

## РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА ВИРУСНИ И БАКТЕРИАЛНИ ИНФЕКЦИИ В АКВАКУЛТУРИТЕ И АНАЛИЗ НА ЕПИЗОТИЧНАТА СИТУАЦИЯ В БЪЛГАРИЯ

ВАНЯ ЧИКОВА

Национален диагностичен научноизследователски ветеринарномедицински институт - София

Ефективността на рибопроизводствената дейност в значителна степен зависи от здравния статус на фермите. Опитът на страните от Европейския съюз в контекста на осигуряване на устойчивото развитие на сектора категорично доказва необходимостта от научнообосновани действия и технологизация на контролните функции чрез въвеждане на съвременни и обективирани критерии, осигурявани от подходящи лабораторни анализи (Anon. 2001/183/EC; Anon. OIE, 2012).

В съответствие със съвременните тенденции за организация и изпълнение на отговорностите, свързани със здравните изисквания към аквакултурите се разработва адекватна система за надзор, основана на рамките на действащите европейски Директиви в този отрасъл (Ahne W. et al., 1989; Anon. Council Directive 2006/88/EC; Antychowicz J. et al., 2006; Bandín & Dopazo, 2006; Jorgensen P. E. V., 1992; Knuesel et al., 2003; Olesen N. J., 1998; Olesen N. J. et al., 1997).

В зависимост от епизоотичната обстановка в Европейския съюз и в глобален мащаб, са се променяли и приоритетите за епизоотологичен контрол (Anon. OIE, 2012).

За оценка на значението на някои заразни болести по рибите ЕК групира нозологичните единици в следните категории:

- екзотични болести, които не са установени на територията на европейските страни са: епизоотична хемопоеична некроза (EHN) и епизоотичен улцеративен синдром (EUS);

- неекзотични болести с приоритетно значение за Европейската общност са: вирусна хеморагична септицемия (VHS), инфекциоз-

на хемопоеична некроза (IHN), инфекциозна анемия по съомгите (ISA), кой херпес вирусна инфекция (KHVD);

- за неекзотични болести с приоритетно национално или регионално значение са определени инфекциозната панкреатична некроза (IPN), пролетната виремия по шарана (SVC) и бактериалното бъбречно заболяване (BKD).

Познаването на епизоотичната ситуация в европейските страни и в света е от съществено значение поради осъществяваната вътреобщностна търговия или импорт от трети страни на оплоден хайвер, замразени сладководни и морски видове риба и продукти от аквакултури, които са важен източник на инфекция при вирусните заболявания (Anon., 2012; Antychowicz et al., 2002; Ariel et al., 2002; Dale et al., 2009; Hedrick et al., 2003; Murray et al., 2005; Rajahalli et al., 2006; Reschova et al., 2008; Stone et al., 2008; Thiéry et al., 2002).

Прегледът на проведените у нас изследвания показва, че към настоящия момент е поставян акцент върху проучвания на актуални за отделните рибовъдни ферми нозологични единици и терапията на рибите в условията на интензивно отглеждане. Независимо от изпълнението на официалната програма за надзор след настъпилите дълбоки структурни промени в отрасъла, данните за здравния статус не са систематизирани през последните години.

С цел актуализация на информацията, свързана с епизоотичната ситуация в рибовъдните ферми са представени резултатите от проведените скринингови изследвания, базирани на съвременни лабораторно-диагностични методи.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

**Епизоотична информация.** Като източник на информация за епизоотичния статус на рибовъдните обекти в Европа и страната за периода 2008-2012 г. са използвани литературни сведения, данни от проведени лабораторни изследвания по мониторингова програма на БАБХ, данни от диагностични изследвания и посещения на рибовъдни обекти.

**Изследвани проби.** Изследвани са 4050 проби от шаранови видове риби, 6480 проби от пъстървови риби и 308 бр. есетрови риби, произхождащи от 103 рибовъдни обекти в страната (27 пъстървови, 72 шаранови и 4 есетрови стопанства, в т.ч. проби от язовири и микроязовири, използвани за рибостопанска дейност) от различни технологични групи и региони на страната.

При мониторинговите изследвания са прилагани стандартни лабораторни методи, използвани за контрол на икономически значимите заболявания по рибите, представени в Наръчника от диагностични тестове за водни животни на Международното бюро по епизоотиите (VII-то издание от 2012 г.). В специален раздел на Решение 2001/183/ЕС също са визирани лабораторно-диагностичните методи за откриване и потвърждаване на някои неекзотични заболявания по рибите и са определени минималните изисквания към плановете за пробовземане.

**Клетъчни култури.** При вирусологичните изследвания е използвана ЕРС клетъчна линия, получена от папилома на шаран (*Cyprinus carpio* L.) и BF – 2 клетъчна линия, които се отличават с висока чувствителност при изолация на патогенни за рибите вируси (Fijan N. et al., 1983; Lorenzen E. et al., 1999; Skall H. F. et al., 2005). За култивирането на тези клетъчни линии са използвани синтетични хранителни среди – Eagle's minimum essential medium (EMEM) с добавка на фетален телешки серум и антибиотици.

