



Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје
Факултет за ветеринарна медицина – Скопје



Александар Бранко Трајчевски

**ЕПИДЕМИОЛОГИЈА НА ЗАРАЗНАТА ХЕМАТОПОЕТСКА
НЕКРОЗА, ВИРУСНАТА ХЕМОРАГИЧНА СЕПТИКЕМИЈА И
КОИХЕРПЕСВИРОЗАТА КАЈ ОДГЛЕДУВАНИТЕ РИБИ ВО
РЕПУБЛИКА СЕВЕРНА МАКЕДОНИЈА**

Докторски труд

Скопје, 2025



Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје
Факултет за ветеринарна медицина – Скопје



Александар Бранко Трајчовски

**ЕПИДЕМИОЛОГИЈА НА ЗАРАЗНАТА ХЕМАТОПОЕТСКА
НЕКРОЗА, ВИРУСНАТА ХЕМОРАГИЧНА СЕПТИКЕМИЈА И
КОИХЕРПЕСВИРОЗАТА КАЈ ОДГЛЕДУВАНИТЕ РИБИ ВО
РЕПУБЛИКА СЕВЕРНА МАКЕДОНИЈА**

Докторски труд

Скопје, 2025

Докторанд:

АЛЕКСАНДАР БРАНКО ТРАЈЧОВСКИ

Тема:

ЕПИДЕМИОЛОГИЈА НА ЗАРАЗНАТА ХЕМАТОПОЕТИСКА НЕКРОЗА, ВИРУСНАТА ХЕМОРАГИЧНА СЕПТИКЕМИЈА И КОИХЕРПЕСВИРОЗАТА КАЈ ОДГЛЕДУВАНИТЕ РИБИ ВО РЕПУБЛИКА СЕВЕРНА МАКЕДОНИЈА

Ментор:

Проф. д-р АЛЕКСАНДАР ЦВЕТКОВИЌ,
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје
Факултет за ветеринарна медицина – Скопје

Комисија за одбрана:

Проф. д-р КИРИЛ КРСТЕВСКИ
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје
Факултет за ветеринарна медицина – Скопје

Проф. д-р АЛЕКСАНДАР ЦВЕТКОВИЌ,
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје
Факултет за ветеринарна медицина – Скопје

Проф. д-р ЕЛЕНА АТАНАСКОВА ПЕТРОВ,
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје
Факултет за ветеринарна медицина – Скопје

Проф. д-р НИКОЛИНА НОВАКОВ,
Универзитет во Нови Сад, Србија
Земјоделски факултет – Нови Сад
Депарتمان за ветеринарна медицина

Проф. д-р АГИМ РЕЏЕПИ,
Универзитет „Хасан Приштина“ во Приштина, Косово
Факултет за земјоделство и ветеринарство – Приштина

Научна област:

БОЛЕСТИ КАЈ РИБИ, ПЧЕЛИ и ДИВЕЧ

Датум на одбрана:

ЕПИДЕМИОЛОГИЈА НА ЗАРАЗНАТА ХЕМАТОПОЕТСКА НЕКРОЗА, ВИРУСНАТА ХЕМОРАГИЧНА СЕПТИКЕМИЈА И КОИХЕРПЕСВИРОЗАТА КАЈ ОДГЛЕДУВАНИТЕ РИБИ ВО РЕПУБЛИКА СЕВЕРНА МАКЕДОНИЈА

– Апстракт –

Овој докторски труд ја обработува епидемиологијата на три значајни вирусни заболувања кај одгледуваните риби во Република Северна Македонија: заразна хематопоетска некроза (IHNV), вирусна хеморагична септикемија (VHS) и коихерпесвируса (KHVD). Истражувањето беше спроведено во периодот од 2020 до 2024 година, при што беа анализирани примероци од 57 рибници за пастрмка и 36 рибници за крап. Применети беа современи молекуларни техники (RT-qPCR), генетска типизација на изолатите, патохистолошки анализи и статистички модели за проценка на факторите на ризик.

Резултатите од анализите покажаа дека во ниту еден од анализираниите примероци не беше утврдено присуство на VHS и KHVD, со што се демонстрира слободниот здравствен статус на земјата во однос на овие болести. Наспроти тоа, беше забележан загрижувачки тренд во однос на ширењето на IHNV во пастрмските рибници. Бројот на заразени рибници со IHNV се зголеми од два случаи во 2018 година на 36 случаи во 2024 година. Генетската анализа покажа дека сите IHNV изолати припаѓаат на генотипот MAKIHNV1, со генетска варијација помала од 1,5%. Ова укажува на заеднички извор на инфекцијата или ограничена еволуција на вирусот во рамките на испитуваната популација. Патохистолошките испитувања на IHNV-позитивните риби открија значително оштетување на жабрените ламели, дегенерација на бубрежното ткиво и воспалителни промени во црниот дроб, потврдувајќи го негативното влијание на вирусот врз здравјето на рибите. Статистичката анализа утврди дека најголемиот фактор на ризик за ширењето на IHNV е набавката на жива риба, особено кога рибниците зависат од еден добавувач. Фреквенцијата на набавката и бројот на добавувачи исто така имаат значително влијание врз стапката на инфекција. Иако мерките за биосигурност, како што се дезинфекција на опремата и транспортните средства, не покажаа значителен ефект врз намалувањето на инфекцијата, контролата на пристап и воведувањето карантин се докажаа како клучни за превенција на ширењето на болеста. Анализите го потврдуваат слободниот здравствен статус на земјата за VHS и KHVD, но истовремено укажуваат на потребата од итни мерки за зајакнување на биосигурноста и засилен мониторинг со цел превенција, сузбивање и контрола на IHNV. Резултатите ја нагласуваат важноста на стратегиските пристапи во управувањето со рибниците, вклучувајќи строг карантин при внес на риба и унапредени биосигурносни системи. Истражувањето обезбедува клучни информации за епидемиологијата на вирусните заболувања во аквакултурата и дава насоки за намалување на ризикот од IHNV во одгледувалиштата.

Клучни зборови: Епидемиологија, риби, заразна хематопоетска некроза, вирусна хеморагична септикемија, коихерпесвируса, генетска типизација, патохистологија, биосигурност

EPIDEMIOLOGY OF INFECTIOUS HEMATOPOIETIC NECROSIS, VIRAL HEMORRHAGIC SEPTICEMIA, AND KOI HERPES VIROSIS IN AQUACULTURED FISH IN THE REPUBLIC OF NORTH MACEDONIA

– Abstract –

This doctoral dissertation investigates the epidemiology of three significant viral diseases affecting cultured fish in the Republic of North Macedonia: Infectious Hematopoietic Necrosis (IHN), Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS), and Koi Herpesvirus Disease (KHVD). The research was conducted from 2020 to 2024, analyzing samples from 57 trout farms and 36 carp farms. Advanced molecular techniques (RT-qPCR), genetic typing of isolates, histopathological analyses, and statistical models for assessing risk factors were employed.

The analyses revealed that VHS and KHVD were not detected in any of the tested samples, confirming the country's disease-free status regarding these infections. In contrast, a concerning trend was noted regarding the spread of IHN among trout farms. The number of farms infected with IHN increased from two cases in 2018 to 36 in 2024. Genetic analysis revealed that all IHN isolates belong to the MAKIHNV1 genotype, exhibiting minimal genetic variation of less than 1.5%. This indicates a common infection source or limited viral evolution within the studied population. Histopathological examinations of IHN-positive fish revealed significant damage to the gill lamellae, kidney tissue degeneration, and inflammatory changes in the liver, confirming the virus's detrimental impact on fish health. Statistical analysis identified that the most significant risk factor for the spread of IHN was the purchase of live fish, particularly when farms relied on a single supplier. The frequency of purchases and the number of suppliers also significantly influenced the infection rate. Although biosecurity measures such as equipment and vehicle disinfection showed no significant impact on infection reduction, access control and quarantine implementation proved critical in preventing disease spread. These findings confirm the disease-free status for VHS and KHVD in the country but highlight an urgent need to strengthen biosecurity measures and monitoring to control IHN. The research emphasizes the importance of strategic management approaches in fish farms, including strict quarantine protocols upon fish introduction and enhanced biosecurity systems. This study provides vital epidemiological information on viral diseases in aquaculture and offers guidelines for reducing the risk of IHN in fish farming operations.

Keywords: Epidemiology, viral diseases, fish, infectious hematopoietic necrosis, viral hemorrhagic septicemia, koi herpesvirus disease, phylogeny, pathohistology, biosecurity

Благодарност

Би сакал да им се заблагодарам на моето семејство, професорите, пријателите, студентите и сите колеги кои ми беа поддршка и ми помогнаа во текот на докторските студии!

Изјавувам дека докторскиот труд е оригинален труд, што го имам изработено самостојно.

Своерачен потпис на докторандот
(на електронската верзија потпис и скратеницата с.р.)

(на електронската верзија на докторски труд)

Изјавувам дека електронската верзија на докторскиот труд е идентична со отпечатениот докторски труд.

Потпис на авторот, с.р

Содржина

– Апстракт –	4
– Abstract –	5
Благодарност.....	6
ЛИСТА НА КРАТЕНКИ	9
ЛИСТА НА ТАБЕЛИ, ГРАФИЦИ И СЛИКИ	11
1.1. Аквакултурата во светот.....	13
1.2. Вируси во аквакултурата	14
1.3. Аквакултурата во Р.С. Македонија	14
1.4. Мотивација и значење на истражувањето.....	15
1.5. Работни хипотези	16
1.6. Научни придонеси.....	16
2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА.....	18
2.1. Заразна хематопоемска некроза (IHN)	18
2.1.1. Историја	18
2.1.2. Географска дистрибуција.....	18
2.1.3. Етиологија	19
2.1.4. Епидемиологија	19
2.1.5. Патогенеза.....	20
2.1.6. Клиничка слика.....	21
2.1.7. Патоанатомски промени	22
2.1.8. Контрола и превенција.....	22
2.1.9. Дијагностика	23
2.2. Вирусна хеморагична септикемија (VHS).....	24
2.2.1. Историја	24
2.2.2. Географска дистрибуција.....	24
2.2.3. Етиологија	25
2.2.4. Епидемиологија	26
2.2.5. Патогенеза.....	31
2.2.6. Клиничка слика.....	32
2.2.7. Патоанатомски промени	32
2.2.8. Контрола и превенција.....	33
2.2.9. Дијагностика	34
2.3. Коиерспесвируса (KHVD).....	36
2.3.1. Историја	36
2.3.2. Географска дистрибуција.....	36

2.3.3. Етиологија	37
2.3.4. Епидемиологија	37
2.3.5. Патогенеза.....	39
2.3.6. Клиничка слика.....	40
2.3.7. Патоанатомски промени	40
2.3.8. Контрола и превенција.....	40
2.3.9. Дијагностика	42
3. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО	45
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ НА РАБОТА	46
4.1 Етичка изјава.....	46
4.2 Собирање на примероците	46
4.3 Екстракција на РНК.....	47
4.4 Детекција на вируси	47
4.5 Генотипизација на изолати.....	49
4.6 Патохистологија.....	50
4.7 Категоризација на одгледувалишта за аквакултура и одредување на степенот на ризик од внес и ширење на болести.....	50
4.8 Статистичка анализа	51
5. РЕЗУЛТАТИ	53
5.1. Молекуларна дијагностика.....	53
5.2. Генотипизација.....	59
5.3. Патохистологија.....	61
5.4. Анализа на резултатите од контролна листа за категоризација на одгледувалишта за аквакултура	63
5.4.1 Ладноводни рибници	63
5.4.2 Топловодни рибници	68
6. ДИСКУСИЈА	74
7. ЗАКЛУЧОК.....	82
8. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА	83
9. ПРИЛОЗИ.....	93
9.1 Контролна листа за категоризација на одгледувалишта за аквакултура и одредување на степенот на ризик од внес и ширење на болести (извор Агенција за храна и ветеринарство).....	93

ЛИСТА НА КРАТЕНКИ

CCB: Chinook Salmon Embryo, 42; Common Carp Brain, 42
CNGV: Carp Nephritis and Gill Necrosis Virus, 36
CyHV-1: Cyprinid herpesvirus 1, 36
CyHV-2: Cyprinid herpesvirus 2, 36
CyHV-3: Cyprinid herpesvirus 3, 36
DEPC: Diethyl Pyrocarbonate, 46, 47
dNTP: дезоксирибонуклеотиден трифосфат, 48
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, 23, 24, 25, 42
EPC: Epithelioma papulosum cyprini, 23
EURL: European Union Reference Laboratories, 48
FVD: Fish-associated Virus Database, 13
G: гликопротеин, 18, 24, 25, 34, 48
H&E: хематоксилин-еозин, 49
IFAT: Indirect Fluorescent Antibody Test, 25, 43
IHNV: Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (вирус на инфективна хематопоемска некроза), 75
IMTA: интегрирана мултитрофична аквакултура, 13
kbp: kbp (kilobase pairs, 36
KF-1: Koi Fin, 42; Koi Fin-1, 42
KHV: Koi herpesvirus, 42, 48
KHVD: Koi Herpesvirus Disease (болест предизвикана од кои херпес вирусот, 15, 34, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 48, 55, 74
L: полимераза, 18, 25, 41
MEM: minimum essential medium, 46
ММС: меланин-макрофажни центри, 60, 61, 62
N: нуклеопротеин, 18, 24, 25, 47
nm: nanometer (нанометар), 23, 25, 33, 36
NT: Neutralization Test, 24
NV: не-вирион протеин, 18, 25
ORF: Open Reading Frames, 36
PCR: Polymerase Chain Reaction, 34, 38, 42, 46, 48, 74
PFU/g: Plaque Forming Units per gram (единици што формираат плаки по грам), 21
qRT-PCR: quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, 34
RaHV-1: Ranid herpesvirus 1, 36
RAS: рециркулационите аквакултурни системи, 13, 14
SNP: Single Nucleotide Polymorphism, 76

ssRNA: Едноверижна рибонуклеинска киселина, 13
UV: ултравиолетова (ултравиолетова светлина), 32, 46
VHS: Viral hemorrhagic septicemia, 15, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 44, 45, 46, 47, 55, 74
WGS: Whole Genome Sequencing, 76
WOAH: World Organisation for Animal Health, 15, 19, 36
µl: микролитар, 46, 47, 48
ДНК: Дезоксирибонуклеинска киселина, 22, 31, 32, 38, 40, 41, 46
ЕУ: Европска унија, 45
Р.С. Македонија.: Република Северна Македонија, 15
РНК: Рибонуклеинска киселина, 13, 18, 24, 25, 46, 48
САД: Соединетите Американски Држави, 17, 35
фосфопротеин: фосфопротеин, 18, 25

ЛИСТА НА ТАБЕЛИ, ГРАФИЦИ И СЛИКИ

Листа на табели

Табела 1. Видови за кои има целосни докази за исполнување на критериумите за приемчивост на инфекција со VHS.	28
Табела 2. Видови за кои има нецелосни докази за исполнување на критериумите за приемчивост на инфекција со VHS	30
Табела 3. Видови за кои има непотполни докази за исполнување на критериумите како приемчиви на инфекција со KHVD.....	38
Табела 4. RT-qPCR за детекција на VHS [87]	48
Табела 5. Подготовка на прајмер микс за VHS.....	48
Табела 6. RT-qPCR за детекција на IHN според Purcell и сор. [131]	48
Табела 7. RT-qPCR за детекција на IHN според Cuenca и сор. [132].....	48
Табела 8. Подготовка на прајмер микс за IHN.....	49
Табела 9. RT-qPCR за детекција на KHVD [128].....	49
Табела 10. Подготовка на прајмер микс за KHVD	49
Табела 11. Резултати од анализираните примероци од риби за вирусни болести (2015–2024) ..	56
Табела 12. Број на IHN позитивни рибници по статистички региони (2020–2024).....	58
Табела 13. Патохистолошки промени кај заразени и здрави риби (скала 1-3)	62
Табела 14. Критериуми за категоризација на ладноводни рибници	64
Табела 15. Присуство на биосигурносни мерки кај ладноводните рибници.....	67
Табела 16. Степен на ризик според категоризација кај ладноводните рибници	68
Табела 17. Критериуми за категоризација на топоводни рибници	70
Табела 18. Присуство на биосигурносни мерки на одгледувалиштата кај топоводните видови риби	72
Табела 19. Степен на ризик според категоризација	73

Листа на графици

График 1. Глобално производство во рибарството и аквакултурата [1].	13
График 2. Производството на пастрмка и крап во периодот од 2010 до 2022 година [6]	15
График 3. Тренд на позитивни рибници на IHN по региони	59

Листа на слики

Слика 1. Географска дистрибуција на IHN [18]	18
Слика 2. Географска дистрибуција на VHS. Легенда за генотипови: генотип IVa (магента), генотип IVb (портокалова), генотип IVc (беж), генотип IVd (виолетова), генотип III (зелена), генотип II (црна), генотип I (сина) [49].....	25
Слика 3. Географска дистрибуција на коихерпесвирозата во светот (2004–2025) според пријавените случаи во WOAH [97]	37

Слика 4. Локација на рибниците во Р.С. Македонија каде сините точки претставуваат ладноводни рибници а црните точки претставуваат топловодни рибници.	53
Слика 5. Амплификациски криви за VHS, IHN и KHVD (RT-qPCR).....	54
Слика 6. Макроскопска патологија на IHN кај виножитна пастрмка. Типичен макроскопски изглед кој вклучува петехијални хеморагии, празен дигестивен тракт и асцитична течност.....	55
Слика 7. Мапа на Р.С. Македонија која го прикажува распределувањето на рибниците во однос на детекцијата на IHN. Црвените точки ги означуваат рибниците каде што е детектиран IHN, додека сините точки ги означуваат рибниците каде вирусот не е пронајден.	58
Слика 8. Филогенетска анализа на изолати на IHN од Р.С.Македонија.....	60
Слика 9. Патохистолошки оштетувања на слезината со присуство на ММС, фиброза и инфилтрација на леукоцити.	61

1. ВОВЕД

1.1. Аквакултурата во светот

Аквакултурата како најдинамичен сектор во современото земјоделство игра клучна улога во одговорот на глобалните предизвици поврзани со зголемената побарувачка за храна, намалувањето на природните рибни ресурси и потребата од одржливи производствени системи. Според податоците на FAO (Food and Agriculture Organization), глобалното производство во аквакултурата достигнува 130,9 милиони тони со пазарна вредност од над 312 милијарди американски долари. Со учество од 59% во вкупното светско производство на водни организми, аквакултурата веќе го надмина традиционалниот риболов. Овој тренд не само што ја потврдува нејзината доминантна позиција, туку ја истакнува и нејзината стратешка улога во обезбедувањето на глобалната сигурност на храна, особено во земјите во развој каде што рибата претставува примарен извор на протеини [1].

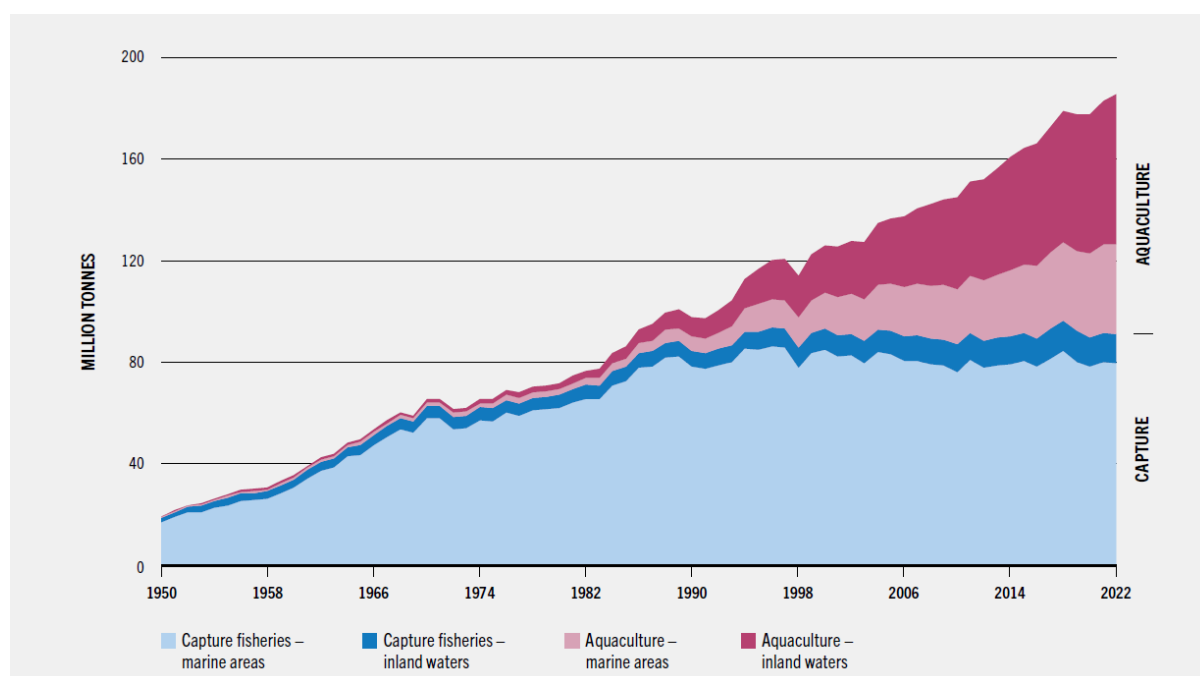


График 1. Глобално производство во рибарството и аквакултурата [1].

Забрзаниот раст на аквакултурата е резултат на современи иновации во производствените методи, меѓу кои значајно место заземаат рецикулационите аквакултурни системи (RAS), кои значително ја намалуваат потрошувачката на вода и го минимизираат влијанието врз екосистемите. Интегрираната мултитрофична аквакултура (IMTA) создава природно одржливи синергии преку коегзистенција на различни организми, како што се рибите, школките и алгите. Генетските подобрувања на аквакултурните видови исто така играат клучна улога во зголемувањето на отпорноста на болести и оптимизацијата на растот.

Сепак, експанзијата на аквакултурниот сектор носи и предизвици, при што заразните болести претставуваат една од најсериозните закани за продуктивноста и економската стабилност. Поединечните епидемии имаат потенцијал да предизвикаат

значителни нарушувања во производните циклуси, што може да предизвика големи економски последици на регионално и глобално ниво. Според FAO, глобалните загуби од заразни болести во аквакултурата се проценуваат на околу 6 милијарди долари годишно [2].

Иако аквакултурата претставува потенцијално решение за глобалната прехранбена криза, нејзиниот успех зависи од ефективната контрола на болестите и прилагодување на практиките кон климатските промени.

1.2. Вириси во аквакултурата

Со брзиот развој на аквакултурата, годишно се регистрираат зголемен број на вируси во рибниците. Некои од овие вируси претходно биле присутни во природните популации без значаен патоген ефект, но поради намалената генетска разновидност кај одгледуваните риби и зголемените нивоа на стрес, тие можат да предизвикаат сериозни заболувања и значителни загуби во производството. Овие инфекции често резултираат со висока стапка на морталитет и потреба од специфични третмани, што дополнително го зголемува финансискиот притисок врз аквакултурата. Финансиските загуби предизвикани од вируси се движат од 15 до 20%, а во случај на епидемии можат да достигнат и до 40% [3]. Овој тренд укажува на постојани предизвици во дијагностиката, превенцијата и третманот на вирусните инфекции, што ја нагласува потребата од подетални истражувања на механизмите на вирусната репликација.

Според базата на податоци за вируси кај риби FVD (Fish-associated Virus Database), досега се идентификувани околу 4.860 различни вируси кои припаѓаат на 15 фамилии. Овие вируси се откриени кај 306 видови риби во 57 земји, а најзначајните фамилии ги вклучуваат: Alloherpesviridae, Iridoviridae, Herpesviridae, Birnaviridae, Reoviridae, Papillomaviridae, Poxviridae, Orthomyxoviridae, Rhabdoviridae, Paramyxoviridae, Caliciviridae, Coronaviridae, Nodaviridae, Togaviridae и Retroviridae [4].

Од вкупниот број на идентификувани вируси, 72,5% имаат РНК геном, при што најголем дел припаѓаат на -ssRNA вирусите. Вирусите од семејството Iridoviridae се едни од најшироко распространетите, додека вирусите од семејството Reoviridae се географски најраспространети. Покрај тоа, најголем број од изолираните вируси потекнуваат од риби од фамилијата Salmonidae со 57,7% од сите забележани случаи. Најголем број од овие вируси се идентификувани во Европа, што претставува 60,2% од вкупно анализираните случаи [5].

1.3. Аквакултурата во Р.С. Македонија

Контролираното одгледување на риби во Р. С. Македонија започнало во 1930-тите години со главна цел заштита и репродукција на автохтоната охридска пастрмка (*Salmo letnica*). Денес, аквакултурата е главно насочена кон производство на виножитна пастрмка (*Oncorhynchus mykiss*) и крап (*Cyprinus carpio*), кои заедно сочинуваат над 95% од вкупниот рибен фонд во одгледувалиштата. Најголем удел во вкупното производство има виножитната пастрмка, со континуиран раст во последните години, додека производството на крап бележи опаѓање [6].

Аквакултурата во Р.С. Македонија сè уште се базира на традиционални методи на производство, што ја зголемува ранливоста на рибниците за заразни заболувања. Иако постојат обиди за воведување на RAS, нивната примена е ограничена, главно поради високите трошоци и недостатокот на техничка експертиза [6].

И покрај значителниот потенцијал за економски раст, домашното производство на риба не ги задоволува потребите на пазарот, поради што земјата останува нето-увозник на риба и рибни производи. Овој факт укажува на потребата од дополнителни инвестиции во модернизација на производствените капацитети, подобрување на биосигурносните мерки и зајакнување на инфраструктурата за контрола на болести, со цел да се намали увозната зависност и да се зголеми конкурентноста на домашниот сектор [6].

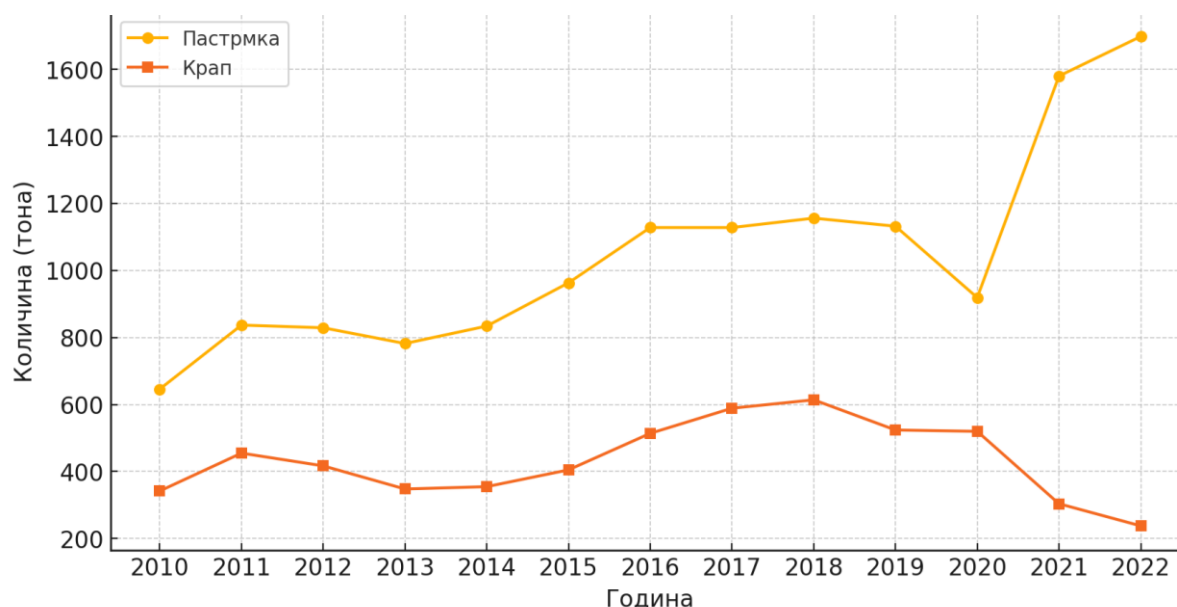


График 2. Производството на пастрмка и крап во периодот од 2010 до 2022 година [6].

1.4. Мотивација и значење на истражувањето

Светската организација за здравје на животните (WOAH – World Organisation for Animal Health), редовно ажурира листа на заразни заболувања кај рибите што треба да бидат следени и пријавувани како потенцијални закани за глобалната трговија со риби. Виножитната пастрмка, која претставува 70% од производството, е исклучително подложна на вирусни заболувања како заразна хематопоемска некроза (IHN) и вирусна хеморагична септикемија (VHS). Од друга страна, крапот (25% од производството) е подложен на коихерпесвируса (KHVD). Овие болести се класифицирани како задолжителни за пријавување според WOAH и можат да предизвикаат значителни штети во одгледувањето на рибите. Разбирањето на нивната епидемиологија е од суштинско значење за превенција, контрола и управување со болестите, а факторите како што се географската распространетост, начините на пренос, видот на домаќините и животните услови играат клучна улога во нивното ширење и контрола [7].

Објавените податоци за распространетоста и епидемиологијата на вирусните заболувања кај рибите во Р.С. Македонија се ограничени. Освен првичното пријавување на IHN [8], систематски истражувања за динамиката и влијанието на ова и други значајни вирусни заболувања врз одгледуваните риби во земјата недостасуваат. Овој докторски труд имаше за цел да ја пополни оваа празнина преку собирање и анализа на релевантни податоци, што овозможи подетално разбирање на епидемиологија и ќе придонесе кон развивање на ефективни стратегии за контрола и превенција. Резултатите од ова

истражување имаат практична вредност во развојот на стратегии и акциски планови за мониторинг и контрола на вирусните заболувања кај рибите. Тие ќе послужат како научна основа за:

- Превенција на ширењето на вирусните инфекции во рибниците,
- Подобрување на биосигурносните мерки во аквакултурата,
- Дизајнирање на национална програма за контрола на вирусните заболувања кај рибите и
- Јакнење на капацитетите на докторите по ветеринарна медицина и професионалните одгледувачи на риба за справување со вирусни епидемии.

Ова истражување обезбеди нови податоци за присуството и распространетоста на IHN, VHS и KHVD во Р.С. Македонија, што ќе придонесе за унапредување на заштитата на аквакултурниот сектор и зголемување на безбедноста на храната.

1.5. Работни хипотези

Врз основа на поставените цели на истражувањето, се очекуваше дека:

- IHN ќе биде присутна кај одгледуваната виножитна пастрмка во значителен број пастрмски рибници.
- Македонската и охридската пастрмка, кои се одгледуваат заедно со виножитната пастрмка во истите рибници, би можеле да претставуваат нови домаќини на IHN.
- Ист генотип на IHN ќе биде распространет во пастрмските рибници, со висок степен на идентичност со првично утврдениот генотип (MAKIHNV1).
- Не се очекуваше присуство на VHS и KHVD кај одгледуваните риби во Р.С. Македонија.

1.6. Научни придонеси

- **Епидемиолошки податоци:** Истражувањето генерираше вредни епидемиолошки податоци за појавата, преваленцата и дистрибуцијата на IHN кај одгледуваните пастрмки во Р.С. Македонија. Овие податоци придонесуваат кон подлабоко разбирање на епидемиологијата на ова вирусно заболување, вклучувајќи сезонски варијации, регионални разлики и потенцијална специфичност на приемчивите видови.
- **Карактеризирање на болеста:** Истражувањето овозможи научни сознанија за генетската разновидност, варијациите на соевите и потенцијалните вирулентни фактори поврзани со IHN. Оваа информација придонесува кон подобро разбирање на патогеноста и динамиката на пренос на вирусот во аквакултурната средина.
- **Идентификација на ризик фактори:** Анализирани се факторите на ризик кои влијаат врз појавата и ширењето на IHN кај одгледуваните пастрмки во земјата. Овие фактори вклучуваат еколошки параметри, практики на одгледување, воведување на заразени риби и потенцијални вектори на пренос. Разбирањето на овие фактори е од суштинско значење за развојот на насочени стратегии за превенција и контрола.

- **Проценка на влијанието на болеста:** Истражувањето овозможи проценка на ефектите од ИHN врз здравјето на рибите, продуктивноста на рибниците и економската одржливост на секторот. Преку анализа на загубите и предизвиците со кои се соочуваат рибниците, добиени се научни основи за проценка на економските последици од ова заболување.
- **Евалуација на мерките за контрола:** Спроведена е проценка на ефикасноста на тековните превентивни и контролни мерки што се применуваат во аквакултурното производство во Р.С. Македонија. Оваа анализа ги идентификува силните и слабите страни на постојните стратегии и нуди научни докази за нивно оптимизирање.
- **Препораки за управување со болести:** Врз основа на добиените резултати, развиени се препораки за подобрување на стратегиите за управување со вирусните заболувања во домашното аквакултурно производство. Овие препораки вклучуваат унапредени биосигурносни мерки и стратегии за минимизирање на ризикот од ширење и влијанието на овие вирусни заболувања, со цел да се обезбеди одржлив развој на секторот.
- **Научен придонес:** Добиените податоци придонесуваат за продлабочување на постоечкото знаење за вирусните заболувања кај рибите, овозможувајќи научна основа за развој на ефикасни стратегии за нивна превенција и контрола. Истражувањето исто така придонесува кон донесување одлуки базирани на докази, кои ќе помогнат во унапредување на националните политики за здравјето на рибите.

