МОЛЕКУЛЯРНА ДІАГНОСТИКА ВІРУСНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ РИБ

Ю. П. Рудь, канд. біол. наук, с. н. с.,
Л. П. Бучацький, д-р біол. наук, професор,
Н. Й. Тушницька, канд. вет. наук, с. н. с.,
І. І. Грициняк, д-р с.-г. наук, професор, академік НААН

Інститут рибного господарства НААН
вул. Обухівська, 135, м. Київ, 03164, Україна
rudziknew@ukr.net, n-tushnitska@ukr.net

У статті подано інформацію про основні вірусні захворювання риб, які зустрічаються в Україні, та методи їх експрес-діагностики. Діагностика вірусів риб за допомогою полімеразної ланцюгової реакції є доступним та актуальним способом моніторингу та попередження спалахів вірусних захворювань. Робота лабораторії біотехнологій в рибництві Інституту рибного господарства НААН спрямована на розробку діагностиків для інфекційних захворювань риб та проведення досліджень згідно з процедурою контролю рибних захворювань. При розробленні діагностичних тест-систем, звертається увага на тенденції розвитку вітчизняного рибництва та віруси, які циркулюють в Україні або можуть проникнути у рибогосподарські підприємства із сусідніх країн. Неабияка роль відводиться вивченню генетичної мінливості вірусів риб, що характеризуються різним ступенем вірулентності.

Наведені приклади застосування методик у проведенні діагностики з метою визначення інфекційного агента та причини епізоотії. Проведено порівняльний аналіз методик, компонентів наборів і реагентів для оптимізації полімеразної ланцюгової реакції та її різновидів, які можуть суттєво скоротити процес ідентифікації вірусів риб. Визначено гени-мішені для підбору олігонуклеотидних праймерів для ПЛР діагностики вірусних захворювань риб, а саме: вірусу весняної віремії коропа (SVCV), герпесвірусу коропа (CyHV-3, KHV), вірусу віспи коропа (CEV), вірусу інфекційного панкреатичного некрозу (IPNV), вірусу геморагічної септицемії (VHSV), вірусу інфекційного гематопоетичного некрозу (IHNV), реовірусу лососевих (PRV), мімівірусу (іридовірусу) осетра (AcIV-E).

Ключові слова: ВІРУСИ РИБ, ДІАГНОСТИКА, ПЛР, МОНІТОРИНГ.

MOLECULAR DIAGNOSIS OF VIRAL DISEASES IN FISHES

Yu. Rud, L. Buchatsky, N. Tushnitska, I. Hrytsyniak

Institute of Fisheries of NAAS
135, Obukhivska str., Kyiv, 03164, Ukraine
rudziknew@ukr.net, n-tushnitska@ukr.net

The paper provides information about the main viral diseases of fish found in Ukraine and methods of their diagnosis. Rapid diagnosis of fish viruses using polymerase chain reaction is an affordable and relevant way to monitor and prevent outbreaks of viral diseases. The work of the Laboratory of Biotechnology in Aquaculture of the Institute of Fisheries of NAAS is aimed to develop diagnostic kits for infectious diseases of fish and conducting research in accordance with the procedure of surveillance of fish diseases. For developing diagnostic test systems, attention is paid to

the trends of cultured fish species and aquafarming as well as to viruses that circulate in Ukraine or can pass into the Ukrainian aquaculture from neighboring countries. An important role is given to the study of genetic variability of fish viruses, characterized by varying types of virulence. Examples of application the techniques in carrying out diagnostics for the purpose of identification of an infectious agent and the reason of an epizootic are resulted.

A comparative analysis of techniques, components of kits and reagents for optimizing the polymerase chain reaction and its modifications, which can significantly reduce the process of identification of fish viruses, are given. Target genes for oligonucleotide primers selection for PCR diagnosis of viral diseases of fish, namely spring viremia of carp virus (SVCV), cyprinid herpesvirus type 3 (CyHV-3 or KHV), carp edema virus (CEV), infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV), Piscine orthoreovirus (PRV), Acipenser iridovirus European (AcIV-E).

Keywords: FISH VIRUSES, DIAGNOSTICS, PCR, MONITORING.

