

NATALIA MONIKA ADAMKOWSKA

**DETEKCJA, WEKTORY ORAZ ELEMENTY BIOLOGII CARP EDEMA VIRUS (CEV)
W ASPEKCIE HODOWLI KARPIA W POLSCE**

**Detection, vectors, elements of carp edema virus (CEV) biology in the
aspect of carp aquaculture in Poland**

Szczecin, 2023

Praca doktorska przygotowana
w Katedrze Bioinżynierii Środowiska Wodnego i Akwakultury
Promotor; prof. dr hab. Jolanta Kiełpińska
Promotor pomocniczy; prof. dr hab. inż. Remigiusz Panicz

Moim Rodzicom

Streszczenie

Akwakulturę karpia (*Cyprinus carpio Linnaeus, 1758*) prowadzi się w Europie głównie w stawach, czyli sztucznych zbiornikach wodnych, wykorzystując zwykle naturalne ukształtowanie terenu sprzyjające ich budowie. U karpia hodowanych w stawach zasilanych wodą z naturalnych cieków oraz gospodarstwach, w których nie prowadzi się tarła na bazie własnych tarlaków, często dochodzi do zawleczenia chorób, w tym patogennych wirusów. Głównymi zagrożeniami dla gospodarki karpiowej jest koi herpes virus (KHV) oraz carp edema virus (CEV).

W niniejszej pracy zostały postawione cele związane ze znacznym poszerzeniem wiedzy z zakresu stopnia zainfekowania wytypowanych gospodarstw karpiowych wirusem CEV, oceny tropizmu, czyli powinowactwa do komórek i tkanek u karpia, oszacowaniu skuteczności metody detekcji pośredniej (nested PCR, real-time PCR, hybrydyzacja *in situ*) oraz analizie pozyskanych sekwencji z wykorzystaniem modelu ewolucji molekularnej.

Analizom poddano łącznie 16 gatunków ryb z 11. lokalizacji, w tym dziewięciu gospodarstw hodowli karpia, wód Zalewu Szczecińskiego i Jeziora Dąbie. Analizom molekularnym poddano łącznie 682 próby.

Wyniki niniejszej pracy wskazują na rozszerzenie spektrum gatunkowego wirusa CEV o gatunek lina (*Tinca tinca (Linnaeus, 1758)*), uklei (*Alburnus alburnus (Linnaeus, 1758)*), płoci (*Rutilus rutilus (Linnaeus, 1758)*) i karasia (*Carassius carassius (Linnaeus, 1758)*), co przy założeniu pospolitego występowania tych gatunków w wodach naturalnych zasilających stawy karpiove stwarza zagrożenie powstawania dodatkowej ścieżki transmisji CEV.

Wykazano również powinowactwo do komórek skóry i nerki, w których określono dodatni tropizm wirusa. Stwarza to nowe możliwości diagnostyczne, które dotychczas zgodnie z wytycznymi Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (WOAH) oparte były tylko o skrawki skrzelii.

Na podstawie uliniowania i porównania sekwencji w obrębie genu odpowiedzialnego za syntezę białka 4a określono poziom ich zmienności genetycznej. Wynika z niego, że wirus CEV ulega systematycznym mutacjom a utworzenie dwóch wyodrębnionych kładów w drzewie filogenetycznym potwierdza wyodrębnianie się tzw. „polskich izolatów CEV”.

Na podstawie uzyskanych wyników zostaną przygotowane wytyczne dla Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (WOAH). W procedurach detekcji CEV autorka zasugeruje konieczność wykorzystania skóry i nerki. Ponadto, biorąc pod uwagę klady utworzone w drzewie filogenetycznym sekwencji wirusa CEV, do CEFAS w Wielkiej Brytanii, zostanie przesłana informacja o konieczności projektowania aktualnych starterów do reakcji PCR.

Summary

In Europe, common carp (*Cyprinus carpio Linnaeus, 1758*) is cultured mainly in earth ponds, i.e., artificial water reservoirs, usually fitting into natural concavities of the terrain. Factors, such as water supply from natural watercourses and the spawning material from elsewhere often contribute to outbreaks of fish diseases, including viral ones. Major threats to carp aquaculture are the koi herpes virus (KHV) and carp edema virus (CEV).

The aim of this thesis was a substantial broadening of our knowledge on the prevalence of the CEV virus in selected carp farms, assessment of the viral tropism, i.e., the susceptibility to carp cells and tissues, the evaluation of indirect detection methods (nested PCR, real-time PCR, *in situ* hybridization) and the analysis of the obtained sequences using the molecular evolution model.

A total of 16 fish species from 11 sites were studied, including 9 carp farms, and the waters of the Szczecin Lagoon and Lake Dąbie. A total of 682 samples were analyzed using molecular methods.

The results of this study indicate a broadening of the host specificity of CEV to cover also tench (*Tinca tinca (Linnaeus, 1758)*), common bleak (*Alburnus alburnus (Linnaeus, 1758)*), roach (*Rutilus rutilus (Linnaeus, 1758)*), and crucian carp (*Carassius carassius (Linnaeus, 1758)*), which, assuming the ubiquity of those species, might represent an additional transmission pathway of the CEV.

The presently reported CEV affinity to skin and kidney cells, where a positive viral tropism was detected, constitutes a new diagnostic option in addition to the gills, which organ has hitherto been recommended by the World Organisation for Animal Health (WOAH).

The level of genetic variation of CEV was determined based on the alignment and comparison of sequences within the gene responsible for protein synthesis initiation factor 4A. It shows that the CEV mutates at a steady rate and the two clearly delimited phylogenetic clades represent the so-called "Polish CEV isolates".

The presently reported results will be sent to the WOAH as a proposed amendment to the existing detection procedures of CEV. The newly suggested sampling organs would include the skin and kidney. The Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science (CEFAS) in the UK will be alerted about the need for up-to-date PCR primers.

Spis treści

1.	WSTĘP	11
1.1.	Biologia karpia	11
1.2.	Znaczenie gospodarcze karpia w Polsce	13
1.3.	Choroby wirusowe karpia	14
1.3.1.	Wiosenna wiremia karpia.....	15
1.3.2.	Koi-herpes-virus	16
1.3.3.	Ospa karpi.....	18
1.3.4.	Martwica układu krwiotwórczego karasi	18
1.3.5.	Carp edema virus disease (CEVD), śpiączka karpi koi (Koi sleepy disease, KSD).....	18
2.	CEL PRACY	20
3.	MATERIAŁ I METODY	21
3.1.	Materiał do badań.....	21
3.2.	Metodologia analiz molekularnych	24
3.2.1.	Izolacja DNA	24
3.2.2.	Amplifikacja	26
3.2.2.1.	PCR	26
3.2.2.2.	Real-Time PCR	27
3.2.2.3.	Sekwencjonowanie i analiza sekwencji.....	27
3.2.2.4.	Hybrydyzacja <i>in situ</i>	27
3.3.	Opracowanie bioinformatyczne wyników.....	29
4.	WYNIKI.....	30
4.1.	Występowanie CEV. Tropizm wirusa CEV	30
4.1.1.	Nested PCR	30
4.1.2.	Real-Time PCR	32
4.1.3.	Hybrydyzacja <i>in situ</i>	32
4.2.	Molekularna analiza sekwencji wirusa CEV.....	40
5.	DYSKUSJA	47
6.	WNIOSKI	52
7.	LITERATURA.....	53

1. WSTĘP

1.1. Biologia karpia

Karp (*Cyprinus carpio*) jest gatunkiem szeroko rozprzestrzenionym w wodach Azji, które uchodzą za ojczyznę tego gatunku. W wodach Europy występuje w odmianie dzikiej i udomowionej. Jako gatunek bardzo odporny na ekstremalne warunki środowiskowe znosi zarówno upalne lata jak i bardzo mroźne zimy. Jest to cecha, która ma ogromne znaczenie w polskiej strefie klimatycznej (Wojda, 2004). Klasyfikacja taksonomiczna karpia przedstawia się następująco:

Typ: strunowce Chordata
 Podtyp: kręgowce Vertebrata
 Gromada: ryby Pisces
 Podgromada: kostnoszkieletowe Osteichthyes
 Rząd: karpiokształtne Cypriniformes
 Podrząd: karpowce Cyprinoidei
 Rodzina: karpowate Cyprinidae
 Rodzaj: karp *Cyprinus*
 Gatunek: karp *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758.

Forma dzika karpia, nazywana sazanem, pochodzi z Dunaju. Udomowione karpie hodowane w stawach i jeziorach można rozróżnić po odmiennym kształcie ciała. Cechami łączącymi obie odmiany są stosunkowo mała głowa o końcowym otworze gębowym i grubymi wargami z wysuwanymi górnymi szczękami. Charakterystyczne są dwa jasne, długie wąsiki i dwa ciemne, krótkie widoczne w kącikach górnej wargi (Brylińska, 1986).

Kształt i ułuszczenie karpia udomowionego są niejednolite. Odmiany karpia hodowlanego powstały według trzech kryteriów. Pierwszym z nich jest wskaźnik wygrzbiecienia, który służy głównie przy rozróżnianiu ras. Kolejnym jest barwa i ułuszczenie będące cechami głównymi przy rozróżnianiu odmian. Ostatnim z nich jest obraz elektroforetyczny krwi.

W odpowiednich warunkach pokarmowych odznacza się szybkim wzrostem, wysokim grzbietem, małym, ostrym łbem i szerokim i krótkim trzonem ogona. Patrząc na ubarwienie, karp hodowlany jest nieco jaśniejszy od dzikiego. W zależności od ułuszczenia, na podstawie fenotypu możemy rozróżnić trzy odmiany. Pierwszą z nich jest karp drobnołuski, którego cała powierzchnia ciała jest pokryta jednakowej wielkości łuskami, tak jak ma to miejsce u sazana. Kolejną odmianą jest karp lustrzeń, który posiada mniej łusek, lecz są one duże i różnie rozmieszczone. Ostatnią odmianą jest karp bezłuski, który całkowicie pozbawiony jest pokrywy łuskowej (Wojda, 2004).

W bardzo korzystnych warunkach potrafi osiągnąć 600 g w pierwszym roku życia, 1500 g w drugim a w trzecim 2500 g. Jest rybą niedrapieżną, dzięki czemu można prowadzić chów w gęstych, różnowiekowych a nawet mieszanych i wielogatunkowych obsadach. Karp dobrze wykorzystuje pokarm naturalny, żeruje na dnie zbiornika i odżywia się zooplanktonem i fauną naroślinną. Żywi się ziarnami roślin uprawnych jak również pełnowartościową paszą. Samce karpia osiągają dojrzałość płciową w trzecim roku a samice w czwartym.

Istotne znaczenie w utrzymaniu prawidłowego wzrostu i zdrowia hodowanych ryb ma prawidłowe odżywianie oraz wyprowadzanie udoskonalonych linii i stad tarłowych. Badania mające na celu poprawę zdrowotności karpia prowadzone są od lat. Szczególnie dużą szansę dają prace ukierunkowane na zwiększenie odporności na patogeny w drodze selekcji genetycznej.

Różnorodność strategii żywieniowych może istotnie wpływać na zdrowie ryb. Dostosowanie określonych poziomów składników odżywczych w diecie ryb jest niezmiernie ważne, gdyż poprzez niedobór witamin i minerałów zagrożona jest immunokompetencja i odporność na choroby (Halver, 1954 w Jurecka, 2008). Obniżona odporność sprzyja występowaniu zakażeń oportunistycznych. W celu zapobiegania infekcjom należy zapewnić zbilansowaną dietę bogatą w wiele mikroelementów m.in. jonów metali. Pasze stosowane w intensywnej akwakulturze są często bogate w składniki antyodżywcze, takie jak fityniany i polifenole, hamujące wchłanianie żelaza i innych jonów metali. Żelazo odgrywa ważną rolę w funkcjach limfocytów związanych z odpornością na choroby zakaźne, jak i w generowaniu odpowiedzi immunologicznej. Żelazo transportowane jest we krwi dzięki wiązaniu transferryny (Tf), kompleks taki pobierany jest przez komórki przy pomocy receptorów transferynowych (TfR). W celu zbadania mechanizmów konkurencji o żelazo pomiędzy patogenem a rybą, Jurecka (2008) wykorzystwała model chorobowy, stosując naturalnego, żyjącego we krwi i płynach ustrojowych karpia (*Cyprinus carpio*) pasożyta *Trypanoplasma boreli*. U karpia transferryna jest wysoce polimorficznym białkiem. Jego allele można zidentyfikować podczas natywnej elektroforezy w żelu poliakrylamidowym. Powyższe badania miały na celu skorelowanie polimorfizmu Tf z funkcją wiązania żelaza oraz jej wpływu na odpowiedź immunologiczną.

W badaniach *in vivo*, pięć genetycznie odległych linii hodowlanych karpia - polskiego „R2” i „K”, ukraińskiego „Or” węgierskiego „RO” i izraelskiego „D” zakażono *Trypanoplasma boreli*. Okazało się, że genotypy Tf mogą wpływać na odporność oraz związek genotypu DD transferryny z niskim zapasożyceniem w dwóch odpornych liniach karpia: polskich „R2” i „K” oraz odwrotna zależność w najwrażliwszej linii izraelskiej „D”. Jurecka (2008) wykazała, że pasożyty żyły krócej w pożywce pozbawionej Tf co wykazało, że transferryna jest kluczowym elementem ich namnażania.

Ruzauskas i in. (2021) zajęli się porównaniem różnic w odmianach drobnoustrojów u karpia pochodzącego z różnych środowisk: sazana i karpia hodowanego w otwartych stawach. Ich prace wykazały, że w jelitach sazanów było ponad 2,5 razy więcej gatunków bakterii w porównaniu z rybami hodowlanymi. Zidentyfikowano ponad 400 gatunków bakterii, w większości uznawane za pożyteczny mikrobiom. Okazało się również, że ryby z hodowli zawierały więcej bakterii, traktowanych jako patogeny ludzi i zwierząt. Istotne różnice mikrobiologiczne zaobserwowano we wszystkich rangach taksonomicznych, w tym u przedstawicieli rodzin takich jak Moraxellaceae, Flavobacteriaceae i Staphylococcaceae. Częstość występowania oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe we wskaźnikach bakteryjnych była bardziej powszechna u ryb z hodowli niż u ryb dzikich, dlatego hodowla ryb może być potencjalnym źródłem zanieczyszczenia środowiska bakteriami opornymi na środki przeciwdrobnoustrojowe.

Ødegård i in. (2010) podjęli się analizy szczepów karpia pod kątem odporności na herpeswirusa koi (KHV) i *Aeromonas hydrophila*. Przebadano ryby pochodzące z tej samej populacji, będące potomstwem wyprowadzonym przez Fish Biology Department at the Research Institute of Fisheries, Aquaculture and Irrigation (HAKI) w Szarvas na Węgrzech. Pochodziły z czterech różnych szczepów pochodzących z banku genów żywych karpia pospolitego (Gorda i in., 1995 w Ødegård, 2010). Wybrano dwa dzikie szczepy - Duna i Amur - będące rodzimymi w rzekach Dunaj i Amur. Ponadto przebadano dwa szczepy hodowlane - Tata i Szarvas15. Szczep wsobny Tata został wyselekcjonowany ze względu na szybki wzrost i okrągły kształt ciała a Szarvas15 ze względu na wysoką heterozję w krzyżówkach. Szczep Szarvas15 miał najniższą przeżywalność (0%) na infekcję KHV. Następne w kolejności były szczepy Amur (11%), Duna (12%) i Tata (21%). W przypadku *A. hydrophila* najniższą przeżywalność zaobserwowano dla szczepów Duna (28%), Amur (31%), Szarvas15 (38%) i Tata (48%).

Kadhim (2009) zbadał odporność karpia na zakażenie *Lernaea cyprinacea* w warunkach laboratoryjnych w okresie 10 tygodni. Ryby, które wcześniej były zarażone naturalnie i zostały użyte w następnym eksperymencie po tygodniu od całkowitego wyzdrowienia okazały się najbardziej odporne na infekcję (50%). Z kolei u ryb wyleczonych z zakażenia i wykorzystanych w następnym eksperymencie po miesiącu od całkowitego wyzdrowienia poziom zarażenia wzrósł do 72,7%. Najgorszy rezultat (78,5%) uzyskano w grupie kontrolnej, czyli u ryb bez wcześniejszego zakażenia *Lernaea*. Badania Kadhima potwierdzają hipotezę, że infekcja *Lernaea cyprinacea* wytwarza nabytą odporność na tego pasożyta u karpia, ale odporność ta nie utrzymuje się długo i nie jest w stanie zapobiec ponownemu zakażeniu.

1.2. Znaczenie gospodarcze karpia w Polsce

Historia akwakultury karpiowej w stawach ziemnych liczy w Polsce kilkaset lat. Przez wiele lat doskonalono hodowlę dbając jednocześnie o zachowanie ich tradycyjnego kilkuletniego cyklu produkcyjnego uzależnionego głównie od panujących warunków termicznych. Karp żywi się głównie naturalnym pokarmem rozwijającym się w zbiorniku, ale zalecane jest również karmienie ryb nieprzetworzonym zbożem. Stopień intensyfikacji produkcji zwykle oscyluje w granicach 700-1000 kg/ha (Lirski, 2007). Ocenia się, że chów karpia jest prośrodowiskowy i proekologiczny. Karp charakteryzuje się dużą wytrzymałością na deficyty tlenowe. Ryby łatwo adaptują się do zmiennych temperatur, w Polsce determinowanych zmianami pór roku.

Akwakulturę karpia prowadzi się w Europie głównie w stawach, czyli sztucznych zbiornikach wodnych wykorzystujących zwykle naturalne ukształtowanie terenu. Niekiedy hodowle prowadzi się w sadzach rzecznych, wykorzystując podgrzane wody pochodnicze pochodzące z elektrowni (Antychowicz, 2004).

Dzięki publikowanym corocznie badaniom statystycznym, polegającym na analizie kwestionariuszy RRW-22, możemy zaobserwować, że karp oraz pstrągi i inne łososiowate stanowią główne filary akwakultury w Polsce. Łączna produkcja ryb w 2021 roku wynosiła 43,80 tys. ton. Hodowla karpia stanowiła 17,40 tys. ton. Tym samym udział karpia zmniejszył się do 40%, natomiast udział pstrąga tęczowego wzrósł do niemal 47%. Jeszcze w 2020 roku oba gatunki miały niemal równy udział w całkowitej produkcji akwakultury w Polsce (Myszkowski, 2022). W ostatnim dziesięcioleciu produkcja karpia wahała się od 14,43 tys. ton w 2011 roku do 21,14 tys. ton w roku 2020. Dla porównania w latach 2013-2020, hodowla pozostałych gatunków akwakultury wyłączając pstrągi i inne łososiowate wahała się od 2,6 do 4,47 tys. ton (Lirski, 2021). Pomimo stagnacji i utrzymywaniu się produkcji na podobnym poziomie około 20. tys. ton, widać jak ważny element polskiej akwakultury stanowi właśnie produkcja karpia. Najwyższe zapotrzebowanie na karpia przypada w Polsce w końcowej fazie sprzedaży grudniowej, co wiąże się z chrześcijańską tradycją spożywania karpia w święta Bożego Narodzenia. W trakcie kilkunastu dni grudnia sprzedaje się około 80% rocznej produkcji karpia (Lirski, 2008). Dochodzi do sytuacji, że na kilkadziesiąt godzin przed wigilią świąt Bożego Narodzenia w wielu punktach w kraju brakuje zaopatrzenia a hodowcy importują karpia z krajów ościennych. Ostatnimi laty, obok Niemiec, Polska pomimo krajowej wysokiej produkcji jest też największym importerem karpia w Unii Europejskiej i przyjmuje nadwyżki produkcyjne z Węgier, Czech czy Litwy Import karpia w Polsce wynosi ok. 3-4 tys. ton (Lirski i Hryszko, 2013). Hryszko w swoim aktualnym opracowaniu (2023) podaje, że według danych Eurostat i informacji o eksporcie ryb karpiowatych poszczególnych państw Unii Europejskiej do Polski, import tych ryb w roku 2022 był zdecydowanie wyższy od deklarowanego przez krajowe podmioty i wyniósł 4,74 tys. ton. Należy zauważyć, że aż 4 tys. ton pochodziło z Czech. Jak wskazują

dane krajowe import w tym samym roku miałby wynieść 2,01 tys. ton. Wartość sprowadzanych do Polski ryb tylko w roku 2022 szacuje się na około 66 mln zł (Hryszko, 2023).