2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА

2.1. Заразна хематопоемска некроза (IHN)

2.1.1. Историја

Вирусот на IHN првично бил забележан како причинител на болест на пацифичкиот лосос во ендемски подрачја на пацифичкиот брег на Канада и САД. Првите епидемии на IHN се пријавени во САД на рибниците во државите Вашингтон и Орегон за време на 1950-тите години [9]. IHN е позната и како болест на кралскиот лосос, Колеман болест, болест на црвениот лосос од реката Колумбија, болест предизвикана од вирусот на езерото Калтус, болест на црвениот лосос од Орегон, болест на кралскиот лосос од реката Сакраменто и вирусна болест на црвениот лосос. Во 1969 Доналд Аменд ја именува како заразна хематопоемска некроза [10].

2.1.2. Географска дистрибуција

Историски гледано, географскиот опсег на овој патоген бил ограничен на западниот (Пацифичкиот) дел од Северна Америка во Соединетите Американски Држави и Канада, каде дивите лососи се ензоотски за болеста. Сепак, со извозот на заразени риби и икра кон крајот на 1980-тите, болеста била внесена во Европа и Азија [11]. Во моментов болеста е широко распространета низ целиот свет вклучувајќи ги: Иран, Јапонија, Јужна Кореја, Чиле, Кина, Тајван, Турција, Русија [12] и Грузија [13]. Вирусот на IHN за прв пат бил интродуциран во Европа во 1987 година во Франција и Италија, а во 1992 година се проширил во Германија. Со ширењето на болеста, индустријата за аквакултура во Франција, Италија и Германија претрпела огромни економски загуби [11]. Други држави каде е пријавен IHN во Европа се Австрија, Белгија, Чешка, Естонија, Финска, Холандија, Полска, Шпанија и Швајцарија [14]. Како што балканскиот регион започнал да се интегрира во Европската унија, IHN почнала да се дијагностицира во Словенија [15], Хрватска [16], Косово [17] и Р. С. Македонија [8].



Слика 1. Географска дистрибуција на IHN [18].

2.1.3. Етиологија

Причинител е РНК вирус од фамилијата *Rhabdoviridae*, род *Novirhabdovirus salmonid*. Вирусот има вирион во форма на куршум кој содржи несегментирана, негативно супресирана едноверижна РНК од приближно 11000 нуклеотиди која што кодира шест протеини: нуклеопротеин (N), фосфопротеин (P), матрикс протеин (M), гликопротеин (G), не-вирионски протеин (NV) и полимераза (L). Филогенетските анализи ги класифицираат изолатите на ИHN во пет геногрупи: U, M, L, J и E [19]. Филогенетската поделба на U, M и L се базира на оригиналната северноамериканска географска дистрибуција на ИHN по должината на брегот на Пацификот (L: долен регион; M: среден регион и U: горен регион) [20]. U изолатите се пронајдени и во Јапонија и Рускиот Далечен Исток [21], додека M изолатите се пронајдени во Кина [22]. Од друга страна, J изолатите се пронајдени само во Азија (Јапонија, Кина и Кореја) [22, 23] а E изолатите се пронајдени само во Европа [11] и во Иран [24]. Се претпоставува дека европската E лоза се одделила од M линијата во текот на 70-тите години на минатиот век, иако првиот европски доказ за ИHN бил во 1987 година. Филогенетската E лоза е поделена во седум подгрупи (A – G) [20]. Сепак, конечното разјаснување на филогенетскиот однос помеѓу овие групи е сè уште невозможно.

2.1.4. Епидемиологија

Извор на инфекција

Извор на инфекција се болни риби, субклинички носители и свежо угинати единки. Причинителот на ИHN влегува во телото преку жабрите, оштетената кожа, перките и почетниот дел на дигестивниот тракт. Преносот на патогенот меѓу рибите се случува претежно хоризонтално, при што големи количини на вирусот се ослободуваат во надворешната средина од заразените млади риби. За време на периодот на мрестење, кога возрасните риби повторно стануваат приемчиви на инфекција, вирусот се ослободува во околината преку репродуктивните продукти. Пријавени се случаи на вертикален пренос преку контаминирана икра, иако веројатноста за овој начин на пренос е незначителна поради вообичаената пракса на дезинфекција на икрата со јодофорен раствор [25]. Вирусот се пренесува преку директен контакт со болни единки, преку вода, кал и риболовна опрема. Оралниот пренос е можен преку канибализам или хранење со заразни риби. Ширењето на патогенот исто така е олеснето од неконтролираниот транспорт на кавијар и риби од рибници кои се погодени од болеста [26]. Внесувањето на причинителот на ИHN во рибник води до циркулација на вирусот во резервоарот и меѓу приемчивите видови дива риби. По епидемијата, дел од излечените риби стануваат носители на вирусот, добиваат стабилен имунитет, како резултат на што се појавуваат антитела во крвта [27]. Рибите со клинички знаци на болеста и латентните носители се природен резервоар на инфекција меѓу одгледуваните и дивите риби. Заразените риби го излучуваат вирусот преку урината, интестиналната слуз (поретко со изметот), производите на репродуктивниот систем, преку жабрите, кожата и ткивото на перките [27].

Инфекцијата со ИHN е ендемска и широко распространета меѓу популациите на салмониди по должината на западниот брег на Северна Америка. Вирусот исто така е воспоставен со висока преваленца на инфекција во главните региони за одгледување пастрмка во Северна Америка, Европа и Азија каде ИHN е воведен преку слободно движење на заразни риби или икра [27].

Приемливост, диспозиција и осетливост

Најважниот еколошки фактор кој влијае на развојот на инфекцијата е температурата на водата. Болеста се јавува на температури од 3 до 15 °C, а нејзината појава и интензитет значително се намалуваат со зголемување на температурата на водата. Епидемиите на IHN обично имаат два пика: пролет (од крајот на зимата до рано лето) и понекогаш есен (од крајот на летото до есента), иако може да се појават во секое време од годината при оптимални температурни услови. Болеста е најизразена при 10–12 °C, при што морталитетот кај младите риби може да достигне до 100% [28]. Кај рибите со тежина 100–500 g, болеста обично се јавува во хронична форма со морталитет кој не надминува 10–25%. Помладите риби се почувствителни на инфекција бидејќи нивниот имунолошки систем сè уште не е целосно развиен [28].

Иако вирусот циркулира во популацијата на риби, може да не дојде до избувнување на IHN. Болеста кај рибите се јавува при стресни услови, предизвикани од различни манипулации и нарушувања на технолошкиот режим на одгледување (транспорт, сортирање, флукуации на температурата, недостаток на кислород, нагли промени на pH, акумулација на метаболити во водата итн.) [26, 28, 29].

Приемчиви видови за IHN се: виножитна пастрмка (*Oncorhynchus mykiss*), арктичка пастрмка (*Salvelinus alpinus*), атлантски лосос (*Salmo salar*), поточна златовчица (*Salvelinus fontinalis*), поточна пастрмка (*Salmo trutta*), кралски лосос (*Oncorhynchus tshawytscha*), кета лосос (*Oncorhynchus keta*), кохо лосос (*Oncorhynchus kisutch*), црвеногрла пастрмка (*Oncorhynchus clarkii*), американска езерска пастрмка (*Salvelinus namaycush*), јапонски лосос (*Oncorhynchus masou*), главатица (*Salmo marmoratus*), штука (*Esox lucius*) и црвен лосос (*Oncorhynchus nerka*) [12]. Видовите за кои има нецелосни докази за приемчивост вклучуваат: пацифичка харинга (*Clupea pallasii*), блескав костреж (*Cymatogaster aggregata*), бурбот (*Lota lota*) и бела есетра (*Acipenser transmontanus*) [12]. Дополнително, вирусот е пријавен кај сите вариетети и подвидови на крап (*Cyprinus carpio*) и американски жолт костреж (*Perca flavescens*), но не е докажана активна инфекција [12].

Според Кодексот за здравје на водни животни на WOAH, видовите кои ги исполнуваат критериумите за наведување како приемчиви на инфекција со IHN се јавуваат кај сите категории на риби, но подмладокот е најчувствителен. Постарите риби обично се поотпорни, но постои висок степен на варијација во приемчивоста. Рибите во добра кондиција се поотпорни на инфекција, додека коинфекциите со патогени бактерии, ракување и други стресни фактори можат да предизвикаат субклиничка болест. Рибите се поотпорни на инфекции со возраста до мрестење, кога тие повторно стануваат високо чувствителни и можат да исфрлат големи количини на вирус во репродуктивните продукти. Преживеаните риби покажуваат силен заштитен имунитет со синтеза на циркулирачки антитела кон вирусот [30]. Вирусот е лабилен на топлина, кисела средина и воздух, и може да преживее во слатка вода најмалку 1 месец при поладни температури, особено ако е присутен органски материјал. Лесно се деактивира со вообичаени средства за дезинфекција и сушење [31].

2.1.5. Патогенеза

Инкубациониот период за природна инфекција кај подмладокот при температура на вода 10–15 °C е околу 7–12 дена [32]. Врата на инфекцијата се жабрите, кожата, перките и почетниот дел од дигестивниот тракт. Според направените истражувања, базалните делови на перките се главното место на влез на вирусот [33]. Преносот на IHN

помеѓу рибите е хоризонтален, но се забележани и случаи на трансмисија и преку обвивката на икрата [32].

Вирусот има зголемен тропизам за сврзното ткиво, но хематопоеетските органи - бубрезите и слезината се најтешко погодени. Овие органи се главните локации каде се акумулира вирусот за време на акутната фаза на инфекција [21].

Размножувањето на вирусот во ендотелните клетки на крвните капилари, хематопоеетското ткиво и секреторните клетки на бубрезите го определува карактерот на клиничките знаци. Болеста се манифестира во форма на ексудативно-хеморагиски синдром. Нарушувањето на водно-електролитната рамнотежа на телото доведува до излевање на плазма од крвните клетки во интерстицијалниот простор и телесната празнина, што клинички се манифестира со едем и крвавења [34]. Оваа форма на болеста напредува до некроза на хематопоеетските ткива на бубрезите и слезината со генерализирана виремија и некроза во сите ткива. Угинувањето се случува од бубрежна инсуфициенција предизвикана од електролитен дисбаланс [35].

Во зависност од видот на рибите, условите за одгледување, температурата и до одреден степен вирусот, IHN може да има од акутен до хронични тек. Загубите во акутен тек можат да достигнат 90-95% или повеќе [30]. Во хроничните случаи, загубите се долготрајни и може да се забележат риби во различни фази на болеста. Најважниот еколошки фактор кој влијае на напредокот на инфекцијата со IHN е температурата на водата. Експерименталните испитувања покажале дека инфекцијата со IHN може да предизвика смртност при температури од 3°C до 18°C. Во природни услови, клинички манифестна болест обично се јавува при температури помеѓу 8°C и 15°C [36].

2.1.6. Клиничка слика

Болеста се карактеризира со развој на септичен процес со значително оштетување на хематопоеетските органи и хеморагии во органите и ткивата. Во класичната (акутна) форма, IHN се манифестира кај млади риби со тежина од околу 0.2–8.0 g. Првите знаци на инфекција се: анорексија и депресија, задно со губење на реакцијата на надворешните сензорни стимули. Болните риби добиваат темна боја, лежат на дното или се на површината на водата и се движат кон рабовите на базенот или каналот каде што струјата е послаба. Акутното избувнување на IHN се карактеризира со нагло зголемен морталитет. Првите угинати единки најчесто не покажуваат видливи надворешни знаци [28]. Кај болните риби се забележува апатија (летаргија), која наизменично се менува со напади на абнормално прекумерна активност (спирално пливање, конвулзивно пливање), затемнување на кожата, испакнати очи, бледило на жабрите, петехијални хеморагии во периокуларното сврзно ткиво, во интеррадијалното ткиво на основите на перките, поретко на стомакот и зад главата и асцит. Нишковидни слузести ленти на измет со сивкаста нијанса (понекогаш помешани со крв) се забележуваат од анусот на некои болни риби. Ларвите имаат хеморагии во жолчното кесе и хидроцефалија. Кај млади риби се забележуваат хеморагии на основата на перките и на површината на органите во телесната празнина како и во жолчното кесе. Мал дел од рибите со тежина поголема од 8 g развиваат нервна форма на болеста што се манифестира со нарушувања во однесувањето (наизменични фази на зголемена возбудливост и депресија). Надворешни знаци на болеста, освен потемнување на телото, обично нема кај такви риби. Оваа форма на IHN е предизвикана од оштетување на централниот нервен систем и вирусот кај овие риби може да се детектира само во мозокот. Се претпоставува дека вирусот што влегува во телото се концентрира во централниот нервен систем, каде имунолошкиот одговор е

помал, се размножува до околу 10^6 PFU/g и го уништува мозочното ткиво што води до искривување на „рбетот“ – сколиозни деформации кај 1-5% од преживеаните риби. Трета форма на IHN е епителотропна или жабрена инфекција, која се јавува кај поголеми риби со тежина од околу 50–100 g. Големите риби можат да се заразат со вирусот на IHN, но инфекцијата не станува системска поради возраста на рибите или некој друг фактор. Сепак, вирусот се размножува во епителните клетки на перките, кожата и жабрите и може да предизвика значителни проблеми со дишењето поради анемичните, често хеморагични жабри. Угинувањето е спорадично, но бидејќи заболуваат поголемите риби, загубите во производната маса може да бидат значајни, што на крајот ја намалува економската ефикасност на рибникот. Болните риби обично покажуваат некои од знаците на болеста од комплексот опишан погоре. При епидемија, само неколку погодени индивидуи покажуваат целосен сет на карактеристични клинички знаци и патоанатомски промени. Ниту еден од овие знаци не е патогномоничен [28, 37].

2.1.7. Патоанатомски промени

При дисекција, рибите се анемични и се забележуваат акумулации на прозирен, жолтеникав (понекогаш крвав) ексудат, заедно со хеморагии во перивисцералното масно ткиво, перитонеумот, сидовите на цревата и воздушниот меур. Црниот дроб, бубрезите и слезината се зголемени или бледи. Гастроинтестиналниот тракт е без храна, понекогаш исполнет со млечно-бела лигава содржина, помешана со крв [34]. Анализите на крвта од болните риби покажуваат намален хематокрит, леукопенија, дегенерација на леукоцитите и тромбоцитите и големи количини на клеточен отпад. Патохистолошките наоди откриваат дегенеративна некроза во хематопоезиските ткива, бубрезите, слезината, црниот дроб, панкреасот и дигестивниот тракт [30].

2.1.8. Контрола и превенција

Методите за контрола на инфекцијата со IHN во моментот се базираат на избегнување на изложеност на вирусот преку имплементација на строги контролни политики и добри хигиенски практики. Дополнително, темелната дезинфекција на оплодената икра, користењето на извори без вируси за инкубација и одгледување, и функционирањето на објектите во согласност со воспоставените био-сигурносни мерки се есенцијални за спречување на инфекција со IHN на локациите за производство на риба [25].

Вакцинација

Експерименталните вакцини за заштита на салмонидите од инфекција со IHN се предмет на истражување повеќе од 40 години, а некои од нив покажуваат резултати во лабораториски и теренски испитувања кога се аплицирани преку имерзија или инјекција [38]. Автогените вакцини, инактивираните вакцини и ДНК вакцината се лиценцирани за комерцијална употреба во аквакултурата на Атлантскиот лосос на западниот брег на Северна Америка, каде вакцините можат да се аплицираат парентерално. Сепак, вакцините против инфекција со IHN сè уште не се лиценцирани во други земји, каде апликацијата на вакцините на милиони помали риби ќе бара дополнителни истражувања за нови методи на масовна примена [39].

Хемотерапија

Иако постојат истражувања за употреба на хемотерапевтски пристапи против ИHN, истите не се комерцијално применливи во аквакултурата [25].

Имуностимулација

Имуностимулантите претставуваат активно поле на истражување, но досега не нашле широка комерцијална примена во аквакултурата за превенција или контрола на инфекцијата со ИHN.

Одгледување на отпорни видови

Една од можните мерки за спречување на ИHN е одгледувањето на видови што се отпорни на болеста. Испитувањата на триплоидни и хибридни форми досега дале добри резултати [29], а научниците активно го проучуваат и генетското потекло на таа отпорност [40].

Обнова со отпорни видови

Во ендемските подрачја, користењето на помалку приемчиви видови риби се употребува за намалување на влијанието на инфекцијата со ИHN [41].

Блокирачки агенси

Природните соединенија со антивирусна активност, идентификувани од водни микроорганизми, досега не нашле широка комерцијална примена во аквакултурата за контрола на инфекцијата со ИHN [25].

Дезинфекција на икра

Дезинфекцијата на икрата е ефикасен метод за блокирање на преносот на ИHN преку икрата во аквакултурни услови. Методот е широко практикуван во подрачја каде што вирусот е ендемски распространет [42].

Опити практики на одгледување

Покрај дезинфекцијата на икрата, користењето на вода која не е контаминирана со вирусот, се покажало како клучен фактор во контролата на ИHN во ендемските подрачја. За таа цел, препорачливо е да се користат извори или бунари без риби и други потенцијални носители на вирусот, како и дезинфекција на површинските води со UV светлина или озон [25].

2.1.9. Дијагностика

Клинички знаци

Болеста се карактеризира со потемнување на кожата, бледи жабри, асцит, зголемен стомак, егзофталмус и внатрешни и надворешни петехијални хеморагии. За време на епидемиите, рибите се летаргични со периоди на ненормална активност како спирално пливање и дезориентирани движења [14].

Макроскопска патологија

Внатрешно, рибите изгледаат анемични и немаат храна во цревниот тракт. Црниот дроб, бубрезите и слезината се бледи. Присутна е течност во телесната празнина и се забележуваат петехии по внатрешните органи [14].

Клиничка хемија

Крвта на заболените риби покажува намален хематокрит, леукопенија, дегенерација на леукоцитите и тромбоцитите, како и големи количества клеточни остатоци [14].

Микроскопска патологија

Патохистолошките наоди откриваат дегенеративна некроза во хематопоезиските ткива, бубрезите, слезината, црниот дроб, панкреасот и дигестивниот тракт. Некрозата на еозинофилните грануларни клетки во сидот на цревниот тракт е патогномонична за инфекција со IHN [14].

Електронска микроскопија

Електронската микроскопија на зафатените клетки открива вирони со форма на куршум од приближно 150–190 nm во должина и 65–75 nm во ширина. Вироните се видливи на површината на клетките, или во вакуоли, или во интрацелуларниот простор откако продреле низ клеточните мембрани. Виронот поседува надворешна обвивка која содржи липиди од домаќинот и вирусни гликопротеински шилци кои реагираат со имуно-голд бојење и ја декорираат површината на вирусот [14].

Методи за детекција и идентификација на причинителот

Традиционалната постапка за откривање на IHN се базира на изолација на вирусот во култура на клетки и последователна идентификација на вирусот со серолошки или молекуларни методи. Различни клеточни линии се користат за изолација на вирусот: BF-2 (Bluegill fry cell line - 2), RTG-2 (Rainbow trout gonad cell line - 2), EPC (Epithelioma papulosum cyprini) [43]. Серолошката идентификација на IHN се изведува со ензимски поврзан имуносорбентен тест (ELISA), индиректен флуоресцентен тест на антитела (IFA) и неутрализациски тест (NT). Предностите на ELISA се високата дијагностичка сензитивност и специфичност, помала сложеност и помалку потрошено време (13).

Молекуларните, генетски дијагностички тестови се најбрзи и најсензитивни меѓу сите методи за детекција на IHN. Се користат пражмери кои ги таргетираат G и N гените и со кои се детектира вирусна РНК [43].

2.2. Вирусна хеморагична септикемија (VHS)

2.2.1. Историја

Вирусната хеморагична септикемија (VHS) е позната и како „болеста на Егтвед“, поради нејзиното првобитно појавување во близина на селото Егтвед во Данска. Вирусот на VHS првично бил изолиран од виножитна пастрмка (*Oncorhynchus mykiss*) во Данска во 1962 и 1965 при појава на зголемено угинување [44, 45]. Оттогаш е идентификуван во многу други европски земји. Дополнително, вирусот на VHS е изолиран од различни видови диви морски риби во водите во близина на Европа, Јапонија и Северна Америка што укажува на неговата широка географска дистрибуција [44, 45].

2.2.2. Географска дистрибуција

До средината на 1970-тите, VHS се сметала за болест специфична за пастрмката во Европа, но во децениите што следеле, вирусот на VHS бил изолиран од различни одгледувани и диви видови риби во Европа, Северна Америка, Јапонија и Кореја [46].

Вирусот на VHS е изолиран од диви риби во умерените области на северната хемисфера и во слатки и во морски води [47]. Со откривање и изолирање на вирусот на VHS од пацифичкиот лосос од северниот дел на Пацификот на американскиот брег во доцните 1980-ти, последователните студии покажале дека VHS се јавува кај многу одгледувани и диви видови риби долж брегот на Пацификот и Атлантот во Северна Америка [47]. Во Европа, VHS е дијагностицирана главно кај одгледувана виножитна пастрмка, и се смета за едно од најсериозните вирусни заболувања во аквакултурата. Пријавена е во Австрија, Данска, Франција, Германија, Полска, Швајцарија и Обединетото Кралство [47]. На Балканскиот полуостров, VHS е регистрирана во Словенија [48] Хрватска [16] и Бугарија [49].



Слика 2. Географска дистрибуција на VHS. Легенда за генотипови: генотип IVa (магента), генотип IVb (портокалова), генотип IVc (беж), генотип IVd (виолетова), генотип III (зелена), генотип II (црна), генотип I (сина) [50].

2.2.3. Етиологија

Причинител е РНК вирус од фамилијата Rhabdoviridae, род *Novirhabdovirus piscine*, исто така е именуван и како *Egtved virus*. Вирионот има форма на куршум (приближно 70 nm во дијаметар и 180 nm во должина), содржи негативно-насочена единечна верига на РНК геном со приближно 11.000 нуклеотиди и поседува обвивка која содржи мембрански гликопротеин (неутрализирачки антиген на површината). Геномот кодира шест протеини: нуклеопротеин (N), фосфопротеин (P) – порано означен како M1, α -матрикс протеин (M) – порано означен како M2, гликопротеин (G), не-вирионски протеини (NV) и полимераза (L) [51]. Вирусот на VHS предизвикува болест кај околу 80 видови слатководни и морски риби. Историски гледано, VHS се поврзува главно со слатководни салмониди во Западна Европа. Првите записи за виножитна пастрмка која покажува знаци слични на VHS се од германски рибници за пастрмка во раните 1930-ти [44]. Набргу потоа болеста била пријавена во неколку други европски земји. Сепак вирусот не бил успешно изолиран до раните 1960-ти [45]. Моноклонските антитела (MAb) IP5B11 реагираат со сите изолати на VHS од сите познати гено- и серотипови [52].

Повеќето поликлонски антитела против VHS тип I (DK-F1) вкрстено реагираат со сите познати изолати на VHS што е потврдено со IFAT и ELISA. Типизацијата на VHS се врши со секвенционирање на нуклеинската киселина. Споредбата на секвенците на изолатите од VHS од неколку лаборатории покажала дека генетските разлики се поврзани повеќе со географската локација отколку со годината на изолација или домаќините [46]. Постојат четири генотипови на VHS, кои се групирани врз основа на секвенционирање на гени по целосна должина и/или скратени гени од N-генот [52, 53], G-генот [54] и NV-генот [27].

Генотип I:

- I-a Одгледувана виножитна пастрмка и други слатководни видови риби од континентална Европа [54].
- I-b Морски видови риби од Балтичко Море, Скагерак, Категат, Северно море и Јапонија [55] .
- I-c Одгледувана виножитна пастрмка од Данска, Германија и Австрија [56].
- I-d Одгледувана виножитна пастрмка од Норвешка, Финска и Ботниски Залив [57].
- I-e Одгледувана виножитна пастрмка од Грузија, одгледуван и див турбот во Црното Море [58].

Генотип II:

- Морски видови риби од Балтичко Море [59].

Генотип III:

- Северен Атлантски Океан до Норвешкиот брег [60], Северно Море, Скагерак и Категат [61].

Генотип IV:

- IVa: Морски риби од северозападниот Пацифик (Северна Америка), северниот Атлантски брег (Северна Америка) [62], Јапонија и Кореја [63].
- IVb: Слатководни риби во Северна Америка во регионот на Големите Езера [64].

2.2.4. Епидемиологија

Извор на инфекција

Вирусот на VHS е присутен во екосистемот поради тоа што природно се појавил таму, или пак бил ненамерно внесен во регионот преку активностите на луѓето. Аквакултурата претставува значаен пат преку кој вирусот на VHS се шири низ европските езера и водотеци, придонесувајќи за негово локално распространување.

Резервоари на VHS се клинички заболени риби, како и скриените носители меѓу одгледуваните или дивите риби. Виножитната пастрмка е најподложна на инфекција со VHS од генотипот I-a. За генотиповите I-b, II и III, природни домаќини најверојатно се диве риби што живеат во јата, како атлантската харинга (*Clupea harengus*) и паламидот (*Sarda sarda*), додека за генотипот IV-a, природен домаќин е пацифичката харинга (*Clupea pallasii*). Генотипот III предизвикува болест кај одгледуваните турботи (*Scophthalmus maximus*) и одгледуваните морски пастрмки (*Salmo trutta*), а генотипот IV-a кај лососи (*Salmo salar*), турботи и паламиди. Во истражувањата на дивите морски риби, највисока преваленца на вирусот е забележана кај рибите што живеат во јата, како атлантската харинга, паламидот и бакаларот (*Gadus morhua*) [47].

Трансмисијата на вирусот на VHS се одвива преку директен контакт или преку вода. Голтањето на вирусот може да предизвика инфекција кај млади виножитни пастрмки. Вирусот може да навлезе во водената средина преку половите продукти и урината, или може да се акумулира во филтер-хранливи организми и на тој начин да ги инфицира чувствителните видови [65]. Секрецијата на вирусот кај носителите е интермитентна, а видовите како плавата мида (*Mytilus edulis*) го задржуваат вирусот во своето тело [66]. Преносот на VHS на други риби главно се случува со хоризонтална трансмисија. По влегувањето во водата преку урината на инфицирана риба, вирусот се прикачува на епителното ткиво на новиот домаќин [67]. Рибојадните птици исто така можат да учествуваат во трансмисијата на вирусот на VHS. Предаторските видови, преку консумирање на инфицирани риби, развиваат повисоки титри на вирусот во споредба со рибите заразени преку водената трансмисија. Амфиподите и пијавиците исто така можат да го пренесат вирусот на предаторите [68].

Приемливост, диспозиција и осетливост

Младите риби се поосетливи на инфекцијата со VHS, но и кај возрасните риби кои се првпат изложени на вирусот има високи стапки на морталитет [69]. Подмладокот од виножитна пастрмка кој тежи помалку од 3 g е најподложен на VHS и кај него има морталитет од 80%. Морталитетот кај јувенилните категории над 3 g варира од 10% до 50% [70]. Кај возрасните виножитни пастрмки има стапка на морталитет од 5% до 90%. Пацифичката харинга може да има морталитет до 100% кога е изложена на VHS генотип IV-a [46]. Возраста е критичен фактор, а морталитетот кај виножитната пастрмка зависи целосно од возраста на рибата и температурата на водата [69].

Во изминатите децении, VHS е изолиран од голем број на морски и слатководни видови риби (Табела 1 и 2). Во Табела 1 е прикажана листа на видови за кои постои дефинитивен научен доказ за приемчивост, а во Табела 2 е прикажана листа на видови за кои постојат недоволно докази за приемчивост. Голема е веројатноста дека VHS е ендемски распространета во популациите на риби во големи области од северната хемисфера. Досега, вирусот на VHS е изолиран од приближно 80 различни видови на риби низ целата северна хемисфера, вклучувајќи ги Северна Америка, Азија и Европа. Неколку видови покажале приемчивост на VHS под експериментални услови [71]. Бројот на можни домаќини се зголемува со зголемувањето на напорите за мониторинг. Сепак, најприемнливиот вид риба во аквакултура е виножитната пастрмка (инфицирана со генотип I-a), иако е забележано дека VHS предизвикува смртност и кај одгледуваниот турбот. Значителен морталитет кај дивите популации на риби е документиран во регионот на Големите Езера меѓу САД и Канада, каде што биле зафатени најмалку 28 различни видови слатководни риби. Сите VHS изолати од овие епидемии припаѓаат на генотипот IV-b [71].

Преживувањето на вирусот на VHS надвор од домаќинот зависи од физичко-хемиските услови на водната средина и од температурата. Вирусот преживува подолг период на 4°C во споредба со 20°C [72]. Документирано е дека вирусот може да опстои во слатка вода 28–35 дена на 4°C [72] и може да остане инфективен 1 година на 4°C во филтрирана слатка вода [73]. Вирусот може да преживее подолг период ако се додадат органски материи во водата, како што се оваријална течност или крвни производи како говедски серум. Во слатка вода на 15°C се инактивира за 13 дена, но во морска вода вирусот се инактивира за 4 дена [73]. Во други студии, во морска вода на 15°C, инфективноста на вирусот се намалила за 50% по 10 часа, но можел да се изолира по 40 часа [74].

Замрзнувањето на VHS-инфицирана риба на комерцијални температури на замрзнување, а потоа одмрзнувањето на рибата, нема целосно да го уништи вирусот но ќе ја намали инфективноста или титрите на вирусот за 90% или повеќе [75].

Табела 1. Видови за кои има целосни докази за исполнување на критериумите за приемчивост на инфекција со VHS.

Фамилија	Латинско име	Генотип
Ammodytidae	Ammodytidae	IVa
Aralichthyidae	<i>Paralichthys olivaceus</i>	IVa
Carangidae	<i>Trachurus mediterraneus</i>	Ie
Centrarchidae	<i>Ambloplites rupestris</i>	IVb
	<i>Lepomis gibbosus</i>	IVb
	<i>Lepomis macrochirus</i>	IV, IVb
	<i>Micropterus dolomieu</i>	IVb
	<i>Micropterus salmoides</i>	IVb
	<i>Pomoxis nigromaculatus</i>	IVb
Clupeidae	<i>Alosa immaculata</i>	Ie
	<i>Sardina pilchardus</i>	ND
	<i>Clupea harengus</i>	Ib, III
	<i>Clupea pallasii pallasii</i>	IVa
	<i>Dorosoma cepedianum</i>	IVb
	<i>Sardinops sagax</i>	IVa
	<i>Sprattus sprattus</i>	Ib
Cyclopteridae	<i>Cyclopterus lumpus</i>	IVd
Cprinidae	<i>Danio rerio</i>	IVa
	<i>Notropis hudsonius</i>	IVb
	<i>Notropis atherinoides</i>	IVb
	<i>Pimephales notatus</i>	IVb
	<i>Pimephales promelas</i>	IVb
Embiotocidae	<i>Cymatogaster aggregata</i>	IVa

Engraulidae	<i>Engraulis encrasicolus</i>	Ie
Esocidae	<i>Esox lucius</i>	Ia, IVb
	<i>Esox masquinongy</i>	IVb
Fundulidae	<i>Fundulus heteroclitus</i>	IVc
Gadidae	<i>Gadus macrocephalus</i>	IVa
	<i>Gadus morhua</i>	Ib, III
	<i>Merlangius merlangus</i>	Ie
	<i>Micromesistius poutassou</i>	Ib, III
	<i>Trisopterus esmarkii</i>	Ib, III
Gasterosteidae	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	IVc
Gobiidae	<i>Neogobius melanostomus</i>	IVb
	<i>Pomatoschistus minutus</i>	Ib
Ictaluridae	<i>Ameiurus nebulosus</i>	IVb
Labridae	<i>Centrolabrus exoletus</i>	III
	<i>Ctenolabrus rupestris</i>	III
	<i>Labrus bergylta</i>	III
	<i>Labrus mixtus</i>	III
	<i>Symphodus melops</i>	III
Lotidae	<i>Gaidropsarus vulgaris</i>	Ie
Moronidae	<i>Morone americana</i>	IVb
	<i>Morone chrysops</i>	IVb
	<i>Morone saxatilis</i>	IVb, IVc
Mullidae	<i>Mullus barbatus</i>	Ie
Osmeridae	<i>Thaleichthys pacificus</i>	IVa
Percidae	<i>Sander vitreus</i>	IVb
	<i>Perca flavescens</i>	IVb
Petromyzontidae	<i>Lampetra fluviatilis</i>	II
Pleuronectidae	<i>Limanda limanda</i>	Ib
	<i>Platichthys flesus</i>	Ib
	<i>Pleuronectes platessus</i>	III
Rajidae	<i>Raja clavata</i>	Ie
	<i>Coregonus artedii</i>	IVb
	<i>Coregonus clupeaformis</i>	IVb
	<i>Coregonus lavaretus</i>	Ia
	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	IVa
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Ia-e, III, IVb
	<i>Oncorhynchus mykiss X Oncorhynchus kisutch hybrids</i>	Ia
	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	IVa, IVb

Salmonidae	<i>Salmo marmoratus</i>	Ia
	<i>Salmo salar</i>	Ia, Ib, II, III, IVa
	<i>Salmo trutta</i>	Ia, Ib
	<i>Salvelinus namaycush</i>	Ia, IVa, IVb
	<i>Thymallus thymallus</i>	Ia
Scophthalmidae	<i>Scophthalmus maxima</i>	Ib, III
Sciaenidae	<i>Aplodinotus grunniens</i>	IVb
Scombridae	<i>Scomber japonicus</i>	IVa
Soleidae	<i>Solea senegalensis</i>	III
Uranoscopidae	<i>Uranoscopus scaber</i>	Ie

Табела 2. Видови за кои има нецелосни докази за исполнување на критериумите за приемчивост на инфекција со VHS

Фамилија	Латинско име	Генотип
Adrianichthyidae	<i>Oryzias latipes</i>	IVb
	<i>Oryzias dancena</i>	IVa
Ammodytidae	<i>Ammodytes personatus</i>	Ib
Anguillidae	<i>Anguilla anguilla</i>	III
Argentinidae	<i>Argentina sphyraena</i>	Ib
Belonidae	<i>Belone belone</i>	Ie
Carangidae	<i>Seriola dumerili</i>	IVa
Catostomidae	<i>Catostomus commersonii</i>	IVb
	<i>Moxostoma anisurum</i>	IVb
	<i>Moxostoma macrolepidotum</i>	IVb
Centrarchidae	<i>Pomoxi annularis</i>	IVb
Clupeidae	<i>Alosa pseudoharengus</i>	IVb
Cottidae	<i>Cottus pollux</i>	IVb
Cyprinidae	<i>Semotilus corporalis</i>	IVb
	<i>Notemigonus crysoleucas</i>	IVb
Esocidae	<i>Esox lucius</i> X <i>E. masquinongy</i> hybrid	IVb
Fundulidae	<i>Fundulus diaphanus</i>	IVb
Gadidae	<i>Gadiculus argenteus</i>	Ib
	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	III
	<i>Theragra chalcogramma</i>	IVa
	<i>Trisopterus minutus</i>	III
Ictaluridae	<i>Ictalurus punctatus</i>	IVb
Liparidae	<i>Liparis tessellatus</i>	IV
Lotidae	<i>Lota lota</i>	IVb

	<i>Enchelyopus cimbrius</i>	Ib
Merlucciidae	<i>Merluccius productus</i>	IVa
Moronidae	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Ia
Mugilidae	<i>Mugil cephalus</i>	IV
Ophidiidae	<i>Hoplobrotula armata</i>	IV
Osmeridae	<i>Hypomesus pretiosus</i>	ND
Oxudercidae	<i>Rhinogobius sp. (undescribed species)</i>	IVb
Percopsidae	<i>Percopsis omiscomaycus</i>	IVb
Petromyzontinae	<i>Petromyzon marinus</i>	IVb
Pleuronectidae	<i>Glyptocephalus stelleri</i>	IVa
	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	III
	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	III
Salmonidae	<i>Oncorhynchus mykiss X Salvelinus alpinus hybrids</i>	Ia
	<i>Oncorhynchus mykiss X Salvelinus namaycush hybrids</i>	Ia
	<i>Oncorhynchus mykiss X Salmo trutta hybrids</i>	Ia
	<i>Salvelinus alpinus</i>	Ia
	<i>Salvelinus fontinalis</i>	Ie
Sciaenidae	<i>Larimichthys polyactis</i>	IV
Scorpaenidae	<i>Scorpaena porcus</i>	Ie
	<i>Scorpaena izensis</i>	IV
Scyliorhinidae	<i>Scyliorhinus torazame</i>	IV
Stromateidae	<i>Pampus argenteus</i>	IV
Trichiuridae	<i>Trichiurus lepturus</i>	IV
Triglidae	<i>Eutrigla gurnardus</i>	III

2.2.5. Патогенеза

Периодот на инкубација варира во зависност од температурата на водата. Меѓу 1°C и 12°C, периодот на инкубација за европските слатководни VHS изолати е од 1 до 2 недели при повисоки температури, и од 3 до 4 недели при пониски температури. Болеста обично се јавува на температури помеѓу 4°C и 14°C. На температура на водата помеѓу 15°C и 18°C болеста генерално трае кратко и има умерен кумулативен морталитет. Ниските температури на водата (1-5°C) генерално резултираат со продолжен тек на болеста, при што дневниот морталитет е низок, но кумулативната смртност е висока. Епидемиите на VHS се случуваат во текот на сите сезони, но најчести се во пролет кога температурата на водата се зголемува или флукуира [76, 77]. Преносот примарно се случува хоризонтално преку вода со екскреција на вирусот во урината [77]. Нема индикации или докази за вистински вертикален пренос на VHS [78].