Сучасна аквакультура демонструє високі темпи розвитку та забезпечує постачання приблизно 40 % рибних продуктів у світі. У контексті збільшення населення світу, аквакультура є однією з найбільш перспективних напрямів харчової промисловості, яка може задовольнити потреби у корисному тваринному білку без ушкодження природних рибних запасів (World Bank, 2013). Сьогодні у рибній індустрії Європи зайнято приблизно 100000 людей з бюджетом 7 млрд євро (FAO, 2018). Однак, наслідки виникнення захворювань у більшості видів риб можуть коштувати сектору до 20 % від вартості продукції. Хвороби риб відіграють одну із важливих ролей, як обмежувальний фактор у виробництві риби. Найкращий спосіб боротися з хворобами – запобігати інфекційним спалахам. Крім того, необхідно проводити правильну діагностику та економічно прийнятні методи профілактики та лікування (Buchatskyi et al., 2018).

Багато небезпечних інфекційних захворювань риб, що підлягають ретельному моніторингу, зазначені у законодавстві ЄС (European Commission, 2019). Не існує ефективного лікування або вакцин для цих захворювань, і їх контроль є обов'язковим для запобігання спалахів інфекцій. Через тісний контакт з навколишнім середовищем, взаємозалежність між природньою та вирощеною рибою спричиняє складну епізоотичну ситуацію в рибництві. Ідентифікація та характеристика інфекційних захворювань повинна бути забезпечена завдяки збільшенню використання сучасних технологічних досягнень та досвіду в галузі рибництва й ветеринарії. Найбільш дієвим методом боротьби з поширенням захворювань риб є запобігання виникненню епізоотій через процедури спостереження та запровадження цільових профілактичних заходів (Buchatskyi et al., 2020).

Основною метою сучасних досліджень є визначення шляхів спостереження за інфекційними захворюваннями риб, використовуючи молекулярно-біологічні методи. Аналіз можливості попередження та поширення захворювань риб відповідно до стратегії ЄС щодо здоров'я тварин дозволяє вирішити цю проблему шляхом розробки та тестування діагностичних тест-систем й таким чином вивчення екології патогенів з різних територій (European Commission, 2007).

Вірусні захворювання риб – це економічно важливий аспект рибного господарства. Попри високу значимість епізоотій в рибництві, на сьогоднішній день бракує достатньо інформації про механізми патологічного процесу, передачі, фактори вірулентності та імуногенності більшості вірусів риб. Тому заходи профілактики та попередження захворювання, до яких відноситься експрес-діагностика, є єдиним доступним та актуальним способом боротьби з вірусними захворюваннями в умовах сучасної аквакультури (Rud, Buchatskyi, 2016).

Згідно з директивами Європейського Союзу (EU)2006/88, (EU)2015/1554, (EU)2016/429, (EU) 2017/625, (EU)2018/1882 та (EU) 2020/689, основним напрямком боротьби

з інфекційними хворобами риб має бути попередження захворювання, профілактика та вирішення проблеми резистентності до протимікробних препаратів. У законодавстві України діяльність з дотримання санітарно-гігієнічних норм та профілактичної роботи зі здоров'я риб ґрунтується на Законах України «Про аквакультуру», «Про рибне господарство, промислове рибальство та охорону водних біоресурсів», «Про ветеринарну медицину».

Рибне господарство України відіграє значну роль у забезпеченні населення продовольством, галузей національної економіки – сировиною, а також у відтворенні природних ресурсів та підвищенні зайнятості населення. Робота лабораторії біотехнологій в рибництві Інституту рибного господарства НААН спрямована на розробку діагностиків для інфекційних захворювань риб та проведення досліджень згідно процедури контролю рибних захворювань відповідно до директив ЄС і рекомендацій Європейської референс лабораторії з хвороб риб та ракоподібних (ECRLFCD).

У статті наведена інформація з розробки та апробації діагностичних тест-систем з ідентифікації вірусних захворювань риб, а саме: вірусу весняної віремії коропа (SVCV), герпесвірусу коропа (CyHV-3, KHV), вірусу віспи коропа (CEV), вірусу інфекційного панкреатичного некрозу (IPNV), вірусу геморагічної септицемії (VHSV), вірусу інфекційного гематопоетичного некрозу (IHNV), реовірусу лососевих (PRV), мімівірусу (іридовірусу) осетра (AcIV-E).

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

Вірус інфекційного панкреатичного некрозу (IPNV) – це представник роду *Aquabirnavirus* родини *Birnaviridae*, який викликає висококонтагіозне захворювання у лососевих видів риб. IPNV широко розповсюджений в усьому світі і в умовах аквакультури призводить до значних економічних збитків. Найчутливішими видами до цього вірусу є атлантичний лосось (*Salmo salar*), райдужна форель (*Onchorhynchus mykiss*) та палія (*Salvelinus fontinalis*). Моніторинг даного захворювання ведеться в Україні (Rud et al., 2015). Для діагностики IPNV використовують ЗТ-ПЛР (зворотна транскрипція) (таблиця).