**Органни суспензии.** За инокулиране на 24-часов клетъчен монослой са използвани 10% (v/v) органни суспензии от сърце, далак, бъбрек и мозък.

**Идентифициране на изолираните вирусни щамове.** Инокулираните клетъчни култури са инкубирани на 15°C за пъстървовите риби и на 20°C за шарановите в продължение на 7-10 дни. Размножаването на вирусите е контролирано ежедневно, а цитопатичният ефект (ЦПЕ) е отчитан визуално по четирикръстната система.

За проучване и идентифициране на изолираните вирусни щамове са използвани индиректен имунофлуоресцентен тест (IFAT), ензим-свързан имуносорбентен тест (ELISA) и имунопероксидазен тест (IPT) (Anon. 2001/183/ЕС; Anon OIE, 2012; Ariel E. et al., 2001; Dixon et al., 1984; Rodak L. et al., 1988, 1993; Vesely T. et al., 2004).

**Микробиологично изследване.** Обект на микробиологично изследване са риби с характерна клинична картина, като е използван патологичен материал от вътрешни органи (черен дроб, далак, бъбрек, храносмилателен канал) съгласно преценката от патологоанатомичната находка.

Бактериалните агенти са изолирани на триптозо-соев (TSA) и кръвен агар. За експресна идентификация на теренните изолати е използвана автоматизирана система за бактериална идентификация Micronaut 6, Merck и API. За изолация на *Renibacterium salmoninarum* са прилагани селективни хранителни среди – KDM-2 и S-KDM (Chambers et al., 2006). Посевките са инкубирани при температура 15°C в продължение на 15-18 дни. Диференцирането на изолатите е провеждано с търговски кит ELISA (Guómundsdottir et al., 1993; Melvin et al., 1995; Olea et al., 1993).

Окончателното диференциране на бактериалните изолати е съобразено с определителя на Bergey (2001).

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Данните за установените вирусни и бактериални заболявания в рибовъдните ферми у нас при изпълнение на Програмата за надзор на здравния статус през периода 2008-2012 г. са отразени в табл. 1.

Анализът на получените данни от лабораторните изследвания показва, че в нашата страна през периода 2008-2012 г. в пъстърво-

Таблица 1. Здравословен статус на рибовъдните ферми и установени болести в изследваните проби по Програма за надзор и научни задачи

Table. 1. Health status of the fish farm and established disease in the samples from surveillance programe and from research

Година	Брой рибовъдни ферми	Видове рибовъдни ферми	Брой	Органични пулове	Вирусни изолати					Бактериални изолати								
					VHSV	IPNV	SVSV	Y.r/.	R. salm.	Aeromonas spp.	Програма за надзор	Програма за надзор	Програма за надзор	Програма за надзор	Програма за надзор			
2008	125	пъстървови	37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		есетрови	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		шаранови	88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2009	162	пъстървови	54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		есетрови	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		шаранови	108	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2010	171	пъстървови	51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		есетрови	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		шаранови	120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2011	155	пъстървови	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		есетрови	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		шаранови	115	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2012	137	пъстървови	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		есетрови	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		шаранови	106	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

вите ферми са регистрирани спорадични случаи на вирусна хеморагична септицемия в 2 рибовъдни стопанства. Заболяването вирусна хеморагична септицемия е установено през м. декември 2007 г. ВХС вирусът е изолиран от ед-нолетни и двулетни дъгови пъстърви с характерна клинична картина. При патологоанатомично изследване се наблюдава двустранен екзофтalmус и петехиални кръвоизливи по хрилните листенца, перивисцералната мастна тъкан и в мускулатурата; далакът е увеличен и с тъмен цвят.

При заразяване на стабилна клетъчна линия ЕРС с органични суспензии от пробата се наблюдава характерен цитопатичен ефект (ЦПЕ) 48 h след инокулацията. Инфекциозните титри на изолатите са между  $10^{4.6} - 10^{6.8}$  TCID<sub>50</sub>/cm<sup>3</sup>.

За идентификация на VHS изолатите са използвани индиректен имунофлуоресцентен тест, имунопероксидазен тест и ELISA диагностични китове. Специфично оцветяване и положителна реакция се установява само при използване на хомоложни реагенти в клетъчните култури, заразени с нашите изолати и при положителните контроли с референтни VHS вирусни щамове.

Нови огнища са регистрирани през м.март и ноември на 2008 г. и през м. ноември, 2009 г.

В заразените рибовъдни ферми в края на 2009 г. е проведена “stamping out” оздравителна програма с унищожаване на рибите от всички технологични групи и последваща дезинфекция на басейните и рибовъдния инвентар. Производствената дейност беше възстановена след тримесечен период, като се осигури внос на оплоден хайвер от рибовъдни ферми, категоризирани като свободни от заболяването.

