеності CEV з метою впровадження заходів контролю.

Звичайний короп (*Cyprinus carpio* Linnaeus) представляє найважливіший вид риби для тепловодної аквакультури в Україні; це традиційна харчова риба в деяких частинах країни, а також важливий економічний актив для риболовлі та рибальства (Piria et al., 2016). Усі коропові ферми розташовані в північній частині країни, що належить до вододілу Дунаю, тоді як південна частина, карстовий регіон, що належить до вододілу Адріатичного моря, характеризується гірськими річками, а короп живе лише в природних або штучних озерах (Mrakovčić et al., 2006). Рибалки контролюють більшість штучних озер і дуже часто заселяють штучні та природні озера, а також відкриті води звичайним коропом з аквакультурних об'єктів у північній частині країни. Усі коропові ферми підлягають національній програмі нагляду, спрямованій на виявлення присутності вірусу герпесу кої (KHV) відповідно до

Директиви Ради 2006/88/ЕС (Анон, 2006). Крім цієї програми, не існує скоординованого нагляду за іншими вірусними патогенами, важливими для виробництва коропа.

Герпесвірусна хвороба кої (KHVD) є смертельною хворобою звичайного коропа та його декоративного різновиду кої (МЕБ, 2019). Він викликається ДНК-вірусом із сімейства *Alloherpesviridae*, позначеним як *Cyprinid herpesvirus 3* (СуHV-3) на основі філогенетичного порівняння з іншими герпесвірусами карпових (Waltzek et al., 2005). Після першого повідомлення наприкінці 1990-х років він поширився по всьому світу, головним чином через торгівлю коропами кої (Hedrick та ін., 2000), і спричинив величезні економічні втрати (Haenen, Way, Bergmann, & Ariel, 2004; Steinhagen, Jung, Schroers, & Adamek, 2016). Температура води від 18 до 28 °C дозволяє розвиватися KHVD, і хворі зразки коропа демонструють зміну кольору, збільшення частоти дихання, набряки, бліді, плямисті, некротичні зябра та ураження шкіри (Pokorova, Vesely, Piacikova, Reschova, & Hulova, 2005). Хоча Хорватія була оголошена вільною від KHVD у 2015 році (Анон, 2015), ізольований спалах цієї хвороби стався на двох фермах і в двох ставках у 2016 році, як буде показано в цій статті та як було представлено раніше на конференції EAFP у Белфасті, Північна Ірландія (Zrnčić et al., 2017).

В останні роки вірус набряку коропа (CEV), який раніше описувався як причина високої смертності молоді коропа кої лише в Японії (Murakami, Shitanaka, Toshida, & Matsuzato, 1976), став важливим збудником декоративних кої та звичайного коропа. у багатьох європейських країнах, а саме у Великобританії (Way & Stone, 2013), Нідерландах і Франції (Haenen, Way, Stone, & Engelsma, 2014), Австрії (Lewisch, Gorgoglione, Way, & El-Marboui, 2015), Німеччина (Jung-Schroers та ін., 2015), Польща (Matras та ін., 2017), Угорщина (Adamek, Baska, Vincze, & Steinhagen, 2018) і Сербія (Radosavljevic, Adamek, Miličević, Maksimović-Zorić, & Steinhagen), 2018). За межами Європи, окрім ендемічної хвороби в Японії (Oyamatsu, Hata, Yamada, Sano, & Fukuda, 1997), повідомлялося про спалахи коропа кої в Індії (Swaminathan et al., 2016

), Китаї (Zhang et al., 2017) і Південної Кореї (Kim et al., 2018), а також від коропа кої та звичайного коропа в Сполучених Штатах Америки (Lovy, Friend, Al-Hussinee, & Waltzek, 2018; Padhi et al., 2019).

Вірус водянки коропа є ДНК-вірусом з родини *Rovviridae*. Вірус викликає гіпертрофію епітеліальних клітин вторинних пластинок зябер (Way et al., 2017), злиття зябрових пластинок, некроз і набряк зябер. Вважається, що інфекція призводить до утрудненого дихання та супутньої летаргічної поведінки з наступною смертю внаслідок аноксії (Miyazaki, Isshiki, & Katsuyuki, 2005). Уражені риби часто мляві, лежать на дні акваріуму (Adamek, Oschilewski та ін., 2017; Lewisch та ін., 2015). Таким чином, хвороба була названа як сонлива хвороба кої (KSD). Очевидними ознаками захворювання є бліді набряклі зябра, набряк тіла, енофтальмія, анорексія, виразка навколо рота та основи плавника, а також запалення анального отвору (Haenen та ін., 2016; Jung-Schroers та ін., 2015). Претто та ін. (2015) спостерігали також надмірне утворення слизу на зябрах і шкірі. Спалахи захворювання відбувалися у кої восени та навесні в діапазоні температур від 15 до 25°C, тоді як спалахи у звичайного коропа в основному реєструвалися при нижчих температурах від 6 до 9°C (Way & Stone, 2013). Було повідомлено про деякі винятки з цього діапазону температур. Наприклад, хвороба виникла у коропа кої в Нідерландах як при низьких, так і при високих температурах (Haenen et al., 2014).

2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проводилися в умовах акваріумального комплексу фізичної особи О.Д. Дерези.

Науковий дослід проводили у лабораторії, де розташована акваріумна установка за схемою, яка наведена в таблиці 1.

Для досліду відібрали за принципом аналогів 50 особин коропа внутрішньо породного типу української лускатої породи середньою вагою майже 50 г і розташували по 10 особин в двох акваріумах об'ємом 250 л кожний.

У період підготовчого періоду терміном сім діб, риба знаходилася в однакових умовах. В акваріуми вода надходила через дихлоратор. Водобмін кожного акваріуму складав 20 л/годину.

Проведено науковий дослід з вивчення діагностики захворювання риб (рис. 1), біометричну обробку отриманих даних за загальноприйнятою методикою (Zar, 2010).

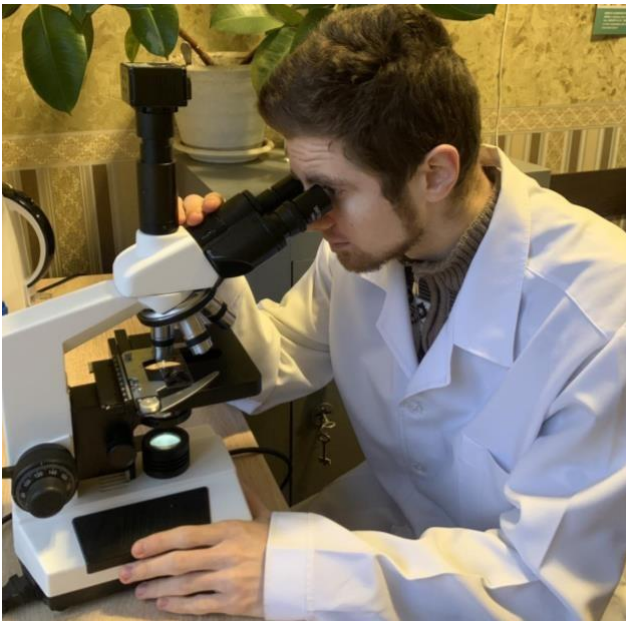


Рис. 1. Робота з отриманими зразками: а) проведення мікроскопії; б) робота з посівним матеріалом в ламінарній шафі

3. ВЛАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1. Дослідження зразків з корошових господарств

Зразки, використані в цьому дослідженні, були зібрані з усіх корошових ферм України в рамках національної програми нагляду в період з 2021 по 2022 роки. Крім того були зібрані зразки зі спалахів смертності. Програма нагляду за КНУ у сприйнятливих видів риб, спрямована на моніторинг територій, вільних від КНУД, і якомога раніше виявлення присутності КНУ є офіційною щорічною програмою, яка реалізується Міністерством аграрної політики та продовольства України, Держпродспоживслужби України. Це базується на наказі «Про заходи щодо захисту здоров'я тварин від інфекційних і паразитарних хвороб» і «Програмі нагляду та ліквідації герпесвірусу кої у сприйнятливих видів риб», які проводяться щорічно. Відповідно до вищезазначених нормативних документів уповноважені ветеринарні лікарі проводять клінічний огляд на всіх корошових фермах по всій країні, який передбачає відбір зразків. Ці зразки склалися з 30 особин *S. carpio* та кросу *S. carpio* × *Carassius auratus*, якщо вони були присутні. Зразки були відібрані з різних ставків на фермі в теплий період року, коли температура води коливалася від 20 до 28 °С, а потім були надані в Держпродспоживслужбу України, Державний науково-дослідний інститут лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи в умовах охолодження.