Вірус інфекційного гематопоетичного некрозу (IHNV) – це один з найнебезпечніших вірусів лососевих, який спричиняє масову загибель форелі у всіх вікових групах. IHNV входить до списку інфекційних захворювань у риб Міжнародного Епізоотичного Бюро (ОІЕ, 2019). Вірус відноситься до родини *Rhabdoviridae*, рід *Novirhabdovirus*. Генوم вірусу містить одноланцюгову РНК ((-)ssRNA). Вірус має зовнішню оболонку, віріони кулевидної форми, розміром 45-100 нм у діаметрі та 100-430 нм в довжину. Вірус викликає хворобу інфекційний гематопоетичний некроз у молоді лососевих в умовах інтенсивного вирощування. Хвороба має широке географічне розповсюдження в країнах, з розвиненим лососевництвом: Америці, Європі та Азії. Він найбільш патогенний для райдужної форелі та атлантичного лосося. Чутливість до хвороби зменшується з віком, найбільш чутлива молодь у віці до 2-х місяців. Загибель в цьому періоді може досягти до 95 %. Вірус передається горизонтально. Вірус потрапляє до організму через зябра та ротову порожнину, викликаючи запалення у внутрішніх органах. Вірус репродукується в нирках, селезінці, серці та нервових тканинах, що і обумовлює довготривале перебування вірусу в організмі риби та вивільнення під впливом

стресових факторів. Інфекція характеризується гострим перебігом зі швидкою вірусною репродукцією, що і спричиняє масову загибель (Buchatskyi et al., 2020).

Вірус ідентифікують на підставі специфічної ампліфікації фрагментів генів у N та G, а також аналізу послідовності нуклеотидів. Вірус здатен реплікуватися в культурах клітин риб FHM і EPC та має високий інфекційний титр (Rud et al., 2019). Діагностику IHNV проводять за допомогою методу ЗТ-ПЛР (таблиця).

Вірус геморагічної септицемії (VHSV) – спричиняє контагіозне захворювання у райдужної форелі, тріски та камбали в умовах аквакультури. Вірус належить до роду *Novirhabdovirus*, родини *Rhabdoviridae*. Вірусна геморагічна септицемія входить до списку МЕБ і є одним з найбільш небезпечних вірусних захворювань в аквакультурі (OIE, 2019). Смертність у мальків форелі може сягати 100 %. Як правило, VHSV характеризується гострою інфекцією, але може бути і у хронічному стані, без будь-яких ознак захворювання. До зовнішніх ознак вірусної геморагічної септицемії відносяться летаргія, потемніння шкіри, екзофтальмія (випуклі очі), анемія (блідні зябра), некротичні запалення та крововиливи біля очей, плавників та зябер. Оскільки VHSV може реплікуватися у нервовій тканині, часто при захворюванні риба демонструє аномальну поведінку у вигляді різких ривків та спірального плавання. Одним з методів діагностики VHSV є ЗТ-ПЛР. Для підбору тест-систем використовують фрагменти генів N та G (Buchatskyi et al., 2020).

Для діагностики можна використовувати декілька пар праймерів, але бажано до різних генів з метою порівняння нуклеотидних послідовностей. Краще під час діагностики проводити синтез кДНК безпосередньо в пробірці, що пришвидчить процедуру ідентифікації вірусу.

Вірус весняної віремії коропа (SVCV) належить до родини *Rhabdoviridae*, роду *Spriovirus*. SVCV спричиняє висококонтагіозне захворювання весняна віремія коропа. SVCV відноситься до категорії особливо небезпечних хвороб риб (OIE, 2019). Геном SVCV кодує п'ять білків: нуклеопротейд (N), фосфопротейн (P), білок матриксу (M), глікопротеїн (G) та РНК-залежну РНК-полімерази (L). SVCV може інфікувати багато видів риб, у тому числі коропа звичайного (*Cyprinus carpio*), білого амура (*Ctenopharyngodon idellus*), карася (*Carassius auratus*), та інші (Rud et al., 2019).