Ceny karpia w latach 2014 – 2021 wahały się od 8,38 zł/kg do 13,86 zł/kg (Myszkowski, 2022). Dla porównania średnia ważona cena wszystkich ryb polskiej akwakultury w roku 2020 wyniosła 11,88 zł/kg. Sprawia to, że karp jest ciągle atrakcyjny cenowo dla konsumenta. Ze względu na rosnące koszty produkcji i sezonowość sprzedaży spadają zyski producentów. Zmieniające się proporcje udziału karpia spowodowane są wzrostem produkcji innych gatunków ryb w akwakulturze intensywnej (Lirski i Myszkowski, 2017). W takiej sytuacji hodowcy zmuszeni są do prowadzenia rygorystycznych działań związanej z profilaktyką chorób ryb czy stosowaniem zasad dobrej praktyki rybackiej. Minimalizują one ryzyko wystąpienia chorób a tym samym obniżają ryzyko masowych śnięć w gospodarstwach. Konkurencja na rynku przetwórstwa rybnego, powoduje zainteresowanie konsumenta gatunkami o niższej cenie detalicznej i lepszych właściwościach prozdrowotnych produktu finalnego. Karp jako gatunek spożywany okazjonalnie, w ponad 90% gospodarstw domowych jedynie przy okazji świąt, nie jest w stanie przebić się przed gatunki uznawane za bardziej wykwintne, takie jak łosoś, pstrąg czy jesiotr. Obecny trend w sekcji sprzedaży gatunków słodkowodnych wskazuje na preferencje konsumentów uznające ryby sprzedawane w formie wstępnie przygotowanej do spożycia (filet odkórzony, ewentualnie dzwonek). W tej sytuacji producenci karpia muszą znaleźć nowe sposoby na utrzymanie konkurencyjności swojego produktu. Pomijając aspekt ekonomiczny pozostaje kwestia środowiskowa, czyli ograniczanie produkcji karpia poprzez presję kormoranów oraz choroby. W szczególności problem stanowią pojawiające się w środowisku nowe choroby wirusowe. Jest to szczególnie niebezpieczne ze względu na brak diagnostyki, szybki przebieg infekcji, który we wstępnej fazie, często jest bezobjawowy, przez co powoduje masowe śnięcia.

1.3. Choroby wirusowe karpia

W stawach zasilanych wodą z różnych zlewni mogą występować odmiennie zespoły chorobowe. Jednym z głównych zagrożeń dla akwakultury są wirusy. Które przenoszą się zarówno przez kontakt bezpośredni, polegający na ocieraniu się ryb, ale także za pośrednictwem wody a właściwie zawartych w niej cząstek organicznych takich jak śluz ryb, fragmenty naskórka i płetw. Objawy kliniczne często pojawiają się dopiero w końcowych stadiach infekcji co sprawia, że rozwój choroby na danym obszarze jest praktycznie nie do zatrzymania. Przykładem może być epidemia KHV w Polsce. Stała się ona sztandarowym przykładem braku odpowiednio szybkiej reakcji środowiska naukowego i weterynaryjnego w Polsce na nowy czynnik patogenny, którego obecność sygnalizowano uprzednio w innych krajach europejskich.

Wytrzymałość karpia na niesprzyjające warunki środowiskowe jest jednocześnie jego wadą i zaletą. Dobór nieodpowiedniej metody transportu, brak kwarantanny, zbyt gęste obsady, zaniechanie konserwacji i odkażania zbiorników, stosowanie sprzętu bez uprzedniej dezynfekcji, nagła zmiana warunków środowiskowych mogą skutkować większym ryzykiem wystąpienia chorób a nawet śnięć. Wyżej wymienione czynniki rzadko występują samodzielnie. Zwykle są ze sobą w pewien sposób powiązane działając na ryby szczególnie dotkliwie. Nie można pominąć faktu o dużym znaczeniu jakości pokarmu dostarczanego poszczególnym grupom wiekowym ryb. Istotna jest również podwodna fauna i flora zbiornika, mająca pozytywny lub negatywny wpływ na rozwój bazy pokarmowej dla karpia. Mało zróżnicowane biologicznie środowisko stawów hodowlanych w połączeniu z bardzo dużym zagęszczeniem obsad powoduje wybuch wielu groźnych chorób. Reakcja organizmu ryby na stres i wszelkie wywołane tym zmiany w organizmie określa się jako ogólny

syndrom adaptacyjny GAS (ang. general adaptation syndrom), którego składowymi są reakcja alarmowa stadium oporu, czyli próba utrzymania przez zwierzę homeostazy oraz stadium wyczerpania, gdy mechanizmy adaptacyjne zawodzą. Stres wywołany jest również przez związki toksyczne oraz choroby. Antychowicz (2017) potwierdza występowanie 32. chorób zakaźnych i inwazyjnych u karpia w Europie. Wywołuje je kilka typów drobnoustrojów: SVCV (*Rhabdovirus carpio*), KHV (CyHV-3), ospa karpia (CyHV-1), wirus martwicy układu krwiotwórczego karasi (CyHV-2) oraz śpiączki karpia koi – KSD (CEV).

1.3.1. Wiosenna wiremia karpia

Wiosenna wiremia karpia (spring viraemia of carp, SVC) znana jest również pod nazwą posocznica karpia. Jest zaraźliwą chorobą zarówno karpia jak i karpiołatach. SVC jest wywoływana przez *Rhabdovirus carpio* (Ruszczuk, 2004) należący do rodziny *Rhabdoviridae* (wirusy RNA). Wiosenna wiremia karpia występuje w Stanach Zjednoczonych oraz w Europie, gdzie znajduje się na liście dyrektywy unijnej (Council Directive 91/67/EEC of 28 January 1991, concerning the animal health conditions governing the placing on the market of aquaculture animals and products) i podlega w Polsce rejestracji (Ustawa z dnia 11 marca 2004 r. o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt (Dz. U. z 2004 r. nr 69, poz. 625).

Ahne i in. (2002) oraz Dixon (2008) wyizolowali wirusa z pasożytniczych bezkręgowców splewki karpiowej (*Argulus foliaceus*) i pijawki rybiej (*Piscicola geometra*). Potencjalnymi wektorami są również ptaki żywiące się rybami.

Czaple siwe (*Ardea cinerea*) były karmione karpiami zakażonymi SVCV oraz zmuszane do zwracania ryb w różnych odstępach czasu po karmieniu. Eksperyment ten wykazał obecność wirusa w zwracanych rybach 120 min po karmieniu. Gatunki spełniające kryteria umieszczenia na liście jako podatne na zakażenie SVCV zgodnie z rozdziałem 1.5. Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code) (Kodeksu Zdrowia Zwierząt Wodnych (Kodeks Wodny)) to leszcz (*Abramis brama*), tołpyga pstra (*Aristichthys nobilis*), karaś złoty (*Carassius auratus auratus*), amur biały (*Ctenopharyngodon idella*), wszystkie odmiany i podgatunki karpia (*Cyprinus carpio*), danio przegowany (*Danio rerio*), wzdręga (*Notemigonus crysoleucas*), strzebla grubogłowa (*Pimephales promelas*), Caspian white fish (*Rutilus kutum*), płoć (*Rutilus rutilus*) i sum europejski (*Silurus glanis*). Gatunki, dla których nie ma pełnych dowodów na wrażliwość zgodnie z rozdziałem 1.5. Kodeksu Wodnego to: karaś pospolity (*Carassius carassius*), szczupak pospolity (*Esox lucius*), traszka chińska (*Cynops orientalis*), tołpyga biała (*Hypophthalmichthys molitrix*) i okoń żółty (*Perca flavescens*). Ponadto zgłoszono pozytywne wyniki reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) dla patogenu, ale nie wykazano aktywnego zarażenia u następujących organizmów: czukuczian biały (*Catostomus commersonii*), tilapia nilowa (*Oreochromis niloticus*), błyszczek (*Notropis atherinoides*), *Cirrhinus mrigala*, rohu (*Labeo rohita*), lin (*Tinca tinca*), krewetka biała (*Litopenaeus vannamei*), czawycza (*Oncorhynchus tshawytscha*), nerka (*Oncorhynchus nerka*) i pstrąg tęczowy (*Oncorhynchus mykiss*) (OIE). Wirus może przetrwać poza organizmem gospodarza przez okres pięciu tygodni w wodach płynących w temperaturze 10°C i ponad sześciu tygodni w osadach dennych w temperaturze 4°C oraz czterech dni w osadach w temperaturze 10°C (Ahne, 1976). Oprócz temperatury istotna jest też pora roku. Na wiosnę po odłowach choroba ma przebieg gwałtowny a jesienią przewlekły, o mniejszej śmiertelności. Wirus uwalniany jest do środowiska wraz z kałem, moczem, produktami płciowymi, złuszczeniem się naskórkiem skóry oraz przez skrzel. Głównie osobniki młode wykazują kliniczne objawy zakażenia. Nie oznacza to jednak, że wirus nie infekuje osobników dorosłych (OIE). SVCV wnika przez skrzel a

następnie rozprzestrzenia się do nerek, wątroby, serca, śledziony i przewodu pokarmowego. Podczas wybuchu choroby wysokie miana wirusa występują w wątrobie i nerkach zakażonych ryb. Znacznie niższe miana występują w śledzionie, skrzelach i mózgu (Dixon, 2008). Wirus został wykryty nawet w płynie jajnikowym (Bekesi, 1985). Objawy kliniczne zarażenia SVC możemy zaobserwować już przy 5-10°C, choroba rozwija się najszybciej w temperaturze 16-18°C, natomiast narybek może ulec zakażeniu nawet temperaturze 22-23°C (Ahne, 2002). Śmiertelność sięga aż 70% u młodych osobników i 30% u ryb starszych. Objawami klinicznymi zakażenia jest letarg, zbieranie się ryb w okolicy odpływów, wybroczyny i bladeść skrzel, wytrzeszcz i wybroczyny gałek ocznych, wybroczyny na skórze oraz pociemnienie powłok skórnych, krwisty śluz z odbytu oraz powiększenie obrysu jamy ciała spowodowanego obrzękiem narządów wewnętrznych (Ahne, 2002; Goodwin, 2003). Wiosenną wiremię karpia można rozpoznać na podstawie objawów klinicznych, izolacji wirusa w hodowli komórkowej oraz metod molekularnych. Wystąpienie choroby w hodowli skutkuje jej zamknięciem w celu dezynfekcji, utylizacji martwych ryb, sterylizacji wapnem palonym oraz urzędowym zgłoszeniem wystąpienia choroby.

Bauer i Faktorowicz (1969) stwierdzili występowanie pierwszych przypadków SVC na terenie Rosji, Niemiec i Polski już w 1930 roku. Przypuszczalnie, wiosenna wiremia karpia zaczęła powodować masowe śnięcia w czasach wprowadzenia intensywnego systemu hodowli. Duży wpływ mógł mieć brak prawidłowego żywienia i zaawansowanych technik hodowlanych. Do roku 1996 wiosenną wiremię karpia rozpoznawano na podstawie objawów klinicznych i zmian anatomopatologicznych. W roku 1996 w Zakładzie Chorób Ryb Państwowego Instytutu Weterynaryjnego zaczęto przeprowadzać badania wirusologiczne, które pozwoliły potwierdzić obecność wirusa *Rhabdovirus carpio* w kilku obiektach rybackich. W celu identyfikacji wirusa zastosowano bezpośrednią metodę ELISA. W roku 1999 pierwszy raz w Polsce wyizolowano wirusa w ciągłej linii komórkowej EPC, następnie zidentyfikowano przy pomocy metody ELISA. W tym samym czasie potwierdzono obecność rabdowirusa za pomocą mikroskopu elektronowego (Antychowicz, 2004). W ostatnich latach zaobserwowano spadek zachorowań na SVCD. Przyczyną tego może być zwiększenie świadomości hodowców. Nieliczne przypadki choroby są diagnozowane przez laboratoria Zakładu Higieny Weterynaryjnej, głównie w Bydgoszczy oraz Zakład Chorób Ryb Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach (ZCHR PIWet-PIB). Może to również wynikać z niezgłaszania do laboratoriów przypadków zachorowań i nie przesyłania do badań ryb z objawami. Wykluczając ostatnie przyczyny można stwierdzić, że choroba zostaje powoli wyeliminowana z Polski (Maj-Paluch i in., 2019). Udoskonalenie metod hodowli oraz mechanizacja, która pozwala na utrzymanie odpowiednich warunków środowiskowych w stawach spowodowały że SVCD występuje rzadko w profesjonalnych gospodarstwach rybackich, ale wciąż często stwierdzana jest w zaniedbanych hodowlach i amatorskich stawach (Antychowicz, 2014).

1.3.2. Koi-herpes-virus

Infekcję koi herpeswirusa, koi herpesvirus disease (KHVD) powoduje wirus należący do rodziny Herpesviridae nazywany przez Międzynarodowy Urząd do Spraw Epizootii (OIE), herpeswirusem koi (KHV) a także cyprinus herpesvirus 3 (CyHV-3). Należy do grupy wirusów, u których materiałem genetycznym jest DNA. Powoduje ostrą i zaraźliwą wiremię u wszystkich odmian karpia (Haenen, 2004). Według Crane i in. (2004) wirus występuje w Polsce, Wielkiej Brytanii, Belgii, Danii, Niemczech, Holandii, Szwajcarii, Luksemburgu, Włoszech, Austrii, i Francji, w Ameryce (Stany Zjednoczone), w Azji (Izrael, Indonezja, Chiny, Taiwan, Japonia) i w Afryce (RPA).

Karpie mające styczność z wirusem są do końca życia jego nosicielami, stanowiąc tym samym zagrożenie wybuchem choroby w sprzyjających warunkach środowiska. Wirus jest spokrewniony z CyHV-2 oraz z wirusem ospy karpiowej CyHV-1. Z czynników środowiskowych mających wpływ na wirusa, najbardziej istotna jest temperatura. Większość epizootcji występuje wiosną i jesienią w temperaturze 18–26°C (Bretzinger, 1999, Hedrick, 2000). Wirus najszybciej replikuje się w temperaturze 20–25°C, zaś nie replikuje się w temperaturze powyżej 30. i poniżej 4°C (Gilad, 2003). Zgodnie z dyrektywą Rady Unii Europejskiej nr 2006/88/WE z dnia 24 października 2006 roku, wirus KHV wraz z SVC stanowi jednostkę chorobową zwalczaną z urzędu i podlegającą obowiązkowi zgłoszenia. Objawami klinicznymi są zmiany na skórze przypominające poparzenia środkami chemicznymi. Skóra staje się szorstka, w wielu miejscach występują ogniska martwicze z silnymi przekrwieniami. Charakterystyczny dla ostrej formy choroby jest obrzęk skrzelii. Są one blade lub szarawe z licznymi ciemnymi plamkami i ogniskami martwiczymi na listkach skrzelowych. Ryby stają się osowiałe, gromadzą się przy dopływie lub urządzeniach napowietrzających wodę, tracą apetyt. Zachorowalność jest bardzo wysoka, sięga aż 80-100%. Śmiertelność w zależności od temperatury oscyluje w granicach 70-80% przy 17°C a powyżej 20°C dochodzi do 100% (Bretzinger, 1999, Walster, 1999).

Gatunki spełniające kryteria umieszczenia na liście jako podatne na zakażenie KHV zgodnie Kodeksem Zdrowia Zwierząt Wodnych, publikowanego przez Międzynarodowy Urząd do Spraw Epizootii (OIE) to wszystkie odmiany i podgatunki karpia (*Cyprinus carpio*) oraz mieszańce karpia (np. karpiokarasie *Cyprinus carpio* × *Carassius auratus*, *Cyprinus carpio* × *Carassius carassius*). Gatunkami, dla których nie ma wystarczających dowodów, aby spełnić kryteria umieszczenia ich na liście jako podatne na zakażenie KHV są: karaś chiński (*Carassius auratus*), amur biały (*Ctenopharyngodon idella*) i karaś pospolity (*Carassius carassius*). Ponadto, zgłoszono pozytywne wyniki reakcji PCR i/lub hybrydyzacji *in situ* ale nie wykazano replikacji dla następujących gatunków: jesiotr rosyjski (*Acipenser gueldenstaedtii*), bester (hybryda sterlet *Acipenser ruthenus* × bieluga *Huso huso*), jesiotr ostronosy (*Acipenser oxyrinchus*), jaź (*Leuciscus idus*), płoć (*Rutilus rutilus*), lin (*Tinca tinca*), tołpyga biała (*Hypophthalmichthys molitrix*), kież zdrojowy (*Gammarus pulex*), śliz pospolity (*Barbatula barbatula*), jazgarz (*Gymnocephalus cernua*), okoń pospolity (*Perca fluviatilis*), szczeżuja wielka (*Anodonta cygnea*).

Istnieją liczne wyniki badań opisujące sposoby transmisji wirusa KHV przez organizmy wektorowe na gatunki wrażliwe. Badania przeprowadzone w Japonii wykazały obecność DNA wirusa w próbkach planktonu, w szczególności u gatunków z rodzaju Rotifera (Minamoto i in., 2011). KHV stwierdzono również metodą PCR u szczeżui wielkiej (*Anodonta cygnea*) i kieży (*Gammarus pulex*) (Kiełpiński i in., 2010) oraz u wędrownych dzikich kaczek z rodzajów Anas, Mareca, Spatula i Oxyura (Torres-Meza i in., 2020).

Po raz pierwszy w Polsce potwierdzono występowanie KHV w czerwcu 2004 roku (Bergmann i in., 2006). Detekcji dokonano na próbach karpia, które zostały dostarczone do analizy, do Rządowego Instytutu Chorób Wirusowych w Riems (Niemcy). Wirusa KHV wykryto w dwóch z trzech prób przy użyciu różnych testów PCR. Wyniki PCR potwierdzono metodą nested PCR i hybrydyzacji *in situ*. Kolejne testy przeprowadzono z wykorzystaniem tkanek skrzelii, mózgu i nerek. Próbkę pozyskano również od osobników, które przetrwały okres śnieć, i nie wykazywały klinicznych objawów choroby. Obecność DNA KHV przeprowadzono za pomocą technik PCR i nested PCR jak również za pomocą hybrydyzacji *in situ* przy użyciu różnych sond Bergmann i in. (2006), Kempter i in. (2008).

Szkody wyrządzone przez wirusa KHV stanowią zagrożenie dla stabilności ekonomicznej hodowli karpia w stawach. Według Karnai i Szűcs (2018) roczna produkcja karpia spadła w Polsce o 2,3%, głównie z powodu chorób koi herpeswirusowych (KHV).