Ситуацията в страната по отношение на това заболяване остава стабилна и при последващите изследвания - вирусната хеморагична септицемия не е установена както в тези рибовъдни ферми, така и в други водосборни зони. Анализът на епизоотичната ситуация показва, че е налице трайна тенденция за ликвидиране на заболяването. В сравнение с периода до 1989 г., когато повече от 38% от рибовъдните ферми бяха заразени, сега регистрираните случаи са изолирани.

Проведеният секвентен анализ в Референтната лаборатория на Общността показва, че изолираният в пъстървов обект „Бяла река” щам принадлежи към серогрупа Id, който е сравнително по-рядко срещан в рибовъдните обекти на Европа и е изолиран предимно в Норвегия при садково отглеждане в Северно море пъстървови риби. Находката на този изолат в нашата страна поражда редица въпроси за произхода на инфекцията. Имайки пред вид факта, че в това стопанство не е внасян оплоден хайвер и зарибителен материал, може да се допусне, че вирусът е пренесен с недезинфекцирани касетки за транспортиране на охладена риба до големи търговски вериги, в които са съхранявани преди това вносни замразени рибни продукти. Останалите два изолата принадлежат към серотип Ia, който е по-широко разпространен в рибовъдните ферми на континентална Европа. Вероятно се касае за стационарни огнища на тази инфекция, имайки предвид произхода на изолатите в нашата страна.

При проведените мониторингови изследвания в пъстървовите стопанства у нас са получени негативни резултати за инфекциозна хемопоеична некроза и инфекциозна анемия по сьомгата (ISA).

Вирусът на инфекциозната панкреатична некроза (IPN) е изолиран за първи път от нулевогодишни пъстърви, произхождащи от пъстървово стопанство „Сини ханчета”, Смолянски регион през пролетта на 2006 г. при вносен оплоден хайвер. През 2007 г. е доказано проявление на IPN при зарибителен материал от вносен хайвер в 4 пъстървови ферми. През 2009 г. заболяването е установено и в модерна рибовъдна ферма от рециркуляционен тип, в която също е използван вносен оплоден хайвер. Постепенно заболяването се разпространява и понастоящем е констатирано в 18 рибовъдни обекта от различни региони на страната.

Първоначални промени в клетъчните култури се установяват 48-72 h след инокулиране с патологичен материал. Инфектираните клетки губят своята характерна вретеновидна форма. ЦПЕ се характеризира с поява на увеличени, окръглени “блестящи” клетки, превръщащи се в гроздовидно струпани големи балониращи клетки. След 96-120 h значителна част от монослоя се засяга и се установяват отделни зрителни полета с частично опадане на деструктивна монослой.

Изоляцията на IPN вируса от патологичен материал върху чувствителни клетъчни култури и наблюдаването на характерен ЦПЕ е един от етапите на диагностичните изследвания. Изолатите са тествани в  $\alpha$  процедура на вирус-неутрализационната реакция при използване на референтен анти IPN-Sp серум в разреждане 1:100.

Получените резултати потвърждават антигенната идентичност на теренните изолати с референтен щам IPN-Sp.

При лабораторни изследвания на шаран и растителноядни риби с клинически изразена хеморагична диатеза, произхождащи от нерегистриран рибовъден обект (микрорязовир), в който е наблюдавана висока смъртност, през 2009 г. е изолиран вирусен агент, който дава ЦПЕ и слаба положителна реакция с SVC ELISA кит, което пороци съмнения за случай на пролетна виремия. При проведената идентификация в Европейската референтна лаборатория по болести на рибите в Архус, Дания изолатът е определен като Tench Rhabdovirus.

Пролетната виремия по шарана е акутно контагиозно вирусно заболяване, което е установено за първи път в нашата страна през 2010 г. в едно рибовъдно стопанство. В стопанството е наблюдавана висока смъртност (40-45%) и характерна клинична картина при еднолетни и двулетни шарани. При патологоанатомичното изследване се наблюдава настръхване на люспите, едностранен или двустранен екзофтальмус, асцит с подуване на корема и изпъкване на ануса. Хрилете са исхемични, а в отделни участъци по кожата се наблюдават кръвоизливи с различна големина и конфигурация. Изолираният в ЕРС-клетъчни култури SVC вирус е идентифициран чрез ELISA и индиректен имунофлуоресцентен тест.

Физиологичният статус на рибите в периода след зимуване, рязкото повишаване на температурата на водата през пролетта до 16-17°C, голямата плътност на посадката и забавеното разселване на рибите вероятно се явяват стресови фактори, повлияващи клиничното проявление на пролетната виремия по шарана в тази ферма.

При последващите скринингови изследвания на риби от това стопанство SVC вирус не беше доказан. Негативни са и изследванията за доказване на антитела в кръвни серуми, получени в края на угоителния период.

До този момент в нашата страна няма регистриран случай на кой-херпес вирусна инфекция (KHV).