Для України діагностика цього захворювання становить особливий інтерес оскільки короп являється традиційним об'єктом аквакультури. Спалахи захворювання відбуваються зазвичай навесні, після пересадки риб із зимувальних у нагульні стави. Загибель риб (переважно цьоголіток та дволіток, рідше – плідників) досягає 30-40 %, а іноді і 70 %. SVCV передається горизонтально і за допомогою векторів коропової воші (*Argulus foliaceus*) і п'явок (*Piscicola geometra*). При латентній інфекції, риба-носіє SVCV може слугувати природними вогнищами захворювання та викликати спалахи у весняний період за температури води 11-15 °C (Ashraf et al., 2016). Для діагностики SVCV краще використовувати напівгніздову модифікацію ЗТ-ПЛР (таблиця).

Орторевіруси риб (Pescine orthoreoviruses або PRV) є збудниками захворювання HSMI - запалення серцевих та скелетних м'язів у атлантичного лосося (*Salmo salar*) та інших лососевих. Нещодавно було встановлено декілька генотипів орторевірусів риб, PRV-1 у атлантичного лосося, PRV-2 у чавичі і кижуча та PRV-3 у райдужної форелі. Найбільших збитків від PRV-1 зазнає норвезька аквакультура, однак географія вірусу стрімко розширюється: наразі інфікованих особин лососевих знайдено у водах Канади і США, а в ряді європейських держав ідентифіковано PRV-3 у райдужної форелі (Buchatskyi et al., 2020).

Для ідентифікації цього вірусу можна використовувати тільки ПЛР, оскільки інші методи поки не розроблені, до того ж вірус не культивується в культурі клітин (таблиця). Більше ймовірності діагностувати вірус у райдужної форелі на господарстві, що має відкрите водопостачання, тобто водозабір відбувається з річки. Скоріше за все вірус має ендемічне походження в Україні.

Вірус герпеса третього типу (CyHV-3) або Koi герпес вірус (KHV) викликає у корокових риб гостру інфекцію та високу смертність, яка становить понад 80%. На початку 2000-х років єдиним хазяїном CyHV-3 вважався короп звичайний (*Cyprinus carpio carpio*) та його підвид, який називають короп кої (*Cyprinus carpio koi*). Було встановлено, що деякі види риб, включаючи таких представників родини коропоподібних, як *Carassius auratus*, стійкі до цього захворювання, незважаючи навіть на довготривале перебування з хворою рибою в одному резервуарі. Проте, нещодавно наявність CyHV-3 була підтверджена за допомогою ПЛР у інших коропоподібних риб, які вирощувались в полікультурі разом з інфікованими коропами – у звичайного карася (*Carassius carassius*), білого амура (*Stenopharyngodon idella*), строкатого товстолобика (*Aristichthys nobilis*), білого товстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix*), линя (*Tinca tinca*) та риба (*Vimba vimba*). Більш того, виявилось що CyHV-3 здатний інфікувати представників сомових (*Silurus glanis*) та осетрових риб, таких як російський (*Acipenser gueldenstaedtii*) та атлантичний (*Acipenser oxyrinchus*) осетри, а також стерлядь (*Acipenser ruthenus*) (Haenen et al., 2004). Це захворювання входить до списку МЄВ (ОІЕ, 2019). Для діагностики даного захворювання рекомендують ПЛР за використанням олігонуклеотидних праймерів, специфічних до гена герпесвірусної тимідинкінази (Rud et al., 2018) (таблиця).

Іридовірус осетрових (AcIV-E) – це великий ядерно-цитоплазматичний ДНК-вмісний вірус. Вірус поки що не класифікований, але за попередніми дослідженнями його було віднесено до родини *Iridoviridae*. Натомість останні результати філогенетичного аналізу свідчать, що вірус більше подібний до мімівірусів. На сьогодні цей збудник було виділено у Північній Америці та Європі. В залежності від географічного походження та хазяїна іридовіруси осетрових поділяють на північно-американські та європейські ізоляти (WSIV, MRSIV, NV, WS-BC – американські віруси та AcIV-E штам виділений в Європі). AcIV-E – це сукупність усіх ізолятів іридовірусів осетрових, які було ідентифіковано у Європі. Іридовіруси осетрових остаточно не класифіковані і вважаються різними штамми одного і того ж вірусу. Особливу увагу приділяють іридовірусам осетрових в США та Канаді, де вірус спричиняє епізоотії в природних умовах. Нещодавно вірус було виявлено у Європі і швидко розповсюджено серед країн континенту: Франція, Італія, Німеччина, Іспанія, Польща, Швеція та Україна. Чутливими до AcIV-E є російський осетр (*A. gueldenstaedtii*), сибірський осетр (*A. baeri*), адриатичний осетр (*A. naccarii*), севрюга (*A. stellatus*), стерлядь (*A. ruthenus*) та білуга (*Huso huso*). В умовах аквакультури вірус спричиняє смертність осетрових, яка може становити понад 50 % (Bigarre et al., 2017).