Незважаючи на те, що вірус набряку коропа поширився на фермах, які вирощують кої та звичайного коропа, по всій Європі, а спалахи були зареєстровані в багатьох сусідніх країнах, не було підтвердження присутності вірусу на корошових фермах України.

Вірусні захворювання є найбільшою загрозою для інтенсивної аквакультури. Зараження коропа двома вірусами з великим геномом ДНК, КНУ і СЕУ, здається, є найсерйознішим ризиком для аквакультури звичайного коропа в Європі (Steinhagen et al., 2016; Way et al., 2017). Враховуючи економічне значення аквакультури звичайного коропа в Україні, ми досліджували наявність цих двох вірусів у національних аквакультурних

об'єктах і у відкритих водах. Незважаючи на те, що ці віруси широко поширені в європейській аквакультурі, їх порівняльна поширеність була менш добре вивчена, головним чином через відсутність діагностичних засобів для виявлення SEV. Цей вірус не росте в будь-якій звичайно використовуваній лінії клітин. Крім того, методи виявлення на основі ПЛР були розроблені та опубліковані зовсім недавно (Matras et al., 2017). Це, швидше за все, призвело до помилкового діагнозу епізоотичних подій, спричинених SEV у минулому. Результати нинішнього дослідження показують, що SEV присутній в українській аквакультурі з 2015 року. Дійсно, є ознаки присутності SEV в Європі ще в 1980-х роках, і SEV був пов'язаний із весняною смертю коропа у Великобританії (Вей та ін., 2017). Протягом останнього десятиліття такі події весняної смертності також були відзначені в Україні, і в основному повідомлялося про популяції звичайного коропа зі штучних озер, контрольованих рибалками. Зразки коропа, ураженого цією смертністю, завжди були негативними на KHV та SVCV. Однак через недостатні знання та недоступні діагностичні інструменти для виявлення SEV причини цієї весняної смертності залишилися нез'ясованими (особисті спостереження).

Хоча Україна оголосила статус «вільної від KHV» у 2015 році (Anon., 2015), захворювання, спричинене цим вірусом, виникало у 2016 році, як повідомляється тут. Вірус було виявлено на обмеженій території, що складається з двох ферм, що належать одній власності. На жаль, вірус також поширився на дві маленькі штучні водойми, які контролюють рибалки. Невдовзі після встановлення діагнозу KHV у червні 2016 року програма ліквідації була успішно реалізована на обох фермах і невеликих штучних ставках. На фермі, де загибель почала відбуватися навесні 2021 року, і в двох штучних ставках було вжито негайних заходів з ліквідації. Це включало вилучення риби з наступним осушенням та дезінфекцією ставків. У той час як на другому короповому господарстві роботи з ліквідації були відкладені до 2022 року через необхідність продовження комерційної діяльності та максимального зменшення економічних збитків. Риба, що має комерційну

цінність, була забита на авторизованій бійні та використана для споживання людиною.

Коли для скринінгу SEV використовували зразки з офіційної програми епідагляду за KHV, у деяких зразках було підтверджено наявність коінфекцій KHV і SEV. Виявлення коінфекцій, викликаних цими двома вірусами, може ускладнити діагностику вірусних епізоотій коропа звичайного. Нещодавня публікація про кої припустила, що у випадку спільного зараження декількома патогенами спостережувана смертність окремих риб може бути спричинена не лише взаємодією двох або більше патогенів, але й різними патогенами навіть серед невеликої когорти риб (Адабек, Тейтге та Штайнхаген, 2019). Оскільки SEV та KHV викликають дуже схожі клінічні ознаки, особливо ті, що пов'язані з патологією зябер, можна припустити, що спалахи SEV у минулому не помічалися та приписувалися іншим збудникам, таким як KHV, бактерії та паразити.

Єдиною потенційно корисною клінічною відмінністю між цими двома вірусами є оптимальна температура для спалахів. Спалахи, спричинені SEV геногрупи I, яка зазвичай присутня в культурі європейського коропа, здається, відбуваються переважно при температурі нижче 18°C (Way et al., 2017). Це також вважається найнижчим температурним діапазоном для клінічного спалаху KHV (Pokorova et al., 2005 ; Rakus et al., 2013). Цікаво, що обидва спалахи смертності звичайного коропа через SEV у штучних озерах у південній частині України відбулися під час раптового підвищення температури води у весняні місяці при температурі води 18°C. Незважаючи на те, що не було жодних повідомлень про збільшення смертності чи будь-яких клінічних ознак у коропа з інших ферм, які були визнані SEV-позитивними, слід підкреслити, що ці зразки були зібрані в теплу пору року. На відміну від SEV-позитивних ферм, на фермі, де діагностовано коінфекцію SEV та KHV, підвищена смертність та наявність клінічних ознак, що нагадують KHV, були зареєстровані вже в середині квітня при температурі води 16. °C. На цій фермі всі зразки, зібрані протягом квітня та травня, були KHV- та SEV-негативними,

що є дивовижним результатом, який підкреслює деякі інші причини смертності на початковій фазі спалаху, які можуть схилити рибу до спалаху вірусної хвороби. Однак клінічні ознаки та смертність тривали протягом травня, а зразки, зібрані в середині червня, виявилися KHV-позитивними. Спостерігаючи за схемою захворюваності та смертності, можна припустити, що віруси розмножуються інтенсивніше за оптимального температурного режиму. Таким чином, під час коінфекції при температурах вище 20°C геномне навантаження вірусу було набагато вищим для KHV (Cq 24,70 і 21,52), ніж для CEV (33,89 і 34,61). Навпаки, під час явних клінічних спалахів, пов'язаних із CEV у штучних озерах, значення Cq для CEV були значно нижчими (27,58 і 26,23), що вказує на більш інтенсивну реплікацію вірусу під час нижчих температур води, які, як повідомляється, є оптимальними для вірус різними авторами (Vesely, Pokorova, Reschove, & Piackova, 2015 ; Way et al., 2017). У сусідніх країнах Хорватії, Угорщини та Сербії було виявлено вищі навантаження CEV, що могло бути пов'язане з клінічними спалахами KSD. Крім того, здається, що фактори навколишнього середовища та інші передбачувані патогени можуть заважати та посилювати клінічні ознаки (Adamek et al., 2019). Однак слід провести додаткові дослідження, щоб з'ясувати кореляцію між температурою та реплікацією вірусу у випадку CEV, оскільки це явище не можна перевірити виключно на основі польових зразків. Філогенетичний аналіз показав, що ізоляти обох вірусів, KHV і CEV, з хорватської аквакультури належать до європейських генетичних груп вірусів. Генетичне різноманіття KHV обмежене, і це також було підтверджено для хорватських ізолятів. Усі хорватські ізоляти CEV, подібні до майже всіх ізолятів CEV звичайного коропа в Європі та Сполучених Штатах, належать до геногрупи I. Згідно з нашим аналізом, усі послідовності CEV можна віднести лише до двох геногруп, I та II, з кількома відмінними ознаками в кожній геногрупі. Геногрупа II більш розбіжна і іноді поділяється на геногрупи IIa та IIb (Adamek et al., 2018; Matras et al., 2017). Нещодавно було запропоновано включити ізоляти CEV з Австрії до додаткових геногруп IIIa та IIIb (Soliman,

Lewis, & El-Matbouli, 2019). У поточному аналізі ми не змогли відтворити цей результат. Однак ми помітили, що послідовності, які належать до запропонованої геногрупи III і які були подані до GenBank, показали послідовність нуклеотидів у зворотному порядку, і після зворотного порядку ці послідовності належали до геногруп I та II (рис. 4). Оскільки ми не використовували той самий тип аналізу, який застосовували Soliman et al. (2022), існування геногрупи III має бути додатково досліджено. Тим не менш, філогенетичний аналіз поточного дослідження показав, що може існувати географічний зв'язок між різними ізолятами CEV. Деякі ізоляти з нашого дослідження мають високу схожість послідовностей (до 100%) з ізолятами, що походять із сусідніх країн або навіть із сусідніх регіонів. Крім того, окрім гомології послідовностей ізолятів, наше епідеміологічне дослідження може ймовірно пов'язати смертність CEV у 2022 році (ізолят 41-2022) у штучному озері з переміщенням риби з хорватської коропової ферми (ізолят 153-7-2021) до це штучне озеро (Таблиця 1, рис 1). Це вказує на те, що передача CEV-інфікованої риби є важливим фактором, що сприяє поширенню вірусу.