1.3.3. Ospa karpia

Ospa karpia (Carp pox) wywoływana jest przez wirusa CyHV-1, należącego do rodziny Herpesviridae. Należy do grupy wirusów DNA i infekuje głównie karpie pospolite i inne karpowate (karasia pospolitego, hybrydy karpia pospolitego x karasia chińskiego) powyżej pierwszego roku życia (Rahmati-Holasoo, 2020). Jak wykazały badania wirus CyHV-1 nie powoduje śnięć amura czarnego (*Mylopharyngodon piceus*), amura białego (*Ctenopharyngodon idella*), tołpygi białej (*Hypophthalmichthys molitrix*) i leszcza (*Abramis brama*) (Su i Su, 2018). Schubert (1966) udowodnił, że czynnikiem etiologicznym tej choroby jest wirus opryszczki a nie wirus ospy. CyHV-1 został wykryty w rybach w większości krajów europejskich, USA, Izraelu, Rosji i części Azji (Chiny, Japonia, Korea i Malezja). CyHV-1 powoduje ostrą ogólnoustrojową śmiertelną chorobę u narybku. Wirus ma zdolność wzrostu w zakresie temperatur od 10-30°C. Ospa może występować w niskich i umiarkowanych temperaturach od późnej zimy do wczesnego lata. Objawia się przerostem naskórka. W jednym lub kilku miejscach mogą pojawić się plackowate zmiany. W skrajnych przypadkach gruby, mlecznobiały nalot może pokryć prawie całą rybę. W pierwszych etapach choroby rozrosty ospowe są płaskie, twarde i przejrzyste, później nabierają mlecznej barwy. Następstwem choroby jest zahamowanie wzrostu ryb a niekiedy nawet ich wychudzenie. Ciało zainfekowanego osobnika jest nienaturalnie giętkie i ma tendencje do odkształcania. Objaw ten wynika z braku związków mineralnych w organizmie ryb, zwłaszcza wapnia i fosforu w kościach. Ryby chore wykazują atonię mięśni (Antychowicz, 2004). Dorosłe osobniki, które przetrwają infekcję zostają bezobjawowymi nosicielami, wykazując sezonowe (zima/wiosna) przypadki przerostu naskórka lub pojawienia się narośli podobnych do brodawczaków, w temperaturze 9–16°C. (Radosavljević, 2017). Śmiertelność u wylęgu dwutygodniowego po zakażeniu eksperymentalnym może wynosić ponad 80%, natomiast w przypadku wylęgu czterotygodniowego osiąga poziom do 30%. (Antychowicz, 2004).

1.3.4. Martwica układu krwiotwórczego karasi

Martwica układu krwiotwórczego karasi (goldfish hemopoietic necrosis) wywoływana jest przez Herpeswirusa CyHV-2 (Antychowicz, 2014). Wirus infekuje ryby z rodzaju *Carassius*, czyli karasia złocistego *Carassius auratus auratus* i karasia srebrzystego *Carassius gibelio*. W 2019 roku wykryto jednak jego bezobjawowe nosicielstwo u karpia *pospolitego* (Panicz i in., 2019). Wirus rozprzestrzenił się w krajach Europy i Azji a także w Ameryce Północnej i Oceanii (Goodwin, 2006; Becker, 2014; Adamek, 2018). Objawami choroby są letarg, martwica skrzeli, bledność skóry ze śluzowatymi przypominającymi pęcherze krostami (Panicz i in., 2019). Wirus powoduje pogorszenie stanu nerek i wątroby prowadzące do śmierci ryb. Śmiertelność wynosi od 50 do 100% (Jeffery, 2007).

1.3.5. Carp edema virus disease (CEVD), śpiączka karpia koi (Koi sleepy disease, KSD)

Carp edema virus (CEV) został wyizolowany z karpia koi w Japonii w prefekturze Hiroshima i Niigata w 1974 r. Od tego czasu zaczął on poszerzać spektrum swojego występowania (Ono, 1986). W latach 90-tych uważano, że czynnikiem etiologicznym CEV jest wirus obrzęku karpia a w roku 2000 potwierdzono, że ten sam wirus powoduje śpiączkę karpia koi (koi sleepy disease -KSD).

(Matras i in., 2022). W Europie po raz pierwszy pojawił się w Anglii w 2009 r. (Way i in., 2017) a w roku 2012, również w Anglii po raz pierwszy stwierdzono obecność wirusa u karpia konsumpcyjnego. (Matras i in., 2022). W Polsce jego występowanie po raz pierwszy potwierdził Matras z zespołem (2017) dodatkowo definiując 3 odrębne polskie izolaty. Zgodnie z danymi Wspólnotowego Laboratorium Referencyjnego w zakresie chorób ryb, stwierdzono występowanie CEV w 2020 roku również w Anglii, Austrii, Belgii, Czechach, Włoszech, Węgrzech, Chorwacji, Danii, Francji, Holandii, Irlandii, Niemczech, Serbii i Polsce (Vendramin i Olsen, 2021). CEV należy do grupy poxwirusów. Wirus wykazuje powinowactwo do komórek epitelialnych skrzeli i skóry (Matras i in., 2022). CEV nie stanowi zagrożenia dla człowieka natomiast wywołuje stany chorobowe u wszystkich grup wiekowych karpia hodowlanych. Śmiertelność ryb powodowana CEV jest bardzo (80-100%), zwłaszcza u osobników młodych, podczas transportu do innej hodowli (Lewisch i in., 2015). Miyazaki i in. (2005) na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzili, że intensywny rozwój KSD następuje po 4-5 dniach od zainfekowania a śmiertelność może dochodzić do 76%. Śnięcia ryb spowodowane CEV w Japonii zaobserwowano przy temperaturze wody w granicach 13-25°C, zaś w Anglii około 6-9°C (Matras i in., 2022). Widocznymi objawami nienaturalnego zachowania się zainfekowanych ryb jest silny letarg. W takim przypadku ryby zbierają się pod powierzchnią wody z objawami duszności lub leżą na dnie stawu. Nietypowe zachowanie wynika ze spowolnienia procesów życiowych u ryb wskutek niedotlenienia, powstałego na skutek patologicznych zmian w skrzelach. U zarażonych ryb zaobserwowano również obrzęk i martwicę skrzeli, hiperplazję, zapadnięcie się gałek ocznych, wybroczyny na płetwach, zmiany patologiczne na skórze, często w okolicy jamy gębowej i odbytu, dodatkowo obrzęk całego ciała u osobników młodocianych (Antychowicz, 2017, Lewish, 2015). Wirus nie namnaża się w liniach komórkowych i do diagnostyki stosuje się techniki biologii molekularnej (Matras i in., 2022). Obecnie istnieją nieliczne badania dotyczące przebiegu epizootcji u ryb wrażliwych. Miyazaki i in. (2005) zaobserwowali, że kąpiel zakażonych CEV ryb w 0,5% roztworze chlorku sodu zapobiega rozwojowi postaci klinicznej i śnięciom ryb, zaś Seno i in. (2003) stwierdzili, że kąpiel karpia z objawami klinicznymi w roztworze soli, pozwoliła im zredukować liczbę śniętych ryb. Zmiany spowodowane namnażającym się wirusem CEV w skrzelach doprowadzają do upośledzenia gospodarki jonowej zaburzającej funkcjonowanie narządów, w konsekwencji doprowadzając do śnięcia. Kąpiel zakażonych ryb w roztworze soli znacznie szybciej przywraca prawidłowy poziom wewnętrznej homeostazy w porównaniu do ryb, niepoddanych kąpielem (Seno i in., 2003). W Polsce na podstawie badań Matrasa i in. w latach 2015-2017 wirusa CEV wykryto u karpia i karpia koi w wielu gospodarstwach rybackich. W 2015 roku CEV wykryto w rybach z 20 na 54 badanych obiektów hodowlanych, w 2016 roku w 14 na 67 w 2017 roku w 10 na 42, w 2018 roku w 13 na 55, w 2019 roku w 5 na 48, w 2020 roku w 1 na 50, w 2021 roku nie wykryto obecności wirusa w żadnym z 50 lokalizacji a w 2022 roku wirusa wykryto w 2 na 14 (Matras i in., 2022). Celem oceny potencjalnych wektorów wirusa Matras i in. (2019) przeprowadzili próbę eksperymentalną i uzyskali pozytywne wyniki dla uklei, karasia pospolitego, okonia europejskiego, karasia srebrzystego, płoci i lina. Te gatunki ryb były eksperymentalnie przetrzymywane z karpiami zakażonymi CEV w temperaturze 16°C.

2. CEL PRACY

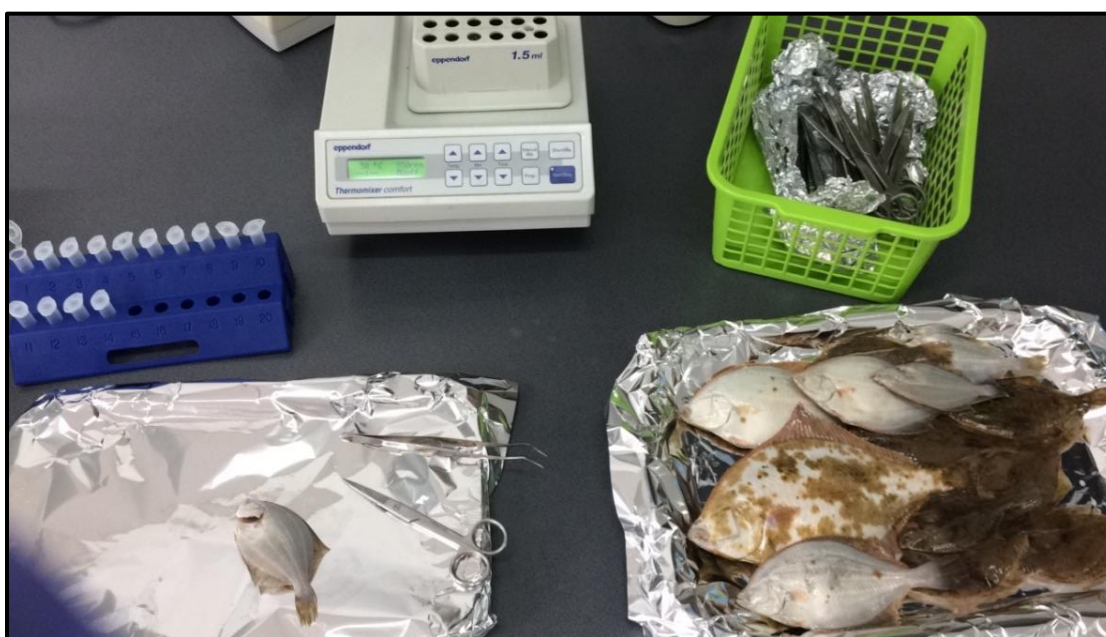
Celem pracy było określenie stopnia zainfekowania wirusem CEV karpia *Cyprinus carpio* oraz wybranych gatunków ryb pochodzących ze zlewni Odry i wytypowanych gospodarstw hodowli karpia. Brak danych dotyczących obecności CEV w zlewni Odry oraz brak możliwości określenia dróg rozprzestrzeniania się wirusa CEV pozwolił zdefiniować cele szczegółowe:

1. zdefiniowanie gatunków wektorowych wśród ichtiofauny umożliwiających transmisję poziomą wirusa w środowisku,
2. określenie tropizmu CEV poprzez zastosowanie hybrydyzacji *in situ*,
3. analiza pozyskanych sekwencji fragmentu genomu CEV w kontekście ewoluowania nowego izolatu w wodach Polski,
4. wskazanie potencjalnych ścieżek transmisji CEV w środowisku wodnym.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Materiał do badań

Materiał do badań wirusologicznych stanowiły ryby pozyskane z wód naturalnych i obiektów hodowlanych karpia w okresie wiosenno – jesiennym w 2017 i 2018 r. W 2017 roku zebrano łącznie 469 sztuk reprezentujących czternaście gatunków z siedmiu lokalizacji. Do gatunków tych należą: płoć (*Rutilus rutilus*) (n=101), sandacz (*Sander lucioperca*) (n=60), okoń (*Perca fluviatilis*) (n=76), babka śniadogłowa (*Neogobius melanostomus*) (n=8), karaś pospolity (*Carassius carassius*) (n=35), karp (*Cyprinus carpio*) (n = 114), certa (*Vimba vimba*) (n=12), rozpiór (*Ballerus ballerus*) (n=9), stornia (*Platichthys flesus*) (n=14), tołpyga pstra (*Hypophthalmichthys nobilis*) (n=6), lin (*Tinca tinca*) (n=5), sum europejski (*Silurus glanis*) (n=6), amur (*Ctenopharyngodon idella*) (n=21) oraz szczupak (*Esox lucius*) (n=2).



Rycina 1. Izolowanie DNA ze świeżego materiału (org).

Próby z Jeziora Dąbie (n=136) oraz Zalewu Szczecińskiego (n=148) pochodzą z odłowów komercyjnych prowadzonych przez lokalnych rybaków. Pozostałe pochodzą z pięciu gospodarstw hodowlanych: Gospodarstwo Rybackie 1 (GR1) (n=15), Gospodarstwo Rybackie 2 (GR2) (n = 39), Gospodarstwo Rybackie 3 (GR3) (n = 6), Gospodarstwo Rybackie 4 (GP4) (n = 58) i Gospodarstwo Rybackie 5 (GP5) (n = 67) (Tab. 1).

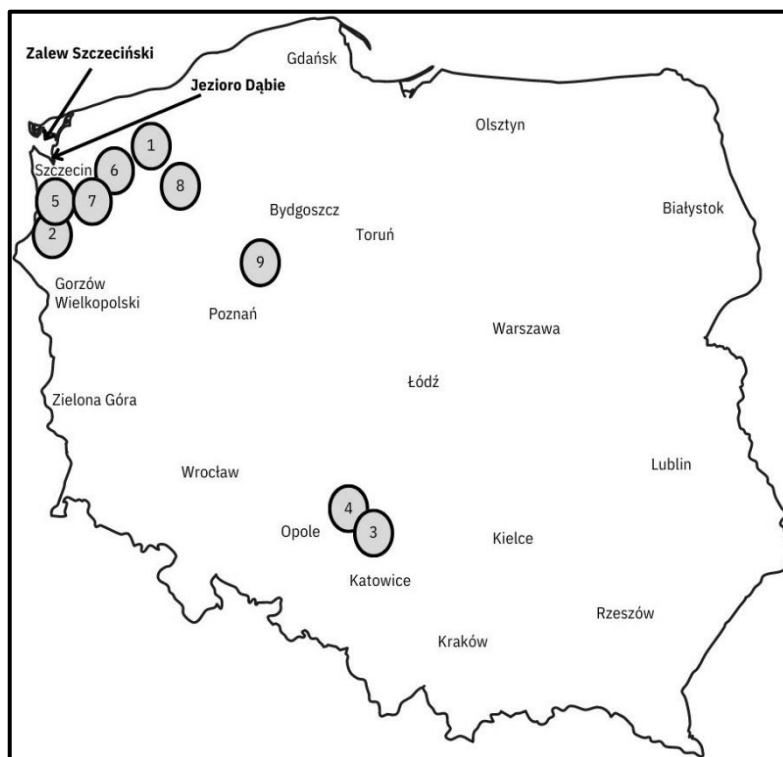
W 2018 roku zebrano łącznie 213 sztuk reprezentujących siedem gatunków ryb pozyskanych z siedmiu lokalizacji. Do gatunków tych należą: płoć (*Rutilus rutilus*) (n=10), lin (*Tinca tinca*) (n=10), karaś pospolity (*Carassius carassius*) (n=10), ukleja (*Alburnus alburnus*) (n=10), okoń (*Perca fluviatilis*) (n=10), karp (*Cyprinus carpio*) (n=119) i karp koi (*Cyprinus carpio koi*) (n=44). Próby z Zalewu Szczecińskiego (n=50) pochodzą z odłowów komercyjnych prowadzonych przez lokalnych rybaków. Pozostałe pochodzą z sześciu gospodarstw hodowlanych: Gospodarstwo Rybackie 2 (GR2) (n=90), Gospodarstwo Rybackie 5 (GR5) (n=13), Gospodarstwo Rybackie 6 (GR6) (n=15), Gospodarstwa Rybackiego 7 (GR7) (n=15), Gospodarstwa Rybackiego 8 (GR8) (n=15), Gospodarstwa Rybackiego 9 (GR9) (n=15) (Tab.2).

Tabela 1. Zestawienie lokalizacji i gatunków w sezonie badawczym w 2017r.

GATUNEK	Jezioro Dąbie	Zalew Szczeciński	GR1	GR2	GR3	GR4	GR5	SUMA
Płóć	50	48				3		101
Sandacz	36	24						60
Okoń	50	24				2		76
Babka śniadogłowa		8						8
Karaś pospolity		9		24		2		35
Karp			15	15		17	67	114
Certa		12						12
Rozpiór		9						9
Stornia		14						14
Tołpyga pstra					6			6
Lin						5		5
Sum europejski						6		6
Amur						21		21
Szczupak						2		2
SUMA	136	148	15	39	6	58	67	469

Tabela 2. Zestawienie lokalizacji i gatunków w sezonie badawczym w 2018r.

Gatunek	Zalew Szczeciński	GR2	GR5	GR6	GR7	GR8	GR9	SUMA
Płóć	10	-	-	-	-	-	-	10
Lin	10	-	-	-	-	-	-	10
Karaś pospolity	10	-	-	-	-	-	-	10
Ukleja	10	-	-	-	-	-	-	10
Okoń	10	-	-	-	-	-	-	10
Karp	-	46	13	15	15	15	15	119
Karp koi	-	44	-	-	-	-	-	44
SUMA	50	90	13	15	15	15	15	213



Rycina 2. Lokalizacje poborów ryb do badań. (Zarys mapy pobrany z strony internetowej fabrykapuzzli.pl, obrobiony graficznie przez Autora w programie canva.com).

Badania przeprowadzono łącznie na 682. rybach reprezentujących 16 gatunków z 11. lokalizacji w Polsce. W tabeli 3 przedstawiono wykaz obiektów hodowlanych i wód otwartych oraz liczebność prób.

Tabela 3. Wykaz przebadanych obiektów hodowlanych i wód otwartych oraz liczebność prób.

Lokalizacja	Liczebność
Jezioro Dąbie	136
Zalew Szczeciński	198
GR1	15
GR2	129
GR3	6
GR4	58
GR5	80
GR6	15
GR7	15
GR8	15
GR9	15

Zestawienie lokalizacji i gatunków w latach 2017 i 2018 obrazuje tabela 4. Po przetransportowaniu ryb do laboratorium z każdej pobierano fragmenty tkanek w celu wykonania badań pod kątem detekcji CEV. Materiał biologiczny umieszczano w jednorazowych probówkach typu Eppendorf 1.5 ml i schładzano do temperatury 4°C w przypadku krótkotrwałego

przechowywania do dalszych analiz. W przypadku długotrwałego przechowywania, materiał biologiczny zabezpieczano poprzez umieszczenie fragmentów tkanek w alkoholu izopropylowym ((CH₃)₂CHOH). Do czasu analiz materiał zakonserwowany w ten sposób przechowywano w temperaturze pokojowej.

Tabela 4. Liczebność pozyskanych ryb w zależności od gatunku i miejsca poboru w latach 2017-2018.