Це епітеліотропний вірус, який реплікується в шкіряних покривах, зябрах та верхніх частинах травного тракту. На відміну від інших іридовірусів риб здатний передаватися як горизонтально, так і вертикально. Для ідентифікації вірусу використовують метод ПЛР. Молекулярна діагностика на основі ПЛР та філогенетичний аналіз проводиться з використанням нуклеотидних послідовностей головного капсидного білка (MCP) (Rud et al., 2020).

Вірус віспи коропа (CEV) був вперше виявлений у Європі в 2013 році, де спричинив спалахи з високим ступенем смертності на коропових господарствах. Інфекція на багатьох господарствах була виявлена як у клінічних так і у безсимптомних варіантах. Хоча вірус був присутній в аквакультурі упродовж багатьох років, все ще не вистачає даних щодо факторів передачі вірусу. Його векторами є інші види риб, що утримуються разом коропом. Краще розуміння механізмів передачі вірусу та перелік векторів є важливим і корисним у заходах, спрямованих на обмеження поширення вірусу (Matras et al., 2019). Тому ідентифікація вірусу як у коропа, так і у інших коропових видів в аквакультурі України є необхідною.

Підвищення температури води впливає на емерджентний вірус (CEV). Сьогодні це захворювання шириться у Європі, а в Україні є підтвердження, що даний збудник циркулює в коропових господарствах вже понад 10 років. До CEV чутливі короп та товстолоб. Вірус стає

більш активним і викликає захворювання при теплих температурах весною та літом, але захворювання виявляють майже цілий рік, навіть при температурі до 3 °С. Захворювання ендемічне для України, поширення вірусу здійснюється неконтрольовано з неперевереним рибопосадковим матеріалом.

Для діагностики вірусу CEV використовують напівгніздову ПЛР (Way et al., 2017). Позитивна реакція в першому раунді свідчить про гострий перебіг інфекційного процесу та високий титр вірусу в тканинах. При позитивному результаті в другому раунді можна стверджувати про хронічну інфекцію. Для відбору зразків найкращими органами є зябра. Дуже часто у інфікованих особин спостерігаються вторинні бактеріальні інфекції.

Таблиця

Гени-мішені для розробки олігонуклеотидних праймерів з діагностики вірусів риб методом ПЛР

Віруси	Геном	Мішень (ген)	Довжина гена, п. н.	Метод діагностики
IPNV	РНК	VP2	3088-3104	ЗТ-ПЛР
		NS	3088-3104	
IHNV	РНК	N	1176-1368	ЗТ-ПЛР
		G	1518-1621	
VHSV	РНК	N	1215-1452	ЗТ-ПЛР
		G	1524-1560	
SVCV	РНК	G	1530-1598	ЗТ-ПЛР
PRV	РНК	Sigma 3	1143	ЗТ-ПЛР
CyHV-3 (KHV)	ДНК	TK	980-1003	ПЛР
		SphI-5	607-610	
		ORF89	483-485	
AcIV-E	ДНК	MCP	1716	ПЛР
CEV	ДНК	P4a	2028	ПЛР

ВИСНОВКИ

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

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

3. В діагностиці інфекційних захворювань риб найбільш популярним різновидом ПЛР є мультиплексна реакція (мПЛР). Використання методу мПЛР дозволяє ідентифікувати одразу декілька вірусів в одному зразку, взятого безпосередньо від риби. До того ж цей різновид ПЛР

зменшує затрати на реагенти для реакції та скорочує час на ідентифікацію кожного збудника завдяки використанню специфічних наборів олігонуклеотидів.

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

Перспективи досліджень. В майбутньому, за використання молекулярно-біологічних та вірусологічних методів досліджень буде визначено спектр вірусів риб в аквакультурі, оцінено ситуацію з їх поширення та можливі шляхи інтродукції в Україні. На основі даних комплексного моніторингу буде оцінено стан біобезпеки в рибогосподарських підприємствах та розроблено рекомендації з покращення епізоотичної ситуації в рибництві України. Діагностичні тест-системи на основі ПЛР для ідентифікації вірусних інфекцій риб можуть бути удосконалені з огляду на нові молекулярно-генетичні дані.