При мониторинговите изследвания е установено широко разпространение на заболяването "ренибактериоза" в пъстървовите ферми в нашата страна. Заболяването се предава по вертикален път (чрез оплоден хайвер), чрез водата от рибопреработвателни предприятия при обработка на заразна риба, както и чрез недезинфекцирани цистерни и инвентар за транспорт на жива или охладена, непочистена от вътрешни органи риба. Положителни резултати за изолация на *Renibacterium salmoninarum* от сивен (*Salvelinus fontinalis*) и пъстърва (*Oncorhynchus mykiss*) са получени в проби от 17 рибовъдни ферми от различни региони на страната.

Установено е проявление на заболяването в

остра и хронична форма, като са засегнати най-често едногодишни и двугодишни риби, но не е изключено проявление и при други възрастови групи риби. Заболяването има сезонен характер, констатирано е предимно през късна пролет и лятото. Заболелите риби плуват бавно по повърхността на водата, извършват некоординирани движения, не реагират адекватно на външни дразнения и не приемат храна. При хронично болните риби се наблюдава почерняване на тялото, бледи анемични хриле, асцит и екзофтальмус. При някои риби се установяват ерозирани участъци и кожни улцерации в областта на дорзалната или латералната линия или дифузни области от интракожни хеморагии.

Патологоанатомичните изменения зависят от степента на болестния процес. Установява се хиперемия на стените на коремната кухина и хидремичност на тъканите. Във вътрешните органи при всички изследвани риби се констатира множество вариращи по големина белезникави, нодуларни образувания (абсцеси). Бъбреците са най-силно засегнати, по-светли на цвят, набъбнали с вълнообразна повърхност. В някои случаи се установяват псевдомембранозни налепи по далака и черния дроб. При голяма част от засегнатите риби се наблюдава и спленомегалия.

При микробиологично изследване на патологичен материал от бъбреци, черен дроб и далак на клинично болни риби върху селективни хранителни среди, са изолирани бактерии, които образуват малки бели или жълтеникаво-кремави колонии. Колониите достигат максимум на растеж на 15-18-ия ден след инкубация при 15°C. Наблюдавани са известни различия в размерите на колониите – по-големи с диаметър приблизително 3 mm са наблюдавани върху S-KDM, докато върху KDM-2 те са с размер 0.5-1.0 mm.

В натривки и отпечатъчни препарати от бъбрек, оцветени по Грам, се наблюдават малки, Грам-положителни бактерии, най-често диплобацили. Изолираните бактерии са неподвижни, не образуват капсули и спори, продуцират каталаза и протеолитичен ензим.

През последните две години се наблюдава тенденция за намаляване броя на засегнатите

ферми, което е свързано, от една страна, с намаляване относителния дял на отглежданите количества сивен и от друга – с ограничаване на ремонтните и маточните стада в нашите рибовъдни ферми и преориентиране към внос на оплоден хайвер от регистрирани като свободни от това заболяване ферми и страни.

При проведените епидемиологични изследвания е установено широко разпространение на заболяването йерсиниоза (*Yersiniosis*) в пъстървовите ферми. Положителни са повече от 60% от изследваните проби, като са изолирани биотип 1 и биотип 2 на *Yersinia ruckeri*. Заболяването остава най-сериозния проблем у нас и причинява значителни икономически щети вследствие висока смъртност и разходи за лекарствени средства и ваксини.

В един от садковите комплекси в страната е изолиран *Streptococcus iniae* и през последните години с успех се прилага автоваксина.

За шарановите стопанства сериозен проблем остават бактериалните инфекции, причинени от бактерии от р. *Aeromonas* (*Aeromonas hydrophila*) и р. *Pseudomonas* (*Ps. fluorescens*). Наблюдавана е висока смъртност и клинично проявление на аеромоноза също при веслонос (*Polyodon spathula* Walb.) и есетрови видове риби.

В мониторинговата програма през последните две години са включени близо 65% от регистрираните в БАБХ рибовъдни обекти. В същото време по данни на Европейската референтна лаборатория по болести на рибите е изяснен статусът само на 33-37% от континенталните рибовъдни ферми.

Вирусната хеморагична септицемия (ВХС) е икономически най-значимата вирусна инфекция при фермерно отглежданите пъстървови риби в страните от континентална Европа (Olesen, 1998). Данните от статистическите годишници на МБЕ за периода 2010-2012 г. показват, че степента на проявление на ВХС се изразява в един или няколко случая годишно (Румъния, България) до по-широко разпространение (Франция, Холандия, Германия, Италия). Цялата крайбрежна зона и вътрешните водоеми на Великобритания, Норвегия, континентална Финландия, Ирландия и Швеция

са свободни от тази инфекция. В резултат от проведени оздравителни програми и постоянен мониторинг, определени водни екосистеми в Дания, Франция, Германия и Испания също са обявени от Европейската комисия като свободни зони. В Испания заболяването не е диагностицирано до 1994 г. и никога не е установявано в Португалия и Гърция (Anon., 2012; Ariel & Olesen, 2002; Olesen, 1998). В някои съобщения обаче се срещат данни за изолация на ВХС вируса от ферми в Иберийския полуостров след 1994 г. (Lopez-Vazquez et al., 2003). Antychowicz et al. (2006) анализират разпространението на ВХС в Полша за периода 1999-2005 г. и установяват значително намаляване на броя на заразените ферми след проведената ерадикационна програма.