Вирусот на VHS влегува во телото на рибата преку епителот на жабрите и кожата. Оттаму, преку крвниот систем пристига до внатрешните органи. Истражувањата покажуваат дека во првите неколку дена од инфекцијата, вирусот примарно цели на ендотелните клетки на бубрезите и слезината. Со продолжување на инфекцијата, вирусот се шири зафаќајќи ги бубрезите, црниот дроб и панкреасот, што предизвикува дегенерација и некроза на овие ткива во текот на неколку дена. Клеточните и некротичните промени во реналното хематопоезско ткиво се манифестираат со појава на макрофаги и меланински макрофаги само неколку дена по инфекцијата. Механизмот на болеста вклучува врзување на вирусот за различни клеточни рецептори, навлегување во клеточната мембрана и започнување на вирусна репликација во цитоплазмата на клетката. Овој процес ја нарушува одбраната на домаќинот, потенцијално со инхибирање на интерферонските одговори и модулирање на имунорегулаторните фактори, како што е NF-карпа B и фосфолипид-киназа 1 (TBK1) [46].

2.2.6. Клиничка слика

Кај виножитната пастрмка, болеста се јавува во три форми: акутна, хронична и нервна, по што следи клицоносителство кај преживеаните риби, од кои вирусот може да се изолира од перзистентно заразени ткива, како што се бубрезите и мозокот.

Во акутната фаза, при температури од 8–12°C, болните риби лежат на дното или се во морбидна состојба, покажувајќи знаци како вртење на страна или спирално пливање. Надворешните клинички знаци на болеста вклучуваат хеморагии на кожата, основата на перките, очите и жабрите, егзофталмија, абдоминална дистензија, затемнета боја на телото и значително бледи жабри како последица на анемија. Хроничната фаза се карактеризира со трајна, перзистентна инфекција и е поврзана со слабо изразени надворешни знаци. Вирусот може да се изолира од сите внатрешни органи, а постојат субакутни ефекти врз бројот на црвените и белите крвни клетки, што може да влијае на имунолошкиот одговор. Во нервната форма, рибите покажуваат силни нарушувања во однесувањето при пливањето, како постојано вртење на страна, бркање на сопствениот опаш и спирално пливање [50].

2.2.7. Патоанатомски промени

На мезентериумот може да има дифузни хеморагии, што укажува на оштетување на крвните садови и нарушена циркулација. Бубрезите и црниот дроб често се хиперемични и едематозни, што укажува на зголемена васкуларна пропустливост и воспалителен одговор. Во некои случаи, црниот дроб може да содржи мултифокални хеморагии, што доведува до нарушување на неговата функција и зголемена смртност. Хеморагии може да се појават и во скелетната мускулатура, што се манифестира со потемни мускули и слабеење на мускулниот тонус. Овие промени можат да бидат особено изразени кај акутната форма на болеста. Во хроничната или нервната форма на болеста, внатрешните патоанатомски промени често се незабележливи или се минимално изразени. Ова укажува на тоа дека вирусот може да предизвика долготрајна, но помалку изразена инфекција, при што клиничките знаци се јавуваат без значајни макроскопски лезии [50].

2.2.8. Контрола и превенција

Во отсуство на антивирусни лекови, методите за контрола на VHS моментално се засноваат на официјални програми за здравствен надзор, во комбинација со контролни мерки насочени кон спречување на ширењето на инфекцијата. Методите како целосно уништување на инфицираните риби и период на мирување, се практики што успешно го намалиле бројот на инфицирани рибници во ендемични подрачја и спречиле повторна инфекција [79, 80].

Вакцинација

Истражувачите работат на развој на вакцина против VHS повеќе од неколку децении, но сè уште не постои комерцијално достапна вакцина. Меѓутоа, постојат мртва вакцина, атенуирана вакцина и нови комбинирани вакцини со ДНК [46]. Метод кој покажал потенцијал е методот на реверзна генетика кој е успешно применет кај вирусот на беснило. Овој метод вклучува производство на рекомбинантни вируси од родот *Rhabdovirus* преку транскрипција на целосната антигенска должина на вирусот од промоторот T7. За да се конструира комплетниот VHS антигенски вектор, антигените се разделуваат на неколку сегменти со ограничувачки ензимски места на двата краја, а секој дел има свој плазмиден вектор. Антигени на VHS може да се генерираат со комбинирање на клетки со плазмиди и трансфекција со реагенси базирани на липидни капки [81]. Друг метод е атенуација на VHS преку реверзна генетика, што вклучува промена на геномот на VHS со намалување на неговата вирулентност. На пример, регионите на вирусниот геном што предизвикуваат вирулентност може да се идентификуваат и модифицираат преку реверзна генетика, со цел да се создаде ослабен, но имуноген сој [81].

Некои студии покажале дека ДНК-вакцините што кодираат гликопротеини на VHS можат да индуцираат заштитен имунолошки одговор кај пастрмките, но нивната ефикасност во природни услови сè уште се испитува. Иако некои експериментални вакцини покажале добри резултати, регулаторните и комерцијалните ограничувања ја забавуваат нивната примена во аквакултурата [39].

Хемотерапија

Не е можна ефикасна терапија за VHS.

Имуностимулација

Неколку имуностимуланти, како што се β -глюкани добиени од квасец, пептиди добиени од IL-1 β и пробиотици, се испитани за зголемување на заштитата против VHS. Иако некои студии покажуваат позитивни резултати, засега не е достапен имуностимулант специфично насочен кон зголемена резистенција на VHS [82].

Одгледување на отпорни видови

Истражувањата покажуваат дека виножитната пастрмка има адитивна генетска варијација за резистенција на VHS [83]. Во друга студија, утврдено е дека наследноста на отпорноста кон VHS изнесува 0,11 за временскиот период до угинување, мерено на логаритамска временска скала [84]. Овие наоди покажуваат добар потенцијал за селективно размножување на отпорни линии. Сепак, комерцијално достапни отпорни виножитни пастрмки сè уште не постојат.

Обнова со отпорни видови

На некои рибници во Данска каде има висока смртност предизвикана од VHS, се направени обиди за порибување со поотпорни видови како што се речна пастрмка (*Salmo trutta*) и костреж (*Perca fluviatilis*) [46].

Блокирачки агенси

Вирусот на VHS е чувствителен на голем број вообичаени дезинфициенси, како што се UV светлина, хлор, јодофор, натриум хипохлорит, на температури над 30°C, на бактериска деградација во седименти и на ензимска активност при распаѓање на рибите [42].

Дезинфекција на икра

Дезинфекцијата на икрата е ефикасна и економична превентивна мерка за спречување на ширењето на болеста. За оваа намена, препорачливо е користење на јодофорни дезинфициенси [78].

Опити практики на одгледување

Лош квалитет на вода, висока густина на риби, висока стапка на хранење и инфекции со други болести, како што се пролиферативна болест на бубрезите, ихтиофтириоза и бактериска болест на бубрезите, можат да влијаат на текот и сериозноста на инфекцијата со VHS. Генерално, зголемувањето на температурата, ограниченото хранење, намалената густина на риби и ограниченото ракување можат да ја намалат смртноста. На ендемски инфицираните рибници, порибувањето со подмладок треба да се врши кога температурата на водата е на максимално ниво [46].

2.2.9. Дијагностика

Клинички знаци

Клиничко испитување за VHS треба да се спроведе доколку се забележат знаци како: брзо појавување на смртност, летаргија, затемнување на кожата, егзофталмија, анемија (бледи жабри), хеморагии на основата на перките, жабрите, очите и кожата, абнормално пливање како што се вртење на страна и спирално пливање, и зголемен абдомен поради едем на органите во телесната празнина. Поради тропизмот на вирусот кон мозокот, нервната форма на болеста се карактеризира со абнормално пливање и постојано вртење на страна. Рибите инфицирани со VHS не се обидуваат да побегнат кога се фаќаат со мрежа. Опишаните знаци се резултат на системска инфекција која предизвикува васкуларни лезии и ткивна некроза [46].

Макроскопска патологија

Макроскопската патологија вклучува генерализирани петехијални хеморагии на кожата, мускулното ткиво (особено во дорзалните мускули) и внатрешните органи. Важно е да се испита дорзалната мускулатура за присуство на петехијални крварења, што е многу чест знак на инфекција со VHS. Бубрегот е темноцрвен во акутната фаза, и може да има значителни некрози кај риби кои се пред угинување. Слезината е умерено отечена. Црниот дроб е често блед и дисколоризиран. Гастроинтестиналниот тракт, особено задното црево, е блед и без храна [46].

Клиничка хемија

Крвта на зафатените риби покажува намален хематокрит, леукопенија, дегенерација на леукоцитите и тромбоцитите, како и големи количества клеточни остатоци [46].

Микроскопска патологија

Во бубрегот, црниот дроб и слезината има фокална некроза и дегенерација - цитоплазматски вакуоли, пикноза, кариолиза и лимфоцитна инвазија. Иако скелетниот

мускул не е примарно место на инфекција, еритроцитите можат да се натрупаат во скелетните мускулни врски и влакна без да предизвикуваат штета на самиот мускул. Овие патохистолошки промени се карактеристични за VHS и помагаат во диференцијалната дијагноза од други болести [85].

Електронска микроскопија

Вирусот на VHS е типичен рибонуклеопротеински вирус во форма на куршум, со дијаметар од 60–75 nm и должина од 180–240 nm. Вирусната обвивка го опкружува нуклеокапсидот и содржи површински гликопротеини, од кои гликопротеинот G е најзначаен поради неговото учество во препознавање и врзување за клеточните рецептори. При напречен пресек, вирионите покажуваат симетрична структура со јасно разграничен нуклеокапсид, кој може да се идентификува како спирално подреден рибонуклеопротеински комплекс. Овие морфолошки карактеристики се препознатливи и слични со оние опишани кај другите припадници на родот *Rhabdovirus*, и претставуваат клучни параметри за нивна идентификација при електронска микроскопија [86].

Методи за детекција и идентификација на причинителот

Стандардниот метод за детекција на вирусот на VHS се базира на неговата изолација во клеточна култура, проследена со потврдување преку методи базирани на антитела (IFAT, ELISA) или со примена на молекуларни техники. Препорачаните клеточни линии за детекција на VHS вклучуваат: BF-2 (bluegill fry), CHSE-214 (Chinook salmon embryo), EPC (epithelioma papulosum cyprini), FHM (fathead minnow) и RTG-2 (rainbow trout gonad) [43]. Осетливоста на клеточните линии на VHS зависи од различни фактори, вклучувајќи ја самата клеточна линија и варијациите помеѓу вирусните соеви. Генерално, изолатите на VHSV што припаѓаат на генотиповите I, II или III покажуваат најдобра репликација во клеточната линија BF-2, додека изолатите од генотип IV најоптимално се култивираат во клеточната линија EPC [46].

Користењето на молекуларни методи (конвенционален PCR и qRT-PCR) е распространето поради нивната брзина, осетливост и специфичност. qRT-PCR тестовите генерално се посензитивни од конвенционалните PCR тестови. Употребата на овие тестови за откривање и идентификација на вирусот во акутната фаза на болеста е оправдана веќе подолго време. Во акутната фаза на инфекција, сензитивноста на конвенционалниот PCR [87] и qRT-PCR [88] е компаративна со детекцијата на клеточна култура и последователна идентификација. Молекуларните методи се насочени кон генот за нуклеопротеин, бидејќи тој е највисоко транскрибиран ген во геномот на VHS [89].

За откривање на сите генотипови на VHS со qRT-PCR, методите на Jonstrup и сор. [88] се валидирани до степен 3, прикажувајќи сензитивност слична на детекцијата на клеточна култура. Овие методи имаат висока аналитичка и дијагностичка сензитивност и специфичност [88].

Генотипот на VHS може да се идентификува со секвенционирање на ампликонот генериран со конвенционален PCR со главните прајмери 3F2R [87]. Секвенцирањето на нуклеотидите на гликопротеинскиот ген се користи за идентификација на генетските соеви и за епидемиолошки студии. За скрининг на здрави популации не се препорачува употреба на методи за детекција на антитела поради нивните ограничувања во дијагностичката сензитивност и специфичност [43].

2.3. Коихерпесвироза (KHVD)

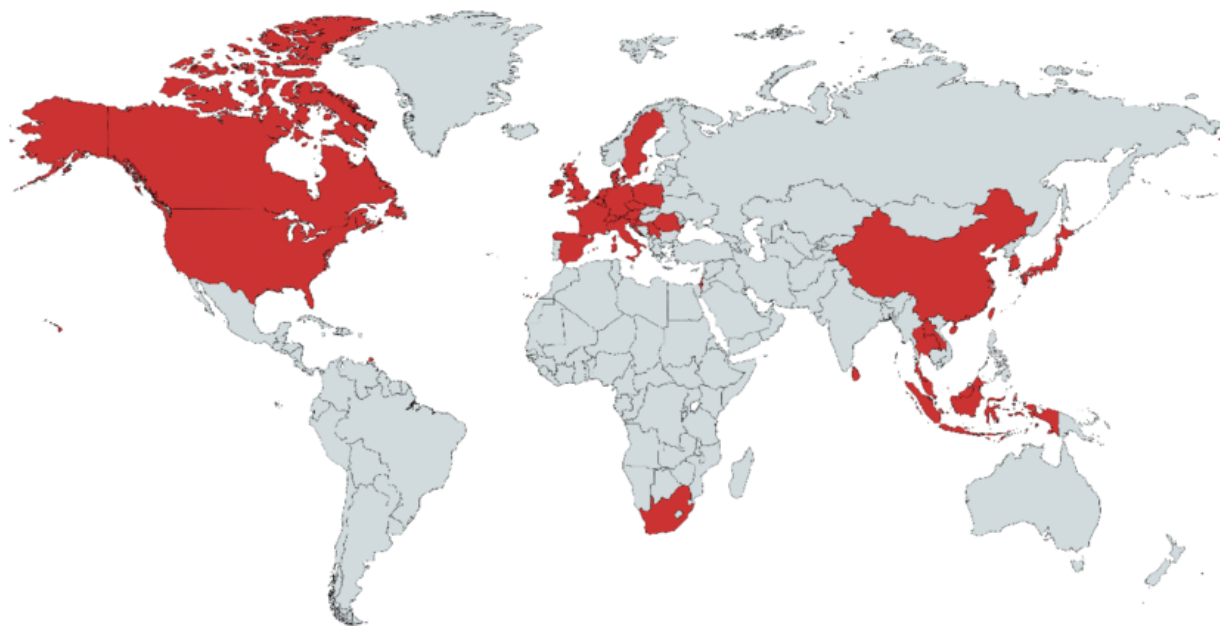
2.3.1. Историја

Украсните варијанти на крапот (*Cyprinus rubrofuscus*), познати едноставно како „кои“, се одликуваат со впечатлива разновидност на бои и шари. Овие декоративни риби се резултат на внимателна, селективна, одгледувачка практика која започнала во Ниигата, Јапонија во раниот 19-ти век. Поради нивната исклучителна естетска вредност, кои краповите често се изложуваат на специјализирани изложби каде што вообичаено се сместуваат заедно во исти аквариуми риби од различни одгледувачи. Иако присутните риби изгледале клинички здрави, присуството на вирусот кај нив довело до именување на болеста според овие декоративни кои крапови [90].

Коихерпесвирозата, или болеста предизвикана од Кои херпес вирусот (KHVD – *Koi herpes viral disease*), првпат била дијагностицирана во САД во 1998 година, за време на избувнување на епидемии во Израел и САД [90]. Сепак, првите докази за присуство на KHVD кај крап во Европа датираат од 1996 година. Најголемите епидемии поврзани со оваа болест биле забележани во рибниците за одгледување крап во Израел во 1998 година, истата година кога инфекцијата била потврдена и во Германија [90]. Ретроспективните анализи на ткива од масовниот морталитет на крапови во Обединетото Кралство од 1996 година покажале присуство на KHVD-ДНК, што сугерира дека вирусот бил присутен во Европа пред 1998 година. Во наредните години, болеста продолжила да се шири и на други континенти [91, 92]. Поради специфичната природа на овој херпесвирус, кој може да предизвика латентни и перзистентни инфекции, развојот на ефикасни дијагностички алатки за негово откривање бил одложен. Дури и денес, во одредени околности, детекцијата на вирусот во примероците од риби останува предизвик, бидејќи во латентната фаза на инфекцијата неговата концентрација е многу ниска. Во Јапонија, првите случаи на масовен морталитет на рибниците за крап биле забележани во мај 2003 година [93]. Истата година, на германските рибници за одгледување крап бил регистриран висок морталитет предизвикан од KHVD, откако биле увезени риби што не потекнувале од Европа. Овој настан довел до промена во претходното гледиште дека KHVD е болест ограничена само на трговијата со украсни риби, укажувајќи на нејзината потенцијална закана и за комерцијалното одгледување крап [91].

2.3.2. Географска дистрибуција

Болеста е присутна низ целиот свет во области каде што се одгледуваат или тргуваат крап и кои. По појавата на масовен морталитет и лабораториско потврдување на инфекцијата во Обединетото Кралство, Германија, Израел, САД и Јапонија [91, 92] ВОАН во 2006 година ја вклучи болеста на списокот на заболувања што задолжително се пријавуваат. Случаи на инфекција се регистрирани на сите континенти, вклучително и во: Австрија, Белгија, Чешка, Данска, Иран, Ирак, Ирска, Италија, Јужна Африка, Канада, Кина, Кореја, Малезија, Филипини, Сингапур, Словачка, Холандија, Хрватска, Шведска, Швајцарија, Шпанија, и Унгарија [94]. Во блиското опкружување на Р.С. Македонија болеста е пријавена во Романија [95], Словенија [96] и Хрватска [97].



Слика 3. Географска дистрибуција на коихерпесвирозата во светот (2004–2025) според пријавените случаи во WOAH [98].

2.3.3. Етиологија

Вирусот на KHVD е познат и како вирус на интерстицијален нефрит и некроза на жабрите (*Carp nephritis and gill necrosis virus* CNGV) [99]. Вирусот е класифициран како *Cyprinid herpesvirus 3* (CyHV-3), според номенклатурата на останатите ципринидни херпесвируси: *Cyprinid herpesvirus 1* (CyHV-1), кој предизвикува папиломатоза кај крапот, и *Cyprinid herpesvirus 2* (CyHV-2), кој е поврзан со хематопоетска некроза кај златната рипка. Анализата на целосната геномска секвенца покажала дека CyHV-3 е најблиску поврзан со CyHV-1, CyHV-2 и *Anguillid herpesvirus 1* (AngHV-1), додека е подалечно сроден со *Ictalurid herpesvirus 1* (IcHV-1, вирусот на каналскиот сом) и *Ranid herpesvirus 1* (RaHV-1, херпесвирусот на жабите) [100]. CyHV-3 е типичен претставник на новиот род *Cyprinivirus* во семејството *Alloherpesviridae*, кое исто така ги вклучува CyHV-1 и CyHV-2 [94].

Сепак, називот KHVD е задржан во Акватичниот кодекс и Акватичниот прирачник на WOAH поради континуитетот и се користи како синоним за CyHV-3. Големината на геномот на вирусот на KHVD е 295 kbp. Нуклеокапсидите на вирусот се со дијаметар од 100–110 nm и се обвиткани [99]. Обвитканите вириони варираат во големина од 170 до 200 nm, во зависност од различните инфицирани типови на клетки [90, 101, 102]. Целокупната геномска секвенца на KHVD содржи 156 уникатни отворени читачки рамки (ORF). Во зрелите вириони се вклучени 40 вирусни протеини и 18 клеточни протеини [103, 104].

2.3.4. Епидемиологија

Извор на инфекција

Постојат докази кои укажуваат дека преживеаните единки од инфекцијата со KHVD можат да останат перзистентно заразени со вирусот и да го задржат вирусот

подолг временски период без да покажат клинички знаци на инфекција. Вирусот перзистира кај крап што бил експериментално заразен на оптималната температура за размножување на вирусот, а потоа бил одржуван на пониска температура [105, 106]. Во 2006 година, јапонски истражувачи извршиле PCR и серолошка анализа за KHVD во езерото Биуа, каде што во текот на претходните две години биле забележани повремени случаи на инфекција по големото избувнување во 2004 година. Анализата на преживеаните единки покажала дека 54% од возрасните крапови биле серопозитивни, што укажува на претходна изложеност на вирусот, додека 31% биле PCR-позитивни, што индицира активно присуство на вирусната ДНК. Континуираното високо ниво на антитела во популацијата укажува на можноста за периодична реактивација на латентниот вирус кај одредени единки, што може да доведе до повремено ослободување на вирусот и негово ниско, но одржливо присуство во екосистемот [94].

Приемливост, диспозиција и осетливост

Сите возрасни групи на риби, од јувенилните до возрасните се приемчиви на инфекција со KHVD. Меѓутоа, под експериментални услови, риби со тежина од 2,5 до 6 g биле поподложни на инфекција во споредба со риби со тежина од 230 g [107]. Се претпоставува дека ларвите на крапот се толерантни на инфекција со KHVD [107].

Според Кодексот за здравје на водни животни, видовите што ги исполнуваат критериумите за класификација како приемчиви на инфекција со KHVD ги вклучуваат сите видови и подвидови на крап (*Cyprinus carpio*), како и неговите хибриди (на пр. *Cyprinus carpio* × *Carassius auratus*, *Cyprinus carpio* × *Carassius carassius*). Од друга страна и според истите критериуми, за одредени видови, како што се златната рипка (*Carassius auratus*), белиот амур (*Ctenopharyngodon idella*) и карашот (*Carassius carassius*), нема доволно докази за нивна приемчивост на инфекција со KHVD [94].

Покрај тоа, кај организмите наведени во Табела 3 биле утврдени позитивни резултати со PCR и/или *in situ* хибридизација. Сепак, досегашните податоци не укажуваат на постоење на активна инфекција [94].

Табела 3. Видови за кои има непотполни докази за исполнување на критериумите како приемчиви на инфекција со KHVD

Фамилија	Научно име
Acipenseridae	<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>
	<i>Acipenser ruthenus</i> × <i>Huso huso</i>
	<i>Acipenser oxyrinchus</i>
Cyprinidae	<i>Leuciscus idus</i>
	<i>Rutilus rutilus</i>
	<i>Tinca tinca</i>
	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>
Gammaridae	<i>Gammarus pulex</i>
Nemacheilidae	<i>Barbatula barbatula</i>
Percidae	<i>Gymnocephalus cernuus</i>
	<i>Perca fluviatilis</i>
Unionidae	<i>Anodonta cygnea</i>

Најприемчиви на инфекција со KHVD се крапот и неговите хибриди, особено кои × крап, и затоа тие се препорачуваат за приоритетна детекција на вирусот. По нив следуваат другите хибриди, како што се златната рипка × крап и караш × крап [108, 109]. Експерименталните истражувања покажале дека стапката на морталитет кај домородните јапонски крапови е највисока (95–100%), додека кај други крапови варира од 30% до 95% [108, 109].

Ниту еден векторски вид не е докажан како преносител на KHVD на приемчивите видови. Сепак, студиите во Јапонија пријавиле детекција на KHVD ДНК во примероци од зоопланктон кај некои видови од класата Rotifera [110]. Вирусот на KHVD е исто така детектиран со PCR во лебедови школки (*Anodonta cygnea*), слатководни ракчиња (*Gammarus pulex*) [111] и во миграциски диви патки од родовите *Anas*, *Mareca*, *Spatula* и *Oxyura* [112] во подрачја каде што коегзистираат риби и патки.

Студиите во Израел покажале дека KHVD останува жив во вода на температури од 23-25°C најмалку 4 часа, но помалку од 21 час [107]. Студиите во Јапонија покажале значително намалување на инфективниот титар на KHVD во рок од 3 дена во примероци од речна или езерска вода или седимент на 15°C. Сепак KHVD останува инфективен повеќе од 7 дена кога бил чуван во примероци од животната средина што биле стерилизирани со автоклавирање или филтрирање [113].

2.3.5. Патогенеза

Болеста се појавува при температура 16-25 °C, со период на инкубација од 7 до 21 ден. Повисоките температури на водата можат да го скратат инкубациониот период, што доведува до побрза појава на клиничките знаци [114]. Вирусот навлегува во организмот преку кожата, особено во пределот на перките и телото, како и преку жабрите [115]. Иако жабрите и гастроинтестиналниот тракт се сметале за главни влезни места, поновите истражувања сугерираат дека кожата игра клучна улога во иницијалната инфекција [115].

По примарната инфекција, вирусот брзо се шири преку крвотокот и инфицира различни органи како што се бубрезите, слезината, црниот дроб и цревата. Бубрезите, како хематопоетски и имунолошки органи кај рибите, претставуваат едни од примарните таргети каде што инфекцијата може да доведе до нефротоксични оштетувања и имunosупресија. Слезината често покажува знаци на значителна хиперплазија, што укажува на силна имуноактивација како одговор на инфекцијата [94].

На клеточно ниво, вирусната репликација започнува во јадрата на инфицираните клетки, каде што вирусната ДНК се амплифицира и се синтетизираат структурните вирусни протеини. По почетната репликација, зрелите вириони се транспортираат до цитоплазмата, каде што се комплетира нивното созревање и од каде што се ослободуваат нови инфективни честички. Овој процес е карактеристичен за сите херпесвируси, кај кои нуклеарната фаза на репликација е критична за продукцијата на нови вириони [94].

Главните ткива во кои се одвива репликацијата на вирусот се епителните клетки на кожата, жабрените клетки и гастроинтестиналниот тракт. Во раната фаза на инфекцијата се забележува зголемена продукција на лига која содржи високи концентрации на вирусни честички. Покрај лигата, вирусот активно се излачува и преку фецесот, урината и жабрените секрети, што значително ја олеснува неговата хоризонтална трансмисија во водената средина [115].

Во зависност од условите во животната средина, стапката на инфекција може да достигне 100%, а морталитетот се движи помеѓу 70% и 100%. Највисока леталност се забележува при температури на водата помеѓу 22 и 25°C, додека при температури над 30°C, репликацијата на вирусот и последователната смртност значително опаѓаат. Овој температурно зависен профил на инфекцијата укажува на можноста за ограничена вирулентност на вирусот во потопли услови [115].

Како и другите херпесвируси, овој вирус има способност да избегне целосна елиминација од имунолошкиот систем преку воспоставување латентна инфекција. Преживеаните риби често стануваат субклинички носители кои повремено ослободуваат вирусни честички во животната средина, особено под стресни услови како што се температурни флукутации, зголемена густина на популацијата или присуство на други коинфекции. Оваа латентна фаза ја комплицира контролата на инфекцијата и ја зголемува можноста за ендемско присуство на вирусот во одредени водни екосистеми [115].

2.3.6. Клиничка слика

Клиничките знаци на KHVD често се неспецифични. Угинувањето може да започне многу брзо кај заразената популација, со смртност што започнува во рок од 24 до 48 часа по првите клинички знаци. Типичните клинички знаци вклучуваат безволност и одбивање на храна три до девет дена по инфекцијата, по што следи значително зголемување на продукцијата на лига на кожата и жабрите. Често се јавува ендоталмија, а подоцна и фокална или проширена некроза на жабреното ткиво. Дополнително, може да се појават кружни до масовно раширени некротични лезии на кожата, како и петехијално до обилно крварење на кожата и перките. Клиничките знаци можат да се појават заедно или поединечно, но можат и да бидат отсутни во случај на перакутен тек на болеста. Развојот на болеста по инфекцијата зависи од повеќе фактори, како што се вируленцијата на вирусот, концентрацијата на вирусот, условите во околината, сезоната, нивото на стрес кај рибите, генетската линија, како и ткивата во кои се одвива репликацијата на вирусот [94].

2.3.7. Патоанатомски промени

Најконзистентната макроскопска патологија се забележува на жабрите, кај кои промените можат да варираат од бледи некротични дамки до екстензивна промена на бојата, тешка некроза и воспаление. Во случаи на ненадејни угинувања, внатрешните лезии често отсуствуваат. Може да има и адхезии во абдоминалната празнина, со или без абнормално обојување на внатрешните органи (посветло или потемно). Бубрегот или црниот дроб можат да бидат зголемени и да покажат петехијални хеморагии. Коинфекции со ектопаразити, како што се жабрените моногени трематоди, можат да ја променат опишаната макроскопска патологија [94].

2.3.8. Контрола и превенција

Како дел од мерките за контрола на KHVD, во бројни земји се применува биосигурносен протокол кој вклучува елиминација на инфицирани риби и дезинфекција на заразените одгледувалишта [116]. Во меѓународен контекст, некои држави имаат воспоставено трговски бариери, како што се забрани за увоз на крап од земји со

потврдено присуство на болеста, или задолжителни програми за скрининг, лабораториско тестирање и карантински период за секоја пратка на живи риби [117].

Вакцинација

Моментално не постои широко распространета, безбедна и ефикасна комерцијална вакцина против KHVD. Сепак, жив ослабен вирус се користи за вакцинација на крапови, при што вакцинацијата индуцира антитела против вирусот, а траењето на заштитата е најмалку 8 месеци [99]. Оваа вакцина е лиценцирана за употреба во Израел. Во моментот се развиваа и друга вакцина, која се администрира орално преку липозоми што содржат инактивиран KHVD и која покажала ефикасност во заштита на краповите од клиничка болест [99, 102]. Вакцина базирана на двојно делетирање на ORF56 и ORF57 била произведена со употреба на клонирачка технологија [118]. ДНК-вакцините што содржат плазмиди кои ги кодираат ORF25, ORF81 и ORF149 покажале ефикасни резултати под лабораториски услови (92,93,94).