Водночас важче співвіднести дві різні послідовності ізолятів 79-2021 і 90-2021, отриманих з однієї коропової ферми, але з різних ставків. Хоча ізолят 90-2021 має подібну послідовність з угорськими, сербськими та польськими ізолятами, послідовність ізоляту 79-2021 здебільшого нагадувала послідовність польських ізолятів (рис. 2-4). Крім того, в обох ставках виявлено коінфекцію ХВ та ЦЕВ. Підсумовуючи, здається, що в Європі торгові переміщення різних груп звичайного коропа дуже динамічні, можуть відбуватися на великі відстані і, отже, сприяти передачі різних штамів патогенів.

Стійкість CEV в інфікованій популяції або в забрудненому середовищі вивчена недостатньо. У той час як КНВ може викликати довічну затримку в інфікованих риб (Eide et al., 2011), поксвіруси не мають такої здатності, оскільки їх ДНК реплікується в цитоплазмі інфікованої клітини, а не в ядрі, як у випадку з герпесвірусами. Проте поксвіруси вищих хребетних, здається,

мають напрочуд високу здатність зберігатися в навколишньому середовищі (Sinclair, Boone, Greenberg, Keim, & Gerba, 2008). Таким чином, SEV, можливо, також може зберігатися в навколишньому середовищі або в популяціях коропа, інфікуючи різних особин одну за одною. Однак це недостатньо вивчено на рибах. Представлені тут дані свідчать про те, що інфекція SEV була передана з коропової ферми до природного ставка шляхом перенесення риби, яка, швидше за все, мала субклінічну інфекцію.

Нещодавно Matras, Stachnik, Borzym, Maj-Paluch та Reichert (2019) постулювали, що гетерологічні види, такі як уклейка, карась, польовий короп, європейський окунь, плотва та лин, можуть відігравати роль векторів в епідеміології SEV. Вони виявили, що зразок згаданих видів тепловодних риб був SEV-позитивним через 72 години після спільного проживання з SEV-інфікованим коропом. Крім того, вони підтвердили, що риба все ще містила вірус до 42 днів після зараження. Здатність цих гетерологічних видів риб передавати вірус і інфікувати сприйнятливого коропа або його кольорового різновиду, кої, ще належить оцінити.

Схоже, що KHV має обидві властивості: затримку в лейкоцитах та інших тканинах (Eide et al., 2011), яка може бути реактивована температурним стресом (Baumer, Fabian, Wilkens, Steinhagen, & Runge, 2013 ; Fabian, Baumer, Adamek, & Steinhagen), 2016) і здатність зберігатися у воді або в осадах ставків (Honjo, Minamoto, & Kawabata, 2012). Він також може переноситися популяцією риби протягом усього виробничого циклу. У помірному кліматі це включає стійкість KHV у періоди, коли температура води не сприятлива для вірусу, щоб викликати спалахи захворювання. Усі ці висновки, спрямовані на необхідність як дезінфекції ґрунту ставка, так і впровадження вільних від вірусів риб, мають на меті запобігти подальшим спалахам KHV та поширенню у відкритих водах (Flamm et al., 2016) у програмах ліквідації після спалаху KHV. Подібна процедура знищення була успішно реалізована в Україні. Оскільки у випадку SEV все ще існують прогалини в знаннях щодо поширення вірусу та його стійкості в навколишньому середовищі, слід бути ще більш

обережними, щоб запобігти спалахам і втратам у ставках із звичайними коропами та у відкритих водоймах. Слід взяти до уваги, що риба, заражена CEV у карстових озерах України під час поточного дослідження, була носіями вірусу, і вірус міг поширюватися в різні стоки, пов'язані з цими величезними водами.

Результати тестування KHV і CEV показали відносно високу поширеність CEV в хорватській аквакультурі коропа, тоді як KHV, здається, успішно ліквідовано. Результати різноманітності послідовностей CEV означають інтенсивну торгівлю коропом між різними країнами ЄС без впровадження необхідного усвідомлення ризику поширення вірусу. Таким чином, навіть якщо CEV не внесено до переліку патогенів, для запобігання його поширенню у відкритих водоймах і збереження там природної популяції надзвичайно важливо запровадити регулярне тестування на наявність CEV принаймні перед переміщенням коропа у відкриту воду або провести тестування всіх коропових господарств країни на визначення поширеності CEV з метою впровадження заходів контролю.



Рис.2 Короп, інфікований KHV (виявлено надмірне виділення слизу, бліді зябра з крововиливами та некротичними ділянками).

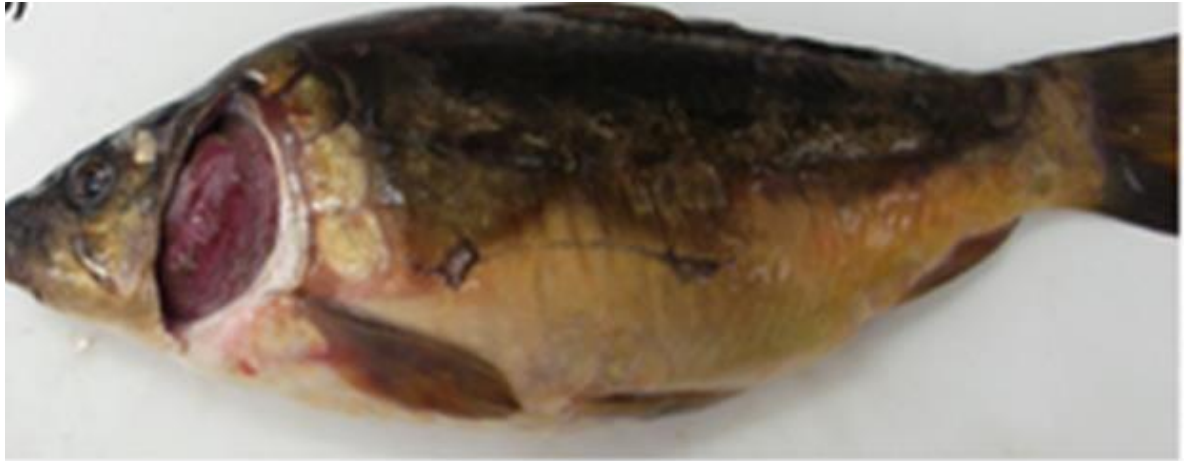


Рис. 3 Короп, інфікований CEV. Виявлено енофтальмію, петехіальні крововиливи на шкірі та некроз зябер