До 1988 г. ВХС вирусът е установен предимно при сладководни пъстървови видове риби във фермите на континентална Европа. По-късно е изолиран от широк ареал свободно живеещи морски видове риби в Североамериканската част на Тихия и Атлантическия океан, Северно и Балтийско море. (Kocan R. et al., 1997). За първи път вирусът е изолиран в Северна Америка в региона на щата Вашингтон, Аляска и Канада от овариална течност на чавича (*O. tshawytscha*) и кижуч (*O. kisutch*). През 2001 г. е наблюдавано избухване на заболяването и в Япония във ферма за отглеждане на *Paralichthys olivaceus* (Isshiki T. et al., 2001).

По данни на Olesen et al. (непубликувани анкетни данни на Европейската референтна лаборатория по болести на рибите) при проведените през 2012 г. изследвания на 12741 ферми, ВХС е установена само в 56 от тях. Инфекциозната анемия по съомгата (ISA) не е установена в европейските ферми през 2012 г., докато инфекциозната хемопоеична некроза е регистрирана в 61 от изследваните 8363 ферми. КНВ инфекция е установена в 53 от изследваните 10403 ферми.

Независимо от факта, че пролетната вирусна инфекция по шарана, инфекциозната панкреатична некроза и ренибактериозата по пъстървата не са включени в списъка на неекзотичните нозологични единици, обект на контрол съгласно

Приложение IV на Директива 2006/88/ЕС, заболяванията са обект на програмите за надзор, съответно в 19, 18 и 14 от общо 35 европейски страни.

Заболяванията в популациите са динамичен феномен и се установяват колебания в разпространението, които зависят от взаимодействието на различни биотични и абиотични фактори.

Проведените наблюдения върху епизоотичното състояние в страната ни позволяват да анализираме и моделираме новите тенденции и значението на всеки един от елементите в епизоотичния процес в условията на аквакултура.

Възприемчивостта на популацията при голяма концентрация на риба вследствие въведените интензивни технологии съществува като постоянно звено в епизоотичната верига поради липсата на специфични средства за профилактика и терапия, от една страна, и от друга, поради особеностите в имунната система при рибите като пойкилотермни животни. Поради задълбочаването на хоризонталната и вертикалната интеграция в рибовъдството значението на това звено в епизоотичния процес нараства.

При анализа на епизоотологичните данни се установява, че осъществяването на неконтролируеми технологични връзки, липсата на системен диагностичен контрол и нарушаването на основни ветеринарно-санитарни изисквания при окомплектоване на стадата (транспортването на оплоден хайвер и зарибителен материал без ветеринарни сертификати или издаването им на база клиничен преглед без съответни лабораторно-диагностични изследвания, използването на непочистени и дезинфекцирани съдове, контейнери и транспортни средства), както и липсата на зонироване на рибовъдните ферми съобразно техния здравен статус, са основната причина за разпространение на заболяванията в нашите рибовъдни ферми. Аналогични данни относно евентуалните източници на зараза, пътищата за разпространение и контрол на основните вирусни и бактериални инфекции в рибовъдните ферми са посочени от редица автори (**Ahne et al., 1989; Murray et al., 2005; Olesen, 1998; Olesen et al., 1997; Olivier, 2002**)

Известно е, че в рибовъдството пътищата

за проникване на вирусни инфекции трудно се подават на контрол, още повече че водата и свободноживеещите популации риби също играят съществена роля при тяхното предаване (**Anon., 2008; Bozoğlu et al., 2007; Dale et al., 2009; Gagne et al., 2007; Olivier G., 2002**).

Независимо от факта, че Директива 2006/88/ЕС е транспонирана в нашето законодателство под формата на Наредба №17, която се изпълнява от 2008 г. все още статусът на рибовъдните ферми не е изяснен и те са отнесени в категория III. Причината за това е, че при скрининговите изследвания у нас невинаги са спазвани изискванията за двукратни изследвания, за сезонност, представителност и обем на пробата (брой риби и технологични групи), както и изискванията за базиран на оценка на риска надзор на фермите. Категорията на фермата съобразно здравния статус и нивото на риска обуславят видовете здравен надзор (активен или пасивен), честотата на проверките и вземането на регулярни проби за лабораторни изследвания.

Осъществяваната вътреобщностна търговия в ЕС – без граничен ветеринарен контрол или импорт от трети страни на оплоден хайвер, замразени сладководни и морски видове риба и продукти от аквакултури, има своите отрицателни страни в епизоотично отношение и способства за разпространението на някои нови или отдавна ликвидирани в страната нозологични единици – вирусна хеморагична септицемия, инфекциозна панкреатична некроза, ренибактериоза.