Хемотерапија

Во моментот не постои достапна хемотерапија за лекување на инфекцијата со KHVD. Сепак, постојат извештаи за антивирусната активност на екзополисахаридите против KHVD во ин витро услови [122].

Имуностимулација

Во моментот нема објавени податоци за употребата на имуностимуланти за контрола на инфекцијата со KHVD кај крап. Сепак, овој пристап привлекува значителен истражувачки интерес во современата аквакултура [122].

Одгледување на отпорни видови

Генетската варијабилност кај различните соеви на крап значајно влијае врз нивната чувствителност на *CyHV-3*. Во една студија, потомци од вкрстувања помеѓу два припитомени и еден див тип на крап покажале екстремно ниска отпорност на вирусот, со стапка на преживување од само 8% [123]. Од друга страна, најотпорниот сој постигнал значително повисоки резултати, со преживување меѓу 61% и 64%. Слични резултати биле добиени и во експеримент со 96 семејства, креирани преку вкрстување на четири европски и азиски генотипови на *C. carpio*, при што преживувањето варираше од 42,9% до 53,4% [124].

Природни епидемии на KHVD не се пријавени кај најчесто одгледуваните хербиворни циприниди – амур (*Ctenopharyngodon idella*), бел толстолобик (*Hypophthalmichthys molitrix*) и сив толстолобик (*Aristichthys nobilis*). Овие хербиворни циприниди често се одгледуваат во поликултура со обичен крап, но не се забележани знаци на болест или смртност кај нив, ниту во нормални услови на поликултура, ниту при експериментална кохабитација со заразена риба, ниту при директно изложување на вирусот [125]. Обичните хибриди на крап исто така претставуваат потенцијален метод за контрола за да се спречат сериозни загуби од KHVD. Хибридите од машка златна рипка × женски крап покажуваат отпорност на KHVD и се карактеризираат со брз раст [126]. Сепак KHVD е детектиран и кај преживеаните хибриди што сугерира дека тие можат да бидат потенцијални носители на вирусот [127].

Инактивација на вирусот

Вирусот се инактивира со UV зрачење со доза од $4.0 \times 10^3 \mu\text{Ws}/\text{cm}^2$, температури над 50°C во тек од 1 минута, и со третман со јодофор (200 mg/L) во тек од 30 секунди при 15°C. Други дезинфекциски средства вклучуваат: бензалкониум хлорид (60 mg/L во

тек од 20 минути), етил алкохол (30% во тек од 20 минути) и натриум хипохлорит (200 mg/L во тек од 30 секунди), сите тестирани на 15°C [128].

Дезинфекција на икра

Дезинфекцијата на површината на икрата може да се постигне со третман со јодофор [128]. Засега не постојат објавени студии за дезинфекција на ларви.

Општи практики на одгледување

Нововнесените риби треба да потекнуваат од места каде што болеста не е пријавена, и да бидат во карантин 4 недели до 2 месеци, на температура од 18–26°C пред трансфер на главната локација и мешање со неинфицирани риби [129]. Со зголемување на температурата на водата над 26-28°C се намалува смртноста, додека намалувањето на температурата под 18°C може да помогне во контрола на болеста. Додавањето сол во водата може да помогне во намалување на секундарните инфекции [129, 130]. Хигиенските мерки на одгледувалиштето треба да вклучуваат дезинфекција на икрата, редовна дезинфекција на езерата, хемиска дезинфекција на опремата на рибникот, внимателно ракување со рибите за избегнување на стрес и безбедно отстранување на угинатите риби.

2.3.9. Дијагностика

Клинички знаци

Болеста се карактеризира со значително зголемување на смртноста во популацијата. Сите возрасни групи се приемчиви на KHVD, иако под експериментални услови, помладите риби, до 1 година стари, се посебно приемчиви на болеста. При макроскопски преглед, типичните клинички знаци вклучуваат бледа дисколорација или црвенило на кожата, која може да има и груба текстура, фокален губиток на епидермисот, прекумерно производство на лига на кожата и жабрите, како и бледа дисколорација на жабрите. Други визуелни знаци вклучуваат енд офталмија и крварење на кожата и основата на перките, како и ерозија на перките. Рибите стануваат безволни, се одвојуваат од јатото и се собираат кај дотокот на водата или на краевите од базените и изгледаат како да сакаат да земат воздух на површината на водата. Некои риби може да покажат знаци на губење на рамнотежата и дезориентација, додека други може да покажат хиперактивност [94].

Макроскопска патологија

Не постојат патогномонични визуелни лезии. Финалната дијагноза мора да се основа на директно откривање на вирусна ДНК или изолација и идентификација на вирусот. Сепак најконзистентната визуелна патологија се забележува на жабрите, и може да варира од бледи некротични места до опширни дисколорации, тешки некрози и воспалителни промени. Друга, често забележана визуелна патологија се бледи, неправилни полиња на кожата, поврзани со зголемено лачење на лига, анорексија, енд офталмија и површинско крварење на основата на перките. Внатрешните лезии се непостојани и често отсутствуваат во случаи на ненадејно угинување. Патолошките промени може да вклучуваат адхезии во абдоминалната празнина со промени во пигментацијата на внатрешните органи (бледило или затемнување). Бубрезите и црниот дроб понекогаш се зголемени и може да имаат точкести крварења. Присуството на визуелни лезии може да биде особено изразено доколку рибите се истовремено инфицирани со ектопаразити како што се: *Argulus* spp., *Chilodonella* spp., *Cryptobia* spp.,

Dactylogyrus spp., *Gyrodactylus* spp., *Ichthyobodo* spp., *Ichthyophthirius* spp. и *Trichodina* spp. [94].

Микроскопска патологија

Испитувањето на жабрите со светлосен микроскоп со мало зголемување може да открие ерозија на примарните ламели, фузија на секундарните ламели и оток на врвовите на примарните и секундарните ламели. Патохистолошката слика на болеста е променлива и не е патогномонична, но воспалението и некрозата на жабреното ткиво се со конзистентни карактеристики. Жабрите покажуваат хиперплазија и хипертрофија на граничниот епител, фузија на секундарните ламели, како и адхезија на филаментите. Некрозата на жабрите варира од мали области со некротични епителни клетки на секундарните ламели до целосно губење на ламелите. Епителните клетки на жабрите и леукоцитите може да покажуваат изразен нуклеарен оток, маргинација на хроматинот и бледо дифузни еозинофилни интрануклеарни инклузии. Слични патохистолошки промени, вклучувајќи воспаление, некроза и интрануклеарни инклузии, може да се детектираат и во други органи, особено во бубрезите, но и во слезината, панкреасот, црниот дроб, мозокот, цревата и усниот епител [94].

Електронска микроскопија

При трансмисиона електронска микроскопија (ТЕМ), кај KHVD се забележуваат морфолошки карактеристики типични за херпесвируси. Икосаедрални капсиди со дијаметар од приближно 100–110 nm се лоцираат во јадрата на инфицираните клетки, додека обвиткани вириони со дијаметар од 170–200 nm се присутни во цитоплазмата или екстрацелуларно. Со електронска микроскопија можат да се набљудуваат различните фази на развој на вирусот, како што се празни капсиди, капсиди исполнети со ДНК и обвиткани вириони. Овие структури претставуваат клучни индикатори за идентификација на вирусот. Сепак, идентификацијата на вирусните честички преку ТЕМ на ткива од клинички инфицирани крапови не претставува сигурен дијагностички метод. За оваа анализа потребно е да се земат примероци од жабрено и бубрежно ткиво, фиксирани во глутаралдехид, при што се препорачува анализа на единки со висок степен на инфекција ($>10^6$ вирусни честички). За оптимални резултати, се препорачува земање примероци од повеќе риби кои се во различни фази на инфекцијата [94].

Методи за детекција и идентификација на причинителот

Дијагноза на KHVD кај клинички заболени риби може да се постави со изолација на вирусот во клеточна култура. Сепак, вирусот се изолира само во ограничен број клеточни линии, а овие клетки можат да бидат тешки за манипулација. Исто така, изолацијата во клеточна култура не е толку осетлива како PCR-базираните методи за откривање на KHVD и не се смета за доверлив дијагностички метод за KHVD. Линиите на клетки што се препорачани се KF-1 (Koi Fin) или CCB (Common Carp Brain) [91].

Методите базирани на ELISA за директно откривање на KHVD-антиген во заразените ткива се развиваат во многу лаборатории и овие методи можат да бидат погодни за потврдна идентификација на вирусот. Во моментот, еден објавен ELISA метод е достапен и е развиен во Израел за откривање на вирусот во фецесот на рибите [131].

Методите за идентификација на вирусот што зависат од производството на KHVD-заразени клеточни култури (на пример, IFAT, имунопероксидазни тестови и серумски неутрализациони тестови) не се препорачуваат. Ова се должи на тоа што растот на вирусот е бавен и непредвидлив во приемливите клеточни култури [91].

Методот кој најчесто се применува за директна детекција на KHVD вирусот во рибните ткива е базиран на PCR технологија специфична за овој патоген. Современите дијагностички лаборатории претежно користат qPCR (квантитативен PCR) наместо конвенционалниот PCR поради неговите предности. Меѓу квантитативните методи, TaqMan real-time PCR развиен од Gilad и сор. [132] се издвојува како најшироко прифатен и применуван дијагностички пристап за детекција на KHVD.

3. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

Ова истражување се фокусираше на присуството и распространетоста на три вирусни заболувања кај одгледуваните риби во Р.С. Македонија: IHN, VHS и KHVD. Овие болести се класифицирани како заболувања што задолжително се пријавуваат во WOAH. Според Кодексот за здравје на водните животни на WOAH, тие претставуваат сериозен ризик поради нивниот потенцијал за брзо ширење, економските загуби и влијанието врз меѓународната трговија.

Во Р.С. Македонија, надзорот врз IHN, VHS и KHVD се спроведува согласно Годишниот план за мониторинг кој започна во 2015 година како дел од регулаторните мерки на Агенцијата за храна и ветеринарство (АХВ). Планот се темели на Директивата на Советот 2006/88/ЕС и Одлуката за спроведување на Комисијата (ЕУ) 2015/1554.

Првата детекција на IHN во 2018 година кај субклинички подмладок на виножитна пастрмка иницираше имплементација на засилен надзор и зајакнување на дијагностичките и превентивните мерки. Ова истражување произлезе како одговор на потребата за сеопфатна евалуација на здравствената состојба на одгледуваните риби во аквакултурните објекти во Р.С. Македонија. Применувајќи стандардизирани протоколи за дијагностика, активностите беа насочени кон мониторинг на присуството на IHN, VHS и KHVD кај различни видови риби, со цел да се обезбедат научно засновани податоци за креирање на ефективни стратегии за контрола и превенција.

Главните задачи на истражувањето беа:

1. Да се утврди застапеноста на IHN кај одгледуваната виножитна пастрмка во Р.С. Македонија.
2. Да се идентификуваат нови домаќини на IHN во пастрмските рибници во Р.С. Македонија.
3. Да се направи генетска карактеризација на вирусот на IHN и да се споредат добиените наоди од различни рибници.
4. Да се идентификуваат факторите што придонесуваат за ширење на IHN и да се процени нивното влијание врз епидемиолошките карактеристики на болеста.
5. Да се предложат мерки за контрола и ерадикација на IHN во Р.С. Македонија.
6. Да се утврди присуството или отсуството на VHS и KHVD кај одгледуваните риби во Р.С. Македонија.
7. Да се изработи национална епидемиолошка карта за вирусните болести кај одгледуваните риби во Р.С. Македонија.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ НА РАБОТА

4.1 Етичка изјава

Сите активности поврзани со ракување и земање биолошки примероци од риби беа спроведени во согласност со стандардизираните процедури наведени во Одлуката за спроведување на Европската комисија (ЕС) 2015/1554 од 11 септември 2015 година [133], како и во согласност со националното законодавство за здравствена заштита на животните. Постапките беа изведени од обучен персонал, со примена на соодветни мерки за минимизирање на стресот и страдањето кај рибите.

Писмена согласност за користење на податоците беше добиена од Агенцијата за храна и ветеринарство, согласно регулаторните барања (Согласност бр. 02-232/2 од 4.11.2022 година).

4.2 Собирање на примероците

Примероците беа земани од официјални ветеринари од регистрирани рибници низ различни региони на Р.С. Македонија, како составен дел од националната програма за надзор имплементирана во периодот 2015-2024 година. Ова истражување беше спроведено од 2020 до 2024 година, при што податоците од претходниот период беа користени за компаративна анализа. Вкупно беа опфатени 57 пастрмски и 43 крапски рибници, со напомена дека бројот на рибници, особено на оние за одгледување крап, варираше низ годините, а некои од нив немаа континуирано присуство на риби во текот на целата година.

Мониторингот за VHS и IHN за 2015 и 2016 година се спроведуваа двапати годишно, во пролет и на есен. Од 2017 до 2024 година, мониторингот за VHS и IHN се спроведуваа само на есен. Во периодот од 2020 до 2021 година, примероци за IHN и VHS беа земени од сите пастрмски рибници во земјата. Сепак, почнувајќи од 2022 година, примероци беа земани само од рибници кои претходно биле тестирани и со негативен резултат за IHN и VHS. Останатите рибници беа сметани за позитивни за IHN и беа исклучени од земање примероци и за двете болести. Дополнително, бројот на примероци беше намален поради адаптација на програмата од страна на АХВ. За VHS и IHN беа земани примероци од виножитна, поточна и охридска пастрмка. Примероците беа земани кога температурата на водата беше меѓу 8 и 14 °C. Од секој рибник беа земени три примероци. Секој примерок беше составен од делови од срце, слезина и бубрези од 10 риби.

Примероците за KHVD беа земани од рибници за крап во потоплите месеци (двапати годишно кон крајот на пролета и почетокот на есента), кога температурата на водата беше меѓу 20 и 28 °C. Бројот на рибници од кои беа земани примероци значително варираше од година во година, бидејќи не сите рибници имаа риби преку целата година. Дел од регистрираните рибници беа наменети исклучиво за одгледување подмладок од крап. Откако рибите ќе достигнеа одредена маса, беа префрлувани во други одгледувалишта каде што се вршеше нивниот тов. Во 2022, 2023 и 2024 година, земањето примероци се спроведуваа само на почетокот на есента. Вкупно 15 примероци беа земани од секој рибник, при што секој примерок се состоеше од делови од жабри и бубрези од две риби. Примероците од рибите беа ставени во медиум MEM (minimum essential medium) и транспортирани до лабораторијата во разладени услови за понатамошна анализа.

Од 2015 до 2019 година, примероците беа тестирани на Институтот за ветеринарна медицина во Србија (Национална референтна лабораторија за болести кај риби), каде што дијагностиката на VHS и IHN се вршела со култура на клетки користејќи ги препорачаните линии BF-2 и EPC согласно препораките на Европската комисија [134]. За VHS и IHN, примероците беа тестирани и со RT-qPCR според протоколите опишани од Европската комисија [134]. По 2020 година, примероците беа анализирани на Факултетот за ветеринарна медицина во Скопје само со RT-qPCR според препорачаните протоколи на Европската комисија [134]. Двете институции користеа исклучиво молекуларни дијагностички техники за детекција на KHVD во доставените примероци.

Бројот на позитивни рибници од кои беа земени примероци за секоја година од 2020 до 2024 година беше анализиран според статистичките региони на Р.С. Македонија. Анализата по статистички региони на претходните години не беше возможна бидејќи примероците беа земени на принципот на слепа проба. Рибниците кои беа депопулирани, било од страна на надлежните органи или од страна на сопствениците, беа вклучени во процесот на земање примероци.

4.3 Екстракција на РНК

Екстракцијата на РНК беше извршена со автоматскиот систем за екстракција SaMag 24 од Sacace Biotechnologies во комбинација со комплетот за екстракција на РНК/ДНК SaMag Total, следејќи го стандардниот протокол обезбеден од страна на производителот. Првин, 25 ml од ткивни агрегати беа хомогенизирани во тубички со помош на метална топка од нерѓосувачки челик во MM Mixer Mill 400 (Retsch) за 5 минути на 22 Hz/min. Потоа, хомогенизираната мешавина беше кратко центрифугирана. По почетната обработка на примероците, 200 µl супернатант од сите примероци подлежеше на екстракција на нуклеински киселини. За да се обезбеди оптимална РНК за последователната PCR реакција, количеството и чистотата на добиената РНК беа проценети користејќи UV спектрофотометар (NanoDrop 2000C, Thermo Scientific) со одредување на A260/280 соодносот.

4.4 Детекција на вируси

За детекција на VHS беше користен RT-qPCR протоколот дизајниран од Jonstrup и сор. [88]. За RT-qPCR се користеше системот QuantStudio 5 произведен од Applied Biosystems во комбинација со Path-ID™ Multiplex One-Step RT-PCR Kit обезбеден од Ambion (Applied Biosystems). Примероците беа анализирани со прајмери кои таргетираа специфична секвенца во геномот на VHS вирусот. Составот на реакционата смеса во вкупен волумен од 22,50 µl се состоеше од: 14,25 µl DEPC третирана вода, 6,25 µl 4x TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix, и 2 µl од прајмер миксот специфичен за VHS. За да се обезбеди доверливост и репродуктивност беше имплементиран пристап со стандардна крива. Калибрацијата на тестот беше извршена користејќи референтен материјал означен како VHS Standard со претходно дефиниран Ct (праг на циклус) вредност. Термалниот протокол за RT-qPCR реакцијата беше оптимизиран на следниот начин: иницијална реверзна транскрипција во траење од 5 минути на 50 °C, проследена со денатурација од 10 минути на 95 °C. Потоа беа спроведени 40 циклуси на амплификација, кои вклучуваа 5-секундна денатурација на 95 °C и 30-секундна екстензија на 60 °C. Овој строго дефиниран протокол овозможи сигурна и чувствителна детекција на VHS вирусот во анализираниите примероци.

Табела 4. *RT-qPCR за детекција на VHS [88].*

Прајмер	Секвенца на прајмер 5'-3'
q VHS _F	AAACTCGCAGGATGTGTGCGTCC 3'
q VHS _R	TCTGCGATCTCAGTCAGGATGAA 3'
q VHS _Pro	FAM-TAGAGGGCCTTGGTGATCTTCT-BHQ1-3'

Табела 5. *Подготовка на прајмер микс за VHS.*

Прајмер	Волумен во μL (100 μM)
q VHS _F	12.5
q VHS _R	12.5
q VHS _Pro	5.0
Tris-EDTA buffer (или ултрачиста H₂O)	170.0

За детекција на IHN беа користени два RT-qPCR протоколи. До мај 2021 година, беше користен RT-qPCR протоколот дизајниран од Purcell и сор. [135]. По мај 2021 година, беше користен протоколот развиен од Cuenca и сор. [136]. Прајмерите користени во ова истражување амплифицираа кратка секвенца во N генот. Нуклеотидните секвенци на прајмерите и методата за подготовка на прајмер миксот се прикажани во Табелите 3, 4 и 5. Реакцијата беше извршена во вкупен волумен од 22,50 μl кој содржеше: 14,25 μl DEPC третирана вода, 6,25 μl 4x TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix и 2 μl микс на прајмери за IHN. Термалниот протокол вклучуваше иницијална инкубација на 50 °C за 2 минути, по што следеше денатурација на 95 °C за 10 минути. Потоа, беа извршени 40 циклуси на амплификација, каде секој циклус се состоеше од 15 секунди на 95 °C и 1 минута на 60 °C.

Табела 6. *RT-qPCR за детекција на IHN според Purcell и сор. [135].*

Прајмер	Секвенца на прајмер 5'-3'
qIHNV_F	AGAGCCAAGGCACTGTGCG
qIHNV_R	TTCTTTGCGGCTTGGTTGA
qIHNV_Pro	6FAM-TGAGACTGAGCGGGACA-NFQ/MGB

Табела 7. *RT-qPCR за детекција на IHN според Cuenca и сор. [136].*

Прајмер	Секвенца на прајмер 5'-3'
qIHNV_F	AGAGCCAAGGCACTGTGCG
qIHNV_R	TTCTTTGCGGCTTGGTTGA
qIHNV_Pro	6FAM-AGCGGGACAGGRATGACAATGGTG- BHQ1

Табела 8. Подготовка на прајмер микс за IHN.

Прајмер	Волумен во μL (100 μM)
qIHNV_F	12.5
qIHNV_R	12.5
qIHNV_Pro	5.0
Tris-EDTA buffer (или ултрачиста H_2O)	170.0

За детекција на KHVD беше користен протоколот дизајниран од Gilad и сор. [132]. Реакцијата на RT-qPCR беше извршена со системот QuantStudio5 произведен од Applied Biosystems во комбинација со Path-ID™ Multiplex One-Step RT-PCR Kit обезбеден од Ambion (Applied Biosystems). Термалниот протокол за RT-qPCR реакцијата беше оптимизиран со цел да се обезбедат висока точност и чувствителност. Протоколот вклучуваше иницијален чекор на реверзна транскрипција при 50 °C во траење од 5 минути, проследен со денатурација на 95 °C во траење од 10 минути. Следеа 40 амплификациски циклуси, при што секој циклус се состоеше од 5-секундна денатурација на 95 °C и 30-секундна екстензија на 60 °C.

Табела 9. RT-qPCR за детекција на KHVD [132].

Прајмер	Секвенца на прајмер 5'-3'
q KHV _89f	GACGCCGGAGACCTTGTG
qKHV _163r	CGGGTTCTTATTTTGTCTTGT
qKHV _109pro	FAM-CTTCCTCTGCTCGGCGAGCACG-BHQ1

Табела 10. Подготовка на прајмер микс за KHVD.

Прајмер	Волумен во (100 μM)
q KHV _89f	12.5
q KHV _163r	12.5
q KHV _109pro	5.0
Tris-EDTA buffer (или ултрачиста H_2O)	170.0

4.5 Генотипизација на изолати

За генотипизација на изолатите на IHN беше анализиран фрагмент од G-генот. Позитивните примероци на IHN беа испратени до Референтната лабораторија на Европската Унија (EURL) за болести кај риби и ракчиња во Данска за дополнителни анализи и потврдување на резултатите. Во EURL беше амплифициран фрагмент од 1394 нуклеотиди кој опфаќа најголем дел од кодирачкиот регион на G-генот користејќи ги прајмерите IG1 и IGR [137]. Со One-Step RT-PCR Kit беше изведена реверзно транскриптазна PCR реакција, при што финалната концентрација на секој прајмер беше 0.6 μM , а концентрацијата на секој дезоксирибонуклеотиден трифосфат (dNTP) изнесуваше 400 μM . Како матричен РНК-темплет беа користени 5 μl екстрахирана РНК од секој примерок. Термалниот протокол се состоеше од: реверзна транскрипција 30 минути на 50°C, иницијална денатурација 15 минути на 95°C, проследена со 40 циклуси

кои вклучуваа 1 минута на 94°C, 30 секунди на 56°C и 2 минути на 72°C со завршна екстензија од 10 минути на 72°C. Амплификациските продукти беа прочистени со QIAquick Purification Kit (Qiagen) според протоколот на производителот и секвенцирани користејќи ги амплификациските прајмери во лабораторијата на Eurofins. Добиените секвенци за македонските изолати на IHN беа депонирани во GenBank под пристапните броеви PV125426, PV125427, PV125428, PV125429 и PV125430.

За целите на компаративна анализа, секвенците на IHN беа преземени од NCBI нуклеотидната база на податоци (www.ncbi.nlm.nih.gov). Обработениот сет на податоци содржеше 67 IHN секвенци кои ги претставуваат сите досега познати геногрупи. Мултипното порамнување на секвенците беше изведено со помош на MAFFT v.7.388 со примена на стандардните параметри [138]. Филогенетската реконструкција беше извршена со програмата RAxML v.8 [139], користејќи го моделот на супституција 8. Програмата автоматски ги процени сите слободни параметри, а филогенетското стебло беше конструирано со 1000 итерации на брза, bootstrap анализа, и пребарување на оптимално скорираното стебло со методот на максимална веројатност (ML), имплементиран во софтверот Geneious 11.1.5 (www.geneious.com).

4.6 Патохистологија

Патохистолошките анализи беа извршени за да се идентификуваат патолошките промени во различни ткива на рибите. Примероците од здрави и заболени риби беа земени од различни органи (жабри, бубрег, слезина, црн дроб, црева и срце). За земање на примероците се користеше стерилен скалпел. За да се запрат патолошките промени и да се зачува морфолошката структура на клетките и ткивата, примероците беа потопени во фиксатор (10% формалдехид) и чувани на температура од 4°C во период од 24 часа по што беа испирани со физиолошки раствор и испратени на Земјоделскиот факултет при Универзитетот во Белград, Србија. По фиксацијата, примероците беа обработени со стандардна методологија за парафинска инклузија. Примероците беа дехидрирани низ серија алкохолни раствори (70%, 80%, 90%, 100%) и потоа излеани во парафин. Кога примероците беа фиксирани во парафин, беа сечени на 5-10 микрометарски сечила користејќи микротом. Слајсовите беа поставени на стаклени слајдови и беа обоени со хематоксилин-еозин (H&E) за општа морфолошка проценка и специјализирани боења како што се Гомори (Gomori's trichrome stain) и Масонов трихром (Masson's trichrome stain) за идентификација на специфични структурни промени во ткивото. По боењето, примероците беа прегледани со оптички микроскоп на различни зголемувања. Патохистолошките наоди беа документирани со дигитална камера поврзана со микроскоп со висока резолуција.

4.7 Категоризација на одгледувалишта за аквакултура и одредување на степенот на ризик од внес и ширење на болести

За категоризација на одгледувалиштата беше користен прашалник дизајниран од АХВ (Прилог 9.1), со кој беа собрани податоци од вкупно 93 рибници, од кои 57 ладноводни и 36 топловодни. Во рамките на истражувањето беа анализирани следните параметри: видовите на риби присутни во рибниците, изворот на вода што се користи, методот и фреквенцијата на снабдување со риби, бројот на добавувачи, намената на рибата, близината на соседните одгледувалишта, типот на структура на рибникот и неговата изложеност на поплавување.

Дополнително беше испитано присуството на биосигурносни мерки, вклучувајќи: дезинфекциони бариери, дезинфекција на опрема и превозни средства (цистерни), огради околу одгледувалиштето, постоење на влезна врата, заштита од дива птица (мрежи), евиденција на посетители и можност за карантин и изолација.

За потребите на проценката на ризикот од појава и ширење на заразни болести, секое одгледувалиште беше оценето врз основа на двостепен пристап, кој вклучуваше пресметка на:

1. Вредности за ризик за внес на болести (Чекор 1)
2. Вредности за ризик за ширење на болести (Чекор 2)

Во рамките на секој чекор, беа дефинирани критериуми со однапред утврдени ризични вредности според одговорите добиени од прашалникот.

Секој можен одговор за даден критериум имаше доделена нумеричка вредност на ризик (од 0 до 3), каде што 0 означува најнизок ризик, а 3 највисок ризик. Дополнително, во делот на биосигурносни мерки (Критериум 13), секоја мерка (како присуство на дезинфекциона бариера, дезинфекција на опрема и цистерни, ограда, заштитни мрежи од птица итн.) беше оценета бинарно (да/не), при што одсуството на мерката се сметаше како потенцијален фактор на ризик. Со собирање на овие вредности, беше добиен збиен ризичен индекс за секој чекор. Врз основа на вкупниот збир и според однапред дефинирани граници, секој рибник беше категоризиран во една од трите групи: низок ризик, среден ризик и висок ризик.

4.8 Статистичка анализа

Со цел да се утврдат статистички значајни разлики во детекцијата на вирусните заболувања низ различни временски интервали, беше спроведена сеопфатна статистичка обработка на податоците, вклучувајќи анализи на трендови, споредби на пропорции и моделирање на инциденцата. Истражувањето беше насочено кон идентификација на значајни промени во бројот на позитивни случаи низ годините, како и кон проценка на просторната дистрибуција на инфекцијата.

Во рамки на оваа анализа, беше применет Chi-square тест за тренд (Cochran-Armitage тест) со цел анализа на долгорочните трендови на појава на вирусни заболувања во периодот 2022–2024 година. Со оваа метода се утврдуваше постоење на континуирано зголемување или намалување на инциденцата. За споредба на пропорциите на позитивни случаи меѓу различни години, во зависност од големината на очекуваните вредности, беа користени Fisher's Exact тестот кога фреквенциите беа помали од 5 и Chi-square тестот кога очекуваните вредности беа доволно високи за сигурна анализа.

Поасоновата регресија (Poisson regression) беше употребена за моделирање на инциденцата низ времето, при што беше пресметан rate ratio (RR) за секоја година. Со овој пристап се овозможи и проценка на регионалната варијабилност на инфекцијата, како и контрола на потенцијални збунувачки фактори (confounding variables), каде што тоа беше релевантно. Нивото на статистичка значајност беше поставено на $p < 0,05$, а резултатите беа прикажани преку табели и графички прикази, со целосна транспарентност на добиените наоди.

Патохистолошката проценка на промените во жабрите, црниот дроб и слезината кај здравите и заразените риби се базираше на полу-квантитативна скала (1–3), при што

се проценуваа зачестеноста и тежината на лезиите во набљудуваните органи. За секоја променлива беа пресметани средна вредност (Mean) и стандардна девијација (SD), а за анализа на разликите во дистрибуцијата на промените беше користен Chi-square тестот.

Во зависност од типот на податоците, за споредба на резултатите меѓу групите беа користени соодветни тестови. Mann-Whitney U тестот беше применет при параметри кои не следеа нормална распределба, додека t-тестот на независни примероци беше користен кај параметри со нормална распределба. За анализа на зачестеноста на патохистолошките промени меѓу различните групи беше применет Chi-square тестот.

Со цел идентификација на факторите што најмногу придонесуваат кон појавата на инфекцијата со IHN, беше спроведена логистичка регресија (Logistic regression), со пресметка на Odds Ratios (OR) и нивните p-вредности, што овозможи проценка на веројатноста од инфекција во зависност од изложеноста на одредени ризик-фактори.

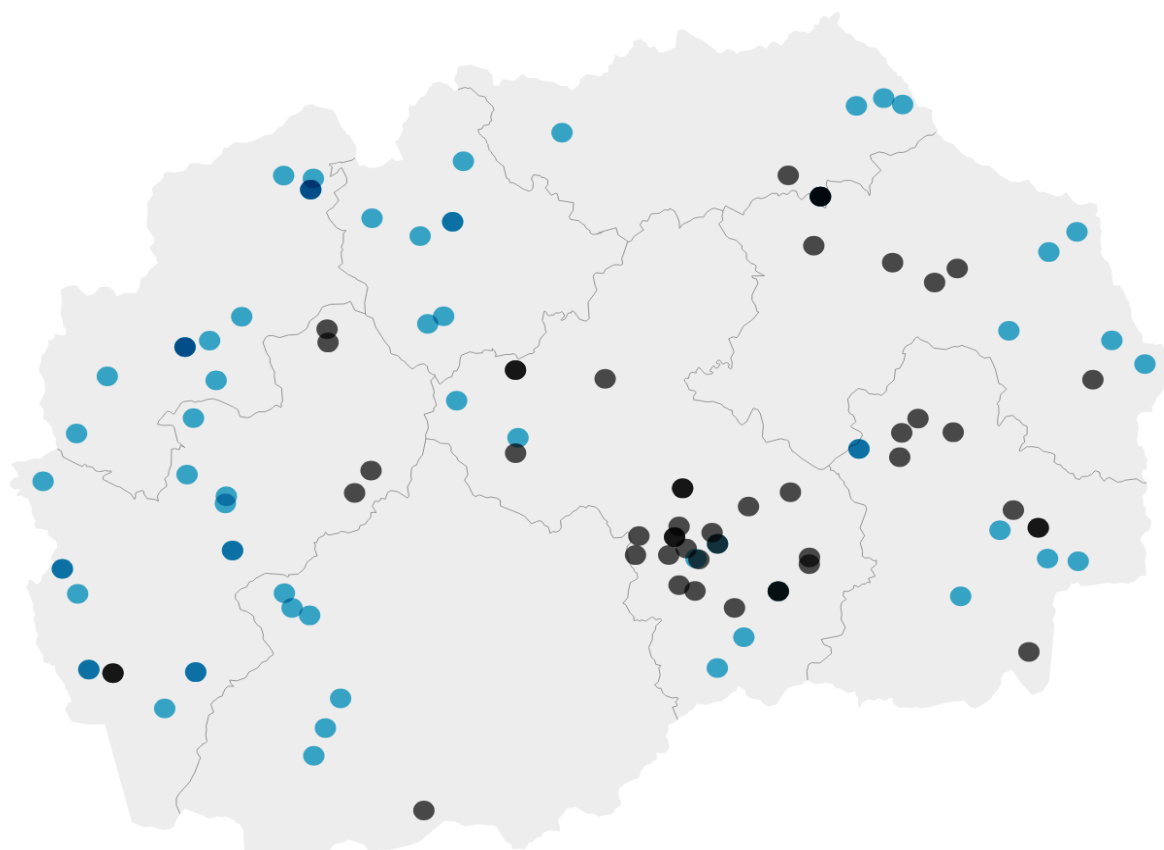
За анализа на податоците добиени преку прашалниците за проценка на биосигурносните практики и факторите на ризик поврзани со појавата и ширењето на заразни болести, применети беа Fisher's Exact тестот, Chi-square тестот и мерката за големина на ефект Cramér's V. Разликата во пристапот кај ладноводните и топоводните рибници се однесуваше на начинот на анализа: кај ладноводните рибници беше оценувана поврзаноста помеѓу различните параметри и здравствениот статус на рибите (инфицирани или неинфицирани), додека кај топоводните рибници беа анализирани разликите во дистрибуцијата на одговорите.