	Jezioro Dąbie	Zalew Szczeciński	GR1	GR2	GR3	GR4	GR5	GR6	GR7	GR8	GR9	SUMA
Płoć	50	58				3						111
Sandacz	36	24										60
Okoń	50	34				2						86
Babka śniadogłowa		8										8
Karaś pospolity		19		24		2						45
Karp			15	61		17	80	15	15	15	15	233
Karp koi				44								44
Certa		12										12
Rozpiór		9										9
Stornia		14										14
Tołpyga pstra					6							6
Lin		10				5						15
Sum europejski						6						6
Amur						21						21
Szczupak						2						2
Ukleja		10										10
SUMA	136	198	15	129	6	58	80	15	15	15	15	682

3.2. Metodologia analiz molekularnych

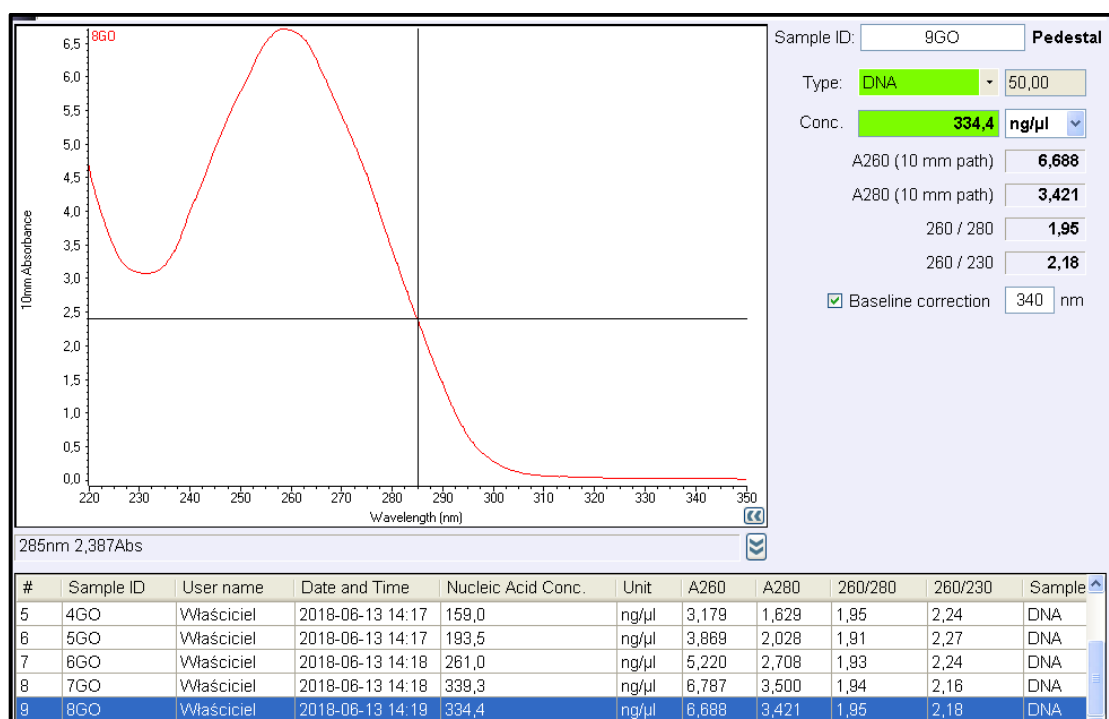
3.2.1. Izolacja DNA

Ekstrakcję DNA przeprowadzono przy użyciu zestawu Genomic Mini Kit (A&A Biotechnology, Polska), zgodnie z instrukcjami producenta dołączonymi do zestawu. Fragmenty skrzeli o masie 10-15 mg rozdrabniano i umieszczano w probówce reakcyjnej o pojemności 1,5 ml. Dodawano 100 µl buforu TRIS (Biotechnology, Polska), 50 µl roztworu lizującego LT (Biotechnology, Polska) oraz 20 µl proteiny K (Biotechnology, Polska). Następnie inkubowano w 50°C do całkowitego strawienia tkanki (około 3h). Próbkę mieszano poprzez worteksowanie. Czynność ta była wykonywana kilkakrotnie w trakcie procesu trawienia. Po zakończeniu etapu trawienia do próbek dodawano 150 µl roztworu lizującego LT i inkubowano przez 5 min w 70°C. Następnie próbki intensywnie worteksowano przez 20 s a potem wirowano przez 3 min przy 10

000rpm. Otrzymane w ten sposób supernatanty przenoszono na kolumny ze złożem krzemionkowym. Kolejnym etapem było oczyszczenie związanego na kolumnie materiału DNA, przez dwukrotne przemywanie kolumn buforem płuczącym A1 (Biotechnology, Polska) o objętości 500 ml oraz A2 (Biotechnology, Polska) o objętości 400 ml. Po każdorazowym dodaniu odczynnika próba była wirowana odpowiednio przez 1. i 2. min przy 10 000rpm. Osuszone minikolumny przenoszono do nowych probówek typu Eppendorf 1,5 ml. Proces elucji przeprowadzono podgrzany do 70°C buforem TRIS w objętości 200 ml. Próbkę inkubowano przez 2 min w temperaturze pokojowej a następnie wirowano przy 10 000rpm.

Ocenę uzyskanych izolatów DNA przeprowadzono za pomocą elektroforezy horyzontalnej. Rozdział izolatów wykonano w 1,5% żelu agarozowym. Roztwór z odmierzoną ilością agarozy BASICA GQT (Prona) jak i buforu TBE (Fermentas) podgrzewano do chwili uzyskania klarownej i jednorodnej cieczy, następnie studzono i dodawano bromek etydyny (EtBr, MP Biomedicals). Ciecz umieszczano w statywie formującym i po zastygnięciu żelu nanoszono po 8 ml izolatu, do każdej ze studzienek. Elektroforeza odbywała się w komorze Wide Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad) napełnionej buforem TBE (Fermentas) przy napięciu 80 V przez okres 45 min. Następnie żel umieszczano w systemie do wizualizacji Gel Doc XR (Bio-Rad) i prowadzono ocenę jakościową izolatów z wykorzystaniem programu Quantity One (Bio-Rad). Ocenę jakościową oraz czystość izolatów oceniano przy użyciu spektrofotometru NanoDrop 2000 UV (ThermoScientific).

Jakościowa i ilościowa analiza uzyskanych izolatów DNA wykazała, że metoda kolumnowa umożliwiła pozyskanie izolatów DNA charakteryzujących się wysokim stopniem czystości ($A_{260} / A_{280} = 1,8-2,0$) oraz odpowiednią koncentracją do przeprowadzenia kolejnych etapów diagnostyki molekularnej (Ryc. 3).



Rycina 3. Przykładowy wynik oceny jakościowej oraz czystości izolatów DNA.

3.2.2. Amplifikacja

3.2.2.1. PCR

Stwierdzenie zainfekowania pobranych tkanek CEV polega na potwierdzeniu występowania w nich sekwencji znanego fragmentu DNA kodującego białko rdzeniowe P4a przy użyciu standardowej procedury łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. Polymerase Chain Reaction – PCR) i nested PCR (Matras i in., 2017). Łańcuchowa reakcja polimerazy to technika powielania określonego fragmentu DNA, usytuowanego pomiędzy dwiema znanymi sekwencjami nukleotydów. Reakcja ta zachodzi *in vitro* i składa się z trzech powtarzalnych cykli. Pierwszym z nich jest denaturacja, kolejnym przyłączanie starterów i ostatnim wydłużanie łańcucha DNA (elongacja). Poszczególne etapy tworzące jeden cykl reakcji różnią się czasem trwania oraz temperaturą (Nowak i Gruszczyńska, 2007). Wszystkie etapy reakcji PCR przebiegały zgodnie z profilem termicznym opublikowanym u Matrasa i in. (2017). Pierwszym etapem była wstępna denaturacja w 95°C przez 5 min, następnie denaturacja w 95°C przez 1 min, przyłączanie starterów w 55°C przez 1 min, reakcja polimeryzacji w 72°C przez 1 min, końcowe wydłużanie przez 10 min oraz schłodzenie próbek do 4°C. Nested PCR (PCR „zagnieżdżony”) jest to rodzaj reakcji PCR, w którym przy użyciu dwóch par starterów, gdzie pierwsza para starterów, amplifikuje większy fragment DNA a druga para „zagnieżdżona” amplifikuje kolejny fragment, znajdując miejsce przyłączania w obrębie pierwszego. Matrycę dla starterów zagnieżdżonych stanowi produkt pierwszej reakcji PCR (Nowak i Gruszczyńska, 2007).

Fragment sekwencji DNA kodujący białko P4a wykrywano za pomocą reakcji nested PCR z użyciem starterów (tab. 5), zgodnie z metodyką opisaną przez Matrasa (2017).

Tabela 5. Startery użyte w celu wykrycia białka P4a w konwencjonalnym i nested PCR.

Nazwa startera	Sekwencja startera	Wielkość produktu PCR	Źródło
CEV for B	5'-ATGGAGTATCCAAAGTACTTAG-3'	528 pz	Matras i in. 2017
CEV rev J	5'-CTCTTCACTATTGTGACTTTG-3'	528 pz	
CEV for B - int	5'-GTTATCAATGAAATTTGTGTATTG-3'	478 pz	
CEV rev J - int	5'-TAGCAAAGTACTACCTCATCC-3'	478 pz	

Produkt reakcji PCR z użyciem starterów CEVforB/CEVrevJ został użyty jako matryca dla drugiej reakcji nested PCR z użyciem starterów CEVforBint/CEVrevJint. Startery zostały zsyntetyzowane przez firmę Genomed (Warszawa, Polska). PCR przeprowadzono w całkowitej objętości 25 ml przy użyciu GoTaq G2 Green MasterMix (Promega) (Tab. 6). Reakcje przeprowadzono w termocyklerze Mastercycler personal (Eppendorf). W każdej reakcji użyto próby negatywnej, zawierającej wodę zamiast matrycy oraz próby pozytywnej, którą stanowiło DNA wirusa CEV pozyskanego z laboratorium referencyjnego (Rządowy Instytut Chorób Wirusowych w Riems (Niemcy). Każdorazowo po zakończeniu reakcji produkty rozdzielano elektroforetycznie, zgodnie z procedurą opisaną dla rozdziału izolatów DNA.

Tabela 6. Skład mieszaniny PCR.

Woda demineralizowana (PCR grade)	GoTaq G2 Green Master Mix	Starter - F	Starter - R	Matryca DNA
6,5 ml	12,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	5 ml

Wyniki każdej reakcji PCR oceniano przez rozdzielenie produktów PCR w 1,5% żelu agarozowym, a pozytywne próby następnie sekwencjonowano dwukierunkowo techniką Sangera.

3.2.2.2. Real-Time PCR

Weryfikacja obecności DNA CEV w pozyskanych próbach została przeprowadzona metodą real-time PCR w Rządowym Instytucie Chorób Wirusowych w Riems (Niemcy) z wykorzystaniem zestawu firmy Roche (Niemcy). Real-time PCR różni się od innych metod PCR tym, że możemy dokonać analizy przyrostu produktów reakcji PCR po każdym cyklu reakcji, a więc w czasie rzeczywistym. Do analizy użyto starterów opisanych przez Matrasa (2017). Startery (tab. 7) zostały zsyntetyzowane przez firmę Genomed. Ta sama firma zaprojektowała i dostarczyła odpowiednie sondy. PCR przeprowadzono w całkowitej objętości 25 ml przy użyciu QuantiTect multiplex PCR NoROX kit (Qiagen) (Tab. 8). Od końca 5' sonda wyznakowana została barwnikiem fluorescencyjnym FAM. Na końcu 3' umieszczono wygaszacz fluorescencji BHQ-1. Reakcje przeprowadzono w termocyklerze Mx 30005 P QPCR system (Stratagene). W każdej reakcji wykorzystano również próbę pozytywną z Rządowego Instytutu Chorób Wirusowych w Riems.

Tabela 7. Startery użyte w celu wykrycia białka P4a w real-time PCR.

Nazwa startera	Sekwencja startera	Źródło
CEVqFor1	5'-AGTTTTGTAKATTGTAGCATTTCC-3'	Matras i in. 2017
CEVqRev1	5'-GATTCCTCAAGGAGTTDCAGTAAA -3'	
CEVqProbe1	5' -AGAGT TTGTTTCTTGCC ATACAAACT-3'	

Tabela 8. Skład mieszaniny do real-time PCR.

Woda destylowana (PCR grade)	GoTaq G2 Green Master Mix	Starter przedni - F	Starter wsteczny - R	Sonda TaqMan	Matryca DNA
6,25 ml	12,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,25 ml	5 ml

Oba protokoły – konwencjonalne PCR i real time PCR zostały opracowane w laboratorium CEFAS w Weymouth (UK) i są dostępne dla laboratoriów.

3.2.2.3. Sekwencjonowanie i analiza sekwencji

Dwukierunkowe sekwencjonowanie metodą Sangera zostało wykonane na zlecenie przez firmę Genomed. W Rządowym Instytucie Chorób Wirusowych w Riems (Niemcy) wykonano sekwencjonowanie metodą Sangera w przy użyciu kitu QIAquick Gel Extraction kit DNA Gel (QIAGEN, Niemcy).

3.2.2.4. Hybrydyzacja *in situ*

Detekcję wirusa przeprowadzono w 2018 roku z wykorzystaniem zestawu odczynników firmy Roche (Niemcy) zgodnie z akredytowaną metodyką opracowaną w laboratorium Rządowego Instytutu Chorób Wirusowych w Riems. Hybrydyzacja *in situ* (ISH) została wykonana przy pomocy sondy molekularnej, aby zlokalizować specyficzną sekwencję wirusa CEV w preparatach histologicznych. Materiałem do badań były tkanki ryb z GR2 (n=6) i z GR9 (n=1), wcześniej zidentyfikowane jako zarażone, zakonserwowane w izopropanolu. Do hybrydyzacji wykorzystano skrzela, skórę, nerkę i śledzionę z siedmiu ryb (tab. 9).

Tabela 9. Zestawienie próbek tkanek (nerka, śledziona, skrzela i skóra) karpia poddanych hybrydyzacji *in situ*.

Symbol gospodarstwa rybackiego	Oznaczenie laboratoryjne próby
GR 2	DC1
GR 2	DC1
GR 2	DC2
GR 2	DC2
GR 2	DC4
GR 2	DC4
GR 2	DC7
GR 2	DC7
GR 2	DC8
GR 2	DC8
GR 2	DC9
GR 2	DC9
GR 9	9SK
GR 9	9SK

Utrwalenie tkanek przeprowadzono zgodnie z metodą Davidsona. Dehydratację, impregnację i zatapianie wykonano maszynowo automatycznie (Tissue-TEK[®] VIP, Miles Scientific). Odpowiednio zakonserwowane preparaty pocięto na mikrotomie i przeniesiono na szkiełka podstawowe SILICAN-PREP[™] SLIDES (Sigma, Niemcy). Rejon zajścia reakcji na szkiełku obrysowano markerem PapPen (Faust Nord, Merck, Niemcy) mającym zapobiec wyptywaniu odczynników z badanej tkanki. Następnie w zaznaczonym polu traktowano próbę proteinazą K (Appligen, France) (100 mg/ml) zawieszoną w buforze TE (50 mM Tris, 10 mM EDTA), dodano po 200 µl na preparaty, po czym inkubowano je przez okres 20 min w łaźni wodnej o temperaturze 37°C. Próbki następnie przepłukiwano 99,8% alkoholem i zostawiono na 1min do wyschnięcia. Po wyschnięciu ponownie obrysowywano preparaty markerem PapPen (ryc. 4). Badane skrawki tkanek przykrywano szkiełkiem nakrywkowym i umieszczono na nagrzałej do temperatury 95°C płycie (Eppendorf Mastergradient) przez okres 5 min, w celu wywołania procesu denaturacji. Po denaturacji preparaty zostały gwałtownie schłodzone, poprzez umieszczenie ich na lodzie przez 2 min. Hybrydyzację *in situ* prowadzono w oparciu o dodane w ilości 5 µl homogenaty z tkanek miękkich izolowane z karpia koi i karpia hodowlanego.

Kolejno umieszczono szkiełka na całą noc w łaźni wodnej, gdzie w temperaturze 42°C zachodził proces hybrydyzacji. Roztwór do hybrydyzacji (po 200 µl na preparat) składał się z roztworu Denhardta, SSC (NaCl, cytrynian sodu, pH 7,0), BSA oraz sond molekularnych. Następnego dnia po ściągnięciu szkiełek nakrywkowych, płukano preparaty 0,4 x SSC (2 x 5 min) podgrzany do 42°C, aby usunąć związane niespecyficzne sondy. Preparaty po raz kolejny inkubowano w temperaturze 42°C przez okres 10 min. Roztwory DIG 1 ((0,1 M kwas maleinowy (11,61 g) Sigma, Niemcy, 0,15 M NaCl (8,766 g)) i DIG 2 (1 g reagentu z kitu DIG Nucleic Acid Detection Kit, Boehringer Mannheim, Niemcy w 100 ml buforu DIG1) posłużyły do wybarwień przeciwciał. Na badane tkanki naniesiono po 200 µl każdego z roztworów i inkubowano je 30 min pod folią w temperaturze pokojowej. Kolejnym etapem było zrównoważenie badanych sekcji roztworem DIG 3 (0,10 M Tris (12,11 g), 0,10 M NaCl (5,844 g), 0,05 M MgCl₂ (10,165 g)) przez 10 min w temperaturze pokojowej. Następnie zatrzymano proces odbarwiania używając roztworu DIG 4 (100 mM Tris-HCl, 0,001 M

EDTA). W celu zróżnicowania stopnia zainfekowania komórek użyto barwienia kontrastowego roztworem Bismarck Brown Y (Sigma, Niemcy). Umożliwia to obserwację zmian w komórkach nadając im odpowiedni kolor. Wysokie stężenie DNA wirusa można stwierdzić, w przypadku obserwowania zmian koloru fioletowo – czarnego a zmiany o kolorach czerwono – fioletowym świadczą o mniejszym stopniu zainfekowania przez wirusa.



Rycina 4. Poligony obrysowane z wykorzystaniem PapPen podczas hybrydyzacji *in situ*.

3.3. Opracowanie bioinformatyczne wyników

Produkty sekwencjonowania zostały poddane analizie bioinformatycznej przy użyciu programów Geneious Prime 8.0 (<https://www.geneious.com>) oraz BLAST-n, dostępny w bazie NCBI (National Center for Biotechnology Information), które pozwoliły ustalić poziom podobieństwa pomiędzy sekwencjami. W programie Geneious Prime uliniowano wszystkie uzyskane sekwencje wirusa CEV i na podstawie matrycy dystansów stworzono drzewo największej wiarygodności (ang. Maximum Likelihood). Analizę wyników hybrydyzacji *in situ* przeprowadzono z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego (Nikon Eclipse E-600). Dane opracowano i obliczano przy użyciu arkusza kalkulacyjnego programu Excel (Microsoft Office).

4. WYNIKI

4.1. Występowanie CEV. Tropizm wirusa CEV

4.1.1. Nested PCR

Najbardziej rozpowszechnionym białkiem rdzeniowym wirusa CEV występującym w wirionie jest główne białko rdzeniowe P4a. Ten polipeptyd jest syntetyzowany w późniejszych okresach podczas infekcji wirusowej (Heljasvaara i in. 2001). Białko 4a jest syntetyzowane jako prekursor o masie 102,5 kDa, który jest przetwarzany proteolitycznie do produktu o masie 62 kDa wraz ze składaniem wirionu. W celu identyfikacji szlaku, za pomocą którego P4a jest przekształcany w 4a, opracowano zestawy immunologiczne, specyficzne dla podregionów prekursora P4a i zastosowano je w połączeniu z procedurami mapowania peptydów i sekwencjonowania białek. Uzyskane wyniki sugerują, że prekursor P4a składający się z 891 aminokwasów jest rozszczepiany w dwóch miejscach, pomiędzy resztami 614 i 615 oraz 697 i 698. Zarówno duże białko 4a z końcem aminowym (reszty 1-614), jak i pochodzące z końca karboksylowego białko 23-kDa (reszty 698-891) staje się głównym składnikiem wirionu. Lokalizacja małego wewnętrznego peptydu (reszty 615-697) nie jest znana (Vanslyke i in. 1991). Rozdział elektroforetyczny produktów nested PCR wykazał obecność DNA genu P4a CEV w 22. na 682. próbach pozyskanych do badań. Pozytywne wyniki uzyskano dla 16. osobników karpia pochodzących z trzech lokalizacji (GR2, GR5 i GR9) oraz pięciu osobników lina, ośmiu osobników płoci, trzech osobników karasia i sześciu osobników uklei z Zalewu Szczecińskiego (tab.10, tab. 11).