Понастоящем във ветеринарните сертификати, съпровождащи пратките оплоден хайвер, се отразяват само екзотичните и неекзотичните заболявания, посочени в Анекс IV на Директива 2006/88/ЕС, но няма данни за инфекциозна панкреатична некроза и бактериално бъбречно заболяване. Отсъствието на гаранции в този смисъл е основна причина за разпространението на тези заболявания у нас.

В бъдеще – при разработване на системата за епидемиологичен контрол в рибовъдните ферми, е необходимо да се акцентира на принципите за определяне и достигане статут на зони и ферми, свободни от вирусни заболява-

ния и на изискванията при изработване на контингенс-планове и предприемане на мерки за ерадикация на нозологичните единици, включени в списъка на екзотичните и неекзотични заболявания съобразно европейските нормативни документи.

Подлежат на обсъждане възможностите освен регистрация на рибовъдните ферми и отразяване на местонахождението по GIS, да се въвеждат данни за техния здравен статус и категория в съответствие с европейските изисквания. Наличните данни ще позволяват да се категоризират рибовъдните ферми в съответствие с изискванията на Директива 2006/88/ЕС и на база анализ на риска да се организира провеждането на скринингови изследвания.

Официалният лабораторен контрол е неразделна част от европейската политика за гарантиране здравеопазването на животните в т.ч. на аквакултурите. Препоръчва се усъвършенстване и поддържане на системата за постоянен епизоотологичен надзор и диагностична готовност за тези болести, с оглед получаване на резултати в реално време. По този начин, основавайки се на рамките на европейското законодателство в България ще се осигури ефективна организация и борба със заразните болести при рибите и въвеждане на ветеринарно-екологичен контрол с оглед превенция на водните екосистеми от заразяване с патогенни причинители. Нерешен обаче остава въпросът за финансиране на програмите за ерадикация и обезщетения на фермерите.

Независимо от нерешените въпроси процесите по въвеждане на Директива 2006/88/ЕС са в прогрес, а успешното им осъществяване зависи от откритата и позитивна колаборация между фермерите и техните асоциации от една страна, и от друга – от компетентните органи за официален контрол на здравия статус в аквакултурите.

## ИЗВОДИ

При проведените мониторингови изследвания в рибовъдните ферми за заболявания, включени в нотификационния списък на МБЕ

и Директива 2006/88/ЕС са получени негативни резултати за инфекциозна хемопоеична некроза по пъстървата, инфекциозна анемия по сьомгата и кой-херпес вирусна инфекция при шарана.

През периода 2008-2012 г. са регистрирани три случая на вирусна хеморагична септицемия, а в 18 рибовъдни ферми е установена инфекциозна панкреатична некроза.

За първи път в страната от проби шаран и растителноядни риби са изолирани етиологичният агент на пролетната виремия по шарана (SVCV) и Tench Rhabdovirus.

Значителни икономически загуби в аквакултурите са свързани с широкото разпространение на ренибактериоза и йерсиниоза в пъстървовите ферми, както и инфекции, причинени от бактерии от р. *Aeromonas* (*Aeromonas hydrophila*) и р. *Pseudomonas* (*Ps. fluorescens*) в шарановите стопанства.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ahne W, J. R Winton, T. Kimura, 1989. Prevention of infectious diseases in aquaculture, J.Vet.Med. (B), 36, 561-567.
2. Anonymous, 2001. 2001/183/EC: Commission Decision of 22 February 2001 laying down the sampling plans and diagnostic methods for the detection and confirmation of certain fish diseases and repealing Decision 92/532/EEC. Official Journal of the EC 2001a; L067:0065-76.
3. Anonymous, 2006. Council Directive 2006/88/EC of 24 November 2006 on the health requirements for aquaculture animals and products, and prevention and control of certain diseases in aquatic animals. Official Journal of the EC OB No. L 328.
4. Anonymous, 2008. Scientific Opinion of the panel on AHAW on a request from the European Commission on aquatic animal species susceptible to diseases listed in the Council Directive 2006/88/EC. The EFSA Journal, 808, 1-144.
5. Anonymous, 2012. World Organisation for Animal Health Aquatic Animal Health Code, 13 ed., 265 pp. OIE, Paris, France.
6. Anonymous, 2012. World Organisation



for Animal Health Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals, 7 ed., 383 pp. OIE, Paris, France.

7. **Anonymous**, 2012. Outbreak reports of viral haemorrhagic septicaemia virus (<http://www.fish-pathogens.eu/vhsv/search.php>).

8. **Anonymous**, 2001. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2 nd.ed., XXI, 721 p;

9. **Antychowicz, J., A. Pękala**, 2002. VHS and IHN of fish in Poland and European countries. *MedycynaWet.* 58,341-343.

10. **Antychowicz, J., W. Mazur, M. Reichert, K. Paszowska, M. Matras**, 2006. Study on the control of VHS in Poland. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 50, 293–29.