Chi-square тестот се користеше при споредба на распределбите на категориски податоци со доволно високи фреквенции, додека Fisher's Exact тестот беше применет во случаи со ниски фреквенции. Големината на ефектот се пресметуваше со Cramér's V, при што вредности блиски до 0,1 укажуваа на слаб ефект, вредности околу 0,3 на умерен ефект, а вредности над 0,5 на силен ефект. Сите статистички анализи беа извршени со користење на софтверскиот пакет SPSS, верзија 21.0 (IBM, Armonk, NY, USA).

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Молекуларна дијагностика

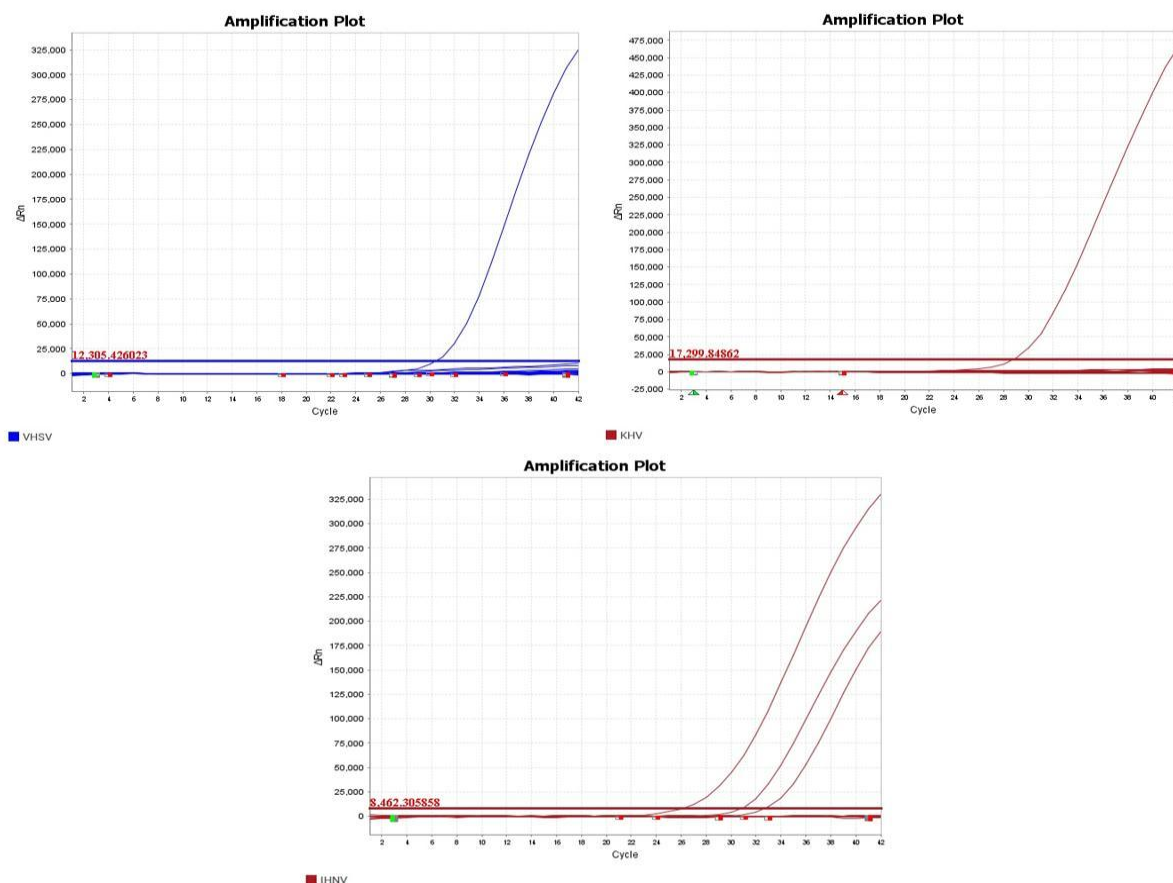
Во рамки на истражувањето беа анализирани вкупно 1.551 примероци за VHS и IHN, собрани од 57 ладноводни рибници, како и 2.985 примероци за KHVD, земени од 36 топловодни рибниц. Примероците беа собрани од рибници распространети во сите статистички региони на државата (Слика 4).



Created with Datawrapper

Слика 4. Локација на рибниците во Р.С. Македонија каде сините точки претставуваат ладноводни рибници а црните точки претставуваат топловодни рибници.

Во периодот на истражување, вирусите на VHS и KHVD не беа детектирани во рибниците во Р.С. Македонија. Амплификациските криви добиени од RT-qPCR (Слика 5), јасно ја издвојуваат позитивната сигнализација за вирусот на IHN, додека за VHS и KHVD не беше утврдено присуство на вирусен генетски материјал.



Слика 5. Амплификациски криви за VHS, IHN и KHVD (RT-qPCR).

Кај дел од позитивните рибници, знаци на болест, како што се затемнување на кожата, анемични жабри, егзофталмија, зголемен абдомен, анемични внатрешни органи и деформации на ‘рбетот, беа забележани исклучиво кај виножитна пастрмка. На Слика 6 е прикажан типичен макроскопски изглед на инфекција со IHN, кој вклучува петехијални хеморагии, празен дигестивен тракт и присуство на асцитична течност. Посебно значајно е што вирусот на IHN беше дијагностициран и кај автохтоните видови – македонската пастрмка (*Salmo macedonicus*) и охридската пастрмка (*Salmo letnica*). Овие позитивни случаи беа идентификувани кај риби одгледувани во рибници со мешан систем, во кој заеднички се одгледуваат виножитна, македонска и охридска пастрмка. Присуството на вирусот кај овие ендемски видови укажува на нивната природна приемчивост кон инфекцијата и потенцијалната улога како резервоари на вирусот во одредени екосистеми. Овој наод има посебно значење во контекст на заштитата на автохтоната ихтиофауна и одржливото управување со ризиците од ширење на инфекцијата во природната средина.



Слика 6. Макроскопска патологија на IHN кај виножитна пастрмка. Типичен макроскопски изглед кој вклучува петехијални хеморагии, празен дигестивен тракт и асцитична течност.

Резултатите од ова истражување од периодот од 2015 до 2024 прикажани по година во Табела 11, опфаќаат податоци за бројот на активни рибници, бројот на рибници од кои биле земени примероци, како и бројот на рибници позитивни на IHN. Во првите пет години од анализираниот период (2015–2019), примероци беа земени од сите активни рибници (100%), а појава на IHN беше регистрирана само во 2018 година, кога беа потврдени два позитивни случаи. Во 2020 година се забележува нагло зголемување на инциденцата, со потврдени 17 позитивни рибници, што претставува 36.17% од сите активни рибници во таа година. Во истиот период, еден рибник беше депопулиран и неговиот статус остана непознат. Во 2021 година, бројот на позитивни рибници изнесуваше 10, од кои три беа новозаразени. Со тоа, вкупниот број на рибници кај кои е потврдено присуство на вирусот достигна 20. Во 2022 година, се намали бројот на мострирани рибници на 30 (60% од активните), но сепак беа детектирани седум нови позитивни случаи, што го зголеми кумулативниот број на позитивни рибници на 27. Во 2023 година беа анализирани 27 рибници (54%), а шест од нив беа позитивни на IHN. До крајот на таа година, вкупниот број на заразени рибници достигна 33. Во 2024 година се забележува најмал број на земени примероци – само 15 рибници (30% од сите активни). Три од нив беа позитивни, што доведе до кумулативна бројка од 36 рибници кај кои е потврдено присуство на IHN.

Просечниот број на позитивни рибници на годишно ниво во анализираниот период изнесуваше 3.6 рибници, со стандардна девијација од 6.2, со изразена варијабилност (од 0 случаи во периодот 2015–2017 до 17 случаи во 2020 година). Просечна покриеност на активниот мониторинг за истиот период беше $78.5\% \pm 25.3\%$, но во 2024 година тој се намали на само 30%, што укажува на несистематичност и недоследност во прибирањето на епидемиолошки податоци.

Анализата на податоците покажа континуиран кумулативен раст на рибниците позитивни на IHN, од два случаи во 2018 година до вкупно 36 случаи во 2024 година. Најзначителниот раст беше забележан во 2020 година, кога беа потврдени 18 нови случаи. По овој период, бројот на нови случаи варираше од 3 до 7 годишно, без статистички значаен тренд ($p > 0.05$).

Статистичката анализа покажа дека нема значајна разлика во бројот на позитивни рибници во периодот 2022–2024 година (χ^2 тест, $p = 0.93$). Според резултатите од Поасоновата регресија, инциденцата на IHN значително е зголемена во 2020 година ($IRR = 9.0$, $p < 0.001$), но во следните години не е забележан статистички значаен тренд.

Табела 11. Резултати од анализираните примероци од риби за вирусни болести (2015–2024)

Година	Вкупен број на рибници			Семплирани рибници n (%)			Позитивни рибници n (%)			Позитивни несемплирани рибници n (%)			Позитивни семплирани рибници n (%)		
	IHN	VHS	KHV/D	IHN	VHS	KHV/D	IHN	VHS	KHV/D	IHN	VHS	KHV/D	IHN	VHS	KHV/D
2015	49	49	-	49 (100%)	49 (100%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2016	50	50	-	50 (100%)	50 (100%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2017	51	51	15	51 (100%)	51 (100%)	15 (100%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2018	50	50	14	50 (100%)	50 (100%)	14 (100%)	2 (4%)	-	-	-	-	-	2 (4%)	-	-
2019	50	50	15	50 (100%)	50 (100%)	15 (100%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2020	47	47	18	47 (100%)	47 (100%)	18 (100%)	17 (36.17%)	-	-	-	-	-	17 (36.17%)	-	-
2021	49	49	20	49 (100%)	49 (100%)	18 (100%)	20 (40.82%)	-	-	17 (34.69%)	-	-	10 (20.41%)	-	-
2022	50	50	11	30 (60%)	30 (60%)	11 (100%)	27 (54%)	-	-	20 (40%)	-	-	7 (23.33%)	-	-
2023	50	50	15	27 (54%)	27 (54%)	15 (100%)	33 (66%)	-	-	27 (54%)	-	-	6 (22.22%)	-	-
2024	50	50	13	15 (30%)	15 (30%)	13 (100%)	36 (72%)	-	-	33 (66%)	-	-	3 (20%)	-	-

Резултатите од лабораториските анализи на примероците од риби собрани во периодот 2020–2024 година беа анализирани по статистички региони и се прикажани во Табела 12. Според добиените резултати, визуелизацијата на мапата на Р.С. Македонија (Слика 7) овозможува јасен приказ на просторната дистрибуција на ладноводните рибници од кои беа земени примероци, како и на локациите каде што е потврдено присуство на вирусот ІНН. На мапата е прикажана детекцијата на ІНН во различни региони низ државата, со јасна дистинкција помеѓу заразените и незаразени рибници. Дополнително, на График 3 е прикажан трендот на позитивни рибници по региони за целиот анализиран период, што овозможува визуелна споредба на промените во бројот на случаи од година во година.

Источен регион – Во 2020 година, позитивни примероци беа идентификувани во два рибника, кои беа и официјално прогласени за позитивни. Во 2021 година беше откриен еден позитивен рибник, но не беа прогласени нови позитивни рибници. Во 2022 и 2023 година беше идентификуван уште по еден новоинфициран рибник (Mean = 3.0, SD = 0.89).

Североисточен регион – Во овој регион, ІНН за првпат беше детектирана во 2021 година со само еден позитивен рибник. Во текот на целиот период на истражување, не беа регистрирани дополнителни инфекции (Mean = 0.8, SD = 0.40).

Пелагониски регион – Во 2020 година, позитивни примероци беа идентификувани од три рибници, сите официјално прогласени позитивни. Во 2021 година, сите примероци беа негативни. Сепак, во 2022 година, два нови рибника беа прогласени за позитивни. Во 2023 година, еден рибник дополнително беше прогласен за позитивен (Mean = 4.6, SD = 1.36).

Полошки регион – Највисоко ниво на ІНН беше евидентирано во 2020 година (5 рибници), а истиот број се одржа во текот на целиот истражувачки период без појава на нови случаи (Mean = 5.0, SD = 0.00).

Скопски регион - Во Скопскиот регион ІНН беше првпат детектирана на два рибника во 2022 година. Во 2024 година, беше откриен нов позитивен рибник кој не бил редовно мониториран, бидејќи не секоја година имал риба за мострирање (Mean = 1.4, SD = 1.30).

Југоисточен регион - Во Југоисточниот регион, ІНН беше детектирана по првпат во 2023 година, кога само еден рибник беше позитивен. Дополнително, во 2024 година беше откриен уште еден позитивен рибник (Mean 0.6, SD = 0.89).

Југозападен регион - Во Југозападниот регион, 4 рибници беа прогласени за позитивни во 2020 година. Во 2021 година, повторно беа регистрирани 4 позитивни рибници, но без нови инфекции. Во 2022 година, еден нов рибник беше прогласен за позитивен. Во 2023 година, 3 нови рибници беа пријавени како инфицирани (Mean = 5.8, SD = 1.92).

Вардарски регион - Во Вардарскиот регион, 4 рибници беа прогласени за позитивни во 2020 година, од кои што еден беше депопулиран. Во 2021 година, 2 дополнителни рибника беа пријавени како инфицирани. Во 2022 година, уште еден рибник беше пријавен за позитивен. Во 2024 година беше откриен еден позитивен рибник кој беше депопулиран во 2020 година (Mean = 5.6, SD = 1.14).

Највисок просечен број на позитивни рибници е регистриран во Југозападниот регион, (Mean = 5.8), следен од Вардарскиот (Mean = 5.6) и Полошкиот регион (Mean = 5.0). Во однос на варијацијата, највисока стандардна девијација е забележана за

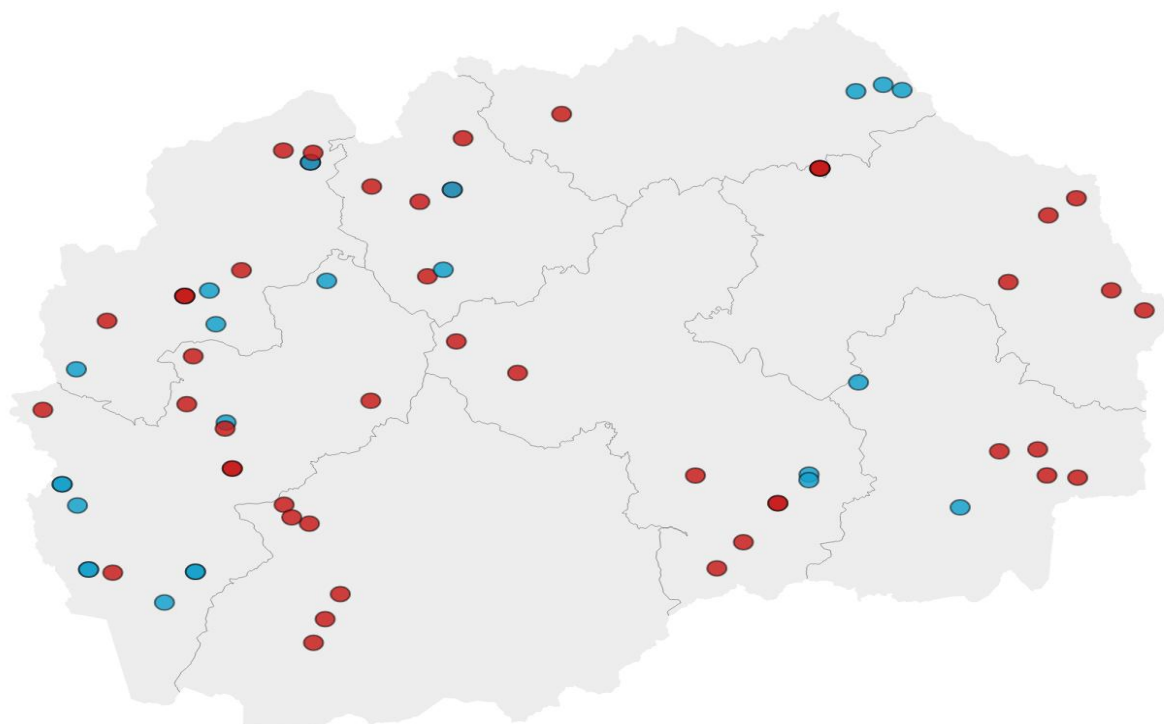
Југозападниот регион ($SD = 1.92$), каде бројот на новоинфицирани рибници флукутира од година во година. Значителна се забележува и во Пелагонискиот ($SD = 1.36$) и Скопскиот регион ($SD = 1.30$).

Југоисточниот ($Mean = 0.6$, $SD = 0.89$) и Североисточниот регион ($Mean = 0.8$, $SD = 0.40$) покажуваат ниска зачестеност на појава на ИHN, со поединечни или изолирани случаи, главно во подоцнежните години од периодот на истражување.

Табела 12. Број на ИHN позитивни рибници по статистички региони (2020–2024)

Регион	2020	2021	2022	2023	2024	Mean	SD
Источен регион	2	2	3	4	4	3.0	0.89
Североисточен регион	0	1	1	1	1	0.8	0.40
Пелагониски регион	3	3	5	6	6	4.6	1.36
Полошки регион	5	5	5	5	5	5.0	0.00
Скопски регион	0	0	2	2	3	1.4	1.30
Југоисточен регион	0	0	0	1	2	0.6	0.89
Југозападен регион	4	4	5	8	8	5.8	1.92
Вардарски регион	4	5	6	6	7	5.6	1.14
Вкупно	18	20	27	33	36		

* Сите вредности претставуваат број на позитивни рибници



Map data: © OSM • Created with Datawrapper

Слика 7. Мапа на Р.С. Македонија која го прикажува распределувањето на рибниците во однос на детекцијата на ИHN. Црвените точки ги означуваат рибниците каде што е детектиран ИHN, додека сините точки ги означуваат рибниците каде вирусот не е пронајден.

Регионална анализа

Статистичката анализа покажа дека бројот на позитивни рибници значително варира меѓу регионите ($\chi^2 = 21.11$, $df = 7$, $p < 0.05$), што укажува дека распространетоста на ИHN не е хомогено распоредена. Анализата според години не покажа статистички значајна разлика во инциденцата по 2020 година ($p > 0.05$), што укажува на потенцијална стабилизација на ширењето на инфекцијата.

Во Полошкиот регион, анализата покажа дека појавата на инфекцијата не е рамномерно распределена низ годините ($\chi^2 = 20$, $p < 0.001$), со највисока концентрација во 2020 година кога беа детектирани пет случаи. Југозападниот и Вардарскиот регион покажаа континуирано присуство на позитивни рибници со зголемување на бројот на нови случаи во 2023 година.

Моделирањето на инциденцата преку Поасонова регресија покажа дека бројот на инфицирани рибници е значително поврзан со регионот ($p < 0.05$) и годината ($p < 0.05$). Југозападниот и Вардарскиот регион покажаа повисоки стапки на инфицираност, додека 2020 и 2023 година беа поврзани со зголемен ризик за нови инфекции.

Cochran-Armitage тестот покажа дека во поголемиот дел од регионите не постои значителен тренд на инциденцата низ годините ($p > 0.05$). Исклучок претставува Југозападниот регион, каде што во 2023 година беше забележан значителен пораст на бројот на нови случаи ($p < 0.05$), што укажува на потенцијална зголемена активност на вирусот во овој регион.

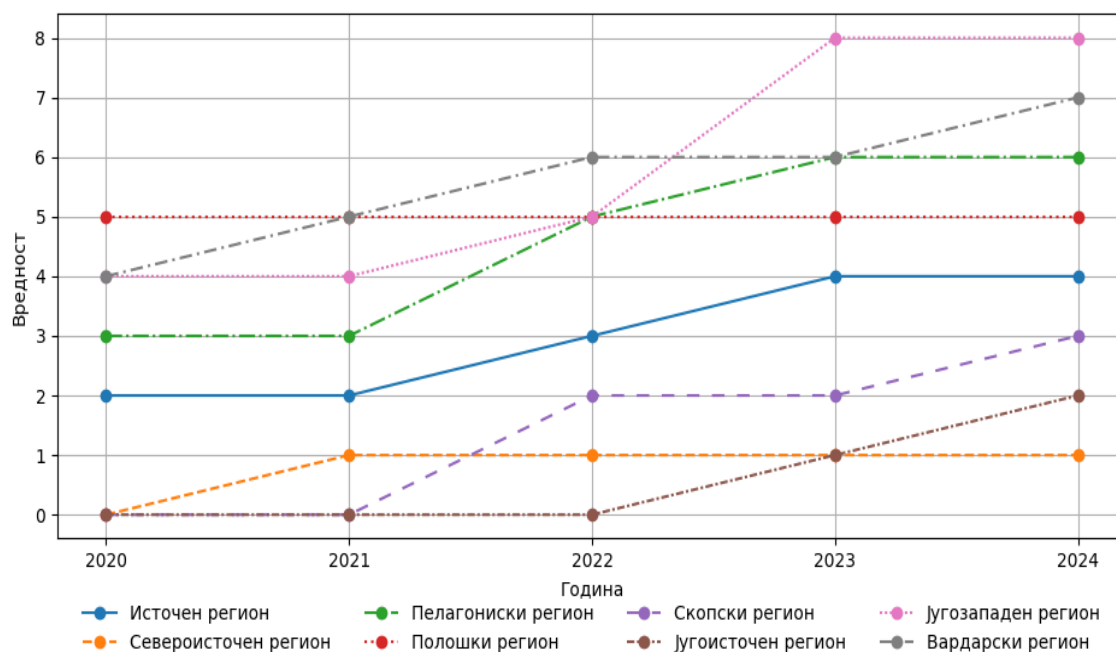


График 3. Тренд на позитивни рибници на ИHN по региони.

5.2. Генотипизација

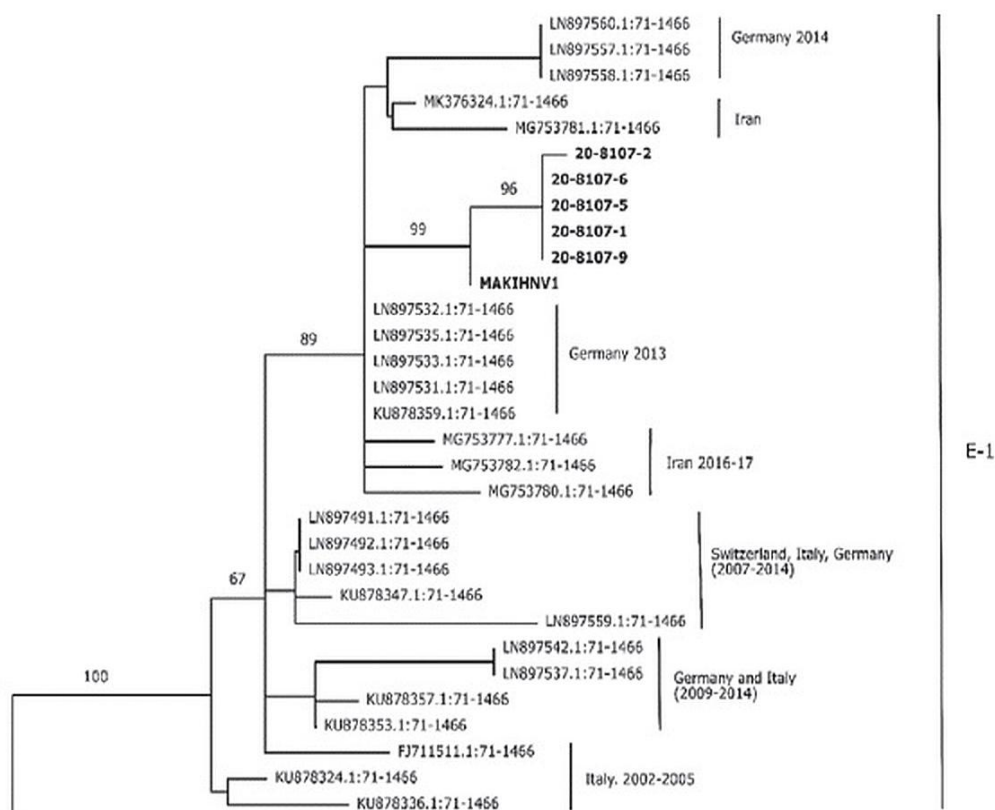
Вкупно беа анализирани пет изолати на вирусот на ИHN. BLAST-анализата во GenBank потврди дека сите пет изолати имаат висока нуклеотидна сличност со референтниот изолат MAKIHNV1 (MN641902). Изолатите 20-8197-6, 20-8197-5, 20-

8197-1 и 20-8197-9 имаа 99.74% сличност, додека петтиот изолат покажа 99.66% сличност со референтниот изолат.

Филогенетската анализа (Слика 8) потврди дека сите македонски изолати припаѓаат на истата филогенетска линија, класифицирана во кладата E-1 на европската E геногрупа. ML-филогенетското дрво со висока статистичка поддршка (bootstrap = 98) ја потврди групацијата на овие изолати заедно со MAKIHNV1, како и со германски (2013–2014), италијански (2013) и ирански изолати (2014–2017).

Парцијалната минимална разгранета мрежа покажа дека MAKIHNV1 има најголема генетска сличност со германските и италијанските изолати од 2013 година, со разлика од само 7 нуклеотиди (99,5% сличност). Од друга страна, новите македонски изолати формираат компактна подгрупа во рамките на кладата E-1, со уште помали генетски разлики (2–4 нуклеотиди; 99,7–99,8% сличност) во однос на MAKIHNV1. Ова ја поддржува хипотезата за ограничено внесување на вирусот и негова локална циркулација.

Во текот на 2023 и 2024 година, позитивните примероци од IHN не беа успешно секвенционирани. Ова може да се поврзе со ниска концентрација на вирусната нуклеинска киселина во примероците или со деградација на геномскиот материјал за време на складирањето или транспортот. Овие фактори често доведуваат до намален квалитет на ДНК/РНК, што ги прави примероците несоодветни за секвенционирање со стандардни методи.



Слика 8. Филогенетска анализа на изолати на IHN од Р.С.Македонија.

5.3. Патохистологија

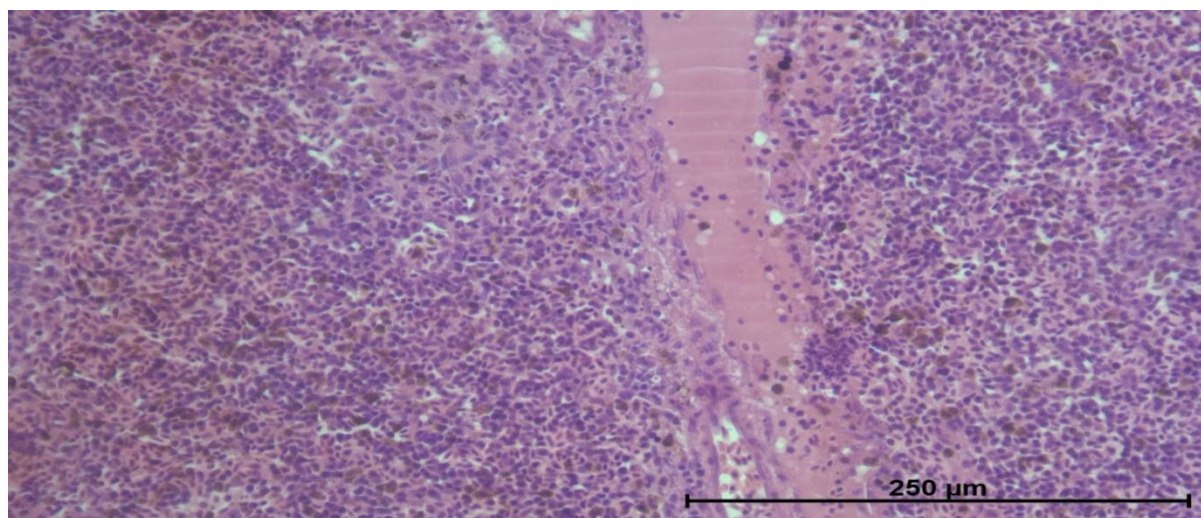
Прикажаните податоци во Табела 13 ги сумираат патохистолошките промени регистрирани кај здрави и заболени риби. Промените се евидентирани по органи, и според типот на оштетување. За секоја промена се прикажани индивидуалните оценки за пет здрави (означени како 31–35) и десет заболени примероци (Б1–Б10), како и процентуалната застапеност на секоја промена во двете групи.

Најчесто забележаната промена во жабрите беше издигнување на респираторниот епител (Mean = 2.2, SD = 0.83 кај заразените риби), со 100% присуство во двете групи. Аневризмите беа забележани со слична зачестеност и кај заболените и кај здравите риби (Mean = 0.2, SD = 0.45). Хипертрофијата на секундарниот респираторен епител беше значително почеста кај заболените риби (Mean = 2.55, SD = 0.72). Вакуолизацијата на хепатоцитите беше значително поретка кај заболените риби (Mean = 0.11, SD = 0.33) во споредба со здравите (80%). Во слезината, присуството на меланин-макрофажни центри (ММС) беше регистрирано кај 100% од заболените риби, со значајна разлика во споредба со здравите (80%). Типичен пример на вакви промени е прикажан на Слика 9, каде се забележуваат изразени ММС, фиброза и инфилтрација на леукоцити.

Хипертрофијата на секундарниот респираторен епител покажа значајна разлика помеѓу групите ($U = 18.3$, $p < 0.01$). Инфилтрацијата на леукоцити во жабрите не покажа статистички значајна разлика ($U = 4.2$, $p = 0.09$). Вакуолизацијата на хепатоцитите беше значително помала кај заболените риби ($t = 3.52$, $p = 0.002$). Деплецијата на белата пулпа во слезината беше значително повисока кај заболените риби ($U = 21.6$, $p < 0.01$).

Присуството на ММС во слезината беше значително почесто кај заболените риби ($\chi^2 = 6.44$, $df = 1$, $p = 0.01$). Некроза на црвената пулпа беше забележана кај 30% од заболените риби, но не покажа значајна разлика ($\chi^2 = 2.89$, $p = 0.07$). Дилатацијата на синусоидите во црниот дроб покажа значајна разлика ($\chi^2 = 8.12$, $df = 1$, $p = 0.004$).

Меѓу анализираните параметри, хипертрофијата на секундарниот респираторен епител беше најсилниот предиктор за инфекцијата ($OR = 4.6$, $p = 0.002$). Исто така, значајна асоцијација беше забележана кај деплецијата на белата пулпа во слезината ($OR = 3.9$, $p = 0.008$).



Слика 9. Патохистолошки оштетувања на слезината со присуство на ММС, фиброза и инфилтрација на леукоцити.

Табела 13. Патохистолошки промени кај заразени и здрави риби (скала 1-3).

Орган	Промена	З 1	З 2	З 3	З 4	З 5	Б 1	Б 2	Б 3	Б 4	Б 5	Б 6	Б 7	Б 8	Б 9	Б 10	Здрав н (%)	Заболен н (%)
Жабри	Издигнување на респираторниот епител	2	2	1	3	3	3	3	2	3	1	3	3	2	3	-	100	100
	Аневризми	1	0	0	0	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	-	20	22
	Хиперплазија	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	-	20	33
	Инфилтрација на леукоцити	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	-	0	11
	Мукоидни клетки во секундарни ламели	0	0	1	0	1	0	2	1	1	1	0	0	1	0	-	40	56
	Хипертрофија на секундарен епител	0	0	0	0	1	0	2	2	1	1	3	2	1	0	-	20	78
	Хиперемија	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	-	20	11
	Некроза	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	-	0	11
Црн дроб	Вакуолизација на хепатоцити	2	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	3	0	-	80	11
	Инфилтрација на леукоцити	0	1	1	1	0	1	2	0	1	0	0	0	1	0	-	60	44
	Фокални промени на хепатоцитите	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	-	20	22
	Дилатација на синусоиди	0	0	2	0	0	2	0	3	2	3	3	1	0	1	-	20	78
	Присуство на ММС	0	0	1	1	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	-	40	33
	Застој	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	-	0	22
	Некроза	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	-	0	22
	Фиброза на портални простори	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	-	0	22
Слезина	Присуство на ММС	1	2	0	1	2	3	3	2	1	3	2	3	2	1	1	80	100
	Фиброза	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	10
	Инфилтрација на леукоцити	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	10
	Присуство на ексудат	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	10
	Депледија на бела пулпа	0	0	0	0	0	1	0	2	2	2	0	0	2	0	0	0	50
	Некроза на црвена пулпа	0	0	0	0	0	0	1	0	3	3	0	0	0	0	0	0	30

*З -здрави, Б- заболени.

5.4. Анализа на резултатите од контролна листа за категоризација на одгледувалишта за аквакултура

5.4.1 Ладноводни рибници

Врз основа на одговорите добиени преку прашалниците, Табела 14 прикажува анализа на параметрите поврзани со биолошките и техничките карактеристики на ладноводните рибници. За секој критериум е прикажана распределбата на рибниците според нивната инфекциска состојба.