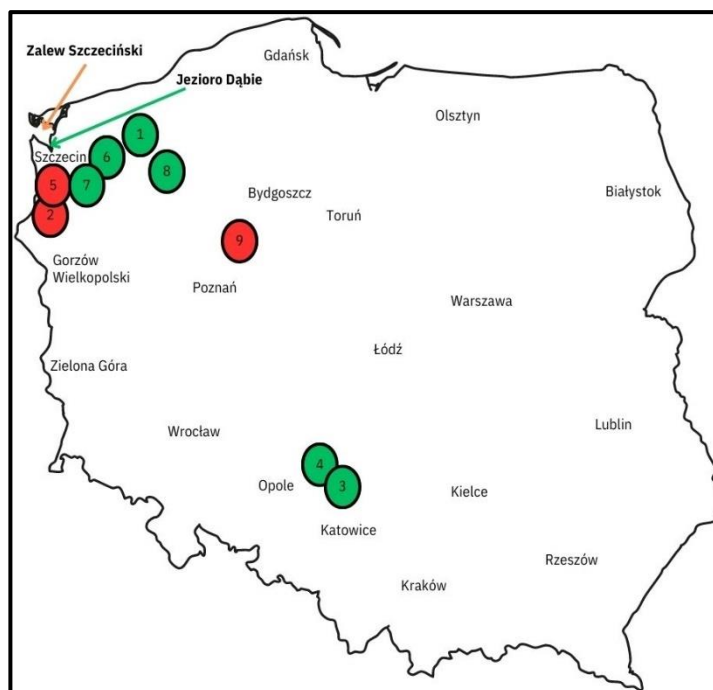
Tabela 10. Zestawienie gatunków ryb z potwierdzonym nosicielstwem CEV.

Gatunek	Nazwa łacińska	Odłowione sztuki	Potwierdzone nosicielstwo
Karp	<i>Cyprinus carpio</i>	233	16 (7%)
Lin	<i>Tinca tinca</i>	14	5 (36%)
Płoc	<i>Rutilus rutilus</i>	111	8 (7%)
Karaś pospolity	<i>Carassius carassius</i>	45	3 (7%)
Ukleja	<i>Alburnus alburnus</i>	10	6 (60%)

Tabela 11. Zestawienie lokalizacji z potwierdzonym nosicielstwem CEV.

Lokalizacja	Ilość zbadanych ryb	Potwierdzone nosicielstwo
GR2	129	14(11%)
GR5	80	1(1%)
GR9	15	1(7%)
Zalew Szczeciński	198	22(11%)

Próby dodatnie potwierdzono poprzez ich zsekwencjonowanie. Uliniowano sekwencje pozyskane z 16. osobników karpia (ryc. 21 i ryc. 22). W roku 2017 uzyskano pozytywne wyniki w pięciu próbach a w roku 2018 w jedenastu (tab. 12, tab. 13). W oparciu o pozytywny wynik reakcji nested PCR z uwzględnieniem kontroli pozytywnej można uznać wynik dla lina, płoci, karasia i uklei jako wynik sporny. Z powodu braku możliwości uliniowania wyniki te nie zostały dołączone do pracy. Mapę epizootyczną z uzyskanymi wynikami przedstawiono na ryc. 5.



Rycina 5. Lokalizacje poboru prób do badań. Lokalizacje z pozytywnym wynikiem badań (kolor czerwony), lokalizacje wolne od wirusa CEV (kolor zielony) oraz lokalizacje z wynikiem spornym (kolor pomarańczowy). (Zarys mapy pobrany z strony internetowej fabrykapuzli.pl, obrobiony graficznie przez Autora w programie canva.com).

Tab. 12. Zestawienie ilościowe pozytywnych prób w poszczególnych latach i lokalizacjach.

Lokalizacja	2017r.	2018r.
GR 2	5	9
GR 5	-	1
GR 9	-	1
Zalew Szczeciński		+/-22 (wynik sporny)
Suma:	5	33

Tabela 13. Oznaczenia prób pozytywnych skrzelii karpia. (*numery akcesyjne zgłoszone przez Autora w NCBI).

Lp.	Oznaczenie próbki	Lokalizacja	Rok	Nr akcesyjny NCBI*
1	5	GR 5	2018	OQ469756
2	DC1	GR 2	2018	OQ469757
3	DC2	GR 2	2018	OQ469758
4	DC3	GR 2	2018	OQ469759
5	DC4	GR 2	2018	OQ469760
6	DC 7	GR 2	2018	OQ469761
7	DC 9	GR 2	2018	OQ469762
8	DC 10	GR 2	2018	OQ469763
9	DC 11	GR 2	2018	OQ469764
10	DC 12	GR 2	2018	OQ469765
11	9SK	GR 9	2018	OQ469766
12	235	GR 2	2017	OQ469767
13	240	GR 2	2017	OQ469768
14	243	GR 2	2017	OQ469769
15	244	GR 2	2017	OQ469770
16	245	GR 2	2017	OQ469771

4.1.2. Real-Time PCR

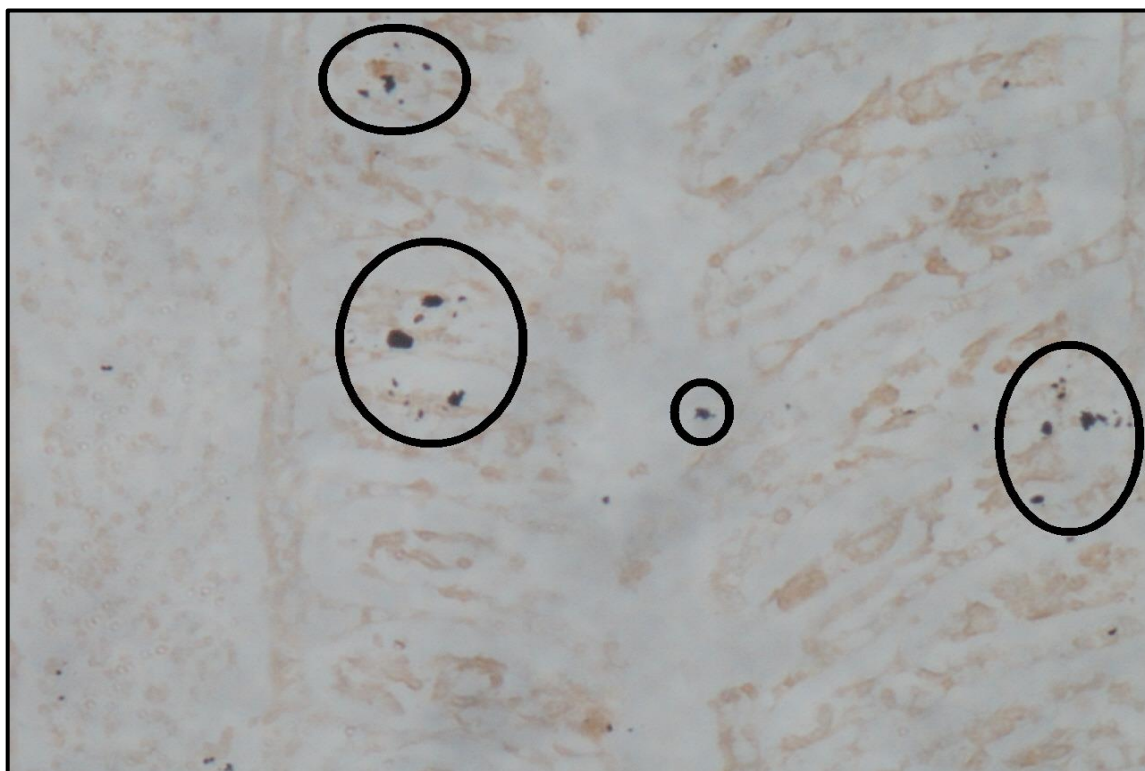
Wartości Ct, czyli punktu progowego detekcji dla izolatów zawierały się w przedziale od 23,47 do 39,35. Poniżej wartości 37 uznano negatywny wynik próbki ze względu na ilość poniżej progu detekcji metody. Uzyskano osiem pozytywnych wyników (tab. 14).

Tabela 14. Wykaz pozytywnych próbek u karpia *Cyprinus carpio* przy zastosowaniu real-time PCR.

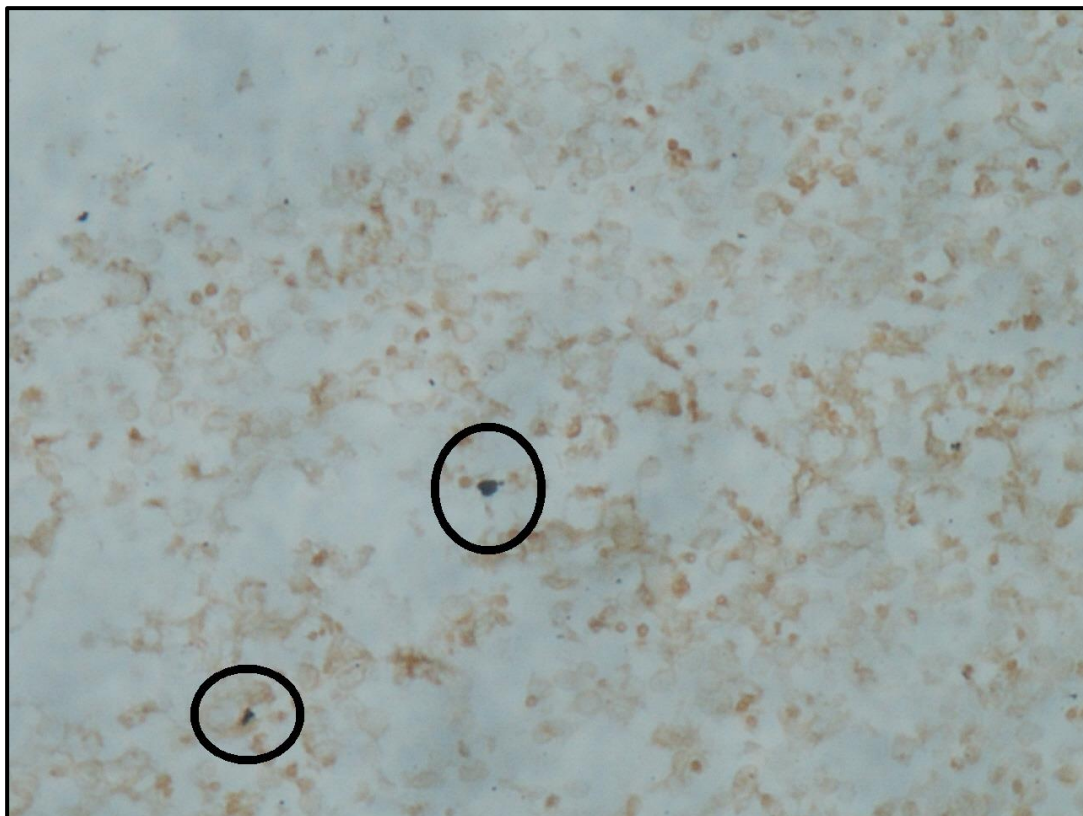
Lp.	Numer próbki	Lokalizacja	Ct
1	DC 4	GR 2	36,67
2	DC 7	GR 2	28,26
3	DC 8	GR 2	24,44
4	DC 9	GR 2	23,47
5	DC 10	GR 2	25,08
6	DC 11	GR 2	24,55
7	DC12	GR 2	24,82
8	5	GR 5	28,2

4.1.3. Hybrydyzacja in situ

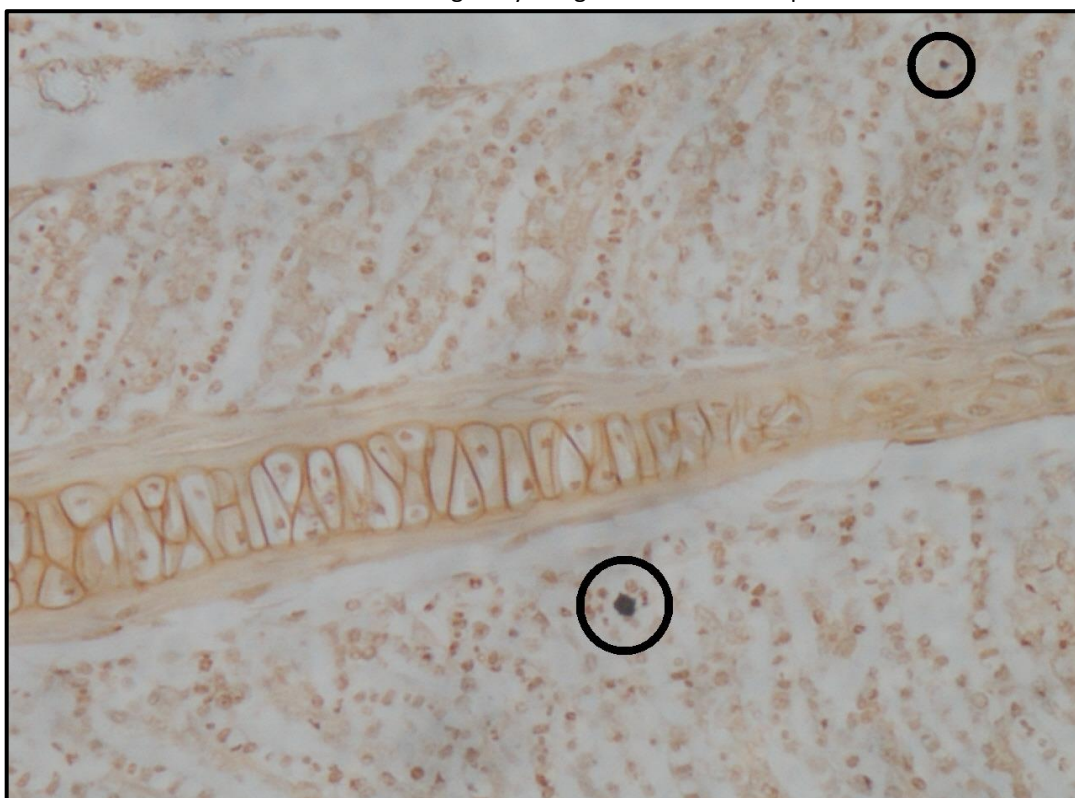
Potwierdzenie obecności materiału genetycznego wirusa CEV zaobserwowano we wszystkich osobnikach wytypowanych do przetestowania tej metodologii. W próbce DC1 potwierdzono obecność materiału genetycznego CEV w skrzelach (ryc. 6) i skórze (ryc. 7).



Rycina 6. Potwierdzenie obecności materiału genetycznego CEV w skrzelach karpia DC1.

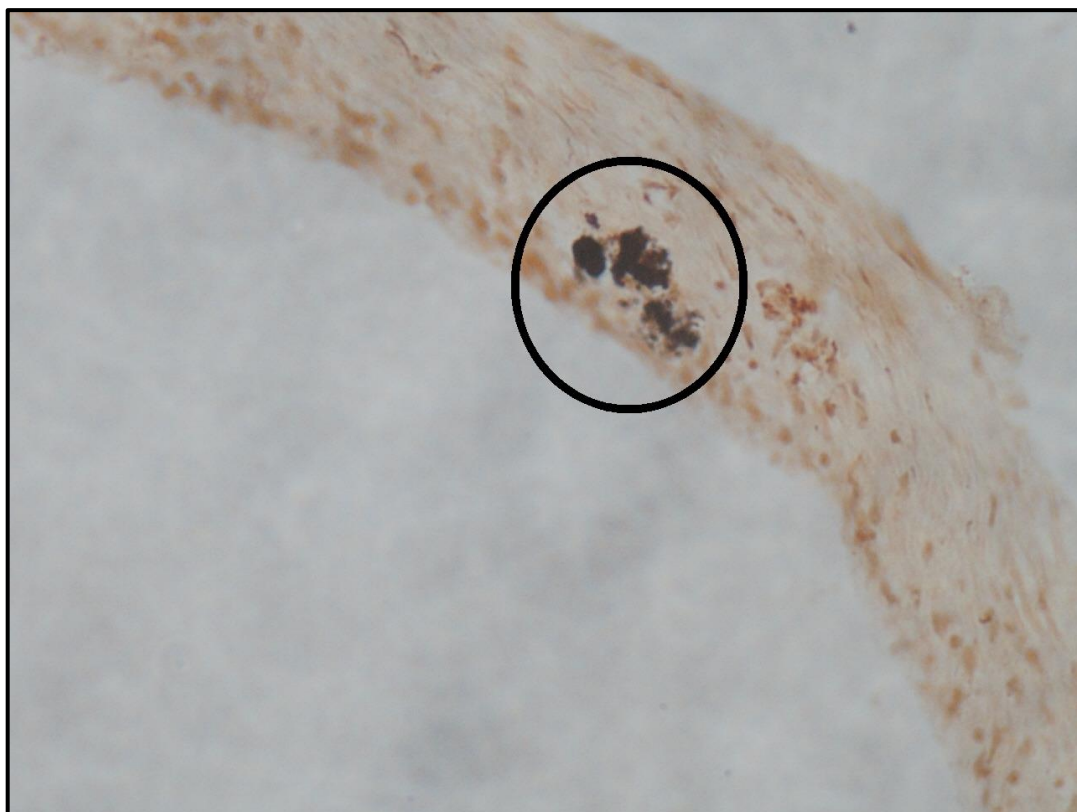


Rycina 7. Potwierdzenie obecności materiału genetycznego CEV w skórze karpia DC1.



Rycina 8. Potwierdzenie obecności materiału genetycznego CEV w skrzelach karpia DC2.

W kolejnej próbkę DC2 potwierdzono obecność materiału genetycznego CEV w skrzelach (ryc. 8), skórze (ryc. 9) oraz nerce (ryc. 10).

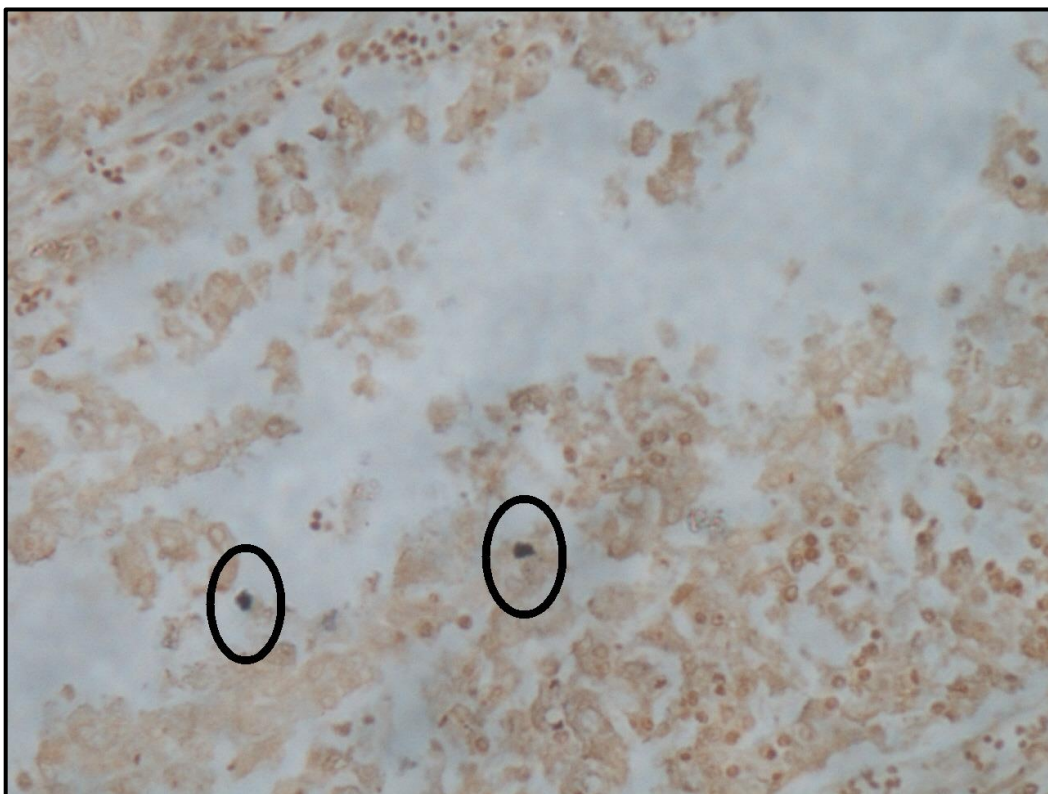


Rycina 9. Potwierdzenie obecności materiału genetycznego CEV w skórze karpia DC2.