References

Ashraf, U., Lu, Y., Lin, L., Yuan, J., Wang, M., Liu, X. (2016). Spring viraemia of carp virus: recent advances. *Gen Virol.* 97(5). 1037-1051. doi: 10.1099/jgv.0.000436.

Bigarré, L., Lesne, M., Lautraite, A., et al. (2017). Molecular identification of iridoviruses infecting various sturgeon species in Europe. *Fish Dis.* 40. 105–118. doi: 10.1111/jfd.12498

Buchatskyi, L.P., Rud, Yu.P., Zaloilo, O.V., Zaloilo, I.A. (2018). Suchasni metody biotekhnolohii u rybnytstvi. *Naukovo-metodychne vydannia - K. : DIA.* 192. - ISBN 978-617-7015-76-4 [in Ukrainian].

Buchatskyi, L.P., Rud, Yu.P., Matvyenko, N.N. (2020) *Virusnye infektsyy osetrov y lososei.* – K.: DIA. 240. - ISBN 978-617-7785-10-0 [in Russian].

European Commission: A new Animal Health Strategy for the European Union (2007-2013) where “Prevention is better than cure”. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities (2007). 26 pp. ISBN 978-92-79-06722-8

European Commission: Delegated Regulation (EU) 2020/689 of 17 December 2019 supplementing Regulation (EU) 2016/429 of the European Parliament and of the Council as regards rules for surveillance, eradication programmes, and disease-free status for certain listed and emerging diseases // <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/TXT/?uri=CELEX:32020R0689>

FAO. (2018). The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Haenen, O.L.M., Wa, K., Bergmann, S.M., Ariel, E. The emergence of koi herpesvirus and its significance to European aquaculture. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists.* 24 (6). 293 - 307.

Matras, M., Stachnik, M., Borzym, E., Maj-Paluch, J., Reichert, M. (2019). Potential vector species of carp edema virus (CEV). *J Fish Dis.* 42. 959–964. <https://doi.org/10.1111/jfd.13000>

OIE Aquatic Animal Health Code (the 22nd edition of the Aquatic Code 2019) // WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2019, Paris, FRANCE: <http://www.oie.int>

Rud, Yu., Maistrenko, M., Buchatsky, L. (2015). Characterization of an infectious pancreatic necrosis virus from rainbow trout fry (*Onchorhynchus mykiss*) in West Ukraine. *Virologica Sinica.* 30 (3). 231-233.

Rud, Yu.P., Buchatskyi, L.P. (2016) *Molekuliarne vyznachennia infektsiinykh zakhvoriuvan ryb / Tvarynnytstvo Ukrainy.* 4-5. 28-31. [in Ukrainian].

Rud, Yu., Maistrenko, M., Buchatsky, L. (2018). Polymerase chain reaction for identification of Cyprinid Herpesviruses in Ukraine. *Biotechnologia acta.* 11(1). 58-63.

Rud, Yu., Buchatsky, L., Matvienko, N. (2019). Characterisation of a newly isolated SVCV strain in Ukraine. *Biologija.* 65(3). 165–173. DOI: 10.6001/BIOLOGIJA.V65I3.4085.

Rud, Yu.P., Buchatskyi, L.P. Hrytsyniak, I.I. (2019). Shtam virusu infektsiinoho hematopoetychnoho nekrozu (Infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV), shtam "Ukraina" (IHNV "Ukraine" strain) dlia otrymannia vaktsyny proty infektsiinoho hematopoetychnoho nekrozu u lososevykh // Patent na korysnu model № 131514 vid 25.01.2019. [in Ukrainian].

Rud, Y., Bigarré, L., Pallandre, L., Briand, F.-X., Buchatsky, L. (2020). First genetic characterization of sturgeon mimiviruses in Ukraine. *J. Fish Dis.* 43(11). 1391-1400. <https://doi.org/10.1111/jfd.13239>.

Way, K., Haenen, O., Stone, D., et al. (2017). Emergence of carp edema virus (CEV) and its significance to European common carp and koi *Cyprinus carpio*. *Dis Aquat Org.* 126. 155 –166. <https://doi.org/10.3354/dao03164>.

World Bank. Fish to 2030: Prospects for Fisheries and Aquaculture (English). Agriculture and Environmental Services Discussion Paper; No. 3 (World Bank Group, Washington DC, 2013).