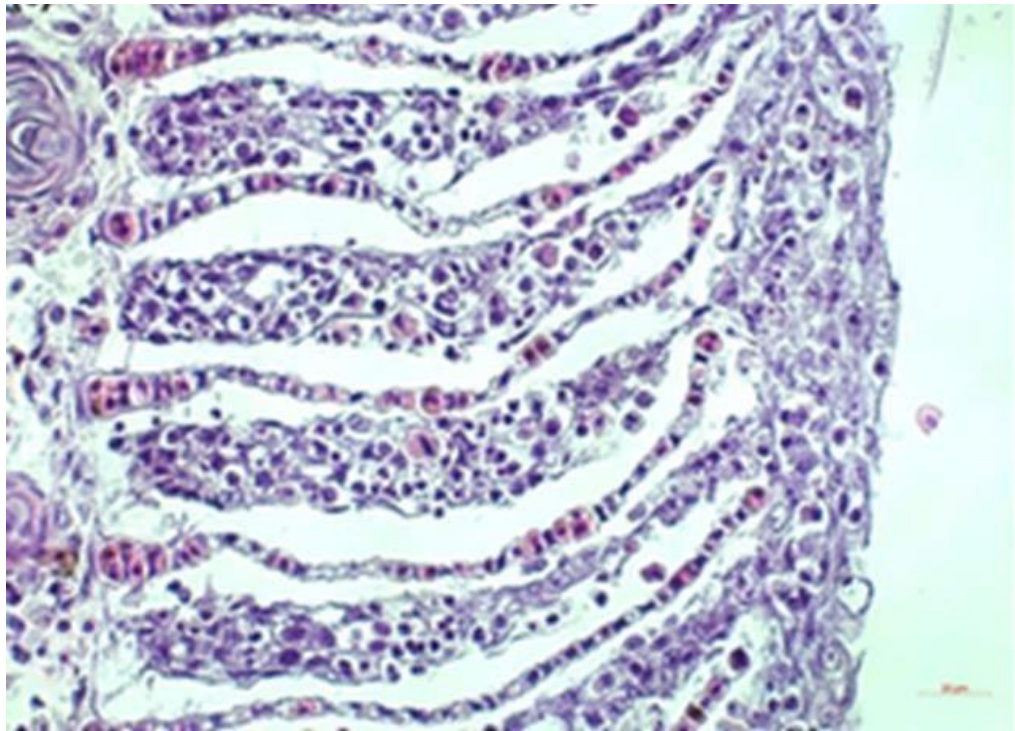


Рис. 4 Мікрофотографія зябер коропа, заражених CEV. Спостерігається закупорка міжпластинкових проміжків через клітинні уламки та гіпертрофію епітеліальних клітин. Внутрішньоцитоплазматичних включень не спостерігалось (Забарвлення гематоксилін-еозином, $\times 40$)

Аутопсія, гістологія, дослідження клітинних культур і КПЦР виключають КНВ і підтверджують наявність CEV під час спалахів

захворювання в 2021 і 2022 роках.

Уражена риба, яка походить від спалаху захворювання у 2021-2022 роках, мала крововиливи на кришці, основі та плавниках, а також на шкірі; енофтальмія; перевиробництво слизу; бліді та роздуті зябра. Під час розтину у внутрішніх органах не було виявлено жодних змін зовнішнього вигляду. Дослідження гомогенатів внутрішніх органів з метою виключення інфекції SVCV за допомогою ліній клітин EPC та BF-2 дало негативні результати. Дослідження гомогенатів нирок зябер і голови для виключення KHV методом ПЛР у реальному часі також дало негативні результати для обох спалахів. Бактеріологічні дослідження зразків внутрішніх органів на АСД та БА не підтвердили ріст бактеріальних збудників. Патогістологічне дослідження уражених зябер виявило оклюзію міжламеллярних просторів накопиченням клітинних уламків і гіпертрофією епітеліальних клітин. ДНК, виділена із зябер коропа, зібрана під час обох подій смертності (2021 та 2022), виявилася позитивною на SEV зі значеннями C_q 27,58 та 26,23.

Скринінг популяцій аквакультури коропа на KHV та SEV

Двадцять два з 793 зразків, зібраних у рамках національної програми епідагляду з 2021 по 2022 роки, були позитивними на KHV. Загалом тільки чотири локації, які були безпосередньо пов'язані зі спалахом у 2021 році, були KHV-позитивними, а після завершення ліквідаційних заходів вірус згодом не був виявлений. Шість із 43 пулів, отриманих із зразків, зібраних під час цієї програми спостереження, були позитивними на SEV. Пули походять із п'яти місць, включаючи одне місце, де два пули показали ко-інфекцію KHV та SEV. Об'єднані зразки з коінфекцією були зібрані під час спалаху захворювання у 2021 році на одній із коропових ферм. Позитивні результати ПЛР-аналізу в реальному часі для обох вірусів представлені в рис. 5. KHV-позитивні проби мали значення C_q в діапазоні від 21,52 до 37,35. SEV-позитивні зразки мали значення C_q в діапазоні від 31,12 до 38,28.

Філогенетичний аналіз часткових послідовностей гена ТК показав приналежність ізолятів КHV хорватського коропа до європейського генотипу КHV (рис. 5). Нуклеотидні послідовності були ідентичні кільком послідовностям, отриманим у Бельгії, Великобританії, Польщі та Нідерландах.

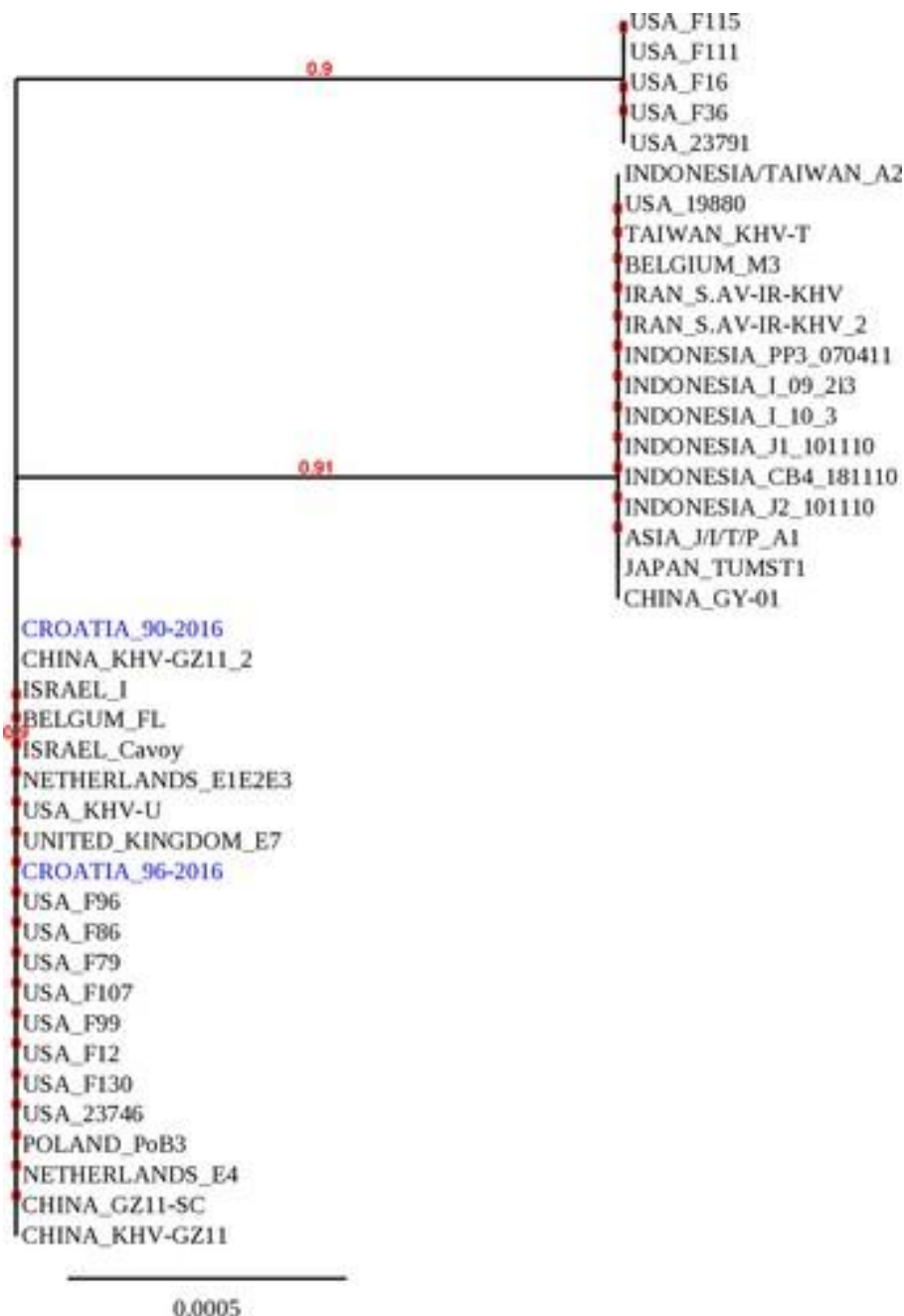


Рис. 5. Філогенетичний аналіз нуклеотидної послідовності, що кодує тимідинкіназу КHV (ORF55). Аналіз проводився за допомогою інструментів, доступних на www.phylogeny.fr (Dereeper та ін., 2008). Послідовності були вирівняні з MUSCLE. Філогенетичний аналіз максимальної ймовірності було виконано за допомогою RhyML, а філогенетичне дерево було відтворено за допомогою TreeDyn. Послідовності, отримані від коропа (порівнювали з послідовностями з Бельгії, Нідерландів, Великобританії, Ізраїлю, Сполучених Штатів, Індонезії, Тайвань, Китай, Іран, Японія та

Філіппіни. Номери доступу GenBank для всіх використаних послідовностей перераховані в додатковому файлі. Значення підтримки гілок позначені червоним кольором. Номери доступу GenBank (ідентифікатори GenBank) для всіх послідовностей.