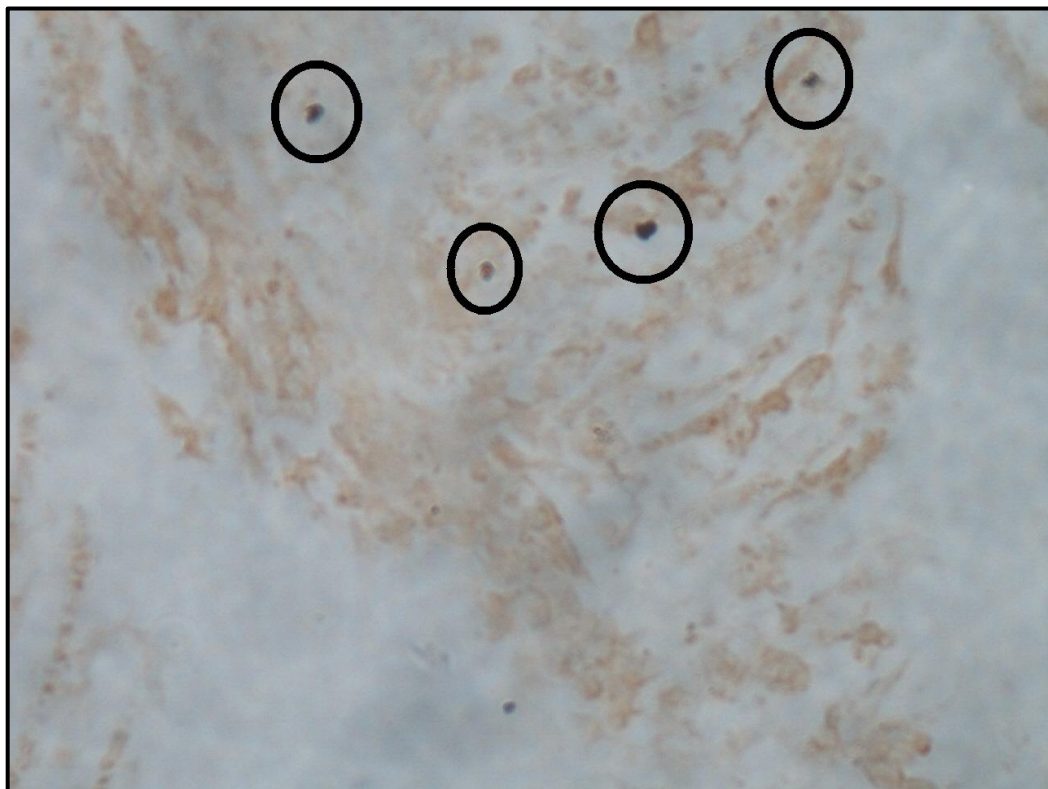
Rycina 10. Potwierdzenie obecności materiału genetycznego CEV w nerce karpia DC2.

W kolejnej DC4 potwierdzono obecność materiału genetycznego CEV w skrzelach (ryc. 11).

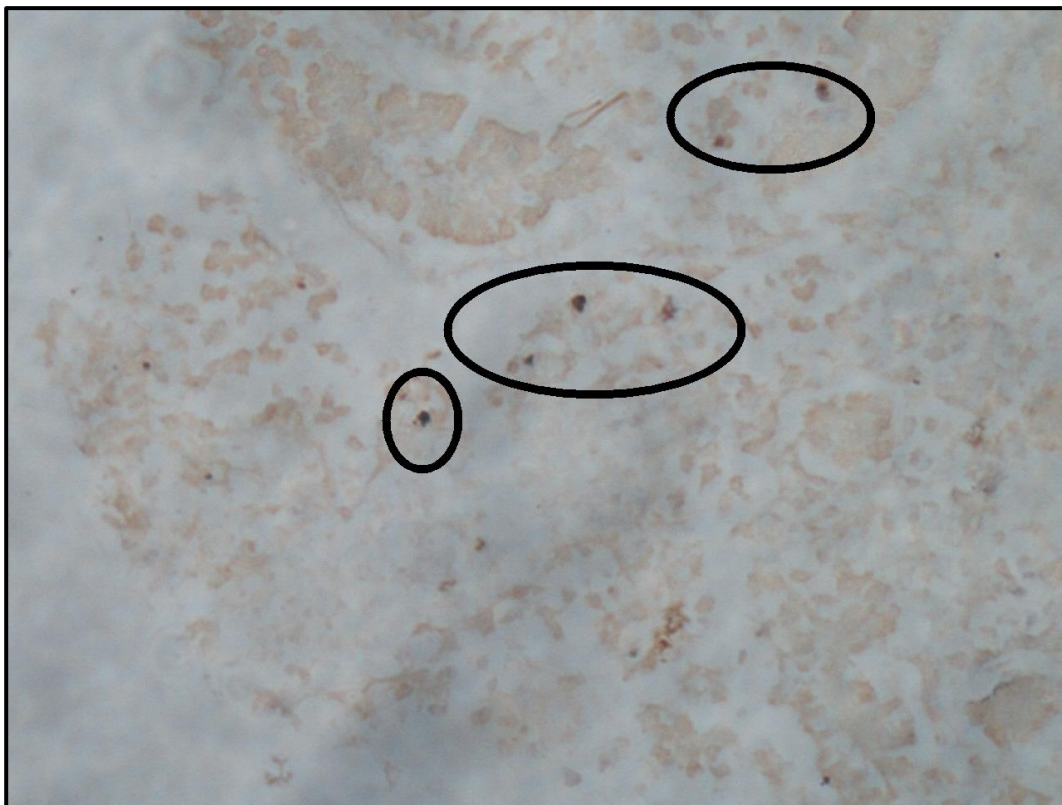


Rycina 11. Potwierdzenie obecności materiału genetycznego CEV w skrzelach karpia DC4.

W próbce DC7 potwierdzono obecność materiału genetycznego CEV w skrzelach (ryc. 12) i nerce (ryc. 13).

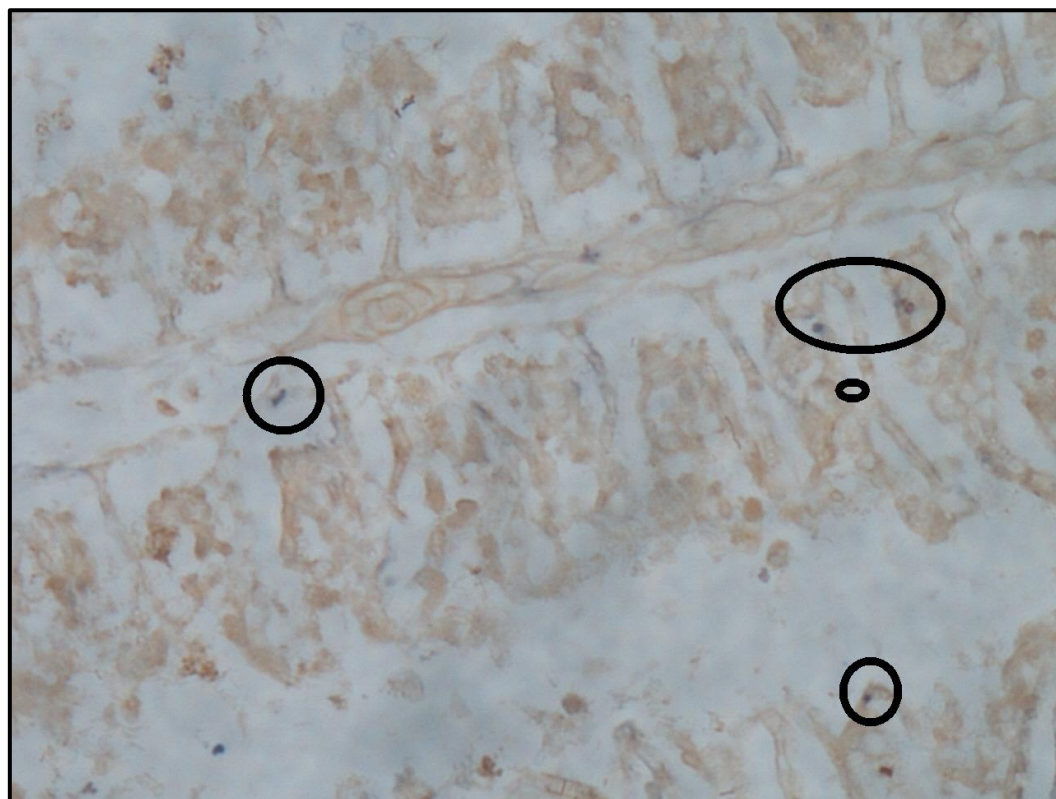


Rycina 12. Potwierdzenie obecności materiału genetycznego CEV w skrzelach karpia DC7.

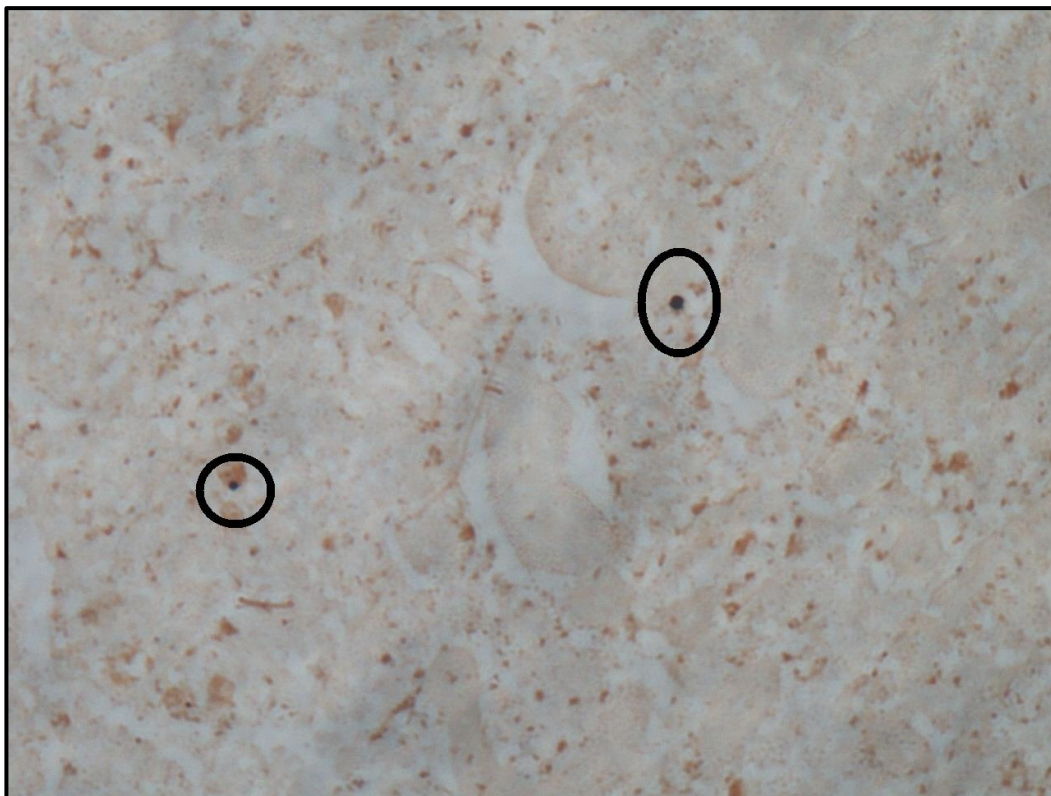


Rycina 13. Potwierdzenie obecności materiału genetycznego CEV w nerce karpia DC7.

W próbce DC8 potwierdzono obecność materiału genetycznego CEV w skrzelach (ryc. 14) i nerce (ryc. 15).



Rycina 14. Potwierdzenie obecności materiału genetycznego CEV w skrzelach karpia DC8.



Rycina. 15. Potwierdzenie obecności materiału genetycznego CEV w nerwie karpia DC8.

W próbce DC9 potwierdzono obecność materiału genetycznego CEV w skrzelach (ryc. 16) i nerwe (ryc. 17).

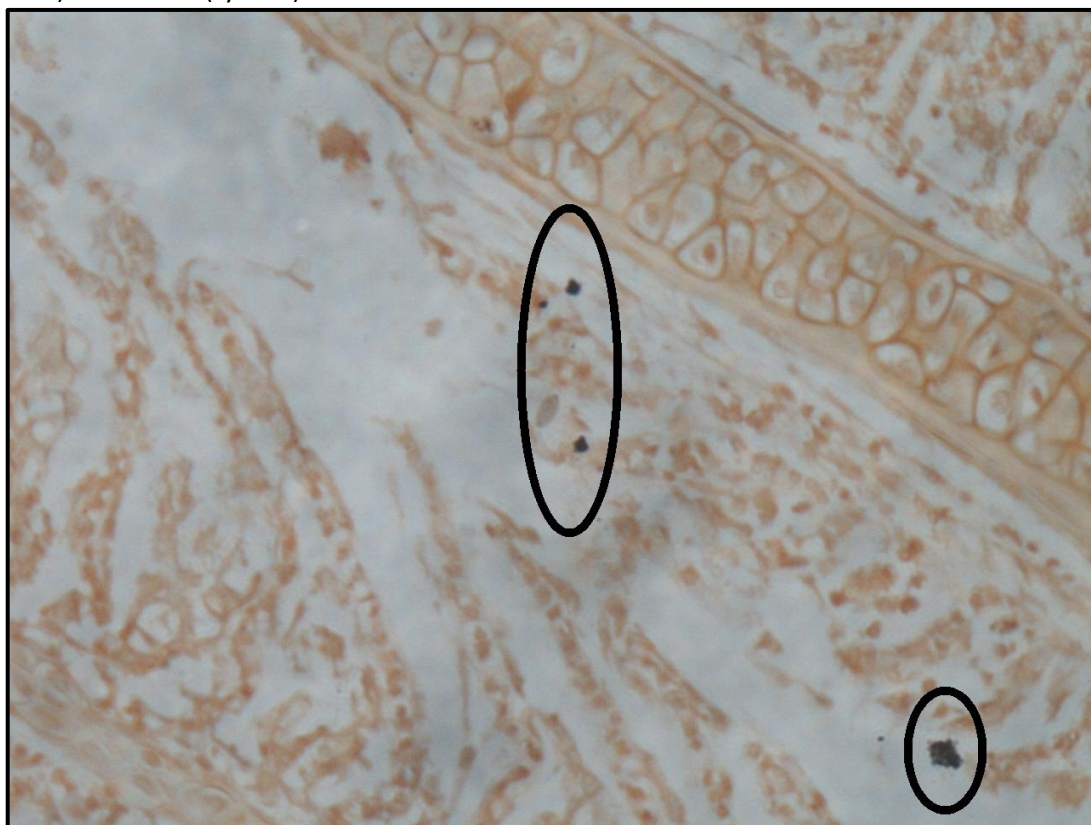


Rycina 16. Potwierdzenie obecności materiału genetycznego CEV w skrzelach karpia DC9.

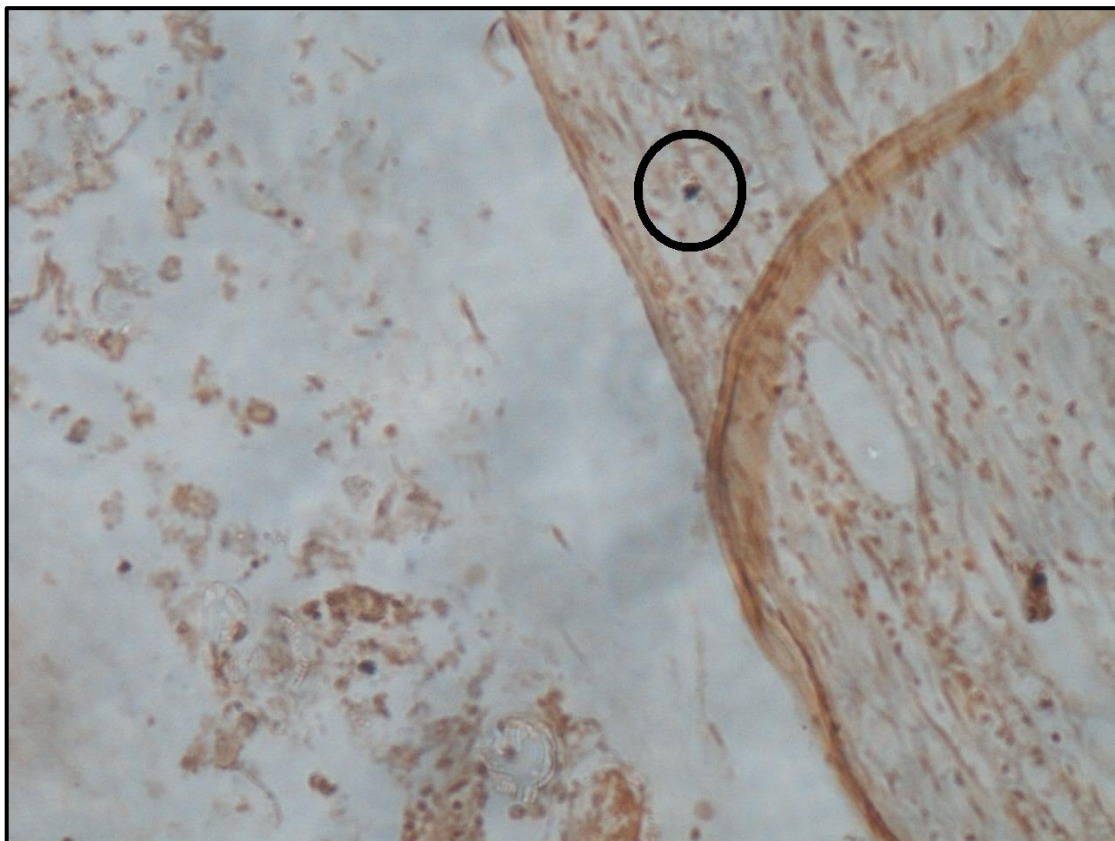


Rycina 17. Potwierdzenie obecności materiału genetycznego CEV w nerce karpia DC9

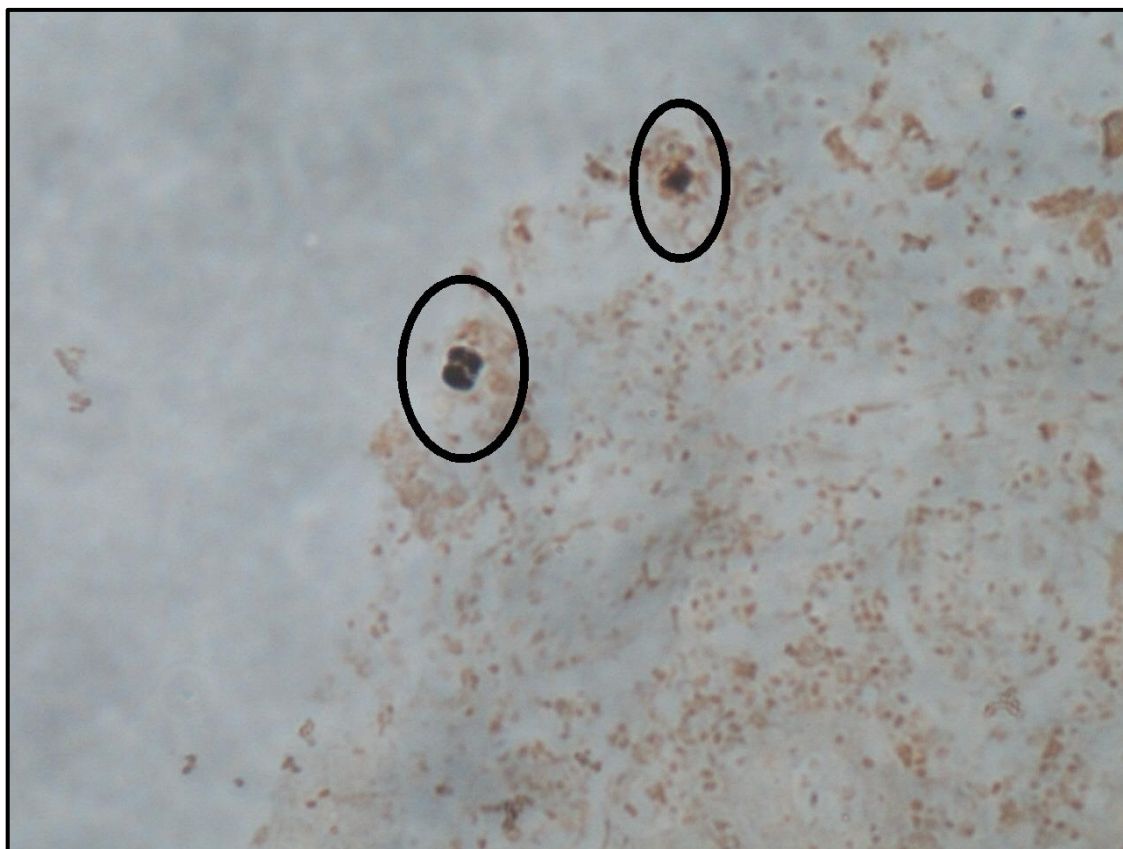
W próbce SK9 potwierdzono obecność materiału genetycznego CEV w skrzelach (ryc. 18), skórze (ryc. 19) oraz nerce (ryc. 20).