Анализите на врската меѓу приемчивите видови и стапката на инфекција покажаа дека рибниците со повеќе од еден приемчив вид риби имаа повисока стапка на инфекција (69.57%, $n = 16$) во споредба со оние со еден вид (51.28%, $n = 20$). Сепак, χ^2 -тестот не покажа статистички значајна разлика ($\chi^2 = 2.34$, $p = 0.126$, $V = 0.20$). Во однос на изворот на водоснабдување, површинската вода беше најчесто користена и кај инфицираните (62.5%, $n = 35$) и кај неинфицираните (37.5%, $n = 21$) рибници, додека бунарската вода беше користена кај само еден инфициран рибник (100%, $n = 1$). Оваа разлика не беше статистички значајна ($\chi^2 = 0.73$, $p = 0.39$).

Типот на набавка на риба се покажа како критичен фактор. Рибниците што набавуваа жива риба за тов имаа значително повисока стапка на инфекција (65.96%, $n = 31$) во споредба со оние што не вршеа набавка (33.33%, $n = 5$), со статистичка значајност потврдена со $\chi^2 = 5.00$ ($p = 0.025$, $V = 0.28$). Фреквенцијата на набавка исто така укажа на тренд: рибниците што набавуваат риба помалку од три пати годишно имаа 65.12% стапка на инфекција ($n = 28$), наспроти 34.88% кај оние што набавуваат почесто ($n = 15$), што беше близу до статистичка значајност ($\chi^2 = 5.02$, $p = 0.081$, $V = 0.28$). Рибниците со еден добавувач покажаа највисок процент на инфекција (68.29%, $n = 28$), додека оние со два до три добавувачи имаа избалансиран сооднос (50% инфицирани, $n = 3$), со значајна разлика меѓу групите ($\chi^2 = 6.79$, $p = 0.033$, $V = 0.33$). Набавката на жива риба беше доминантна кај инфицираните рибници (67.39%, $n = 31$), додека икрата беше забележана само кај еден неинфициран рибник што беше статистички значајно ($\chi^2 = 6.82$, $p = 0.033$, $V = 0.33$).

Намената на рибата (на пр., за конзумирање) не покажа статистички значајна поврзаност со инфекцијата ($\chi^2 = 0.25$, $p = 0.895$). Просторните фактори, како близината до соседни рибници, покажаа високи стапки на инфекција кај рибниците на 1-5 km во долен тек (87.50%, $n = 7$) и горен тек (80%, $n = 4$), но без статистичка значајност ($\chi^2 = 4.92$, $p = 0.18$). Слично, рибниците со два до четири соседни објекти имаа 80% стапка на инфекција ($n = 12$), наспроти 50% кај оние без соседи ($n = 22$), но без статистичка значајна вредност ($\chi^2 = 4.23$, $p = 0.12$).

Инфраструктурните фактори, како што се присуството на објекти за производство, ризикот од поплавување и типот на градба, не покажаа статистички значајна поврзаност со инфекцијата. Рибниците со објекти за производство имаа 50% стапка на инфекција ($n = 2$), додека оние без такви објекти имаа 58.33% стапка на инфекција ($n = 35$) ($\chi^2 = 0.05$, $p = 0.82$, $V = 0.03$). Рибниците со можност за поплавување имаа 60.71% стапка на инфекција ($n = 17$), наспроти 55.88% кај оние без можност за поплавување ($n = 19$) ($\chi^2 = 0.15$, $p = 0.70$). Типот на градба (цврста/бетонска vs. комбинирана) исто така не покажа значајна разлика ($\chi^2 = 0.72$, $p = 0.396$, $V = 0.11$).

Табела 14. Критериуми за категоризација на ладноводни рибници.

Прашање	Одговор	Инфицирани n (%)	Неинфицирани n (%)	Статистички параметар
Видови на риби присутни на одгледувалиштето	Неприемчиви видови на риби	0 (0.00)	0 (0.00)	$\chi^2 = 1.41$ $p > 0.05$ $V = 0.16$
	Векторски видови риби	0 (0.00)	0 (0.00)	
	Една приемлива врста на риби	20 (57.14)	15 (51.28)	
	Повеќе од една приемлива врста на риба	16 (72.73)	6 (27.27)	
Извор на вода за снабдување на одгледувалиштето	Бунар- сопствен извор на вода	1 (100.00)	0 (0.00)	$\chi^2 = 0.73$ $p > 0.05$ $V = 0.05$
	Површинска вода	35 (62.5)	21 (37.5)	
	Комбинирано бунар- сопствен извор и површинска вода	0 (0.00)	0 (0.00)	
	Систем за рецикулација	0 (0.00)	0 (0.00)	
Внес на риба (набавување)	Нема набавување и купување на риба	5 (33.33)	10 (66.67)	$\chi^2 = 7.83$ $p < 0.05$ $V = 0.37$
	Убиена риба	0 (0.00)	0 (0.00)	
	Жива риба за конзумирање /тов	31 (73.81)	11 (26.19)	
	Жива риба за други одгледувалишта	0 (0.00)	0 (0.00)	
Фреквенција на набавување на риба(годишно)	Не набавува	5 (33.33)	10 (66.67)	$\chi^2=7.83$ $p<0.05$ $V = 0.37$
	Помалку од 3	28 (73.68)	10 (26.32)	
	Помеѓу 3 и 5	3 (75.00)	1 (25.00)	
	Повеќе од 6	0 (0.00)	0 (0.00)	
Број на добавувачи	Нема	10 (50.00)	10 (50.00)	$\chi^2=5.21$ $p=0.074$ $V = 0.29$
	1 добавувач	28 (77.78)	8 (22.22)	
	2-3 добавувачи	3 (50.00)	3 (50.00)	
	Повеќе од 4 добавувачи	0 (0.00)	0 (0.00)	
Вид на риба која се набавува	Икра	0 (0.00)	1 (100.00)	$\chi^2 = 10.16$ $p < 0.05$ $V = 0.42$
	Жива риба за тов	31 (75.61)	10 (24.39)	
	Жива риба за производство	0 (0.00)	0 (0.00)	
	Не набавува	5 (33.33)	10 (66.67)	
Намена на рибата/продажба	За сопствена употреба	0 (0.00)	0 (0.00)	$\chi^2 = 0.18$

	За конзумирање	31 (63.27)	18 (36.73)	p = 0.91 V = 0.06
	Промет со жива риба за понатамошно одгледување	4 (66.67)	2 (33.33)	
	Порибување на отворени води	1 (50.00)	1 (50.00)	
Близина на соседно одгледувалиште на растојание изразено во км во горен или долен тек во однос на одгледувалиштето кое се категоризира	Нема	23 (56.10)	18 (43.90)	$\chi^2 = 3.54$ p = 0.32 V = 0.25
	Оддалеченост од 1 до 5 км во долен тек (по одгледувалиштето)	7 (87.50)	1 (12.50)	
	Оддалеченост од 1 до 5 км во горен тек (пред одгледувалиштето)	4 (80.00)	1 (20.00)	
	Оддалеченост од 0.2 до 0.5 км во горен тек (пред одгледувалиштето)	0 (0.00)	0 (0.00)	
	Оддалеченост од 0.2 до 0.5 км во долен тек (по одгледувалиштето)	0 (0.00)	0 (0.00)	
	Оддалеченост од 0.5 до 1 км во горен/ долен тек (пред/по одгледувалиштето)	2 (66.67)	1 (33.33)	
	Оддалеченост од 0 до 0.2 км во горен/ долен тек (пред/по одгледувалиштето)	0 (0.00)	0 (0.00)	
	Оддалеченост помала од 0.5 км во долен тек (по одгледувалиштето)	0 (0.00)	0 (0.00)	
	Оддалеченост помала од 0.5 км во горен тек (пред одгледувалиштето)	0 (0.00)	0 (0.00)	
Број на одгледувалишта во растојание од 5 км околу рибникот независно од системот на вода	Нема	22 (55.00)	18 (45.00)	$\chi^2 = 4.22$ p = 0.12 V = 0.27
	1 одгледувалиште	2 (66.67)	1 (33.33)	
	2 до 4 одгледувалишта	12 (85.71)	2 (14.29)	
	Повеќе од 5 одгледувалишта	0 (0.00)	0 (0.00)	
Објект за производство на одгледувалиштето	Да	1 (50.00)	1 (50.00)	$\chi^2 = 0.16$ p = 0.69 V = 0.05
	Не	35 (63.64)	20 (36.36)	

Можност за поплавување	Да	17 (65.38)	9 (34.62)	$\chi^2 = 0.10$
	Не	19 (61.29)	12 (38.71)	$p = 0.75$ $V = 0.04$
Тип на почва/градба на одгледувалиштето	Цврста/бетонска	34 (65.38)	18 (34.62)	$\chi^2 = 1.26$
	Природни	0 (0.00)	0 (0.00)	$p = 0.26$
	Комбинирано цврста/ бетонска и природна	2 (40.00)	3 (60.00)	$V = 0.15$

Анализата прикажана во Табела 15 се однесува на проценката на присуството и имплементацијата на биосигурносни мерки во ладноводните рибници врз основа на прашалникот. Во табелата се наведени различни типови на мерки, како што се: присуство на дезинфекциона бариера, дезинфекција на опрема и превозни средства, ограда и влезна врата на објектот, заштита од диви птици, водење евиденција на посетители, како и можност за карантин и изолација на новодонесена риба. За секоја од овие мерки се прикажани процентот и бројот на рибници кои ги применуваат, поделено според нивниот статус – инфицирани или неинфицирани со ИHN.

Рибниците со дезинфекциска бариера ($n = 39$) имаа пониска стапка на инфекција (66.67%), во споредба со рибниците без бариера ($n = 18$), каде што стапката на инфекција изнесуваше 55.56%. Сепак, разликата не беше статистички значајна ($\chi^2 = 0.65$, $p = 0.42$, $V = 0.11$), што укажува дека иако оваа мерка може да има одреден позитивен ефект, таа не е доволно ефикасна за значително намалување на инфекцијата.

Редовната дезинфекција на опремата исто така не покажа статистички значајна поврзаност со стапката на инфекција. Рибниците што ја спроведуваа оваа мерка ($n = 56$) имаа стапка на инфекција од 62.50%, додека единствениот рибник без дезинфекција ($n = 1$) немаше детектирани инфекции. Разликата не беше статистички значајна ($\chi^2 = 0.59$, $p = 1.00$, $V = 0.10$).

Дезинфекцијата на превозните средства не покажа значајна разлика во стапката на инфекција. Рибниците што применуваа дезинфекција ($n = 29$) имаа стапка на инфекција од 58.62%, додека кај оние без оваа мерка ($n = 28$) стапката на инфекција беше 67.86%. Разликата беше мала и статистички незначајна ($\chi^2 = 0.53$, $p = 0.47$, $V = 0.10$).

Присуството на ограда во рибниците не покажа статистички значајна разлика во стапката на инфекција. Рибниците со ограда ($n = 53$) имаа стапка на инфекција од 64.15%, додека кај оние без ограда ($n = 4$) оваа стапка изнесуваше 50%. Разликата не беше значајна ($\chi^2 = 0.324$, $p = 0.57$, $V = 0.08$).

Присуството на влезна врата беше единствената биосигурносна мерка што покажа потенцијално значајна разлика. Рибниците со влезна врата ($n = 55$) имаа стапка на инфекција од 65.45%, додека рибниците без врата ($n = 2$) немаа регистрирани инфекции. Разликата беше блиску до границата на статистичка значајност ($\chi^2 = 3.54$, $p = 0.06$, $V = 0.25$).

Заштитата од диви птици не покажа значаен ефект врз стапката на инфекција. Рибниците што користат заштита ($n = 6$) имаа стапка на инфекција од 50%, додека кај оние без заштита ($n = 51$) оваа стапка изнесуваше 64.71%. Разликата не беше статистички значајна ($\chi^2 = 0.49$, $p = 0.48$, $V = 0.09$).

Водењето евиденција за посетителите не покажа статистички значајна разлика во стапката на инфекција. Рибниците што водат евиденција ($n = 25$) имаа стапка на инфекција од 64%, додека кај оние што не водат ($n = 32$), оваа стапка изнесуваше 62.5% ($\chi^2 = 0.01$, $p = 0.91$, $V = 0.02$).

Можноста за карантин и изолација покажа одредена разлика во стапката на инфекција, но не беше статистички значајна. Рибниците што имаа можност за карантин ($n = 5$) имаа стапка на инфекција од 40%, додека кај оние без карантин ($n = 52$), оваа стапка изнесуваше 65.38% ($\chi^2 = 1.26$, $p = 0.26$, $V = 0.15$). Иако постои разлика, таа не е доволно изразена за да се смета за статистички значајна, што укажува дека карантинот сам по себе можеби не е доволен за значително спречување на инфекцијата.

Табела 15. Присуство на биосигурносни мерки кај ладноводните рибници.

Прашање	Одговор	Инфицирани n (%)	Неинфицирани n (%)	Статистички параметар
Присуство на дезифециона бариера	Да	26 (66.67)	13 (33.33)	$\chi^2 = 0.65$
	Не	10 (55.56)	8 (44.44)	$p = 0.42$ $V = 0.11$
Дезинфекција на опрема	Да	35 (62.50)	21 (37.50)	$\chi^2 = 0.59$
	Не	1 (100.00)	0 (0.00)	$p = 1.0$ $V = 0.10$
Дезинфекција на превозно средство/ цистерна	Да	17 (58.62)	12 (41.38)	$\chi^2 = 0.53$
	Не	19 (67.86)	9 (32.14)	$p = 0.47$ $V = 0.10$
Ограда околу одгледувалиштето	Да	34 (64.15)	19 (35.85)	$\chi^2 = 0.324$
	Не	2 (50.00)	2 (50.00)	$p = 0.64$ $V = 0.08$
Постоење на влезна врата на одгледувалиштето	Да	36 (65.45)	19 (34.55)	$\chi^2 = 3.54$
	Не	0 (0.00)	2 (100.00)	$p = 0.06$ $V = 0.25$
Заштита од диви птици (мрежи)	Да	3 (50.00)	3 (50.00)	$\chi^2 = 0.49$
	Не	33 (64.71)	18 (35.29)	$p = 0.48$ $V = 0.09$
Евиденција на посетители	Да	16 (64.00)	9 (36.00)	$\chi^2 = 0.01$
	Не	20 (62.50)	12 (37.50)	$p > 0.90$ $V = 0.02$
Можност за карантин и изолација	Да	2 (40.00)	3 (60.00)	$\chi^2 = 1.26$
	Не	34 (65.38)	18 (34.62)	$p = 0.26$ $V = 0.15$

Согласно дизајнот на прашалникот, беше примент двостепен пристап за проценка на ризик – Чекор 1 (ризик за внес на болести) и Чекор 2 (ризик за ширење на болести). Секој ладноводен рибник беше оценет според утврдени критериуми со доделени

вредности на ризик. Вкупните поени добиени од секој рибник овозможуваат нивна категоризација во три ризични групи: низок, среден и висок ризик. Категоризацијата се засноваше на сумирање на вредностите по критериуми, согласно методологијата претставена во материјали и методи.

Резултатите од ваквата категоризација се прикажани во Табела 16, каде рибниците се поделени според добиеното ниво на ризик и нивниот статус (инфицирани и неинфицирани со ИHN). Според распределбата на податоците, инфицираните рибници доминираа во категоријата среден ризик, каде 69.44% од испитуваните објекти ($n = 25$) беа позитивни на инфекција. Наспроти ова, неинфицираните рибници покажаа подеднаква распределба меѓу категориите: 57.69% ($n = 15$) припаѓаа на групата со низок ризик, додека 42.31% ($n = 11$) беа класифицирани како среден ризик. Статистичката анализа со Chi-square тест покажа статистички значајна врска меѓу присуството на инфекција и нивото на ризик кај рибниците ($\chi^2 = 4.56$, $p = 0.033$). Јачината на оваа асоцијација, измерена преку коефициентот V, беше оценета како слаба до умерена ($V = 0.27$), што укажува дека постои значајна поврзаност меѓу инфекцијата и категоризацијата на ризикот.

Табела 16. Степен на ризик според категоризација кај ладноводните рибници

Степен на ризик	Инфицирани n (%)	Неинфицирани n (%)
низок ризик	11 (44.00)	14 (56.00)
среден ризик	25 (78.13)	7 (21.87)
висок ризик	0	0

5.4.2 Топловодни рибници

Анализата прикажана во Табела 17 претставува сумирани резултати од прашалникот насочен кон категоризација на топоводните рибници, според биолошки, технички и географски критериуми.

Според добиените податоци ниту еден одгледувач не пријавил присуство на неприемчиви или векторски видови. Во однос на бројот на приемчиви видови, 29 рибници (80,56%) одгледуваат само еден приемчив вид, додека 7 рибници (19,44%) одгледуваат повеќе од еден. Оваа разлика беше статистички значајна ($\chi^2 = 62,88$, $p < 0,001$, $V = 0,76$).

Изворот на вода главно е површински ($n = 28$, 77,78%), додека 4 рибници (11,11%) користат бунарска вода, а исто толку ($n = 4$, 11,11%) користат комбиниран извор. Ниту еден рибник не користи систем за рецикулација ($n = 0$). Оваа разлика беше статистички значајна ($\chi^2 = 54,67$, $p < 0,001$, $V = 0,71$).

Што се однесува до внесот на риба, повеќето рибници (66,67%, $n = 24$) набавуваат жива риба за консумирање или тов, додека 12 рибници (33,33%) не вршат набавка. Оваа разлика беше статистички значајна ($\chi^2 = 44$, $p < 0,001$, $V = 0,64$). Ниту еден од рибниците не набавува убиена риба ($n = 0$) или жива риба за други одгледувалишта ($n = 0$).

Фреквенцијата на набавка исто така покажа дека 24 рибници (66,67%) набавуваат риба помалку од три пати годишно, а останатите 12 (33,33%) воопшто не вршат набавка.

Ниту еден рибник не врши набавка помеѓу 3 и 5 пати или повеќе од 6 пати годишно ($n = 0$). Оваа разлика беше статистички значајна ($\chi^2 = 44$, $p < 0,001$, $V = 0,64$).

Бројот на добавувачи варира, при што 22 рибници (61,11%) се потпираат на еден добавувач, 2 рибници (5,56%) имаат два до три добавувачи, а 12 рибници (33,33%) немаат добавувачи. Оваа разлика беше статистички значајна ($\chi^2 = 34,22$, $p < 0,001$, $V = 0,56$).

Во однос на видот на рибата што се набавува, 24 рибници (66,67%) набавуваат жива риба за тов, додека 12 рибници (33,33%) не вршат набавка. Икра ($n = 0$) и риба за производство ($n = 0$) не се набавуваат. Оваа разлика беше статистички значајна ($\chi^2 = 44$, $p < 0,001$, $V = 0,64$).

Во поглед на намената на рибата, најголем дел од рибниците ($n = 26$, 72,22%) произведуваат риба за консумирање, 5 рибници (13,89%) за порибување на отворени води, а 4 рибници (11,11%) за продажба на жива риба за понатамошно одгледување, додека само еден рибник (2,78%) ја користи рибата за сопствени потреби. Оваа разлика беше статистички значајна ($\chi^2 = 43,78$, $p < 0,001$, $V = 0,64$).

Просторната анализа покажа дека 17 рибници (47,22%) немаат соседни одгледувалишта во радиус од 5 km, 14 рибници (38,89%) се наоѓаат на растојание од 1 до 5 km во горен тек, а 3 рибници (8,33%) во долен тек. Само 2 рибници (5,56%) се наоѓаат на растојание од 0,5 до 1 km, додека ниту еден рибник не е поблиску од 0,5 km. Оваа разлика беше статистички значајна ($\chi^2 = 92,5$, $p < 0,001$, $V = 0,57$). Бројот на одгледувалишта во радиус од 5 km исто така варира, при што 17 рибници (47,22%) немаат соседни рибници, 3 рибници (8,33%) имаат едно, 7 рибници (19,44%) два до четири, а 9 рибници (25%) повеќе од пет. Оваа разлика беше статистички значајна ($\chi^2 = 11,55$, $p < 0,01$, $V = 0,33$).

Инфраструктурните фактори покажаа дека ниту еден рибник ($n = 0$) нема објект за производство. Оваа разлика беше статистички значајна ($\chi^2 = 36,0$, $p < 0,001$, $V = 1,0$). Во однос на можноста за поплавување, 11 рибници (30,56%) се изложени на ризик, додека 25 рибници (69,44%) не се. Оваа разлика беше статистички значајна ($\chi^2 = 5,44$, $p = 0,0196$, $V = 0,39$). Типот на почва и градба варира, при што 25 рибници (69,44%) имаат комбинирана градба од природни и цврсти материјали, 9 рибници (25,00%) имаат природна градба, а 2 рибници (5,56%) се изградени од бетон. Оваа разлика беше статистички значајна ($\chi^2 = 23,16$, $p < 0,001$, $V = 0,57$).

Табела 17. Критериуми за категоризација на топловодни рибници.

Прашање	Одговор	Зачестеност(п)	Процент(%)	Статистички параметар
Видови на риби присутни на одгледувалиштето	Неприемчиви видови на риби	0	0.00	$\chi^2=62.88$ $p<0.001$ $V=0.76$
	Векторски видови риби	0	0.00	
	Една приемчива врста на риби	29	80.56	
	Повеќе од една приемчива врста на риба	7	19.44	
Извор на вода за снабдување на одгледувалиштето	Бунар- сопствен извор на вода	4	11.11	$\chi^2= 54.67$ $p<0.001$ $V=0.71$
	Површинска вода	28	77.78	
	Комбинирано бунар-сопствен извор и површинска вода	4	11.11	
	Систем за рецикулација	0	0.00	
Внес на риба (набавување)	Нема набавување и купување на риба	12	33.33	$\chi^2=44$ $p<0.001$ $V=0.64$
	Убисна риба	0	0.00	
	Жива риба за конзумирање /тов	24	66.67	
	Жива риба за други одгледувалишта	0	0.00	
Фреквенција на набавување на риба (годишно)	Не набавува	12	33.33	$\chi^2=44$ $p<0.001$ $V=0.64$
	Помалку од 3	24	66.67	
	Помеѓу 3 и 5	0	0.00	
	повеќе од 6	0	0.00	
Број на добавувачи	Нема	12	33.33	$\chi^2=34.22$ $p<0.001$ $V=0.56$
	1 добавувач	22	61.11	
	2-3 добавувачи	2	5.56	
	Повеќе од 4 добавувачи	0	0.00	
Вид на риба која се набавува	Икра	0	0.00	$\chi^2=44$ $p<0.001$ $V=0.64$
	Жива риба за тов	24	66.67	
	Жива риба за производство	0	0.00	
	Нема	12	33.33	
Намена на рибата/продажба	За сопствена употреба	1	2.78	$\chi^2=43.78$ $p<0.001$ $V=0.64$
	За конзумирање	26	72.22	
	Промет со жива риба за понатамошно одгледување	4	11.11	
	Порибување на отворени води	5	13.89	

Близина на соседно одгледувалиште на растојание изразено во км во горен или долен тек во однос на одгледувалиштето кое се категоризира	Нема	17	47.22	$\chi^2=92.5$
	Оддалеченост од 1 до 5 км во долен тек (по одгледувалиштето)	3	8.33	$p<0.001$
	Оддалеченост од 1 до 5 км во горен тек (пред одгледувалиштето)	14	38.89	$V=0.57$
	Оддалеченост од 0.2 до 0.5 км во горен тек (пред одгледувалиштето)	0	0.00	
	Оддалеченост од 0.2 до 0.5 км во долен тек (по одгледувалиштето)	0	0.00	
	Оддалеченост од 0.5 до 1 км во горен/ долен тек (пред/по одгледувалиштето)	2	5.56	
	Оддалеченост од 0 до 0.2 км во горен/ долен тек (пред/по одгледувалиштето)	0	0.00	
	Оддалеченост помала од 0.5 км во долен тек (по одгледувалиштето)	0	0.00	
	Оддалеченост помала од 0.5 км во горен тек (пред одгледувалиштето)	0	0.00	
Број на одгледувалишта во растојание од 5 км околу рибникот независно од системот на вода	нема	17	47.22	$\chi^2=11.55$
	1 одгледувалиште	3	8.33	$p<0.01$
	2 до 4 одгледувалишта	7	19.44	$V=0.33$
	Повеќе од 5 одгледувалишта	9	25.00	
Објект за производство на одгледувалиштето	Да	0	0.00	$\chi^2=36.0$
	Не	36	100	$p<0.001$ $V=1.0$
Можност за поплавување	Да	11	30.56	$\chi^2=5.44$
	Не	25	69.44	$p=0.0196$ $V=0.39$
Тип на почва/градба на одгледувалиштето	Цврста/бетонска	2	5.56	$\chi^2=23.16$
	Природни	9	25.00	$p<0.001$
	Комбинирано цврста/бетонска и природна	25	69.44	$V=0.57$

Во рамки на спроведената анкета беше испитано присуството на биосигурносни мерки кај топловодните рибници, со цел да се оцени нивото на заштита од потенцијални биолошки ризици. Во Табела 18 се прикажани одговорите на прашањата поврзани со конкретни биосигурносни практики, како што се употребата на дезинфекциони бариери, дезинфекција на опрема и транспортни средства, постоење на ограда и влезна врата,

заштита од диви птици, водење на евиденција на посетители, како и можноста за карантин и изолација.

За секоја поединечна мерка е прикажана апсолутната зачестеност (n), процентуалната застапеност (%), како и статистичката значајност на разликите помеѓу групите, проценета со χ^2 тест. Дополнително, пресметани се вредностите на Cramér's V со цел да се одреди јачината на асоцијацијата помеѓу категоријалните варијабли.

Дезинфекциона бариера е присутна во 38,89% од рибниците (n = 14), додека во 61,11% (n = 22) не е воспоставена. Разликата не е статистички значајна ($\chi^2 = 1,78$, $p > 0,05$, $V = 0,22$). Дезинфекцијата на опремата е најшироко применувана мерка, присутна во 34 рибници (94,44%), а само 2 рибници (5,56%) не вршат дезинфекција, што претставува статистички значајна разлика ($\chi^2 = 28,44$, $p < 0,001$, $V = 0,89$).

Дезинфекцијата на превозните средства или цистерните се спроведува во 22 рибници (61,11%), додека 14 (38,89%) не ја применуваат оваа практика, без значајна разлика ($\chi^2 = 1,78$, $p > 0,05$, $V = 0,22$). Ограда околу рибникот е присутна во 17 рибници (47,22%), додека 19 (52,78%) немаат ограда, што не покажува статистички значајна поврзаност ($\chi^2 = 0,11$, $p > 0,05$, $V = 0,06$).

Влезната врата е присутна во 18 рибници (50,00%), додека останатите 18 (50,00%) немаат ваква мерка, без значајна разлика ($\chi^2 = 0$, $p = 1,0$, $V = 0,00$). Заштитата од диви птици со поставување мрежи е присутна во 20 рибници (55,56%), додека 16 (44,44%) немаат ваква заштита, без статистички значајна поврзаност ($\chi^2 = 0,44$, $p = 0,51$, $V = 0,11$).

Евиденцијата на посетители се води во 26 рибници (72,22%), додека 10 (27,78%) не водат евиденција, при што е утврдена статистички значајна разлика ($\chi^2 = 7,11$, $p = 0,0076$, $V = 0,44$). Можноста за карантин и изолација е присутна во само 6 рибници (16,67%), додека во 30 рибници (83,33%) не постои таква мерка. Оваа разлика е статистички значајна ($\chi^2 = 16,00$, $p < 0,001$, $V = 0,67$), укажувајќи на тоа дека голем дел од рибниците немаат систем за карантин и изолација.

Табела 18. Присуство на биосигурносни мерки на одгледувалиштата кај топловодните видови риби.

Прашање	Одговор	Зачестеност(n)	Процент(%)	Статистички параметар
Присуство на дезинфекциона бариера	Да	14	38.89	$\chi^2=1.78$
	Не	22	61.11	$p>0.05$. $V=0.22$
Дезинфекција на опрема	Да	34	94.44	$\chi^2=28.44$
	Не	2	5.56	$p<0.001$ $V=0.89$
Дезинфекција на превозно средство/ цистерна	Да	22	61.11	$\chi^2=1.78$
	Не	14	38.89	$p>0.05$. $V=0.22$
Ограда околу одгледувалиштето	Да	17	47.22	$\chi^2=0.11$
	Не	19	52.78	$p>0.05$ $V=0.06$
	Да	18	50.00	

Постоење на влезна врата на одгледувалиштето	Не	18	50.00	$\chi^2=0$ $p=1.0$ $V=0.00$
Заштита од диви птици(мрежи)	Да	20	55.56	$\chi^2=0.44$
	Не	16	44.44	$p=0.51$ $V=0.11$
Евиденција на посетители	Да	26	72.22	$\chi^2=7.11$
	Не	10	27.78	$p=0.0076$ $V=0.44$
Можност за карантин и изолација	Да	6	16.67%	$\chi^2=16.00$
	Не	30	83.33%	$p<0.001$ $V=0.67$

Проценката на ризикот кај топловодните рибници беше спроведена со истата методологија како и кај ладноводните рибници. Резултатите од проценката се презентирани во Табела 19, каде што се прикажани рибниците според доделеното ниво на ризик. Најголем дел од рибниците (86,11%, $n = 31$) се класифицирани во категоријата среден ризик, додека 11,11% ($n = 4$) припаѓаат на категоријата висок ризик. Само еден рибник (2,78%, $n = 1$) е оценет со низок ризик, што укажува на тоа дека речиси сите рибници се соочуваат со одреден степен на ризик.

Анализата на степенот на ризик кај топловодните рибници покажа статистички значајни разлики во дистрибуцијата на испитуваните категории ($\chi^2 = 45,49$, $p < 0,001$), што укажува на многу висока статистичка значајност. Според Cramer's V ($V \approx 0,79$), постои силна поврзаност меѓу категоризацијата на рибниците и нивото на ризик.

Табела 19. *Степен на ризик според категоризација*

Степен на ризик	Топловодни рибници
низок ризик	1 (2.78)
среден ризик	31 (86.11)
висок ризик	4 (11.11)

6. ДИСКУСИЈА

Оваа студија покажа дека VHS и KHVD не беа детектирани во одгледувалиштата за аквакултура во Р.С. Македонија до 2024 година. Тест-реакцијата ја потврди доверливоста на PCR-методата, покажувајќи дека прајмерите функционираат добро и дека условите за PCR се идеални (Слика 6). Сепак, во ниту еден од анализираните примероци не беа детектирани сигнали за амплификација кои би укажале на присуство на VHS и KHVD, односно сите примероци беа негативни. Овој резултат е значаен бидејќи овие две вирусни заболувања се познати по својата висока контагиозност и предизвикување на висок морталитет кај рибите во одгледувалиштата [46, 94].

Отсуството на VHS и KHVD во тестираните примероци од рибници во Р.С. Македонија претставува значаен епидемиолошки наод, особено ако се земе предвид долгорочната и широка распространетост на овие болести во Европа и пошироко [62, 140–142]. Фактот дека и покрај докажаната присутност на VHS во Бугарија [49], Хрватска [16] и Словенија [48], како и на KHVD во Романија [95], Словенија [96] и Хрватска [97], овие вируси не се детектирани во рибниците на територијата на Р.С. Македонија, укажува на одредени заштитни фактори кои го ограничуваат нивното навлегување и ширење.

Постојат повеќе можни објаснувања за ваквата состојба. Географската изолираност и релативно затворените хидрографски системи на територијата на Р.С. Македонија може да придонесат кон ограничен контакт со инфицирани води или риби. Иако некои од одгледувачите увезуваат икра, увозот најчесто се врши од земји кои имаат официјално признат статус на слободни од овие вирусни инфекции, со што значително се намалува веројатноста за внесување на патогени преку човечки фактор. Фактот што аквакултурното производство не бележи значајна експанзија, туку се одржува или бележи умерен раст, како и отсуството на извоз во поголем обем, ја намалува изложеноста на ризици. Исто така, не треба да се потцени улогата на надлежните институции во спроведувањето на контрола и мониторинг на здравствената состојба на рибите, особено во последната деценија. Иако аквакултурниот сектор кај нас е помал, институционалната ангажираност е споредлива со онаа во индустриски развиени земји како Италија или Франција.

Спротивно на ова, загрижувачки е трендот во однос на ширењето IHN на Балканот. Иако болеста првично беше детектирана во западноевропските земји во 1980-тите години [31], хронолошки гледано податоците укажуваат дека нејзиното присуство постепено се проширува и кон југоисточна Европа. Првите случаи на IHN во балканскиот регион се документирани во држави кои географски и економски се посилно поврзани со централна Европа како Словенија [15] и Хрватска [16], по што продолжува да се шири во Косово [17] и Р.С. Македонија [8]. Овој тренд укажува на сериозен ризик за аквакултурата кај соседните држави.

Во 2018 година, првите IHN-позитивни примероци во Р.С. Македонија биле детектирани во рибници лоцирани во горните текови на реките, во области каде што немало други рибници во пониските делови од истите речни базени. Поради фактот што растојанието помеѓу двата рибника изнесува повеќе од 100 km, тие биле класифицирани како затворени, одделни компартмани. Епидемиолошката истрага не идентификувала промени во практиките на одгледување, ниту биле пронајдени докази за внесување на вирусот преку транспорт на оплодена икра, живи риби, луѓе, храна или опрема. Овие рибници учествувале во мониторингот за VHS и IHN од 2015 година и секогаш биле

негативни, токму тоа го остава отворено прашањето за можниот начин на влез на вирусот [8].