11. **Ariel, E., N. J. Olesen**, 2001. Assessment of a commercial kit collection for diagnosis of the fish viruses: IHN, IPNV, SVCV and VHSV. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 21, 6–11.

12. **Ariel, E., N. J. Olesen**, 2002. Finfish in aquaculture and their diseases – A retrospective view on the European Community. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 22, 72–85.

13. **Bandín I, C. P. Dopazo**, 2006. Restocking of salmon in Galician rivers A health management program to reduce the risk of introduction of certain fish viruses. *Dipnet newsletter*; 35. Available in URL: <http://www.dipnet.info/>.

14. **Bozoğlu, M., V. Ceyhan, H. A. Cinemre, K. Demiryürek and O. Kılıç**, 2007. Important factors affecting trout production in the Black Sea Region, Turkey. *Czech Journal of Animal Science*, 52: 308-313.

15. **Chambers, E., G. Barker**, 2006. Comparison of culture media for the isolation of *Renibacterium salmoninarum* from naturally infected Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 26 (3) , 137-142.

16. **Dale, O. B., I. Ørpetveit, T. M. Lyngstad, S. Kahns, H. F. Skall, N. J. Olesen, B. H. Dannevig**, 2009. Outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in seawater-farmed rainbow trout in Norway caused by VHS virus Genotype III, *Dis. Aquat. Org.* 85: 93–103;

17. **Dixon, P. F., B. J. Hill**, 1984. Rapid detection of fish rhabdoviruses by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Aquaculture* 42, 1-12.

18. **Faisal, M. et al.**, 1980. Use of immunoperoxidase technique for detection of fish virus antigens. Pages 186-192 in W. Ahne, ed. *Fish diseases*. Third COPRAQ, Session. Springer-Verlag, Berlin.

19. **Fijan, N., D. Sulimanovic, M. Bearzotti, D. Muzinic, L. O. Zwillenberg, S. Chilmonczyk, J.F. Vautherot, P. de Kinkelin**, 1983. Some properties of the epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell line from carp (*Cyprinus carpio*). *Annales de l'Institut Pasteur. Virology*, 134 E, 207–220.

20. **Gagne, N., A. M. MacKinnon, L. Boston, B. Souter, M. Cook-Versloot, S. Griffiths, G. Olivier**, 2000. Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus from mummichog, stickleback, striped bass and brown trout in eastern Canada. *Journal of Fish Diseases*, 30, 213–223.

21. **Guðmundsdóttir S., E. Benediksdóttir, S. Helgason**, 1993. Detection of *Renibacterium salmoninarum* in salmonid kidney samples: a comparison of results using double-sandwich ELISA and isolation on selective medium. *J. Fish Dis.* 16:185-195.

22. **Hedrick R. P., W. N. Batts, S. Yun, G. S. Traxler, J. Kaufman, J. R. Winton**, 2003. Host and geographic range extensions of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus. *Dis. Aquat. Org.*, 55, 211–220. .

23. **Isshiki, T., T. Nishizawa, T. Kobayashi, T. Nagano, T. Miyazaki**, 2001. An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. *Diseases of Aquatic Organisms*, 47, 87-99.

24. **Jorgensen, P. E. V.**, 1992. Recent advances in surveillance and control of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) of trout. *Proceedings of the OJI International Symposium on Salmonid Diseases*, Hokkaido University Press, Sapporo, Japan, 60-71.

25. **Kocan, R., M. Bradley, N. Elder, T. R. Meyers, W. N. Batts, J. R. Winton**, 1997. North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus is highly pathogenic for laboratory-reared pacific herring. *J. Aquat. Anim. Health*, 9, 279–290.

26. **Knuesel, R., H. Segner, T. Wahli**, 2003. A survey of viral diseases in farmed and feral salmonids in Switzerland. *Journal of Fish Diseases*, 26, 167–182;