Rycina 18. Potwierdzenie obecności materiału genetycznego CEV w skrzelach karpia SK9.



Rycina 19. Potwierdzenie obecności materiału genetycznego CEV w skórze karpia SK9.



Rycina 20. Potwierdzenie obecności materiału genetycznego CEV w nerce karpia SK9.

Wszystkie próby, w których stwierdzono obecności genomu wirusa CEV pozyskano od karpia pochodzących z gospodarstw rybackich o numerach 2 i 9 (tab.15).

Tabela 15. Wykaz pozytywnych prób u karpia pobranych z nerki, śledziony, skrzel i skóry uzyskanych z wykorzystaniem hybrydyzacji *in situ*.

Lokalizacja	Oznaczenie	Nerka	Śledziona	Skrzela	Skóra
GR 2	DC1	-	-	+	+
GR 2	DC2	+	-	+	+
GR 2	DC4	-	-	+	-
GR 2	DC7	+	-	+	-
GR 2	DC8	+	-	+	-
GR 2	DC9	+	-	+	-
GR 9	9SK	+	-	+	+

4.2. Molekularna analiza sekwencji wirusa CEV

Sekwencje próbek pozytywnych porównano do sekwencji wirusa CEV opublikowanej przez Matrasa i in. (2017) w bazie GenBank pod numerem dostępu KX253999. (ryc. 21 i ryc. 22). Analiza bioinformatyczna pozwoliła ustalić pozycje nukleotydowe, którymi sekwencje różniły się między sobą (zestawienie w tab. 16.) Po przyrównaniu sekwencji względem siebie zdefiniowano mutacje punktowe powstałe w wyniku substytucji.

W celu uzyskania danych na temat pokrewieństwa ewolucyjnego pomiędzy sekwencjami pozyskanymi podczas badań realizowanych w ramach niniejszej pracy (oznaczonych jako ORYG.), oraz sekwencjami analogicznego fragmentu genomu odpowiedzialnymi za syntezę białka 4a zdeponowanymi w bazie GenBank, posłużono się modelem ewolucji molekularnej. Na bazie modelu Tamura-Nei (TN93) skonstruowano drzewo filogenetyczne, uwzględniające zarówno różnice występowania poszczególnych rodzajów nukleotydów jak i różnice prawdopodobieństw tranzycji i transwersji. Im mniejsza odległość ewolucyjna analizowanego fragmentu genu (mniej mutacji punktowych), tym genotypy carp edema wirusa wykorzystane do konstrukcji drzewa są bliżej spokrewnione. Jak wykazało porównanie sekwencji (ryc. 23) te, które pozyskano w ramach niniejszych badań (ORYG.) tworzą dwa wyodrębnione kłady.

W analizowanym fragmencie genu stwierdzono wielokrotne podstawienia tyminą w pozycji 1, 43 oraz 124. W pozycjach 82. i 289 stwierdzono podstawienia guaniną, w pozycjach 214 oraz 397 – adeniną zaś w pozycjach 385. oraz 409 – cytozyną. Analizując obraz wysycenia sekwencji analizowanego genu poszczególnymi nukleotydami, można określić poziom zmienności wewnątrzgenowej, co z kolei ma znaczenie podczas produkcji białek docelowych. W przypadku wirusów, im większe jest tempo mutacji, tym słabsza jest reakcja ryb, które miały już kontakt w wirusem na tzw. reinfekcje. Ze względu na zmianę ramki odczytu w kodzie genetycznym, nawet w przypadku mutacji punktowej obejmującej jedną zasadę, zmienia się automatycznie skład aminokwasowy produkowanego białka. Ono właśnie jest ściśle związane z możliwością szybkiej odpowiedzi immunologicznej ze strony układu odpornościowego gospodarza (ryby).

Tabela 16. Zestawienie miejsc mutacji punktowych w porównaniu do sekwencji wirusa CEV opublikowanej przez Matrasy i in. (2017) w GenBank pod numerem dostępu KX253999 (kropkami oznaczono miejsca zgodności, zaś litera oznacza podstawioną zasadę).

Nr próbki	Pozycja nukleotydu								
	1	43	82	124	214	289	385	397	409
5	.	.	G	T	.	G	.	.	C
DC1	T	.	.	T	.	.	C	.	.
DC2	T	.	.	T	.	.	C	.	.
DC3	T	.	.	T	.	.	C	.	.
DC4	T	.	.	T	.	.	C	.	.
DC7	T	.	.	T	.	.	C	.	.
DC8	T	.	.	T	.	.	C	.	.
DC9	T	.	.	T	.	.	C	.	.
DC10	T	.	.	T	.	.	C	.	.
DC11	T	.	.	T	.	.	C	.	.
DC12	T	.	.	T	.	.	C	.	.
9SK	T	.	G	T	.	G	.	.	C
235	.	T	G	.	A	.	C	A	.
240	T	T	G	.	A	.	C	A	.
243	T	T	G	.	A	.	C	A	.
244	T	T	G	.	A	.	C	A	.
245	T	T	G	.	A	.	C	A	.

1. KX253999	10	AGTTTGTGTTAGTCCCAAGAGTTTCTTTTCGTCATTTGTTACCTTTTGTAGTTGTTTAAATTTGTGATÁAGATTTCCATTAGCATAA	80
2. 5	10	AGTTTGTGTTAGTCCCAAGAGTTTCTTTTCGTCATTTGTTACCTTTTGTAGTTGTTTAAATTTGTGATÁAGATTTCCATTAGCATAA	80
3. DC1	10	AGTTTGTGTTAGTCCCAAGAGTTTCTTTTCGTCATTTGTTACCTTTTGTAGTTGTTTAAATTTGTGATÁAGATTTCCATTAGCATAA	80
4. DC2	10	AGTTTGTGTTAGTCCCAAGAGTTTCTTTTCGTCATTTGTTACCTTTTGTAGTTGTTTAAATTTGTGATÁAGATTTCCATTAGCATAA	80
5. DC3	10	AGTTTGTGTTAGTCCCAAGAGTTTCTTTTCGTCATTTGTTACCTTTTGTAGTTGTTTAAATTTGTGATÁAGATTTCCATTAGCATAA	80
6. DC4	10	AGTTTGTGTTAGTCCCAAGAGTTTCTTTTCGTCATTTGTTACCTTTTGTAGTTGTTTAAATTTGTGATÁAGATTTCCATTAGCATAA	80
7. DC7	10	AGTTTGTGTTAGTCCCAAGAGTTTCTTTTCGTCATTTGTTACCTTTTGTAGTTGTTTAAATTTGTGATÁAGATTTCCATTAGCATAA	80
8. DC9	10	AGTTTGTGTTAGTCCCAAGAGTTTCTTTTCGTCATTTGTTACCTTTTGTAGTTGTTTAAATTTGTGATÁAGATTTCCATTAGCATAA	80
9. DC10	10	AGTTTGTGTTAGTCCCAAGAGTTTCTTTTCGTCATTTGTTACCTTTTGTAGTTGTTTAAATTTGTGATÁAGATTTCCATTAGCATAA	80
10. DC11	10	AGTTTGTGTTAGTCCCAAGAGTTTCTTTTCGTCATTTGTTACCTTTTGTAGTTGTTTAAATTTGTGATÁAGATTTCCATTAGCATAA	80
11. DC12	10	AGTTTGTGTTAGTCCCAAGAGTTTCTTTTCGTCATTTGTTACCTTTTGTAGTTGTTTAAATTTGTGATÁAGATTTCCATTAGCATAA	80
12. 95K	10	AGTTTGTGTTAGTCCCAAGAGTTTCTTTTCGTCATTTGTTACCTTTTGTAGTTGTTTAAATTTGTGATÁAGATTTCCATTAGCATAA	80
13. 235	10	AGTTTGTGTTAGTCCCAAGAGTTTCTTTTCGTCATTTGTTACCTTTTGTAGTTGTTTAAATTTGTGATÁAGATTTCCATTAGCATAA	80
14. 240	10	AGTTTGTGTTAGTCCCAAGAGTTTCTTTTCGTCATTTGTTACCTTTTGTAGTTGTTTAAATTTGTGATÁAGATTTCCATTAGCATAA	80
15. 243	10	AGTTTGTGTTAGTCCCAAGAGTTTCTTTTCGTCATTTGTTACCTTTTGTAGTTGTTTAAATTTGTGATÁAGATTTCCATTAGCATAA	80
16. 244	10	AGTTTGTGTTAGTCCCAAGAGTTTCTTTTCGTCATTTGTTACCTTTTGTAGTTGTTTAAATTTGTGATÁAGATTTCCATTAGCATAA	80
17. 245	10	AGTTTGTGTTAGTCCCAAGAGTTTCTTTTCGTCATTTGTTACCTTTTGTAGTTGTTTAAATTTGTGATÁAGATTTCCATTAGCATAA	80
1. KX253999	90	AAATCCATCCAGATTTGGGTTGAAACATGTTTAGAGTTTGTATTTGTAGCAATTCCTAGTTTGTATGGCAGAAACAAAACCTCTCT	170
2. 5	90	AAATCCATCCAGATTTGGGTTGAAACATGTTTAGAGTTTGTATTTGTAGCAATTCCTAGTTTGTATGGCAGAAACAAAACCTCTCT	170
3. DC1	90	AAATCCATCCAGATTTGGGTTGAAACATGTTTAGAGTTTGTATTTGTAGCAATTCCTAGTTTGTATGGCAGAAACAAAACCTCTCT	170
4. DC2	90	AAATCCATCCAGATTTGGGTTGAAACATGTTTAGAGTTTGTATTTGTAGCAATTCCTAGTTTGTATGGCAGAAACAAAACCTCTCT	170
5. DC3	90	AAATCCATCCAGATTTGGGTTGAAACATGTTTAGAGTTTGTATTTGTAGCAATTCCTAGTTTGTATGGCAGAAACAAAACCTCTCT	170
6. DC4	90	AAATCCATCCAGATTTGGGTTGAAACATGTTTAGAGTTTGTATTTGTAGCAATTCCTAGTTTGTATGGCAGAAACAAAACCTCTCT	170
7. DC7	90	AAATCCATCCAGATTTGGGTTGAAACATGTTTAGAGTTTGTATTTGTAGCAATTCCTAGTTTGTATGGCAGAAACAAAACCTCTCT	170
8. DC9	90	AAATCCATCCAGATTTGGGTTGAAACATGTTTAGAGTTTGTATTTGTAGCAATTCCTAGTTTGTATGGCAGAAACAAAACCTCTCT	170
9. DC10	90	AAATCCATCCAGATTTGGGTTGAAACATGTTTAGAGTTTGTATTTGTAGCAATTCCTAGTTTGTATGGCAGAAACAAAACCTCTCT	170
10. DC11	90	AAATCCATCCAGATTTGGGTTGAAACATGTTTAGAGTTTGTATTTGTAGCAATTCCTAGTTTGTATGGCAGAAACAAAACCTCTCT	170
11. DC12	90	AAATCCATCCAGATTTGGGTTGAAACATGTTTAGAGTTTGTATTTGTAGCAATTCCTAGTTTGTATGGCAGAAACAAAACCTCTCT	170
12. 95K	90	AAATCCATCCAGATTTGGGTTGAAACATGTTTAGAGTTTGTATTTGTAGCAATTCCTAGTTTGTATGGCAGAAACAAAACCTCTCT	170
13. 235	90	AAATCCATCCAGATTTGGGTTGAAACATGTTTAGAGTTTGTATTTGTAGCAATTCCTAGTTTGTATGGCAGAAACAAAACCTCTCT	170
14. 240	90	AAATCCATCCAGATTTGGGTTGAAACATGTTTAGAGTTTGTATTTGTAGCAATTCCTAGTTTGTATGGCAGAAACAAAACCTCTCT	170
15. 243	90	AAATCCATCCAGATTTGGGTTGAAACATGTTTAGAGTTTGTATTTGTAGCAATTCCTAGTTTGTATGGCAGAAACAAAACCTCTCT	170
16. 244	90	AAATCCATCCAGATTTGGGTTGAAACATGTTTAGAGTTTGTATTTGTAGCAATTCCTAGTTTGTATGGCAGAAACAAAACCTCTCT	170
17. 245	90	AAATCCATCCAGATTTGGGTTGAAACATGTTTAGAGTTTGTATTTGTAGCAATTCCTAGTTTGTATGGCAGAAACAAAACCTCTCT	170
1. KX253999	180	TTACTGTAACCTCCTTGAGGAACTCGATCTAGAAATCCGGCAATATGTAATCTCAAAATTTGTTTGGGAGTTTTTGAAATATACTACTTC	260
2. 5	180	TTACTGTAACCTCCTTGAGGAACTCGATCTAGAAATCCGGCAATATGTAATCTCAAAATTTGTTTGGGAGTTTTTGAAATATACTACTTC	260
3. DC1	180	TTACTGTAACCTCCTTGAGGAACTCGATCTAGAAATCCGGCAATATGTAATCTCAAAATTTGTTTGGGAGTTTTTGAAATATACTACTTC	260
4. DC2	180	TTACTGTAACCTCCTTGAGGAACTCGATCTAGAAATCCGGCAATATGTAATCTCAAAATTTGTTTGGGAGTTTTTGAAATATACTACTTC	260
5. DC3	180	TTACTGTAACCTCCTTGAGGAACTCGATCTAGAAATCCGGCAATATGTAATCTCAAAATTTGTTTGGGAGTTTTTGAAATATACTACTTC	260
6. DC4	180	TTACTGTAACCTCCTTGAGGAACTCGATCTAGAAATCCGGCAATATGTAATCTCAAAATTTGTTTGGGAGTTTTTGAAATATACTACTTC	260
7. DC7	180	TTACTGTAACCTCCTTGAGGAACTCGATCTAGAAATCCGGCAATATGTAATCTCAAAATTTGTTTGGGAGTTTTTGAAATATACTACTTC	260
8. DC9	180	TTACTGTAACCTCCTTGAGGAACTCGATCTAGAAATCCGGCAATATGTAATCTCAAAATTTGTTTGGGAGTTTTTGAAATATACTACTTC	260
9. DC10	180	TTACTGTAACCTCCTTGAGGAACTCGATCTAGAAATCCGGCAATATGTAATCTCAAAATTTGTTTGGGAGTTTTTGAAATATACTACTTC	260
10. DC11	180	TTACTGTAACCTCCTTGAGGAACTCGATCTAGAAATCCGGCAATATGTAATCTCAAAATTTGTTTGGGAGTTTTTGAAATATACTACTTC	260
11. DC12	180	TTACTGTAACCTCCTTGAGGAACTCGATCTAGAAATCCGGCAATATGTAATCTCAAAATTTGTTTGGGAGTTTTTGAAATATACTACTTC	260
12. 95K	180	TTACTGTAACCTCCTTGAGGAACTCGATCTAGAAATCCGGCAATATGTAATCTCAAAATTTGTTTGGGAGTTTTTGAAATATACTACTTC	260
13. 235	180	TTACTGTAACCTCCTTGAGGAACTCGATCTAGAAATCCGGCAATATGTAATCTCAAAATTTGTTTGGGAGTTTTTGAAATATACTACTTC	260
14. 240	180	TTACTGTAACCTCCTTGAGGAACTCGATCTAGAAATCCGGCAATATGTAATCTCAAAATTTGTTTGGGAGTTTTTGAAATATACTACTTC	260
15. 243	180	TTACTGTAACCTCCTTGAGGAACTCGATCTAGAAATCCGGCAATATGTAATCTCAAAATTTGTTTGGGAGTTTTTGAAATATACTACTTC	260
16. 244	180	TTACTGTAACCTCCTTGAGGAACTCGATCTAGAAATCCGGCAATATGTAATCTCAAAATTTGTTTGGGAGTTTTTGAAATATACTACTTC	260
17. 245	180	TTACTGTAACCTCCTTGAGGAACTCGATCTAGAAATCCGGCAATATGTAATCTCAAAATTTGTTTGGGAGTTTTTGAAATATACTACTTC	260

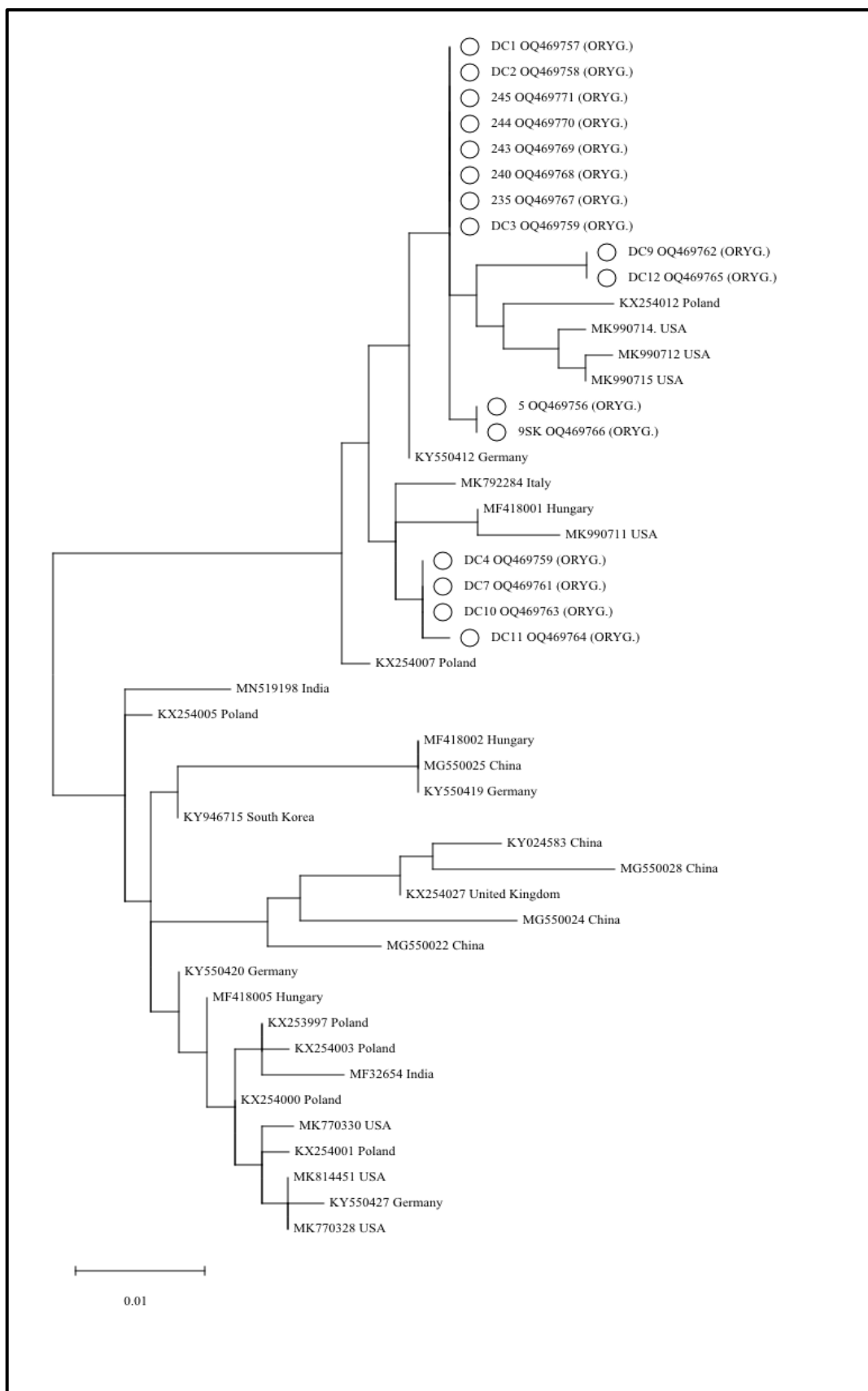
Rycina 21A. Uliniowanie pozyskanych sekwencji poz. 1-264. Kolorem zaznaczono mutacje pojedynczych nukleotydów.