Секвенування SEV-позитивних ізолятів

Усі ізоляти SEV належали до геногрупи I SEV. Було отримано чотири характерні послідовності: чотири об'єднані зразки, 135-9-2021, 153-7-2021, 90-2021 і 41-2022, мали ту саму послідовність, що й декілька зразків із Сербії, Угорщини та Австрії. Дві послідовності, 79-2022 і 79-2021, були згруповані разом із послідовністю з Польщі, тоді як послідовність 37-2022 була ідентичною з кількома послідовностями, отриманими зі зразків звичайного коропа з Великобританії, Польщі та Німеччини. Остання послідовність, 149-7-2021, була ідентичною послідовності, отриманій із зразка звичайного коропа з Угорщини (рис. 4). Крім того, філогенетичний аналіз показав, що вірус, виділений із випадка смертності в штучному озері в 2022 році, мав ту саму послідовність, що і ізолят з SEV-позитивної ферми, з якої коропа було введено в штучне озеро для зариблення. Це вказує на те, що спалах може бути пов'язаний із завезенням SEV-позитивної риби в озеро.

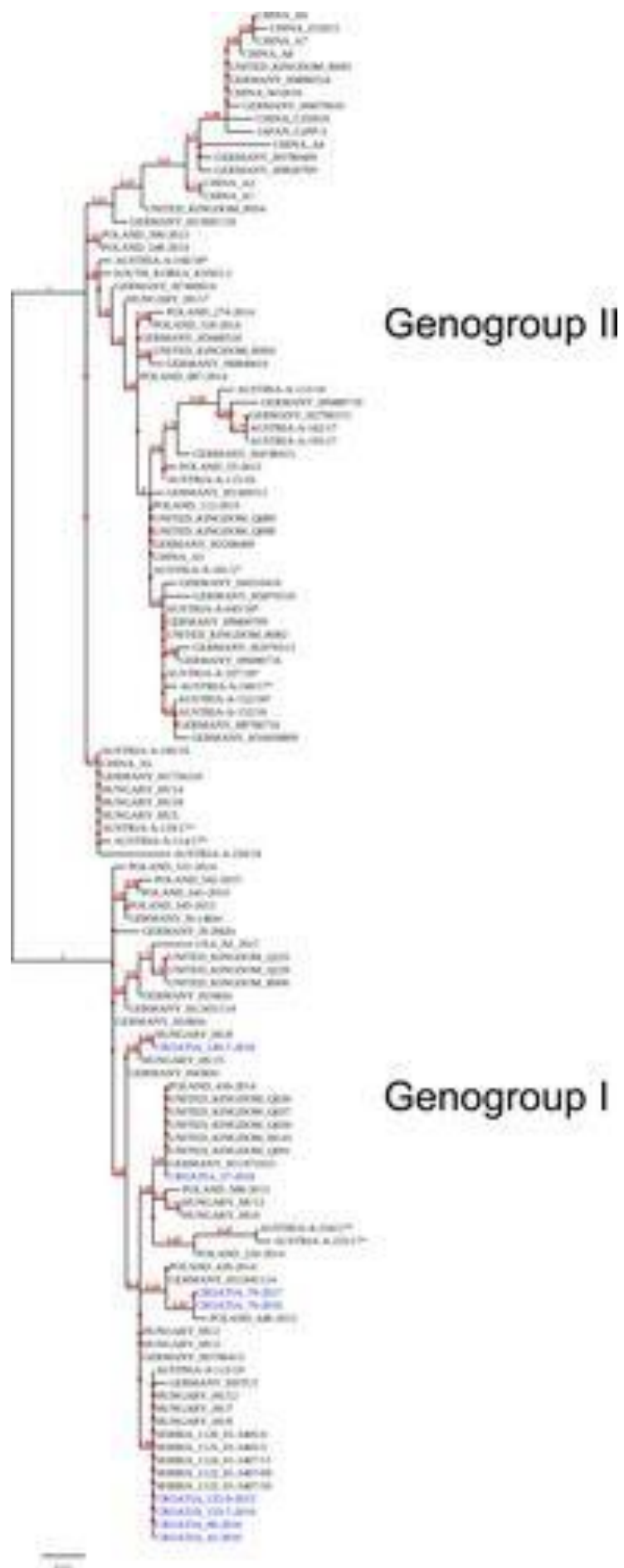


Рис. 6 Філогенетичний аналіз нуклеотидної послідовності, що кодує

фрагмент білку віріону CEV P4a. Аналіз проводився за допомогою інструментів, доступних на www.phylogeny.fr (Dereeper та ін., 2008). Послідовності були вирівняні з MUSCLE. Філогенетичний аналіз максимальної ймовірності було виконано за допомогою PhyML, а філогенетичне дерево було відтворено за допомогою TreeDyn. Послідовності, отримані з коропа в Хорватії (CROATIA_135-9-2021 GenBank ID: MN906969; CROATIA_79-2021 GenBank ID: MN906970; CROATIA_153-7-2021 GenBank ID: MN906971; CROATIA_79-2022 GenBank ID: MN906972; CROATIA_90-2022 GenBank ID : MN906973; CROATIA_149-7-2021 GenBank ID: MN906974; CROATIA_37-2022 GenBank ID: MN906975; CROATIA_41-2022 GenBank ID: MN906976, позначено *синім кольором*) порівнювали з послідовностями з Німеччини, Польщі, Угорщини, Сербії, Великобританії, Китаю, Південної Кореї, Японії та США. Номери доступу GenBank для всіх використаних послідовностей перераховані в додатковому файлі. Довжина гілки пропорційна кількості замін на сайт. *Значення підтримки гілок позначені червоним кольором*. Послідовності, позначені * (AUSTRIA_A-114/17, AUSTRIA-A-124/17, AUSTRIA-A-240/17, AUSTRIA-A-045/18, AUSTRIA-A-107/18, AUSTRIA-A-152/18, AUSTRIA-A-166/18, AUSTRIA-A-234/17, AUSTRIA-A-235/17) були перевернуті та залишені з оригінальним урожаєм із GenBank, який не завжди охоплює 357 bp, що зазвичай використовуються у філогенетичних аналізах. Номери доступу GenBank (ідентифікатори GenBank) для всіх послідовностей, які використовуються в аналізах, перераховані в додатковому файлі.

3.2 Лабораторні методи діагностики захворювання

Опис спалахів захворювання коропа звичайного. Спалах у 2021 році.

Протягом квітня 2021 року при температурі води 16°C коропферма поблизу кордону з Угорщиною повідомила про підвищення смертності (рис. 1). Відповідальний ветеринарний лікар ферми відібрав зразки хворої риби ($n = 10$) і відправив їх у лабораторію для діагностики. Оскільки смертність тривала протягом весни, у середині червня, коли температура води

підвищилася до 18°C, були зібрані додаткові зразки ($n = 10$) з тієї ж ферми. У той же час було повідомлено про збільшення смертності з двох невеликих штучних ставків, які контролюються рибалками і розташовані в північній частині України. Коропа з цих озер також відбирали. Усі зразки були піддані дослідженню на наявність KHV та SEV, як описано нижче, тоді як зразки, зібрані в квітні, також перевірені на наявність *весняної віремії вірусукоропа* (SVCV).