27. **López-Vázquez, C, N. Bain, J. G. Oliveira, M. Snow, R. S. Raynard, J. L. Barja, C. P. Dopazo**, 2003. Characterization of VHSV isolates from Iberian origin and from the Flemish Cap by sequencing. 11th International Conference of the EAFP on Diseases of Fish and Shellfish, St. Julians, Malta, 21-26 September, 2002. Abstract Book, p.138.
28. **Lorenzen, E., B. Carstensen, N. J. Olesen**, 1999. Inter-laboratory comparison of cell lines for susceptibility to three viruses: VHSV, IHNV and IPNV. *Dis. Aquat. Org.*, 37, 81–88.
29. **Melvin R. W., Ching Ching Wu, R. Sharon**, 1995. Comparison of diagnostic tests for bacterial kidney disease in juvenile steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) *J. Vet. Diagn. Invest.*, 7, 494–499.
30. **Murray, A.G., E. J. Peeler**, 2005. A framework for understanding the potential for emerging disease in aquaculture. *Preventive Veterinary Medicine* 67;223–35.
31. **Olea, I, D. W. Bruno, T. S. Hastings**, 1993. Detection of *Renibacterium salmoninarum* in naturally infected Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Aquaculture* 116, 99–110;
32. **Olesen, N. J.**, 1998. Sanitation of viral haemorrhagic septicaemia (VHS). *J. Appl. Ichthyol.*, 14, 173–177.
33. **Olesen N. J., H. Korsholm**, 1997. Control measures for viral diseases in aquaculture: eradication of VHS and IHN. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 17, 229–233.
34. **Olivier, G.**, 2002. Disease interactions between wild and cultured fish: observation and lessons learned in the American northwest (Atlantic provinces). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists.*; 22:103–9.
35. **Raja-Halli, M., T. K. Vehmas, E. Rimala-Parnanen, S. Sainmaa, H. F. Skall, N. J. Olesen, H. Tapiovaara**, 2006. Viral haemorrhagic septicaemia (VHS) outbreaks in Finnish-rainbow trout farms. *Diseases of Aquatic Organisms*, 72, 201–211.
36. **Reschova, S., D. Pokorova, J. Hulova, P. Kulich, T. Vesely**, 2008. Surveillance of viral fish diseases in the Czech Republic over the period January 1999 – December 2006 *Veterinari Medicina*, 53, (2), 86–92.
37. **Rodak, L., Z. Pospisil, J. Tomanek, T. Vesely, T. Obr, L. Valicek**, 1988. Enzyme-linked immunosorbent-assay (ELISA) detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in culture fluids and tissue-homogenates of the rainbow-trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases*, 11, 225–235.
38. **Rodak, L., Z. Pospisil, J. Tomanek, T. Vesely, T. Obr, L. Valicek**, 1993. Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) for the detection of spring viraemia of carp virus (SVCV) in tissue-homogenates of the carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Diseases*, 16, 101–111.
39. **Skall, H. F., N. J. Olesen, S. Møllergaard**, 2005. Viral haemorrhagic septicaemia virus in marine fish and its implications for fish farming – a review. *Journal of Fish Diseases*, 28, 509–529.
40. **Skall, H. F., N. J. Olesen, S. Møllergaard**, 2005. Prevalence of viral haemorrhagic septicaemia virus in Danish marine fishes and its occurrence in new host species *DisAquatOrg*, 66:145–151.
41. **Stone, D. M., H. W. Ferguson, P. A. Tyson, J. Savage, G. Wood, M. J. Dodge, G. Woolford, P. F. Dixon, S. W. Feist, K. Way**, 2008. The first report of viral haemorrhagic septicaemia in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in the United Kingdom. *Journal of Fish Diseases*, 31: 775–784.
42. **Thiéry, R, C. de Boissésou, J. Jeffroy, J. Castric, P. de Kinkelin, A. Benmansour**, 2002. Phylogenetic analysis of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) isolates from France. *Diseases of Aquatic Organisms* 52, 29–37.
43. **Vesely, T., Z. Nevorankova, J. Hulova, S. Reschova, D. Pokorova**, 2004. Monoclonal antibodies to nucleoprotein and glycoprotein of the virus of infectious haematopoietic necrosis of salmonids (IHNV) and their use in immunoperoxidase test. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 24, 218–230.

DISSEMINATION OF THE VIRAL AND BACTERIAL INFECTIONS  
IN AQUACULTURE AND ANALYSIS OF  
EPIZOOTIC SITUATION IN BULGARIA

*V. Chikova*

*National Diagnostic&Research Veterinary Institute - Sofia*

SUMMARY

A specialized system for registration of freshwater fish producers in accordance with the new Directive 2006/88/EC will be established soon in our country. Bulgarian Food safety Agency, Department of Health Animal Control and National reference laboratory for fish and molluscs diseases carried out the official programme for control of viral fish diseases.

The surveillance programme of viral diseases includes general regulations concerning clinical health inspections with criteria for sampling and specific regulations for prevention, control and eradication in accordance with the requirements of the European legislation. The level of surveillance will be related both to the recognized health status and to the risk of contracting and spreading of diseases into/out of the farm or farming area.

VHS is the most important viral diseases occurred in our trout farms. The first isolation of Viral haemorrhagic septicaemia virus was done in December 2007. There were also outbreaks of Viral haemorrhagic septicaemia in farmed rainbow trout in March 2008 and in November 2008. IPN first emerged as a serious problem in Bulgaria during the last three year, when virus was detected in four trout farms. The epidemiological update on the current health situation showed that Yersiniosis (*Y.ruckeri*), Bacterial kidney disease (*Renibacterium salmoninarum*) and Aeromonosis (*Aeromonas salmonicida*) being the main problems in different trout farming regions. Based on the information received, it appears that our country is IHN and KHV free. First case of Spring viraemia of carp (SVC) was diagnosed in 2010 in one carp farm. The most important bacterial diseases encountered in carp farms are Erythrodermatitis – motil aeromonads mainly *A. hydrophilla* and *Ps. fluorescens*.

E- mail: vchikova@abv.bg