Во соседно Косово, IHN била детектирана кај субклинички поточни пастрмки во три од пет тестирани реки, но вирусот не бил пронајден во одгледуваната виножитна пастрмка [143]. Не е познато дали постојат рибници на истите реки од каде што биле земени примероците позитивни на IHN. Другите земји во регионот (Србија, Босна и Херцеговина, Бугарија и Црна Гора) имаат слични надзорни програми за VHS и IHN, но досега нема пријавено позитивни случаи на IHN [8, 144].

Од истражувањата од 2020 година, откриено е дека IHN се проширила низ целата земја и е присутна и во клиничка форма. Истражувањето исто така утврди дека македонската пастрмка и охридската пастрмка се приемливи на инфекција со вирусот на IHN и дека инфекцијата била субклиничка. Сепак оваа студија има одредени ограничувања, бидејќи малиот број анализирани примероци од автохтони риби може да влијае на точноста на резултатите [144]. Иако клиничката манифестација на болеста предизвикана од IHN најчесто се јавува при температури меѓу 8 и 15°C во природни услови, на рибниците со виножитна пастрмка во 2018 не беа забележани угинати риби, слабост или абнормално однесување [8]. Наспроти тоа, на рибниците што биле инфицирани во 2020 година, во одредени случаи се забележани клинички знаци на болеста, додека по 2020 година таа преминала во хронична форма [145]. Познато е дека инфекциите со IHN кај салмонидните видови можат да се воспостават дури и при изложеност на ниски дози на вирусот, но развојот на клиничка болест зависи од сложените интеракции помеѓу домаќинот, околината и самиот вирус. Како резултат на тоа, можно е инфекцијата да биде присутна во рибникот без видливи клинички знаци, што претставува значаен предизвик во раното откривање на болеста и може да ја отежне контролата на нејзиното ширење [146]. Континуираното присуство на IHN укажува на постојан ризик на пренос на болеста меѓу одгледувалиштата. Овие наоди сугерираат дека вирусот на IHN најверојатно циркулирал уште во 2019 година, но останал недетектиран. Поради наизглед поволните резултати од 2019 година, одгледувачите погрешно верувале дека проблемот е решен, продолжувајќи со нормални активности без да ги применат потребните мерки на претпазливост. Ова создава можност за незабележано ширење на болеста [145]. Во 2020 година вирусот на IHN беше детектиран и кај македонската пастрмка во отворени води, но не беше спроведен посебен надзор за IHN/VHS кај пастрмките во тие средини.

Анализата на податоците укажува на прогресивно ширење на инфекцијата со вирусот на IHN во ладноводните рибници, при што бројот на позитивни рибници се зголемил од 2 во 2018 година на 36 во 2024 година. Овој тренд сугерира постепена експанзија на болеста, со најзначителен пораст во 2020 година, кога биле регистрирани 18 нови случаи. Овој период претставува пресвртна точка во епидемиолошкиот тек на болеста, бидејќи по 2020 година бројот на нови случаи останува стабилен во опсег од 3 до 7 годишно. Слични епидемиолошки текови се забележани и во други европски земји, каде инфекцијата со IHN покажува брановидна појава проследена со стабилизација [11].

Статистичката анализа не покажа значаен тренд на зголемување или намалување на инциденцата по 2020 година, што укажува на стабилизирање на бројот на позитивни случаи. Ова се потврдува со отсуството на значајна разлика во стапката на позитивни случаи меѓу 2022, 2023 и 2024 година. Константната стапка на детекција може да укажува на воспоставување на ендемска состојба на вирусот во одредени региони што е во согласност со податоците за локализирана циркулација на специфични вирусни варијанти во географски ограничени подрачја [147].

Значителниот пораст на инциденцата во 2020 година е статистички значаен, но по овој период не се забележува значаен тренд на промена. Оваа динамика укажува дека иако 2020 година претставува критичен момент во ширењето на болеста, во наредните години не се регистрираат значајни промени во фреквенцијата на нови случаи. Ваквите резултати се потврдени со трендовите на долготрајна циркулација на ИHN опишани во повеќегодишни студии од Европа [11, 147].

Генотипизација

Филогенетските анализи покажаа дека изолатите од Р.С. Македонија се класифицирани во групата E-1 на E (европската геногрупа), заедно со претходно детектираниот македонски изолат MAKIHNV1 [8], како и со изолати од континентална Европа, вклучувајќи ги Германија и Италија (2013–2014) [147] и Иран (2014–2017) чија филогенетска анализа укажува на нивно европско потекло [24]. Изолатот MAKIHNV1 се издвојува како значаен репрезентативен примерок што ја одразува продолжената циркулација на генетски сродни варијанти на вирусот во поширокиот регион. Анализите покажаа дека петте македонски изолати формираат единствена, силно поддржана класа, што укажува на нивна тесна еволутивна поврзаност со веќе постоечките европски изолати на ИHN. Оваа филогенетска структура сугерира дека вирусот се шири или преку неодамнешна локална циркулација, или пак дека во регионот е присутна варијанта на вирусот која подолго време опстојува без значајни генетски промени. Овие наоди се во согласност со глобалните согледувања за еволутивната стабилност на некои варијанти на ИHN вирусот во географски ограничени популации [148]. Постојат основани сомнежи дека вирусот можеби бил пренесен од соседно Косово, потенцијално преку неконтролирани движења на живи риби или преку приемчиви дивни видови. Сепак MAKIHNV1 не може директно да се поврзе со одредено потекло бидејќи не е извршена генотипизација на изолатите од Косово. Алтернативно, можно е ИHN веќе да циркулира во природни популации на риби во македонските реки што ги снабдуваат заразените рибници што би сугерирало природен извор на инфекцијата. Идентични предизвици се забележани и во други европски земји каде што природните водни тела служат како скривалишта за вирусот, овозможувајќи му континуирано пренесување меѓу дивите и одгледуваните популации [149]. Заради тоа, потеклото на вирусот останува нејасно. Потребни се понатамошни истражувања за да се утврди дали детектираните изолати потекнуваат од единечен воведен настан, или пак постојат повеќе независни извори на инфекција. Геномските анализи со повисока резолуција како што се Whole Genome Sequencing (WGS) и Single Nucleotide Polymorphism анализа (SNP), би можеле да дадат подетални информации за еволутивната динамика и можните механизми на пренос на вирусот во регионот.

Патохистологија

Резултатите од патохистолошката анализа ја открија патогенезата на инфекцијата кај рибите со јасни разлики во распределбата и тежината на лезиите меѓу заболените и здравите единки. Овие наоди не само што ја потврдуваат дијагнозата на инфекцијата, туку и даваат увид во механизмите на одбрана и патолошката динамика на заболувањето.

Најзначајна промена во жабрите беше хипертрофијата на секундарниот респираторен епител, што беше значително изразена кај заболените риби. Оваа хиперплазија е типичен одговор на хронично воспаление или хипоксија, што укажува дека инфекцијата ја нарушува респираторната функција, било преку директен

цитопатоген ефект или индиректно преку стрес [31]. Издигнувањето на респираторниот епител беше присутно кај сите анализирани риби, што сугерира дека овој параметар може да биде неспецифичен маркер за оштетување на жабрите, потенцијално поврзан и со други еколошки фактори како што се квалитетот на водата и присуството на токсини.

Во црниот дроб беше забележана значително намалена вакуолизација на хепатоцитите кај заразените риби, што укажува на нарушен липиден метаболизам или намален енергетски статус. Оваа промена може да се должи на пренасочување на ресурсите кон имунолошкиот одговор, што резултира со намалена акумулација на резервни супстрати во хепатоцитите. Дилатацијата на синусоидите беше исто така почеста кај заразените риби, што може да се должи на циркулаторни нарушувања или на воспалителни промени кои предизвикуваат промени во васкуларната пропустливост во природни услови. На рибниците со виножитна пастрмка во 2018 не беа забележани угинати риби, слабост или абнормално однесување [14].

Слезината покажа значајни патохистолошки промени, вклучувајќи засилено присуство на меланин-макрофажни центри, што ја одразува активноста на фагоцитозата и елиминацијата на клеточните остатоци. Оваа реакција е во согласност со активираниот вроген имунолошки одговор, што укажува на силна реакција на организмот против инфекцијата. Од друга страна, деплецијата на белата пулпа сугерира супресија на адаптивниот имунитет, што може да доведе до зголемена приемчивост на секундарни инфекции и хронична прогресија на болеста [31].

Некои од испитуваните параметри не покажаа статистички значајни разлики, како што се инфилтрацијата на леукоцити во жабрите и некрозата на црвената пулпа во слезината. Ова може да се должи на временската динамика на инфекцијата, при што одредени промени можат да станат поизразени во подоцнежните фази на заболувањето [31].

Логистичката регресија покажа дека хипертрофијата на секундарниот респираторен епител и деплецијата на белата пулпа се најсилни предиктори за инфекцијата. Овие наоди ја нагласуваат важноста на респираторните и имunosупресивните промени во патогенезата на болеста и потенцијално можат да се искористат за рана дијагностика и проценка на ризикот од инфекција [31].

Употребата на полу-квантитативна скала за оценка на патохистолошките промени овозможи стандардизирана и репродукцибилна проценка на оштетувањата, но останува одредена субјективност поради зависноста од визуелна интерпретација. Ограничениот број на примероци во одредени категории може да влијае на стабилноста на статистичките анализи, што укажува на потребата од проширување на студијата со поголем број испитани единки.

Идните истражувања треба да се насочат кон испитувањето на динамиката на патохистолошките промени во различни фази на инфекцијата што може да помогне во подобро разбирање на прогресијата на заболувањето. Функционалните студии на респираторната функција и имunosупресивните ефекти може да дадат понатамошни насоки за развој на стратегии за превенција и контрола на болеста.

Ладноводни рибници - категоризација

Од сите анализирани фактори, набавката на жива риба за тов се покажа како најкритична, со 73.81% стапка на инфекција кај рибниците што ја практикуваат оваа активност. Оваа поврзаност е во согласност со претходните истражувања кои укажуваат дека транспортот на живи организми претставува клучен пат за внесување на патогени [150]. Рибниците со еден добавувач имаа највисока стапка на инфекција, што укажува дека зависноста од единствен снабдувач може да ја зголеми изложеноста на патогени. Ова дополнително ја нагласува важноста на строгата контрола, мониторингот на добавувачите и диверзификацијата на изворите како стратегија за намалување на ризикот од инфекција. Од друга страна, рибниците со два до три добавувачи покажаа избалансиран сооднос, што ја нагласува улогата на диверзификацијата како превентивна стратегија. Овие резултати се совпаѓаат со принципите на управување со биосигурноста, каде што намалувањето на централизацијата на добавувачите може да го намали ризикот [150].

Рибниците со повеќе од еден приемчив вид покажаа повисока стапка на инфекција, но разликата не беше статистички значајна. Ова веројатно произлегува од тоа што одредени одредени видови делуваат како резервоари на патогени, овозможувајќи нивно подолго опстојување и потенцијално зголемување на ризикот од инфекција [151].

Просторните фактори како што е близината до други рибници, покажаа тенденција кон зголемена стапка на инфекција кај рибниците на 1-5 km од соседни објекти, но без статистичка значајност. Ова може да се должи на малиот број на набљудувања во одредени категории или на недостаток на податоци за движењето на патогените низ водните текови [152].

Инфраструктурните фактори не покажаа значајна врска со стапката на инфекција. Рибниците со бетонска градба имаа стапка на инфекција од 65.38%, додека оние со комбинирана градба 40%. Ова укажува дека физичките карактеристики на рибниците имаат помал ефект врз инфекцијата во споредба со биолошките фактори или управувачките практики [153].

Иако биосигурносните мерки се широко препорачувани за спречување на инфекции во аквакултурата, ова истражување покажа дека нивната ефикасност е контекстуална и зависи од специфичните услови на нивната имплементација. Дезинфекциските бариери покажаа тренд на намалување на инфекцијата, но недостатокот на статистичка значајност укажува дека самото нивно присуство не е доволно. Ова може да се објасни со фактот дека ефективноста на дезинфекцијата зависи од нејзината конзистентност и правилна примена – фактори кои не беа директно измерени во оваа студија. Слично, дезинфекцијата на опрема и транспортни средства не покажа значајни ефекти, што укажува на можност дека патогените се пренесуваат преку други патишта (на пр., вода, жива риба) или дека процедурите за дезинфекција се несоодветни [153].

Присуството на ограда беше поврзано со повисока стапка на инфекција, што може да се објасни со фактот што оградите се често поставувани во рибници со интензивно производство, каде густината на популацијата и стресот ги зголемуваат ризиците.

Заштитата од диви птици покажа пониска стапка на инфекција, но малиот примерок (на пр., ограничен број на рибници со заштита од диви птици) ја намали моќта на анализата. Оваа мерка останува важно истражувачко прашање, бидејќи птиците се познати вектори на патогени [154]. Слично, карантинските зони покажаа тенденција на

заштита, но недостатокот на значајност може да укажува на неконзистентна примена или несоодветен дизајн на карантинските процедури.

Иако евиденцијата на посетители е важна биосигурносна мерка, анализата покажа дека сама по себе не е доволна за спречување на инфекцијата. Самиот записник без придружни мерки (на пр., обука, дезинфекција на обувки) е неефикасен [153].

Статистички значајната поврзаност меѓу присуството на инфекција и категоризацијата на ризикот сугерира дека класификацијата на ризик може да служи како корисен индикатор за предвидување на веројатноста за инфекција во рибниците [153]. Доминантната присутност на инфицирани рибници во категоријата среден ризик во споредба со неинфицираните укажува на тоа дека оваа група е особено ранлива, веројатно поради комбинација на фактори како што се управувачки практики, густина на популација или ограничени биосигурносни мерки. Сепак, слабата до умерена јачина на асоцијацијата индицира дека самата категоризација на ризикот е само еден дел од сложената етиологија на инфекцијата [155]. Распределбата на неинфицираните рибници (57.69% низок ризик, 42.31% среден ризик) дополнително ја нагласува комплексноста. Иако категоријата "низок ризик" е поврзана со помала стапка на инфекција, присуството на неинфицирани рибници во групата "среден ризик" сугерира дека некои од овие објекти успешно ги балансираат ризиците преку превентивни мерки.

Главното ограничување на студијата е малиот примерок во одредени категории (на пр., бунарска вода: $n = 1$; карантин: $n = 5$), што ја намалува статистичката моќ и општата применливост на заклучоците.

Идните истражувања треба да се фокусираат на лонгитудинални студии за следење на динамиката на инфекциите во текот на времето и нивната корелација со управувачките стратегии во рибниците. Ова ќе овозможи подетални увиди во ефикасноста на различните биосигурносни мерки и ќе помогне во развојот на оптимални превентивни стратегии. Покрај тоа, молекуларната епидемиологија е клучна за идентификација на изворите на патогените агенсии, со посебен акцент на разликување на надворешни добавувачи на подмладок од локалната средина како можен извор на инфекција. Потребно е да се анализира ефектот на диверзификацијата на добавувачите врз намалувањето на ризикот од инфекција, со цел да се утврдат најдобрите стратегии за минимизирање на патогените внесови во аквакултурните системи.

Во оваа студија не беа идентификувани рибници со висок ризик, што може да се објасни преку два главни фактори. Прво, можно е преземените превентивни стратегии и управувачките протоколи да се доволно ефикасни за да спречат влошување на условите до критично ниво, со што се минимизира ризикот од инфекција. Второ, можно е методологијата за категоризација или процесот на собирање податоци да не го регистрираат присуството на висок ризик. Ова може да укаже на потенцијално недоволно пријавување на случаи со висока изложеност на болести, што би можело да влијае на точноста на проценките и реалната слика за состојбата во рибниците.

Топловодни рибници - категоризација

Кај анализираните рибници не беа забележани неприемчиви или векторски видови. Голем дел од рибниците ($n=29$, 80.56%) одгледуваат само еден приемчив вид, додека останатите 7 (19.44%) одгледуваат повеќе од еден вид. Овие податоци се статистички значајни и укажуваат на доминација на специјализирани рибници кои се насочени кон одгледување на еден вид риба што е во согласност со глобалните трендови за зголемување на производната ефикасност [153]. Иако монокултурата е економски

оправдана, се истакнува потребата од построги биосигурносни протоколи за компензација на зголемениот ризик, особено во комбинација со фактот дека 77,78% од рибниците користат површинска вода, фактор кој е клучен пат за пренос на вируси [156].

Во однос на снабдувањето со риба, резултатите покажуваат дека 66,67% од рибниците купуваат жива риба за конзумирање или тов, додека 33,33% не вршат набавка. Фреквенцата на набавка покажува дека сите рибници кои купуваат риба тоа го прават помалку од три пати годишно. Ова укажува на релативно затворен систем на работа, каде што внесот на нови риби е ограничен, што може да има позитивен ефект врз контролата на болестите. Повеќето рибници (61,11%) имаат само еден добавувач, додека мал дел (5,56%) имаат два до три. Ограничен број на снабдувачи може да биде фактор на ризик во случај на епидемии или нарушувања во синџирот на снабдување. Оваа практика може да доведе до зголемен биосигурносен ризик, бидејќи зависноста од еден добавувач ја зголемува можноста за ширење на болести во случај на инфекција [155]. Анализата на просторната дистрибуција покажа дека 47,22% од рибниците немаат друго одгледувалиште во радиус од 5 km, што укажува на нивна релативна изолираност и потенцијално намален ризик од хоризонтален пренос на патогени. Од друга страна, 25% од рибниците се наоѓаат во зони со висока густина, што може да претставува ризик за хоризонтален пренос на патогени, особено преку водата. Недостатокот на регионално планирање и отсуството на буфер-зони укажува на потреба од интегриран пристап во просторната регулатива [153]

Во однос на инфраструктурните фактори, резултатите покажаа дека ниту еден рибник нема објект за производство, рибниците работат главно како отворени системи, без капацитети за обработка или дополнителна преработка на рибата. Можноста за поплавување е присутна кај 30,56% од рибниците, што претставува значителен ризик за биосигурноста и одржливоста на производството. Голем дел од рибниците (69,44%) имаат комбинирана градба од природни и цврсти материјали, додека само 5,56% се целосно изградени од бетон. Дел од топловодните рибници функционираат како кафезни системи, што ги прави поприемчиви на надворешни влијанија и ја зголемува можноста за структурни оштетувања. Овој тип на конструкција, во комбинација со изложеноста на природните фактори, може лесно да предизвика бегство на рибата во надворешната средина, што дополнително ја зголемува можноста за ширење на болести. Ова претставува значителен биосигурносен ризик, бидејќи контактот со диви популации и неконтролираната дисперзија на патогени може да има значителни последици врз екосистемот и аквакултурното производство [152].

Дезинфекцијата на опремата е применувана од речиси сите рибници (94,44%), што е позитивен индикатор за контролата на патогените. Од друга страна, дезинфекцијата на превозните средства и цистерните е значително помалку застапена (61,11%), што може да се должи на користење на неспецијализиран транспорт. Ова се потенцијални слабости во спречувањето на преносот на болести преку транспорт. Присуството на физички бариери како огради (47,22%) и заштитни мрежи против диви птици (55,56%) покажува дека значителен дел од рибниците се изложени на ризик од контаминација од надворешни извори. Евиденцијата на посетители е практика што се применува кај 72,22% од рибниците, што може да помогне во следењето на потенцијалните ризици, но сепак покажува дека значителен дел од рибниците (27,78%) немаат систем за мониторинг. Загрижувачки е фактот дека само 16,67% од рибниците имаат капацитети за карантин и изолација што претставува значителен недостаток во поглед на управувањето со болести. Ваквите резултати го потврдуваат наодот дека биосигурноста често се перципира како збир на изолирани мерки, наместо како

интегриран и сеопфатен систем, што го оневозможува потенцијалот за превенција и брза реакција [153].

Анализата на ризиците покажа дека најголем дел од рибниците (86,11%) припаѓаат на категоријата среден ризик, додека 11,11% се со висок ризик. Овие податоци укажуваат на силна поврзаност меѓу структурните и биосигурносните фактори и нивото на ризик во рибниците. За намалување на ризикот, топловодните рибници треба да ги зајакнат биосигурносните мерки, особено во поглед на карантинските капацитети, дезинфекцијата на транспортните средства и подобрување на физичката заштита од надворешни контаминенти [155].

7. ЗАКЛУЧОК

Ова истражување обезбеди сеопфатни епидемиолошки податоци за трите значајни вирусни заболувања кај одгледуваните риби во Р.С. Македонија. Врз основа на добиените резултати, се заклучува следново:

- Вирусната хеморагична септикемија и коихерпесвирозата не се детектирани во ниту еден од анализираните примероци, што го потврдува слободниот здравствен статус на земјата во однос на овие две болести.
- Заразната хематопоемска некроза покажува прогресивно ширење кај пастрмските рибници, со зголемување на бројот на позитивни рибници од 2 (4%) во 2018 година до 36 (72%) во 2024 година.
- Најголем пораст на инциденцата на заразната хематопоемска некроза е регистриран во 2020 година, со 17 нови случаи, по што следело стабилизирање на бројот на нови инфекции.
- Генетската анализа покажа дека сите изолати на вирусот на заразната хематопоемска некроза се многу сродни (>99,5% идентичност) и припаѓаат на европската геногрупа Е, подгрупа Е-1, што укажува на единствен извор на инфекцијата.
- За прв пат е документирана инфекција со вирусот на заразната хематопоемска некроза кај автохтоните видови - македонска пастрмка (*Salmo macedonicus*) и охридска пастрмка (*Salmo letnica*), иако во субклиничка форма.
- Главниот фактор на ризик за ширење на заразната хематопоемска некроза е набавката на жива риба, особено кога рибниците зависат од еден добавувач. Практиката на мешано одгледување на автохтони и алохтони видови дополнително го зголемува ризикот.
- Постои јасна географска варијабилност во распространетоста на заразната хематопоемска некроза, со највисока преваленца во Југозападниот, Вардарскиот и Полошкиот регион.
- Традиционалните биосигурносни мерки (дезинфекциски бариери, дезинфекција на опрема и транспортни средства) не покажаа значаен ефект, додека карантинот се потврди како потенцијално ефективна мерка за контрола на болеста.

Врз основа на овие наоди, се препорачуваат следниве мерки:

- Контрола на движењето на жива риба и формирање специјализирани репроцентри со докажан слободен статус за посебно опасни болести.
- Зајакнат надзор на сите рибници, со посебен фокус на рибниците што произведуваат подмладок.
- Задолжителен карантин за сите новонабавени риби.
- Строга контрола на порибувањето со цел заштита на автохтоните видови.

Спроведувањето на овие препораки би требало да резултира со подобра контрола на ИHN и одржување на слободниот статус во однос на VHS и KHVD, што би придонело кон поодржлив развој на аквакултурата во земјата.

8. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

1. Food And Agriculture Organization of the United Nations (2024) The State of World Fisheries and Aquaculture 2024 – Blue Transformation in action. FAO, Rome
2. The International Bank for Reconstruction and Development (2014) Reducing disease risk in aquaculture: World Bank report number 88257-GLB
3. da Costa AR, da Costa MM, de Carvalho Azevedo VA, de Padua Pereira U (2023) Fish Pathogens: Infection and Biological Control. *Fishes* 8:579. <https://doi.org/10.3390/fishes8120579>
4. Chen Y, Shi M, Cheng Y, Wanting Z, Tang Q, Xia XQ (2018) FVD: The fish-associated virus database. *Infection, Genetics and Evolution* 58:23–26. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.11.004>
5. Costa VA, Holmes EC (2024) Diversity, evolution, and emergence of fish viruses. *J Virol* 98:. <https://doi.org/10.1128/jvi.00118-24>
6. Министерство за земјоделство шумарство и водостопанство. (2023) Годишен извештај за земјоделство и рурален развој.
7. World Organisation for Animal Health (2023) Notification, diseases listed by the OIE and surveillance for aquatic animals. In: *Aquatic Animal Health Code*. Paris, France
8. Cvetkovikj A, Radosavljevic V, Cuenca A, Strojmanovska B, Maksimovic-Zoric J, Cvetkovikj I, Olesen NJ (2020) First detection of infectious haematopoietic necrosis virus in farmed rainbow trout in North Macedonia. *Dis Aquat Organ* 140:219–225. <https://doi.org/10.3354/dao03507>
9. Rucker RR, Whipple WJ, Parvin JR, Evans CA (1953) Contagious disease of salmon possibly of virus origin. *US Fish Wildlife Service Fisheries Bulletin*
10. Amend DF, Yasutake WT, Mead RW (1969) A hematopoietic virus disease of rainbow trout and sockeye salmon. *Trans Am Fish Soc* 98:796–804
11. Enzmann PJ, Castric J, Bovo G, Thiery R, Fichtner D, Schütze H, Wahli T (2010) Evolution of infectious hematopoietic necrosis virus (ihnv), a fish rhabdovirus, in Europe over 20 years: Implications for control. *Dis Aquat Organ* 89:9–15. <https://doi.org/10.3354/dao02182>
12. World Organisation for Animal Health (2023) Infection with viral haemorrhagic septicaemia virus. In: *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. WOA, Paris, France, pp 377–401
13. Balakhnina KA, Melnikov VP (2024) Infectious hematopoietic necrosis (review). *Veterinary Science Today* 13:124–135. <https://doi.org/10.29326/2304-196x-2024-13-2-124-135>
14. World Organisation for Animal Health (2023) Infection with infectious haematopoietic necrosis virus. In: *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. WOA, Paris, France, pp 297–314
15. Grilc Fajfar A, Jenčič V, Mankoč S, Maganja DB, Hostnik P (2011) Genotyping of Slovenian infectious hematopoietic necrosis virus isolates based on the “mid-G” region sequences of the glycoprotein gene
16. Oraic D, Zrncic S, Brnic D, Vendramin N, Mikkelsen SS, Bruun MS, Toffan A, Olesen NJ (2021) Isolation of VHS and IHN from recent outbreaks on croatian rainbow trout farms. In: *17th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish*. European Association of Fish Pathologists, pp 241–241
17. Rexhepi A, Bërxfholi K, Scheinert P, Hamidi A, Sherifi K, Rexhepi A, Bërxfholi K, Scheinert P, Hamidi A, Sherifi K (2011) Study of viral diseases in some freshwater fish in the Republic of Kosovo. *Vet Arh* 81:405–413
18. Leong J-A (2024) Infectious haematopoietic necrosis. In: *CABI Compendium*. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium.79281>. Accessed 13 Mar 2025

19. He M, Ding N-Z, He C-Q, Yan X-C, Teng C-B (2013) Dating the divergence of the infectious hematopoietic necrosis virus. *Infect Genet Evol* 18:145–150. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.05.014>
20. Schütze H (2017) Phylogeny of the infectious hematopoietic necrosis virus in European aquaculture. *PLoS One* 12:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184490>
21. Rudakova SL, Kurath G, Bochkova E V (2007) Occurrence and genetic typing of infectious hematopoietic necrosis virus in Kamchatka, Russia. *Dis Aquat Organ* 75:1–11. <https://doi.org/10.3354/dao075001>
22. Niu L, Zhao ZZ (1988) Epidemiology of infectious haematopoietic necrosis and infectious pancreatic necrosis of rainbow trout in North East China. 12:327–332
23. Kim HJ, Olesen NJ, Dale OB, Kim YC, Jung TS, Vendramin N, Kwon SR (2023) Pathogenicity of two lineages of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) to farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in South Korea. *Virus Res* 332:. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199133>
24. Ahmadivand S, Soltani M, Mardani K, Shokrpour S, Hassanzadeh R, Ahmadpoor M, Rahmati-Holasoo H, Meshkini S (2017) Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) outbreak in farmed rainbow trout in Iran: Viral isolation, pathological findings, molecular confirmation, and genetic analysis. *Virus Res* 229:17–23. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.12.013>
25. Winton JR (1991) Recent advances in detection and control of infectious hematopoietic necrosis virus in aquaculture. *Annu Rev Fish Dis* 1:83–93. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(91\)90024-E](https://doi.org/10.1016/0959-8030(91)90024-E)
26. Oidtmann BC, Peeler EJ, Thrush MA, Cameron AR, Reese RA, Pearce FM, Dunn P, Lyngstad TM, Tavoranpanich S, Brun E, Stärk KDC (2014) Expert consultation on risk factors for introduction of infectious pathogens into fish farms. *Prev Vet Med* 115:238–254. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2014.03.017>
27. Lapatra SE, Turner T, Lauda KA, Jones GR, Walker S (1993) Characterization of the Humoral Response of Rainbow Trout to Infectious Hematopoietic Necrosis Virus. *J Aquat Anim Health* 5:165–171. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(1993\)005<0165:COTHRO>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(1993)005<0165:COTHRO>2.3.CO;2)
28. Bootland LM, Leong JC (2011) Infectious Haematopoietic Necrosis Virus. In: *Fish Diseases and Disorders: Viral, Bacterial and Fungal Infections*, 2nd Edition. pp 66–109
29. Vallejo RL, Cheng H, Fragomeni BO, Shewbridge KL, Gao G, MacMillan JR, Towner R, Palti Y (2019) Genome-wide association analysis and accuracy of genome-enabled breeding value predictions for resistance to infectious hematopoietic necrosis virus in a commercial rainbow trout breeding population. *Genetics Selection Evolution* 51:. <https://doi.org/10.1186/s12711-019-0489-z>
30. Dupuy C, Cabon J, Louboutin L, Le Floch S, Morin T, Danion M (2019) Cellular, humoral and molecular responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to a herbicide and subsequently infected with infectious hematopoietic necrosis virus. *Aquatic Toxicology* 215:105282. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105282>
31. Dixon P, Paley R, Alegria-Moran R, Oidtmann B (2016) Epidemiological characteristics of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV): a review. *Vet Res* 47:63. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0341-1>
32. Pavlov D K, Pichuevaa A A (2015) Analysis of the epizootic situation in the world on viral diseases of fish. *Veterinary Science Today* 2:54–58
33. Harmache A, LeBerre M, Droineau S, Giovannini M, Brémont M (2006) Bioluminescence Imaging of Live Infected Salmonids Reveals that the Fin Bases Are the Major Portal of Entry for *Novirhabdovirus*. *J Virol* 80:3655–3659. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.7.3655-3659.2006>

34. Doronin MI, Pylnov VA, Rybakov SS (2015) Latex agglutination method for detection of antibodies to salmonid infectious hematopoietic necrosis virus. *Bulletin of Udmurt University. Series Biology Earth Sciences* 2:135–144
35. Saint-Jean SR, Borrego JJ, Perez-Prieto SI (2003) Infectious Pancreatic Necrosis Virus: Biology, Pathogenesis, and Diagnostic Methods. *Adv Virus Res* 62:113–165. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(03\)62003-8](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(03)62003-8)
36. LaPatra SE (1996) Characterization of the humoral response of rainbow trout to infectious hematopoietic necrosis virus. *Ann Rev Fish Dis* 6:15–28
37. Zrnčić S, Radosavljević V (2017) West Balkans Regional Aquatic Animal Disease Diagnostic Manual Assistance to Western Balkan Countries for Improving Compliance to International Standards. Rome
38. Kurath G (2008) Biotechnology and DNA vaccines for aquatic animals. *Rev sci tech Off int Epiz* 27:175–196
39. Marsella A, Pascoli F, Pretto T, Buratin A, Biasini L, Abbadi M, Cortinovis L, Berto P, Manfrin A, Vanelli M, Perulli S, Rasmussen JS, Sepúlveda D, Vendramin N, Lorenzen N, Toffan A (2022) Efficacy of DNA Vaccines in Protecting Rainbow Trout against VHS and IHN under Intensive Farming Conditions. *Vaccines (Basel)* 10:. <https://doi.org/10.3390/vaccines10122062>
40. Purcell MK, LaPatra SE, Woodson JC, Kurath G, Winton JR (2010) Early viral replication and induced or constitutive immunity in rainbow trout families with differential resistance to Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Fish Shellfish Immunol* 28:98–105. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.10.005>
41. Barroso RM, Wheeler PA, LaPatra SE, Drew RE, Thorgaard GH (2008) QTL for IHNV resistance and growth identified in a rainbow (*Oncorhynchus mykiss*) × Yellowstone cutthroat (*Oncorhynchus clarki bouvieri*) trout cross. *Aquaculture* 277:156–163. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.001>
42. Midtlyng PJ, Wolffrom T, Bovo G, Husby A, Håstein T, Hill B, Storset A, Michel C, Olesen NJ Pathogen survival outside the host, and susceptibility to disinfection Report: Fish Egg Trade Zoo-sanitary Controls in Trade and Transfer of Fish Eggs and Sperm
43. Uwe F, Schütze H, Bergmann S (2021) Diagnostic methods and procedures for the surveillance and confirmation of infection with VHSV and IHNV
44. Schäperclaus W (1938) Die schädigungen der deutschen fischerei durch fischparasiten und fischkrankheiten. *Fischerei-Zeitung* 41:267–270
45. Jensen MH (1965) Research on the virus of Egtved disease. *Annals New York Academy of Sciences* 422–426
46. World Organisation for Animal Health (2023) Infection with viral haemorrhagic septicaemia virus. In: *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. WOAHA, Paris, France, pp 377–401
47. Skall HF, Olesen NJ, Møllergaard S (2005) Viral haemorrhagic septicaemia virus in marine fish and its implications for fish farming – a review. *J Fish Dis* 28:509–529. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2005.00654.x>
48. Toplak I, Hostnik P, Rihtarič D, Olesen NJ, Skall HF, Jenčič V (2010) First isolation and genotyping of viruses from recent outbreaks of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in Slovenia. *Dis Aquat Organ* 92:21–29. <https://doi.org/10.3354/dao02251>
49. Chikova V (2014) Dissemination of the viral and bacterial infections In aquaculture and analysis of epizootic situation in Bulgaria. *Article in Journal of Animal Science* 51:62–70
50. Mohammadisefat P, Zorriehzahra MJ, Adel M, Chamjangali ZA, Jabbari M, Eftekhari A, Farzipour H, Jazi SY (2023) Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), past, present and future: a review. *Int Aquat Res* 15:191–203