Спалах у 2022 році. Наприкінці квітня 2022 року, під час сезону нересту коропа, у штучному озері в південному карстовому регіоні України спостерігався високий рівень смертності коропа – це неглибоке озеро глибиною від 1 до 6 метрів, і під час сухого сезону лише невелика частина поверхні містить воду. Озеро з'єднане з водосховищем і утримує надмірну кількість води навесні або в інші періоди сильних опадів. Під час загибелі температура води підвищилася з 18 до 20°C. Рівень смертності тримався майже місяць, протягом якого загинула більшість популяції коропа в озері. Клінічні ознаки захворювання або смертності не спостерігалися в інших видів риб, що живуть у тому ж озері. Десять екземплярів мертвої риби вагою від 4 до 6 кг передали на лабораторне дослідження. Зразки обробляли відповідно до стандартних лабораторних процедур для діагностики захворювання, як описано нижче.

На початку травня 2021 року зразок звичайного коропа з озера (рис. 1), великого водосховища площею 15 км², яке служить резервуаром для електростанції, розташованої в південному карстовому регіоні, було відібрано та відправлено на лабораторне обстеження з анамнезом високої летальності, утрудненим диханням та млявою поведінкою риби. Температура води під час загибелі була 18°C. Короп для зариблення озера був завезений із звичайної коропової ферми в північній частині України за тиждень до початку спалаху захворювання. Представлені екземпляри ($n = 7$) важили від 0,278 до 0,870 кг. Зразки також були оброблені відповідно до стандартних лабораторних процедур для діагностики захворювання, як описано нижче.

Зовнішній огляд і розтин труп

Уражену рибу з усіх вищезазначених спалахів передавали для лабораторної діагностики в пінопластових боксах в умовах охолодження ($\leq 8^{\circ}\text{C}$). Зовнішні поверхні риб досліджували на наявність будь-яких відхилень від нормальної форми, а шкіру, очі, плавники та зябра перевіряли на патологічні зміни.

Під час розтину внутрішні органи досліджували на наявність грубих пошкоджень, а свіжі туші піддавали бактеріологічному дослідженню шляхом відбору мазків з голови нирки, селезінки та серця та висіву їх на триптонний соєвий агар (TSA) і кров'яний агар (BA). Крім того, свіжі препарати шкіри, зябер, кишечника, нирок і плавального міхура збирали у вигляді мазків, зіскрібків і/або тиснень і досліджували під мікроскопом як незабарвлені препарати на наявність паразитів або інших розпізнаваних аномальних ознак.

Гістологічне дослідження

Зразки зябер, селезінки, головної нирки, серця та печінки фіксували в 10% нейтральному забуференому формаліні. Тканини, фіксовані формаліном для гістологічного дослідження, дегідратували через градуйовану серію етанолу, а потім ксилолу, залили в парафін, розділили на 5 мкм і встановили на предметні скла Microm EC 350-2 (Thermo Scientific Inc.). Змонтвані предметні скла нагрівали до 60°C , депарафінували та повторно гідратували в ксилолі, градуйованій серії спирту та, нарешті, у воді з подальшим фарбуванням гематоксиліном та еозином.

Зразки для скринінгу KHV і CEV та вірусологічного дослідження

Пули органів (зябра та нирки голови) двох риб гомогенізували товкачем і ступкою зі стерильним піском. Після гомогенізації кожен об'єднаний зразок суспендували у співвідношенні 1:10 у мінімальному необхідному середовищі Ігла (EMEM, EuroClone) з додаванням 10% об'єму фетальної телячої сироватки (FCS, Biological Industries) та 2% об'ємного розчину антибіотика та протигрибкового засобу (пеніцилін). 100 МО/мл, стрептоміцину сульфат 10

мг/мл, амфотерицин В 25 мкг/мл і канаміцин 10 мг/мл) (Gibco, Thermo Scientific Inc). Тканинні екстракти центрифугували при $3000 \times g$, і 600 мкл збирали для екстракції ДНК і подальшого виявлення КНВ- і СЕV-специфічних послідовностей ДНК. Загалом за період з 2020 по 2022 рр. на наявність КХВ перевірено 793 басейни-двійки. Пізніше екстрагована ДНК була об'єднана відповідно до приналежності до конкретної ферми/місця відбору проб, і загалом 43 пули були використані для виявлення СЕV (Табл. 1).

Таблиця 1.

Зразки, проаналізовані в програмі спостереження за вірусом герпесу кої у чутливих видів риб (2020–2022 рр.)

Рік досліджу	2020	2021	2022
Кількість рибних басейнів, проаналізованих на КНВ	331	368	94
ХВ-позитивний	0	22	0
Кількість місць/пулів для відбору проб, проаналізованих на СЕV	10	30	3
СЕV-позитивний	1	4	1

Для перевірки на наявність КНВ та СЕV у двох спалахах захворювання у 2021 та 2022 роках зразки обробляли таким же чином. Крім того, внутрішні органи (головну нирку, селезінку та серце) досліджували на наявність SVCV, а зразки гомогенізували, як описано вище. Тканинні екстракти інокулювали у двох 10-кратних розведеннях (1:10 і 1:100) на одноденну епітеліому папулозум циприні (EPC, Fijan et al., 1983) і мальків синьожаберних (BF-2, Wolf & Quimby, 1962) клітинні моношари, вирощені в 96-лункових культуральних планшетах (Sigma-Aldrich Nunc) та інкубовані при 15°C. Після інокуляції чашки щодня спостерігали для розвитку цитопатичних ефектів (CPE). Через сім днів супернатанти фільтрували через мембрани 0,45 мкм і використовували для інокуляції активно зростаючих клітинних моношарів EPC і BF-2. Культури досліджували безперервно протягом семи днів.

Виділення ДНК. Загальну ДНК екстрагували за допомогою набору для очищення нуклеїнових кислот MagMAX CORE (Applied Biosystems, Thermo Scientific Inc.) відповідно до інструкцій виробника системи очищення KingFisher Duo Prime (Thermo Scientific Inc.). Екстраговану ДНК зберігали при -20°C до аналізу.

ПЛР у режимі реального часу та звичайна ПЛР для виявлення та секвенування KHV. Для виявлення KHV у зразках коропа ми провели кПЦР у реальному часі з праймерами та зондом, розробленими Gilad et al. (2004). Реакції проводили в термоциклері Rotor-Gene Q (Qiagen GmbH) з використанням VetMAX-Plus qPCR Master Mix (Applied Biosystems). Умови термічного циклу встановлювалися відповідно до інструкцій виробника набору для датчика без MGB. Для кожної реакції ми використовували 5 мкл екстрагуваної ДНК, 0,4 мкм кожного праймера (KHV-86F GACGCCGGAGACCTTGTG; KHV-163R CGGGTTTTATTTTTTGTCTTTTT) та 0,12 мкм A Double Mabeled ([FAM]-CTCTCTCTGCGGCGCG- загальний об'єм 25 мкл. Граничне значення Cq 40 було використано для підтвердження позитивного результату зразка на KHV. Зразки, виявлені позитивними за допомогою цієї кПЦР, також аналізували за допомогою звичайної ПЛР із застосуванням протоколу згідно з Vercovier et al. (2005), HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen GmbH) і праймери KHV-TKf (GGGTTACCTGTACGAG) і KHV-TKr(CACCCAGTAGATTATGC).

Вкладена ПЛР для виявлення SEV. Для виявлення SEV у зразках коропа ми використовували вкладену ПЛР, описану в Matras et al. (2017), з модифікаціями для оптимізації методу для HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen GmbH). Температурний протокол був наступним: активація ферменту при 95 °C протягом 15 хв, потім 35 циклів денатурації при 95 °C протягом 60 с, відпал праймера при 51 °C протягом 60 с і елонгація при 72 °C протягом 60 с, закінчуючи кінцевою стадією елонгації при 72°C протягом десяти

хвилин. Обидві ПЛР проводили за допомогою системи ProFlex PCR (Applied Biosystems Inc.) у кінцевому об'ємі 20 мкл. Ми використовували 2 мкл екстрагованої ДНК і 0,5 мкМ праймерів CEV ForB (ATGGAGTATCCAAAGTACTTAG) і CEV RevJ (CTCTTCACTATTGTGACTTTG) для першого раунду ПЛР. Для другого циклу ПЛР ми використовували 2 мкл продукту ПЛР з першої реакції та 0,25 мкМ праймерів CEV ForB-int (GTTATCAATGAAATTTGTGTATTG) і CEV RevJ-int (TAGCAAAGTACTACCTCATCC). Результати обох ПЛР перевіряли електрофорезом на системі QIAxcel (Qiagen GmbH).

ПЛР у реальному часі для виявлення CEV. Для виявлення та кількісного визначення ДНК р4а CEV, аналіз qPCR на основі зонда, розроблений Центром навколишнього середовища, рибальства та аквакультури (CEFAS) у Веймуті, Англія (Adamek, Matras, et al., 2017; Matras et al., 2017) була виконана. Реакційна суміш містила 1 × Maxima ProbeqPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.), 500 нМ кожного праймера (CEFAS_qF: AGTTTTGTAKATTGTAGCATTTCC; CEFAS_qR: GATTCCTCAAGGAGTTDCAGTAAA), 0,2 мкМ подвійно міченого зонда ([FAM]-AGAGTTTGTCTTGTCCATACAAA КТ-[BHQ1]), 5 мкл матричної ДНК і води без нуклеази до кінцевого об'єму 20 мкл. Програма ампліфікації включала початкову денатурацію при 95 °C протягом 10 хв, потім 40 циклів денатурації при 95 °C протягом 30 с і відпал при 60 °C протягом 30 с. Подібно до KHV qPCR, було використано граничне значення Cq 40.

Секвенування та філогенез. Продукти ПЛР, отримані ампліфікацією з використанням пар праймерів CEV ForB і CEV RevJ або CEV ForB-int і CEV RevJ-int, використовували для секвенування, використовуючи як прямий, так і зворотний праймери, щоб отримати послідовності, що перекриваються, довжиною щонайменше 357 п.н.ген, що кодує коровий білок віріону Р4а CEV. Для відібраних KHV- позитивних зразків фрагмент геному розміром ~940 bp, що включає повну

послідовність гена ТК, був ампліфікований за допомогою праймерів ТК_F AACGCGGGCCAGCTGAACAT і ТК_R TGTGTGTATCCCAATAAACG (Kurita et al., 2009). Пряме секвенування за Сенгером виконували LGC Genomics GmbH або Macrogen Europe BV. Отримані послідовності аналізували за допомогою програмного забезпечення Geneious Prime 2021.2.1 і BioEdit 7.0. Послідовності були проаналізовані на їх філогенетичний зв'язок з іншими послідовностями CEV або KHV, знайденими в GenBank, за допомогою інструментів, доступних на www.phylogeny.fr (Dereeper et al., 2008). Послідовності були вирівняні з MUSCLE. Філогенетичний аналіз (на основі максимальної ймовірності) проводився за допомогою PhyML; філогенетичні дерева були відтворені за допомогою TreeDyn.

4. ЕКОНОМІЧНА ЕФЕКТИВНІСТЬ ПРОВЕДЕНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Розрахунок збитку державі визначений з вибракуванням ураженого інфекційним захворюванням коропа проводили за формулою:

$$З = Пз \times Ц + Вз, \text{ де}$$

З — витрати від утилізації ураженого коропа, грн.;

Пз – кількість вибракуваного коропа, кг;

Вз - витрати на утилізацію коропа, грн.;

Ц - договірна закупівельна ціна 1 кг продукції, грн.

1. Розрахунок збитку, пов'язаного з вибракуванням ураженого інфекційним захворюванням коропа.

Ціна за 1 кг коропа становить 138,0 грн. Загальна вага ураженого коропа склала 18970 000 кг.

$$З \text{ коропа} = 138,0 \times 18970\ 000 = 2617860000,0 \text{ грн.}$$

Отже, у зв'язку з вибракуванням ураженого інфекційним захворюванням коропа країна отримала 2617860000,0 грн. збитку.

5. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА БЕЗПЕКА В НАДЗВИЧАЙНИХ СИТУАЦІЯХ

5.1. Дослідження стану охорони праці на виробництві

У польових умовах режим праці і відпочинку часто залежить від метеорологічних умов, ясні сонячні дні використовують для виконання польових робіт, похмури і дощові дні - для відпочинку і організаційних заходів. Головний убір, взуття, одяг повинні захищати людину від сильної дії температури, дощу, вітру.

5.2 Вимоги безпеки праці під час виконання роботи

Вибір місця табору, очищення і обкопування майданчика для багаття попереджують можливість розповсюдження вогню і пожежі, а також захищають табір від кліщів і інших переносників інфекційних захворювань.

При вітрах задню стінку намету обертають до вітру, а в жарку сонячну погоду - до сонця. У холодний сонячний день - дверима до сонця, в лісах від захисту від гнусу - до вітру, дверима.

5.3. Рекомендації щодо забезпечення безпеки та поліпшення умов праці на виробничих ділянках

Вимоги особистої гігієни: підтримка чистоти тіла, систематичне і регулярна зміна білизни - повинні бути законом польового життя. Основні причини виникнення пожеж: необережне застосування багать, недбале використання відкритого вогню, неакуратне зберігання горючих матеріалів. Багаття слід розводити не ближче 5-6 м від намету у бік вітру.

Не слід додавати в багаття суччя по своїй довжині що виходять за обкопану смугу.

Не можна розводити костри поблизу будов, складів майна експедиції, місць зберігання пального.

Забороняється залишати багаття без нагляду, необхідно вести постійне чергування біля багаття. За непотрібністю багаття слід ретельно загасити водою, засипати землею, оглянути, чи немає залишку тління в корінні.

Забороняється застосування небезпечних форм відкритого вогню. Слід застосовувати безпечне батарейне освітлення або кишенькові ліхтарі.

5.4. Дії у надзвичайних ситуаціях

Фахівці пожежної служби планово виконують заходи з протипожежної безпеки серед персоналу.

ВИСНОВКИ І ПРОПОЗИЦІЇ

В результаті проведення наукових досліджень виявлено:

1. Аутопсія та ПЦР підтверджують, що КНВ є агентом, причетним до спалаху хвороби коропа звичайного в 2021 та 2022 роках.

2. Зразки, зібрані протягом квітня 2021 року, виявилися негативними на КНВ- SVCV- і CEV. Однак смертність тривала протягом весни, а додаткові зразки, зібрані в середині червня, підтвердили позитивний результат на КНВ, коли температура води підвищилася до 18°C.

3. Зразки коропа, зібрані під час спалаху, показали ознаки хвороби, типові для КНВД, а саме білясту пігментацію шкіри, вогнищеву втрату луски, надлишок секретії слизу, бліді зябра з великими петехіальними крововиливами та некротичними ділянками .

4. Виявлено, що коропа були КНВ-позитивними зі значеннями C_q в діапазоні від 21,52 до 33,85. У двох пулах, виготовлених із проб, взятих із ставків з найнижчими значеннями C_q КНВ (24,13 і 21,52), були виявлені відносно вищі значення C_q CEV (33,89 і 34,61), що вказує на коінфекцію КНВ-CEV.