51. Walker PJ, Breyta R, Blasdel KR, Calisher CH, Dietzgen RG, Fooks AR, Fieitas-Astúa J, Kondo H, Kurath G, Kuzmin I V, Longdon B, Stone DM, Tesh RB, Tordo N, Vasilakis N, Whitfield Edited AE, Kuhn JH, Siddell SG, Walker PJ, Blasdel KR (2018) Virus Taxonomy The ICTV Report on Virus Classification and Taxon Nomenclature Rhabdoviridae Chapter Rhabdoviridae Citation
52. Snow M, Bain N, Black J, Taupin V, Cunningham C, King J, Skall H, Raynard R (2004) Genetic population structure of marine viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV). *Dis Aquat Organ* 61:11–21. <https://doi.org/10.3354/dao061011>
53. Snow M, Cunningham CO, Melvin WT, Kurath G (1999) Analysis of the nucleoprotein gene identifies distinct lineages of viral haemorrhagic septicaemia virus within the European marine environment. *Virus Res* 63:35–44. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(99\)00056-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(99)00056-8)
54. Einer-Jensen K, Ahrens P, Forsberg R, Lorenzen N (2004) Evolution of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicaemia virus. *Journal of General Virology* 85:1167–1179. <https://doi.org/10.1099/vir.0.79820-0>
55. Nishizawa T, Iida H, Takano R, Isshiki T, Nakajima K, Muroga K (2002) Genetic relatedness among Japanese, American and European isolates of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) based on partial G and P genes. *Diseases of Aquatic Organisms* 48:143–148
56. Jonstrup SP, Gray T, Kahns S, Skall HF, Snow M, Olesen NJ (2009) FishPathogens.eu/vhsv: A user-friendly viral haemorrhagic septicaemia virus isolate and sequence database. *J Fish Dis* 32:925–929. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01073.x>
57. Raja-Halli M, Vehmas T, Rimaila-Pärnänen E, Sainmaa S, Skall H, Olesen N, Tapiovaara H (2006) Viral haemorrhagic septicaemia (VHS) outbreaks in Finnish rainbow trout farms. *Dis Aquat Organ* 72:201–211. <https://doi.org/10.3354/dao072201>
58. Nishizawa T, Savaş H, Işidan H, Üstündağ C, Iwamoto H, Yoshimizu M (2006) Genotyping and pathogenicity of viral hemorrhagic septicemia virus from free-living turbot (*Psetta maxima*) in a Turkish coastal area of the Black Sea. *Appl Environ Microbiol* 72:2373–2378. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2373-2378.2006>
59. Gadd T, Jakava-Viljanen M, Tapiovaara H, Koski P, Sihvonen L (2011) Epidemiological aspects of viral haemorrhagic septicaemia virus genotype II isolated from Baltic herring, *Clupea harengus* membras L. *J Fish Dis* 34:517–529. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01264.x>
60. López-Vázquez C, Raynard R, Bain N, Snow M, Bandín I, Dopazo C (2006) Genotyping of marine viral haemorrhagic septicaemia virus isolated from the Flemish Cap by nucleotide sequence analysis and restriction fragment length polymorphism patterns. *Dis Aquat Organ* 73:23–31. <https://doi.org/10.3354/dao073023>
61. Dale OB, Ørpetveit I, Lyngstad TM, Kahns S, Skall HF, Olesen NJ, Dannevig BH (2009) Outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in seawater-farmed rainbow trout in Norway caused by VHS virus Genotype III. *Dis Aquat Organ* 85:93–103. <https://doi.org/10.3354/dao02065>
62. Garver KA, Traxler GS, Hawley LM, Richard J, Ross JP, Lovy J (2013) Molecular epidemiology of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) in British Columbia, Canada, reveals transmission from wild to farmed fish. *Dis Aquat Organ* 104:93–104. <https://doi.org/10.3354/dao02588>
63. KIm SM, Park SI (2004) Detection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in wild marine fishes in the coastal region of Korea. *Journal of fish pathology* 17:1–10
64. Elsayed E, Faisal M, Thomas M, Whelan G, Batts W, Winton J (2006) Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus from muskellunge, *Esox masquinongy* (Mitchill), in Lake St Clair, Michigan, USA reveals a new sublineage of the North American genotype. *J Fish Dis* 29:611–619. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2006.00755.x>

65. Kim SJ, Qadiri SSN, Kim JO, Oh MJ (2019) Kinetics of infectious virus and viral RNA copy number in the blood of olive flounder infected with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Virus Res* 267:16–20. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.05.001>
66. Getchell RG, Cornwell ER, Groocock GH, Tingwong P, Coffee LL, Wooster GA, Bowser PR (2013) Experimental transmission of VHSV genotype IVb by predation. *J Aquat Anim Health* 25:221–229. <https://doi.org/10.1080/08997659.2013.811126>
67. Baillon L, Mérour E, Cabon J, Louboutin L, Vigouroux E, Alencar ALF, Cuenca A, Blanchard Y, Olesen NJ, Panzarin V, Morin T, Brémont M, Biacchesi S (2020) The Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) Markers of Virulence in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Front Microbiol* 11:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.574231>
68. Kim R, Faisal M (2011) Emergence and resurgence of the viral hemorrhagic septicemia virus (Novirhabdovirus, Rhabdoviridae, Mononegavirales). *J Adv Res* 2:9–23. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.05.007>
69. Mohammadisefat P, Zorriehzahra MJ, Adel M, Chamjangali ZA, Jabbari M, Eftekhari A, Farzipour H, Jazi SY (2023) Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), past, present and future: a review. *Int Aquat Res* 15:191–203. <https://doi.org/10.22034/iar.2023.1983457.1424>
70. Vennerström P, Maunula L, Välimäki E, Virtala AM (2020) Presence of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) in the environment of virus-contaminated fish farms and processing plants. *Dis Aquat Organ* 138:145–154. <https://doi.org/10.3354/dao03454>
71. Stepien CA, Pierce LR, Leaman DW, Niner MD, Shepherd BS, Chen TY (2015) Gene diversification of an emerging pathogen: A decade of mutation in a novel fish Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) substrain since its first appearance in the Laurentian Great Lakes. *PLoS One* 10:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135146>
72. Parry L, Dixon PF (1997) Stability of nine viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) isolates in seawater. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 17:31–36
73. Hawley LM, Garver KA (2008) Stability of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in freshwater and seawater at various temperatures. *Dis Aquat Organ* 82:171–178
74. Kocan R, Hershberger P, Elder N (2001) Survival of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in filtered seawater and seawater containing ovarian fluid, crude oil and serum-enriched culture medium. *Dis Aquat Organ* 44:75–78. <https://doi.org/10.3354/dao044075>
75. Arkush K, Mendonca H, McBride A, Yun S, McDowell T, Hedrick R (2006) Effects of temperature on infectivity and of commercial freezing on survival of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Dis Aquat Organ* 69:145–151. <https://doi.org/10.3354/dao069145>
76. Wolf K (1988) Viral hemorrhagic septicemia. *Fish Viruses and Fish Viral Diseases* 217–249
77. Smail DA, Snow M (2011) Viral Haemorrhagic Septicaemia. In: *Fish diseases and disorders*. pp 110–142
78. Munro ES, Gregory A (2010) The risk associated with vertical transmission of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 30:154–158
79. Jensen BB, Ersbøll AK, Korsholm H, Skall HF, Olesen NJ (2014) Spatio-temporal risk factors for viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in Danish aquaculture. *Dis Aquat Organ* 109:87–97. <https://doi.org/10.3354/dao02706>
80. Olesen NJ (1998) Sanitation of viral haemorrhagic septicaemia (VHS). *J Appl Ichthyol* 14:173–177

81. Kim MS, Kim KH (2019) Genetically engineered viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) vaccines. *Fish Shellfish Immunol* 95:11–15. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.10.031>
82. Peddie S, McLauchlan P, Ellis A, Secombes C (2003) Effect of intraperitoneally administered IL-1b-derived peptides on resistance to viral haemorrhagic septicaemia in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis Aquat Organ* 56:195–200. <https://doi.org/10.3354/dao056195>
83. Quillet E, Dorson M, Aubard G, Torhy C (2007) In vitro assay to select rainbow trout with variable resistance/susceptibility to viral haemorrhagic septicaemia virus. *Dis Aquat Organ* 76:7–16. <https://doi.org/10.3354/dao076007>
84. Henryon M, Jokumsen A, Berg P, Lund I, Pedersen PB, Olesen NJ, Slierendrecht WJ (2002) Genetic variation for growth rate, feed conversion efficiency, and disease resistance exists within a farmed population of rainbow trout. *Aquaculture* 209:59–76. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00729-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00729-3)
85. Evensen O, Meier W, Wahli T, Olesen NJ, Jorgensen PEV, Hastein T (1994) Comparison of immunohistochemistry and virus cultivation for detection of viral haemorrhagic septicaemia virus in experimentally infected rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis Aquat Organ* 20:101–109. <https://doi.org/10.3354/dao020101>
86. Caturla N, Estepa A, Micol V (2010) The Relationship between Oleuropein Antimicrobial Activity and its Effects on Biological Membranes. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* 1345–1354. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374420-3.00150-9>
87. Kim HJ, Cuenca A, Olesen NJ (2018) Validation of a novel one-step reverse transcription polymerase chain reaction method for detecting viral haemorrhagic septicaemia virus. *Aquaculture* 492:170–183. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.03.047>
88. Jonstrup SP, Kahns S, Skall HF, Boutrup TS, Olesen NJ (2013) Development and validation of a novel Taqman-based real-time RT-PCR assay suitable for demonstrating freedom from viral haemorrhagic septicaemia virus. *J Fish Dis* 36:9–23. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2012.01416.x>
89. Chico V, Gomez N, Estepa A, Perez L (2006) Rapid detection and quantitation of viral hemorrhagic septicemia virus in experimentally challenged rainbow trout by real-time RT-PCR. *J Virol Methods* 132:154–159. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.10.005>
90. Hedrick RP, Gilad O, Yun S, Spangenberg J V., Marty GD, Nordhausen RW, Kebus MJ, Bercovier H, Eldar A (2000) A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. *J Aquat Anim Health* 12:44–57. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(2000\)012<0044:AHAWMM>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(2000)012<0044:AHAWMM>2.0.CO;2)
91. Haenen O, Bergmann SM, Ariel E, Haenen O L M, Way K, Bergmann S M, Ariel E (2004) The emergence of Koi herpesvirus and its significance to European aquaculture
92. Bretzinger A, Fischer-Scherl T, Oumouna M, Hoffmann R, Truyen U (1999) Mass mortalities in Koi carp, *Cyprinus carpio*, associated with gill and skin disease. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 19:182–185
93. Sano M, Ito T, Kurita J, Yanai T, Watanabe N, Miwa S, Iida T (2004) First Detection of Koi Herpesvirus in Cultured Common Carp *Cyprinus carpio* in Japan. *Fish Pathol* 39:165–167. <https://doi.org/10.3147/jsfp.39.165>
94. World Organisation for Animal Health (2023) Chapter 10.7. Infection with koi herpesvirus. In: *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. WOAHA, Paris, France, pp 1–18
95. Nica Aurelia (2010) The current problem: koi herpesvirus (KHV). *Lucrări Științifice-Seria Zootehnie* 59–321
96. Toplak I, Grilc Fajfar A, Hostnik P, Jenčič V (2011) The detection and molecular characterization of koi herpesvirus (KHV) in Slovenia. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 31:219–226

97. Zrnčić S, Oraić D, Zupčić IG, Pavlinec Ž, Brnić D, Rogić ŽA, Sućec I, Steinhagen D, Adamek M (2020) Koi herpesvirus and carp edema virus threaten common carp aquaculture in Croatia. *J Fish Dis* 43:673–685. <https://doi.org/10.1111/jfd.13163>
98. Technischen D, Jin Y, Castiglione K, Lindenberger C, Silaghi C (2022) Disinfection efficacy, mechanism and potential application of commercial proteases against fish viruses Wirksamkeit der Desinfektion, Mechanismus und mögliche Anwendung kommerzieller Proteasen gegen Fischviren. Der Technischen Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
99. Ilouze M, Davidovich M, Diamant A, Kotler M, Dishon A (2011) The outbreak of carp disease caused by CyHV-3 as a model for new emerging viral diseases in aquaculture: A review. *Ecol Res* 26:885–892. <https://doi.org/10.1007/s11284-010-0694-2>
100. Waltzek TB, Kelley GO, Alfaro ME, Kurobe T, Davison AJ, Hedrick RP (2009) Phylogenetic relationships in the family Alloherpesviridae. *Dis Aquat Organ* 84:179–194. <https://doi.org/10.3354/dao02023>
101. Miwa S, Ito T, Sano M (2007) Morphogenesis of koi herpesvirus observed by electron microscopy. *J Fish Dis* 30:715–722. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00850.x>
102. Miyazaki T, Yasumoto S, Kuzuya Y, Yoshimura T (2008) A Primary Study on Oral Vaccination with Liposomes Entrapping Koi Herpesvirus (KHV) Antigens Against KHV Infection in Carp
103. Aoki T, Hirono I, Kurokawa K, Fukuda H, Nahary R, Eldar A, Davison AJ, Waltzek TB, Bercovier H, Hedrick RP (2007) Genome Sequences of Three Koi Herpesvirus Isolates Representing the Expanding Distribution of an Emerging Disease Threatening Koi and Common Carp Worldwide. *J Virol* 81:5058–5065. <https://doi.org/10.1128/jvi.00146-07>
104. Haenen OLM, Schuetze H, Cieslak M, Oldenburg S, Spierenburg MAH, Roozenburg-Hengst I, Voorbergen-Laarman M, Engelsma MY, Olesen NJ (2016) First evidence of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in the Netherlands. *J Fish Dis* 39:971–979. <https://doi.org/10.1111/jfd.12434>
105. Gilad O, Yun S, Adkison MA, Way K, Willits NH, Bercovier H, Hedrick RP (2003) Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi. *Journal of General Virology* 84:2661–2668. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19323-0>
106. St-Hilaire S, Beevers N, Way K, Le Deuff R, Martin P, Joiner C (2005) Reactivation of koi herpesvirus infections in common carp *Cyprinus carpio*. *Dis Aquat Organ* 67:15–23. <https://doi.org/10.3354/dao067015>
107. Perelberg A, Smirnov M, Hutoran M, Diamant A, Bejerano Y, Kotler M (2003) Epidemiological Description of A New Viral Disease Afflicting Cultured *Cyprinus Carpio* In Israel. *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgah* 55:5–12. <https://doi.org/10.46989/001c.20337>
108. Takafumi I, Hiroshi H, Kei Y (2014) Fins Are an Applicable Organ for PCR-based Diagnosis of Koi Herpesvirus Disease in Clinical Fish. *Fish Pathol* 49:194–197
109. Ito T, Kurita J, Yuasa K (2014) Differences in the susceptibility of Japanese indigenous and domesticated Eurasian common carp (*Cyprinus carpio*), identified by mitochondrial DNA typing, to cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3). *Vet Microbiol* 171:31–40. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.03.002>
110. Minamoto T, Honjo MN, Yamanaka H, Tanaka N, Itayama T, Kawabata Z (2011) Detection of cyprinid herpesvirus-3 DNA in lake plankton. *Res Vet Sci* 90:530–532. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2010.07.006>
111. Kielpinski M, Kempter J, Panicz R, Sadowski J, Schütze H, Ohlemeyer S, Bergmann SM (2010) Detection of KHV in Freshwater Mussels and Crustaceans from Ponds with KHV History in Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgah* 62:28–37. <https://doi.org/10.46989/001c.20576>

112. Torres-Meza OA, Loza-Rubio E, Martínez-Maya JJ, García-Espinosa G (2020) The First Detection of Koi Herpesvirus (CyHV3) in Migratory Wild Ducks in North America. *J Aquat Anim Health* 32:28–31. <https://doi.org/10.1002/aah.10092>
113. Shimizu T, Yoshida N, Kasai H, Yoshimizu M (2006) Survival of Koi Herpesvirus (KHV) in Environmental Water. *Fish Pathol* 41:153–157. <https://doi.org/10.3147/jsfp.41.153>
114. Pikarsky E, Ronen A, Abramowitz J, Levavi-Sivan B, Hutoran M, Shapira Y, Steinitz M, Perelberg A, Soffer D, Kotler M (2004) Pathogenesis of Acute Viral Disease Induced in Fish by Carp Interstitial Nephritis and Gill Necrosis Virus. *J Virol* 78:9544–9551. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.17.9544-9551.2004>
115. Bergmann SM, Jin Y, Franzke K, Grunow B, Wang Q, Klafack S (2020) Koi herpesvirus (KHV) and KHV disease (KHVD) – a recently updated overview. *J Appl Microbiol* 129:98–103. <https://doi.org/10.1111/jam.14616>
116. Schlotfeldt H. F. (2004) Severe losses of common carp in Germany due to koi herpesvirus (KHV). *Bull Euro Assoc Fish Pathol* 24:216–217
117. Regidor SE, Albaladejo JD, Somga JR Current Status of Transboundary Fish Diseases in the Philippines: Occurrence, Surveillance, Research and Training I. Current Status of Koi Herpesvirus Disease (KHVD) in the Production of Common Carp and Koi Carp I-1. Production of Common Carp and Koi Carp
118. Boutier M, Ronsmans M, Rakus K, Jazowiecka-Rakus J, Vancsok C, Morvan L, Peñaranda MMD., Stone DM, Way K, van Beurden SJ, Davison A, Vanderplasschen A (2015) Cyprinid Herpesvirus 3: An Archetype of Fish Alloherpesviruses. *Adv Virus Res* 93:161–256. <https://doi.org/10.1016/BS.AIVIR.2015.03.001>
119. Zhou J, Xue J, Wang Q, Zhu X, Li X, Lv W, Zhang D (2014) Vaccination of plasmid DNA encoding ORF81 gene of CJ strains of KHV provides protection to immunized carp. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 50:489–495. <https://doi.org/10.1007/s11626-014-9737-2>
120. Zhou J, Wang H, Li X, Zhu X, Lu W, Zhang D (2014) Construction of <scp>KHV</scp> - <scp>CJ ORF</scp> 25 <scp>DNA</scp> vaccine and immune challenge test. *J Fish Dis* 37:319–325. <https://doi.org/10.1111/jfd.12105>
121. Hu F, Li Y, Wang Q, Wang G, Zhu B, Wang Y, Zeng W, Yin J, Liu C, Bergmann SM, Shi C (2020) Carbon nanotube-based DNA vaccine against koi herpesvirus given by intramuscular injection. *Fish Shellfish Immunol* 98:810–818. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.11.035>
122. Reichert M, Bergmann SM, Hwang J, Buchholz R., Lindenberger C (2017) Antiviral activity of exopolysaccharides from *Arthrosira platensis* against koi herpesvirus. *J Fish Dis* 40:1441–1450. <https://doi.org/10.1111/jfd.12618>
123. Tadmor-Levi R, Asoulin E, Hulata G, David L (2017) Studying the genetics of resistance to CyHV-3 disease using introgression from feral to cultured common carp strains. *Front Genet* 8:. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00024>
124. Shapira Y, Magen Y, Zak T, Kotler M, Hulata G, Levavi-Sivan B (2005) Differential resistance to koi herpes virus (KHV)/carp interstitial nephritis and gill necrosis virus (CNGV) among common carp (*Cyprinus carpio* L.) strains and crossbreds. *Aquaculture* 245:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.11.038>
125. Dixon PF, Joiner CL, Way K, Reese RA, Jeney G, Jeney Z (2009) Comparison of the resistance of selected families of common carp, *Cyprinus carpio* L., to koi herpesvirus: preliminary study. *J Fish Dis* 32:1035–1039. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01081.x>
126. Hedrick RP, Waltzek TB, McDowell TS (2006) Susceptibility of Koi Carp, Common Carp, Goldfish, and Goldfish × Common Carp Hybrids to Cyprinid Herpesvirus-2 and Herpesvirus-3. *J Aquat Anim Health* 18:26–34. <https://doi.org/10.1577/H05-028.1>

127. Meyer K, Bergmann SM, van der Marel M, Steinhagen D (2012) Detection of Koi herpesvirus: impact of extraction method, primer set and DNA polymerase on the sensitivity of polymerase chain reaction examinations. *Aquac Res* 43:835–842. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02897.x>
128. Kasai H, Muto Y, Yoshimizu M (2005) Virucidal Effects of Ultraviolet, Heat Treatment and Disinfectants against Koi Herpesvirus (KHV). *Fish Pathol* 40:137–138. <https://doi.org/10.3147/jsfp.40.137>
129. Walster C (2003) A note on Koi Herpes Virus (KHV): current situation and issues arising. In: Fish Veterinary Society, Spring Scientific Meeting,. *Fish Veterinary Journal*, Edinburgh, UK, pp 77–81
130. Ronen A, Perelberg A, Abramowitz J, Hutoran M, Tinman S, Bejerano I, Steinitz M, Kotler M (2003) Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*. *Vaccine* 21:4677–4684. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00523-1](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00523-1)
131. Dishon A, Perelberg A, Bishara-Shieban J, Ilouze M, Davidovich M, Werker S, Kotler M (2005) Detection of carp interstitial nephritis and gill necrosis virus in fish droppings. *Appl Environ Microbiol* 71:7285–7291. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7285-7291.2005>
132. Gilad O, Yun S, Zagmutt-Vergara FJ, Leutenegger MC, Bercovier H, Hedrick RP (2004) Concentrations of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio koi* as assessed by real-time TaqMan PCR. *Dis Aquat Org* 60:179–187
133. European Commission (2015) Commission Implementing Decision (EU) 2015/1554 of 11 September 2015 laying down rules for the application of Directive 2006/88/EC as regards requirements for surveillance and diagnostic methods (notified under document C(2015) 6188)
134. Olesn NJ, Cuenca A, Vendramin N (2021) Diagnostic methods and procedures for the surveillance and confirmation of infection with VHSV and IHNV v2021.2 2
135. Purcell MK, Thompson RL, Garver KA, Hawley LM, Batts WN, Sprague L, Sampson C, Winton JR (2013) Universal reverse-transcriptase real-time PCR for infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Dis Aquat Organ* 106:103–115. <https://doi.org/10.3354/dao02644>
136. Cuenca A, Vendramin N, Olesen NJ (2020) Analytical validation of one-step real-time RT-PCR for detection of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Bull Eur Ass Fish Pathol* 260:261–272.
137. Enzmann P, Kurath G, Fichtner D, Bergmann S (2005) Infectious hematopoietic necrosis virus: monophyletic origin of European isolates from North American Genogroup M. *Dis Aquat Organ* 66:187–195. <https://doi.org/10.3354/dao066187>
138. Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 30:772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
139. Stamatakis A (2014) RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30:1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
140. Skall HF, Olesen NJ (2015) VHS virus-present situation. Paper presented at the DAFINET and profish workshop, University of Copenhagen, København, 17-18 Nov 2015
141. Gomez DK, Joh SJ, Jang H, Shin SP, Choresca CH, Han JE, Kim JH, Jun JW, Park SC (2011) Detection of koi herpesvirus (KHV) from koi (*Cyprinus carpio koi*) broodstock in South Korea. *Aquaculture* 311:42–47. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.11.021>
142. Bergmann SM, Jin Y, Franzke K, Grunow B, Wang Q, Klafack S (2020) Koi herpesvirus (KHV) and KHV disease (KHVD) – a recently updated overview. *J Appl Microbiol* 129:98–103. <https://doi.org/10.1111/jam.14616>

143. Rexhepi A, Bërxfholi K, Scheinert P, Hamidi A, Sherifi K, Rexhepi A, Bërxfholi K, Scheinert P, Hamidi A, Sherifi K (2011) Study of viral diseases in some freshwater fish in the Republic of Kosovo. *Vet Arh* 81:405–413
144. Trajchovski A, Djadjovski I, Krstevski K, Hristovska ZP, Nikolovski M, Rashikj L, Bozinovski D, Grujovska A, Vendramin N, Cuenca A, Cvetkovikj A (2024) Distribution and Genotyping of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus in Farmed Rainbow Trout and Autochthonous Salmonids in North Macedonia. *Maced Vet Rev*. <https://doi.org/10.2478/macvetrev-2024-0013>
145. Trajchovski A, Djadjovski I, Krstevski K, Hristovska ZP, Nikolovski M, Grujovska A, Cvetkovikj A (2025) Occurrence of Infectious Hematopoietic Necrosis, Koi Herpesvirus Disease, and Viral Hemorrhagic Septicemia in North Macedonia Between 2015-2023. *Maced Vet Rev*. <https://doi.org/10.2478/macvetrev-2025-0015>
146. Balakhnina KA, Melnikov VP (2024) Infectious hematopoietic necrosis (review). *Veterinary Science Today* 13:124–135. <https://doi.org/10.29326/2304-196x-2024-13-2-124-135>
147. Abbadi M, Fusaro A, Ceolin C, Casarotto C, Quartesan R, Dalla Pozza M, Cattoli G, Toffan A, Holmes EC, Panzarin V (2016) Molecular evolution and phylogeography of co-circulating IHNV and VHSV in Italy. *Front Microbiol* 7:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01306>
148. Cieslak M, Wahli T, Diserens N, Haenen OLM, Schütze H (2017) Phylogeny of the infectious hematopoietic necrosis virus in European aquaculture. *PLoS One* 12:e0184490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184490>
149. Bandín I, Dopazo CP (2011) Host range, host specificity and hypothesized host shift events among viruses of lower vertebrates. *Vet Res* 42
150. Assefa A, Abunna F (2018) Maintenance of Fish Health in Aquaculture: Review of Epidemiological Approaches for Prevention and Control of Infectious Disease of Fish. *Vet Med Int* 2018:1–10. <https://doi.org/10.1155/2018/5432497>
151. European Commission (2024) Commission Implementing Regulation (EU) 2024/216 of 11 January 2024 amending the Annex to Implementing Regulation (EU) 2018/1882 concerning listed diseases of aquatic animals and the list of species and groups of species posing a considerable risk for the spread of those listed diseases. *Official Journal of the European Union L* 216:1–4
152. Oidtmann BC, Peeler EJ, Thrush MA, Cameron AR, Reese RA, Pearce FM, Dunn P, Lyngstad TM, Tavoranpanich S, Brun E, Stärk KDC (2014) Expert consultation on risk factors for introduction of infectious pathogens into fish farms. *Prev Vet Med* 115:238–254. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.03.017>
153. Oidtmann B, Peeler E, Thrush M, Pearce F, Stärk K, Lyngstad TM, Brun E, Tavoranpanich S, Bang JB, Dalla Pozza Manuela, Cheolin C, Cameron A (2013) Project ‘Risk categorisation for Aquatic Animal Health Surveillance’ (CFP/EFSA/AHAW/2011/03). EFSA Supporting Publications 10:. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2013.EN-442>
154. Gnocchi M, Aires M, Alvarez J, Arzul I, Aznar I, Bicout D, Carmosino I, Drewe JA, Dharmaveer S, Bastuji BG, Karagianni AE, Chueca MÁM, Olesen NJ, Palaiokostas C, Roberts H, Nielsen SS, Schiøtt M, Sindre H, Stone D, Rusina A, Vendramin N, Dhollander S (2023) Extensive literature review on vectors and reservoirs of AHL-listed pathogens of fish. EFSA Supporting Publications 20:. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2023.EN-8123>
155. Oidtmann BC, Pearce FM, Thrush MA, Peeler EJ, Ceolin C, Stärk KDC, Pozza MD, Afonso A, Diserens N, Reese RA, Cameron A (2014) Model for ranking freshwater fish farms according to their risk of infection and illustration for viral haemorrhagic septicaemia. *Prev Vet Med* 115:263–279. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.04.005>
156. Oidtmann B, Dixon P, Way K, Joiner C, Bayley AE (2018) Risk of waterborne virus spread – review of survival of relevant fish and crustacean viruses in the aquatic environment and implications for control measures. *Rev Aquac* 10:641–669

9. ПРИЛОЗИ

9.1 Контролна листа за категоризација на одгледувалишта за аквакултура и одредување на степенот на ризик од внес и ширење на болести (извор Агенција за храна и ветеринарство на Р.С. Македонија)

Критериум за категоризација	Вредности за ризик за внес на болести (чекор 1)	Вредности за ризик за ширење на болести (чекор 2)
1. Видови на риби присутни на одгледувалиштето		
Неприемчиви видови на риби	0	0
Векторски видови риби	0	1
Една приемлива врста на риби	2	2
Повеќе од една приемлива врста на риба	3	3
2. Извор на вода за снабдување на одгледувалиштето		
Бунар- сопствен извор на вода	0	1
Површинска вода	2	2
Комбинирано бунар- сопствен извор и површинска вода	1	2
Систем за рецикулација	0	1
3. Внес на риба (набавување)		
Нема набавување и купување на риба	0	0
Убиена риба	0	1
Жива риба за конзумирање /тов	2	0
Жива риба за други одгледувалишта	3	3
4. Фреквенција на набавување на риба (годишно)		
Не набавува	0	0
Помалку од 3	1	0
Помеѓу 3 и 5	2	0
повеќе од 6	3	0
5. Број на добавувачи		
Нема	0	0
1 добавувач	1	0
2-3 добавувачи	2	0
Повеќе од 4 добавувачи	3	0
6. Вид на риба која се набавува		
Икра	2	0
Жива риба за тов	1	0
Жива риба за производство	3	0
7. Намена на рибата/продажба		

За сопствена употреба	0	0
За конзумирање	0	1
Промет со жива риба за понатамошно одгледување	0	2
Порибување на отворени води	0	3
8. Близина на соседно одгледувалиште на растојание изразено во км во горен или долен тек во однос на одгледувалиштето кое се категоризира		
Нема	0	0
Оддалеченост од 1 до 5 км во долен тек (по одгледувалиштето)	0	1
Оддалеченост од 1 до 5 км во горен тек (пред одгледувалиштето)	1	0
Оддалеченост од 0.2 до 0.5 км во горен тек (пред одгледувалиштето)	0	1
Оддалеченост од 0.2 до 0.5 км во долен тек (по одгледувалиштето)	1	0
Оддалеченост од 0.5 до 1 км во горен/ долен тек (пред/по одгледувалиштето)	2	2
Оддалеченост од 0 до 0.2 км во горен/ долен тек (пред/по одгледувалиштето)	2	2
Оддалеченост помала од 0.5 км во долен тек (по одгледувалиштето)	0	3
Оддалеченост помала од 0.5 км во горен тек (пред одгледувалиштето)	3	0
9. Број на одгледувалишта во растојание од 5 км околу рибникот независно од системот на вода		
нема	0	0
1 одгледувалиште	1	1
2 до 4 одгледувалишта	2	2
Повеќе од 5 одгледувалишта	3	3
10. Објект за производство на одгледувалиштето		
Да	2	0
Не	0	0
11. Можност за поплавување		
Не	0	0
Да	0	1
12. Тип на почва/градба на одгледувалиштето		
Цврста/бетонска	0	0
Природни	0	2
Комбинирано цврста/ бетонска и природна	0	2

Присуство на биосигурносни мерки на одгледувалиштето		
Присуство на дезинфекциони бариери	да/не	да/не
Дезинфекција на опрема	да/не	да/не
Дезинфекција на превозни средства/цистерни	да/не	да/не
Ограда околу одгледувалиштето	да/не	да/не
Постоење на влезна врата на одгледувалиштето	да/не	да/не
Евиденција на посетители	да/не	да/не
Можност за карантин и изолација	да/не	да/не
Одговори со да: Повеќе од 6 (≥ 6) потврдни одговори (низок ризик) Коефициент 1; Помеѓу 3 и 5 потврдни одговори (среден ризик) коефициент 2; Помеѓу 0 и 2 потврдни одговори (висок ризик) коефициент 3 *истите вредности се однесуваат и за ризик од внес на болести и за ризик од ширење на болести		

Забелешка: толкување на вредноста на коефициентот со степенот на ризик

Коефициент	Степен на ризик
0	нема ризик
1	низок ризик
2	среден ризик
3	висок ризик

Вредности за ризик за внес на болести максимална вредност коефициент 28	Вредности за ризик за ширење на болести максимална вредност коефициент 23
Коефициент 0-9 низок ризик	Коефициент 0-7 низок ризик
Коефициент 10-19 среден ризик	Коефициент 8-15 среден ризик
Коефициент 20-28 висок ризик	Коефициент 16-23 висок ризик
Коефициент на рибникот:	Коефициент на рибникот:

Проценка на степенот на ризик со комбинирање на чекорите 1 и 2

Чекор 1 Веројатност за внес на болест	Висока	С	В	В
	Средна	Н	С	В
	Ниска	Н	Н	С
		Ниска	Средна	Висока

Чекор 2

Веројатност на ширење на болест

КАТЕГОРИЗАЦИЈА НА ОДГЛЕДУВАЛИШТЕТО:

Категоризација на одгледувалиштето врз основа на толкување на вредностите за ризик за внес на болести (чекор1) и вредностите за ризик за ширење на болестите (чекор2)

Категорија: _____ ризик.

Претставник на операторот

Членови на комисија:

1. _____
2. _____
3. _____