Відповідно до результатів роботи можна рекомендувати наступне:

- в рамках державної моніторингової програми щорічно проводити дослідження коропових ставків на наявність інфекційних хвороб;
- розробляти ефективні заходи з профілактики і лікування коропів у ставкових господарствах;

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. “Методика дослідної справи у рибництві”. Методичний посібник М.Ю. Євтушенко, П.Г. Шевченко. К.: 2005. – 44 с.
2. Abdelsalam, E. E. E., & Piačková, V. (2023). Carp edema virus: host selection and interaction, and potential factors affecting its introduction to the common carp population, distribution, and survival. *Aquaculture*, 563, 739009. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.739009>
3. Adamek, M., Oschilewski, A., Wohlsein, P., Jung-Schroers, V., Teitge, F., Dawson, A., Gela, D., Piackova, V., Kocour, M., Adamek, J., Bergmann, S. M., & Steinhagen, D. (2017). Experimental infections of different carp strains with the carp edema virus (CEV) give insights into the infection biology of the virus and indicate possible solutions to problems caused by koi sleepy disease (KSD) in carp aquaculture. *Veterinary Research*, 48(1). <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0416-7>
4. Behera, B. K., Bera, A. K., Paria, P., Das, A., Parida, P. K., Kumari, S., Bhowmick, S., & Das, B. K. (2018). Identification and pathogenicity of *Plesiomonas shigelloides* in Silver Carp. *Aquaculture*, 493, 314–318. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.063>
5. Bigarré, L., Baud, M., Pallandre, L., Meunier, E., & Leguay, E. (2016). Maladie du sommeil de la Carpe: état des lieux des connaissances et situation épidémiologique en France Situation en France Bulletin épidémiologique santé animale et alimentation, 76.
6. Colorio, S., Toffan, A., Lewisch, E., Dalla Pozza, M., Stifter, E., Pircher, A., Meraner, A., Bettini, A., & Tavella, A. (2020). Koi herpesvirus disease outbreak: Input for the implementation of a surveillance program in South Tyrol – Italy. *Preventive Veterinary Medicine*, 181, 105089. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105089>
7. Haenen, O., Way, K., Stone, D., & Engelsma, M. (2014). Koi sleepy disease found for the first time in koi carps in the Netherlands. *Tijdschrift Voor Diergeneeskunde*, 139, 26–29.(in Dutch).

8. Horchanok A. V. Fluctuating fish asymmetry in natural and artificial reservoirs of Dnipro region on example of invasion types. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*. 2019. T. 7. № 3. C. 147–152.
9. Hedrick, R. P., Antonio, D. B., & Munn, R. J. (1997). Pox-virus like agent associated with epizootic mortality in juvenile koi (*Cyprinus carpio*). *FHS Newsletter*, 25, 1–3.
10. Gjessing, M. C., Yutin, N., Tengs, T., Senkevich, T., Koonin, E., Rønning, H. P., Alarcon, M., Ylving, S., Lie, K.-I., Saure, B., Tran, L., Moss, B., & Dale, O. B. (2015). Salmon Gill Poxvirus, the Deepest Representative of the Chordopoxvirinae. *Journal of Virology*, 89(18), 9348–9367.
11. Jung-Schroers, V., Adamek, M., Teitge, F., Hellmann, J., Bergmann, S. M., Schütze, H., Kleingeld, D. W., Way, K., Stone, D., Runge, M., Keller, B., Hesami, S., Waltzek, T., & Steinhagen, D. (2015). Another potential carp killer?: Carp Edema Virus disease in Germany. *BMC Veterinary Research*, 11, 114. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0424-7>
12. Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., Von Haeseler, A., & Jermin, L. S. (2017). ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*, 14(6), 587–589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
13. Kim, S. W., Jun, J. W., Giri, S. S., Chi, C., Yun, S., Kim, H. J., Kim, S. G., Kang, J. W., & Park, S. C. (2018). First report of carp oedema virus infection of koi (*Cyprinus carpio haematopterus*) in the Republic of Korea. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65, 315–320. <https://doi.org/10.1111/tbed.12782>
14. Kotob, M. H., Menanteau-Ledouble, S., Kumar, G., Abdelzaher, M., & El-Matbouli, M. (2016). The impact of co-infections on fish: A review. *Veterinary Research*, 47(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0383-4>
15. Kozińska, A. (2007). Dominant pathogenic species of mesophilic aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. *Journal of Fish Diseases*, 30(5), 293–301. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00813.x>

16. Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
17. Lewisch, E., Gorgoglione, B., Way, K., & El-Matbouli, M. (2015). Carp Edema Virus/Koi sleepy disease: An emerging disease in central-east Europe. *Transboundary and Emerging Diseases*, 62(1), 6–12. <https://doi.org/10.1111/tbed.12293>
18. Lovy, J., Friend, S. E., Al-Hussinee, L., & Waltzek, T. B. (2018). First report of carp edema virus in the mortality of wild common carp *Cyprinus carpio* in North America. *Diseases of Aquatic Organisms*, 131(3), 177–186. <https://doi.org/10.3354/dao03296>
19. Martinez-Murcia, A. J., Monera, A., Saavedra, M. J., Oncina, R., Lopez-Alvarez, M., Lara, E., & Figueras, M. J. (2011). Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(3), 189–199. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.11.014>
20. Marsella, A., Pretto, T., Abbadi, M., Quartesan, R., Cortinovis, L., Fiocchi, E., Manfrin, A., & Toffan, A. (2021). Carp edema virus-related mortality in wild adult common carp (*cyprinus carpio*) in Italy. *Journal of Fish Diseases*, 44(7), 939–947. Portico. <https://doi.org/10.1111/jfd.13353>
20. Tolo, I. E., K. Padhi, S., Hundt, P. J., Bajer, P. G., K. Mor, S., & Phelps, N. B. D. (2021). Host Range of Carp Edema Virus (CEV) during a Natural Mortality Event in a Minnesota Lake and Update of CEV Associated Mortality Events in the USA. *Viruses*, 13(3), 400. <https://doi.org/10.3390/v13030400>
21. Matějčková, K., Pojezdal, L., Pokorová, D., Reschová, S., Piačková, V., Palíková, M., Veselý, T., & Papežiková, I. (2020). Carp oedema virus disease outbreaks in Czech and Slovak aquaculture. *Journal of Fish Diseases*, 971–978, <https://doi.org/10.1111/jfd.13179>
22. Matras, M., Borzym, E., Stone, D., Way, K., Stachnik, M., & Reichert, M. (2017). Carp edema virus in Polish aquaculture – evidence of significant

- sequence divergence and a new lineage in common carp *Cyprinus carpio* (L.), 319–325. <https://doi.org/10.1111/jfd.12518>
23. Matras, M., Stachnik, M., Borzym, E., Maj-Paluch, J., & Reichert, M. (2019). Potential vector species of carp edema virus (CEV). *Journal of Fish Diseases*, 42, 959–964. <https://doi.org/10.1111/jfd.13000>
 24. Novitskyi, R. O., Makhonina, A. V., Kochet, V. M., Khristov, O. O., Hubanova, N. L., & Horchanok, A. V. (2019). Причини загибелі товстолобика білого *Hirorhthalmichthys molitrix* у магістральному каналі “Дніпро-Донбас” та заходи щодо її попередження. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 7(2), 102–106.
 25. Padhi, S. K., Tolo, I., McEachran, M., Primus, A., Mor, S. K., & Phelps, N. B. D. (2019). Koi herpesvirus and carp oedema virus: Infections and coinfections during mortality events of wild common carp in the United States. *Journal of Fish Diseases*, 42(11), 1609–1621. <https://doi.org/10.1111/jfd.13082>
 26. Pretto, T., Abbadi, M., Quartesan, R., Manfrin, A., & Toffan, A. (2018). Approccio diagnostico alle patologie virali della carpa (*cyprinus carpio*): l’esperienza dell’IZSVe. SIPI 24th National Conference on disease of fish, Turin 11-13 October 2018. p 25.
 27. Stevens B. N., Michel A., Liepnieks M. L. et al. (2018). Outbreak and treatment of carp edema virus in koi (*Cyprinus carpio*) from northern California. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine: Official Publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, 49, 755–764.
 28. Zhang J., Huiling Q., Wen Z. et al. (2023). Carp edema virus, a great threat for carp and koi farming in Henan, China. *Aquaculture*, 576, 739869. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739869>
 29. Zrnčić, S., Oraić, D., Zupičić, I. G., Pavlinec, Ž., Brnić, D., Rogić, Ž. A., Sućec, I., Steinhagen, D., & Adamek, M. (2020). Koi herpesvirus and carp edema virus threaten common carp aquaculture in Croatia. *Journal of Fish Diseases*, 43(6), 673–685. Portico. <https://doi.org/10.1111/jfd.13163>