1. KX253999	270	300	310	320	330	340	350		
2. 5	ATCA	TACAA	TCCCTAGAA	CTAGAGCA	AGATTAGAA	GTCAATTTG	TGTC		
3. DC1	ATCA	TACAA	TCCCTAGAA	CTAGAGCA	AGATTAGAA	GTCAATTTG	TGTC		
4. DC2	ATCA	TACAA	TCCCTAGAA	CTAGAGCA	AGATTAGAA	GTCAATTTG	TGTC		
5. DC3	ATCA	TACAA	TCCCTAGAA	CTAGAGCA	AGATTAGAA	GTCAATTTG	TGTC		
6. DC4	ATCA	TACAA	TCCCTAGAA	CTAGAGCA	AGATTAGAA	GTCAATTTG	TGTC		
7. DC7	ATCA	TACAA	TCCCTAGAA	CTAGAGCA	AGATTAGAA	GTCAATTTG	TGTC		
8. DC9	ATCA	TACAA	TCCCTAGAA	CTAGAGCA	AGATTAGAA	GTCAATTTG	TGTC		
9. DC10	ATCA	TACAA	TCCCTAGAA	CTAGAGCA	AGATTAGAA	GTCAATTTG	TGTC		
10. DC11	ATCA	TACAA	TCCCTAGAA	CTAGAGCA	AGATTAGAA	GTCAATTTG	TGTC		
11. DC12	ATCA	TACAA	TCCCTAGAA	CTAGAGCA	AGATTAGAA	GTCAATTTG	TGTC		
12. 95K	ATCA	TACAA	TCCCTAGAA	CTAGAGCA	AGATTAGAA	GTCAATTTG	TGTC		
13. 235	ATCA	TACAA	TCCCTAGAA	CTAGAGCA	AGATTAGAA	GTCAATTTG	TGTC		
14. 240	ATCA	TACAA	TCCCTAGAA	CTAGAGCA	AGATTAGAA	GTCAATTTG	TGTC		
15. 243	ATCA	TACAA	TCCCTAGAA	CTAGAGCA	AGATTAGAA	GTCAATTTG	TGTC		
16. 244	ATCA	TACAA	TCCCTAGAA	CTAGAGCA	AGATTAGAA	GTCAATTTG	TGTC		
17. 245	ATCA	TACAA	TCCCTAGAA	CTAGAGCA	AGATTAGAA	GTCAATTTG	TGTC		
1. KX253999	360	370	380	390	400	410	420	430	433
2. 5	TTCC	AGAAC	ATAAC	ATTG	CAATTTG	CAACG	TATCC	TAATTT	CTTT
3. DC1	TTCC	AGAAC	ATAAC	ATTG	CAATTTG	CAACG	TATCC	TAATTT	CTTT
4. DC2	TTCC	AGAAC	ATAAC	ATTG	CAATTTG	CAACG	TATCC	TAATTT	CTTT
5. DC3	TTCC	AGAAC	ATAAC	ATTG	CAATTTG	CAACG	TATCC	TAATTT	CTTT
6. DC4	TTCC	AGAAC	ATAAC	ATTG	CAATTTG	CAACG	TATCC	TAATTT	CTTT
7. DC7	TTCC	AGAAC	ATAAC	ATTG	CAATTTG	CAACG	TATCC	TAATTT	CTTT
8. DC9	TTCC	AGAAC	ATAAC	ATTG	CAATTTG	CAACG	TATCC	TAATTT	CTTT
9. DC10	TTCC	AGAAC	ATAAC	ATTG	CAATTTG	CAACG	TATCC	TAATTT	CTTT
10. DC11	TTCC	AGAAC	ATAAC	ATTG	CAATTTG	CAACG	TATCC	TAATTT	CTTT
11. DC12	TTCC	AGAAC	ATAAC	ATTG	CAATTTG	CAACG	TATCC	TAATTT	CTTT
12. 95K	TTCC	AGAAC	ATAAC	ATTG	CAATTTG	CAACG	TATCC	TAATTT	CTTT
13. 235	TTCC	AGAAC	ATAAC	ATTG	CAATTTG	CAACG	TATCC	TAATTT	CTTT
14. 240	TTCC	AGAAC	ATAAC	ATTG	CAATTTG	CAACG	TATCC	TAATTT	CTTT
15. 243	TTCC	AGAAC	ATAAC	ATTG	CAATTTG	CAACG	TATCC	TAATTT	CTTT
16. 244	TTCC	AGAAC	ATAAC	ATTG	CAATTTG	CAACG	TATCC	TAATTT	CTTT
17. 245	TTCC	AGAAC	ATAAC	ATTG	CAATTTG	CAACG	TATCC	TAATTT	CTTT

Rycina 21B. Uliniowanie pozyskanych sekwencji poz. 265-433 Kolorem zaznaczono mutacje pojedynczych nukleotydów.

KX253999	260	Tyr	Val	Val	Glu	Asp	Tyr	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Ala	Leu	Asn	Ser	Thr	Met	Thr	Lys	Asp	Phe	Val	Ser	Met	Lys	Asn	Trp	Asp	Asp	Ile	Gln	Ile	Gly	Lys	Trp	Phe	Met	Val	Asn	Ala	Ile	Lys						
5	270	Tyr	Val	Val	Glu	Asp	Tyr	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Ala	Leu	Asn	Ser	Thr	Met	Thr	Lys	Asp	Phe	Val	Ser	Met	Lys	Asn	Trp	Asp	Asp	Ile	Gln	Ile	Gly	Lys	Trp	Phe	Met	Val	Asn	Ala	Ile	Lys						
DC1	280	Tyr	Val	Val	Glu	Asp	Tyr	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Ala	Leu	Asn	Ser	Thr	Met	Thr	Lys	Asp	Phe	Val	Ser	Met	Lys	Asn	Trp	Asp	Asp	Ile	Gln	Ile	Gly	Lys	Trp	Phe	Met	Val	Asn	Ala	Ile	Lys						
DC2	290	Tyr	Val	Val	Glu	Asp	Tyr	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Ala	Leu	Asn	Ser	Thr	Met	Thr	Lys	Asp	Phe	Val	Ser	Met	Lys	Asn	Trp	Asp	Asp	Ile	Gln	Ile	Gly	Lys	Trp	Phe	Met	Val	Asn	Ala	Ile	Lys						
DC3	300	Tyr	Val	Val	Glu	Asp	Tyr	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Ala	Leu	Asn	Ser	Thr	Met	Thr	Lys	Asp	Phe	Val	Ser	Met	Lys	Asn	Trp	Asp	Asp	Ile	Gln	Ile	Gly	Lys	Trp	Phe	Met	Val	Asn	Ala	Ile	Lys						
DC4	310	Tyr	Val	Val	Glu	Asp	Tyr	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Ala	Leu	Asn	Ser	Thr	Met	Thr	Lys	Asp	Phe	Val	Ser	Met	Lys	Asn	Trp	Asp	Asp	Ile	Gln	Ile	Gly	Lys	Trp	Phe	Met	Val	Asn	Ala	Ile	Lys						
DC7	320	Tyr	Val	Val	Glu	Asp	Tyr	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Ala	Leu	Asn	Ser	Thr	Met	Thr	Lys	Asp	Phe	Val	Ser	Met	Lys	Asn	Trp	Asp	Asp	Ile	Gln	Ile	Gly	Lys	Trp	Phe	Met	Val	Asn	Ala	Ile	Lys						
DC9	330	Tyr	Val	Val	Glu	Asp	Tyr	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Ala	Leu	Asn	Ser	Thr	Met	Thr	Lys	Asp	Phe	Val	Ser	Met	Lys	Asn	Trp	Asp	Asp	Ile	Gln	Ile	Gly	Lys	Trp	Phe	Met	Val	Asn	Ala	Ile	Lys						
DC10	340	Tyr	Val	Val	Glu	Asp	Tyr	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Ala	Leu	Asn	Ser	Thr	Met	Thr	Lys	Asp	Phe	Val	Ser	Met	Lys	Asn	Trp	Asp	Asp	Ile	Gln	Ile	Gly	Lys	Trp	Phe	Met	Val	Asn	Ala	Ile	Lys						
DC11	350	Tyr	Val	Val	Glu	Asp	Tyr	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Ala	Leu	Asn	Ser	Thr	Met	Thr	Lys	Asp	Phe	Val	Ser	Met	Lys	Asn	Trp	Asp	Asp	Ile	Gln	Ile	Gly	Lys	Trp	Phe	Met	Val	Asn	Ala	Ile	Lys						
DC12	360	Tyr	Val	Val	Glu	Asp	Tyr	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Ala	Leu	Asn	Ser	Thr	Met	Thr	Lys	Asp	Phe	Val	Ser	Met	Lys	Asn	Trp	Asp	Asp	Ile	Gln	Ile	Gly	Lys	Trp	Phe	Met	Val	Asn	Ala	Ile	Lys						
95K	370	Tyr	Val	Val	Glu	Asp	Tyr	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Ala	Leu	Asn	Ser	Thr	Met	Thr	Lys	Asp	Phe	Val	Ser	Met	Lys	Asn	Trp	Asp	Asp	Ile	Gln	Ile	Gly	Lys	Trp	Phe	Met	Val	Asn	Ala	Ile	Lys						
235	380	Tyr	Val	Val	Glu	Asp	Tyr	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Ala	Leu	Asn	Ser	Thr	Met	Thr	Lys	Asp	Phe	Val	Ser	Met	Lys	Asn	Trp	Asp	Asp	Ile	Gln	Ile	Gly	Lys	Trp	Phe	Met	Val	Asn	Ala	Ile	Lys						
240	390	Tyr	Val	Val	Glu	Asp	Tyr	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Ala	Leu	Asn	Ser	Thr	Met	Thr	Lys	Asp	Phe	Val	Ser	Met	Lys	Asn	Trp	Asp	Asp	Ile	Gln	Ile	Gly	Lys	Trp	Phe	Met	Val	Asn	Ala	Ile	Lys						
243	400	Tyr	Val	Val	Glu	Asp	Tyr	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Ala	Leu	Asn	Ser	Thr	Met	Thr	Lys	Asp	Phe	Val	Ser	Met	Lys	Asn	Trp	Asp	Asp	Ile	Gln	Ile	Gly	Lys	Trp	Phe	Met	Val	Asn	Ala	Ile	Lys						
244	410	Tyr	Val	Val	Glu	Asp	Tyr	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Ala	Leu	Asn	Ser	Thr	Met	Thr	Lys	Asp	Phe	Val	Ser	Met	Lys	Asn	Trp	Asp	Asp	Ile	Gln	Ile	Gly	Lys	Trp	Phe	Met	Val	Asn	Ala	Ile	Lys						
245	420	Tyr	Val	Val	Glu	Asp	Tyr	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Ala	Leu	Asn	Ser	Thr	Met	Thr	Lys	Asp	Phe	Val	Ser	Met	Lys	Asn	Trp	Asp	Asp	Ile	Gln	Ile	Gly	Lys	Trp	Phe	Met	Val	Asn	Ala	Ile	Lys						
KX253999	430	Val	Gln	Glu	Pro	Ile	Thr	Asp	Val	Tyr	Gly	Ile	Asp	Lys	Lys	Val	Val	Tyr	Asn																														
5	440	Val	Gln	Glu	Pro	Ile	Thr	Asp	Val	Tyr	Gly	Ile	Asp	Lys	Lys	Val	Val	Tyr	Asn																														
DC1	450	Val	Gln	Glu	Pro	Ile	Thr	Asp	Val	Tyr	Gly	Ile	Asp	Lys	Lys	Val	Val	Tyr	Asn																														
DC2	460	Val	Gln	Glu	Pro	Ile	Thr	Asp	Val	Tyr	Gly	Ile	Asp	Lys	Lys	Val	Val	Tyr	Asn																														
DC3	470	Val	Gln	Glu	Pro	Ile	Thr	Asp	Val	Tyr	Gly	Ile	Asp	Lys	Lys	Val	Val	Tyr	Asn																														
DC4	480	Val	Gln	Glu	Pro	Ile	Thr	Asp	Val	Tyr	Gly	Ile	Asp	Lys	Lys	Val	Val	Tyr	Asn																														
DC7	490	Val	Gln	Glu	Pro	Ile	Thr	Asp	Val	Tyr	Gly	Ile	Asp	Lys	Lys	Val	Val	Tyr	Asn																														
DC9	500	Val	Gln	Glu	Pro	Ile	Thr	Asp	Val	Tyr	Gly	Ile	Asp	Lys	Lys	Val	Val	Tyr	Asn																														
DC10	510	Val	Gln	Glu	Pro	Ile	Thr	Asp	Val	Tyr	Gly	Ile	Asp	Lys	Lys	Val	Val	Tyr	Asn																														
DC11	520	Val	Gln	Glu	Pro	Ile	Thr	Asp	Val	Tyr	Gly	Ile	Asp	Lys	Lys	Val	Val	Tyr	Asn																														
DC12	530	Val	Gln	Glu	Pro	Ile	Thr	Asp	Val	Tyr	Gly	Ile	Asp	Lys	Lys	Val	Val	Tyr	Asn																														
95K	540	Val	Gln	Glu	Pro	Ile	Thr	Asp	Val	Tyr	Gly	Ile	Asp	Lys	Lys	Val	Val	Tyr	Asn																														
235	550	Val	Gln	Glu	Pro	Ile	Thr	Asp	Val	Tyr	Gly	Ile	Asp	Lys	Lys	Val	Val	Tyr	Asn																														
240	560	Val	Gln	Glu	Pro	Ile	Thr	Asp	Val	Tyr	Gly	Ile	Asp	Lys	Lys	Val	Val	Tyr	Asn																														
243	570	Val	Gln	Glu	Pro	Ile	Thr	Asp	Val	Tyr	Gly	Ile	Asp	Lys	Lys	Val	Val	Tyr	Asn																														
244	580	Val	Gln	Glu	Pro	Ile	Thr	Asp	Val	Tyr	Gly	Ile	Asp	Lys	Lys	Val	Val	Tyr	Asn																														
245	590	Val	Gln	Glu	Pro	Ile	Thr	Asp	Val	Tyr	Gly	Ile	Asp	Lys	Lys	Val	Val	Tyr	Asn																														

Rycina 22B. Uliniowanie pozyskanych sekwencji (aminokwasy) poz. 251-433. Mutacje oznaczono innym kolorem.



Rycina 23. Drzewo Maximum Likelihood skonstruowane za pomocą modelu TN93 (Tamura-Nei) dla sekwencji genu 4a carp edema virusa pozyskanych z GenBanku oraz sekwencji autora o numerach dostępu OQ469756 - OQ469771. Skala – częstość substytucji.

5. DYSKUSJA

Choroby wirusowe u ryb stanowią ogromny problem ze względu na praktycznie brak możliwości ich wyeliminowania z obiektów hodowlanych. Zdiagnozowanie choroby wirusowej często wiąże się z ograniczeniem sprzedaży ryb żywych oraz koniecznością wprowadzenia restrykcji takich jak obowiązkowe osuszenie stawów, dezynfekcja poprzez ich wapnowanie oraz wyłączenie stawu/stawów z użytkowania przynajmniej na jeden sezon. Z punktu widzenia hodowców zaburza to cykl produkcyjny oraz generuje straty finansowe. Jak wskazuje doświadczenie, po fali upadku wielu gospodarstw karpionych będących skutkiem infekcji koi herpes wirusem, brak szybkiej diagnozy praktycznie „skazuje” hodowcę na masowe śnięcia wszystkich roczników nawet do 100% obsady (Way i Stone, 2013).

Analogiczna sytuacja może mieć miejsce w przypadku carp edema virusa, który rozprzestrzenił się na całym świecie w bardzo krótkim czasie. Pierwsza jego detekcja miała miejsce już w latach siedemdziesiątych w Japonii (Murakami i in., 1976), gdzie obserwowano śnięcia młodocianych karpów koi. Opisane przez Japończyków objawy kliniczne to obrzęk ciała i pływanie na powierzchni stawu. Jak wynika z danych literaturowych, dopiero po około 40. latach od pierwszej detekcji CEV zaobserwowano i zdiagnozowano tę chorobę w Europie. W pierwszej kolejności było to w 2009 roku w Wielkiej Brytanii (Way i Stone, 2013) następnie we Francji i Holandii (Haenen i in., 2013), Austrii i Niemczech (Lewisch i in., 2015, Jung-Schroers i in. 2015), Węgrzech (Adamek i in., 2017), Korei Południowej (Kim i in., 2017), Ameryce Północnej (Lovy i in., 2018), Czechach i Słowacji (Matějčková i in., 2020), Indiach (Sahoo i in., 2020), Tajlandii (Pikulkaew i in., 2020) oraz Chorwacji (Zrnčić i in., 2020).

W Polsce pierwsza diagnoza wirusa CEV była wynikiem ponownej analizy prób zebranych w ramach programu nadzoru KHV z 36. gospodarstw hodowlanych (Matras i in., 2017). Pomimo, że próbki poddane analizie molekularnej miały archiwalne pochodzenie (zebrane w latach 2013-2015), to w przypadku 47% potwierdzono obecność materiału genetycznego wirusa CEV. Należy zatem postawić pytanie, czy brak detekcji CEV przez prawie cztery dekady od jego potwierdzenia w Japonii, wynikał faktycznie z niezaobserwowania objawów klinicznych czy śnięć, czy też był wynikiem braku diagnostyki w tym kierunku. Wysoce prawdopodobne jest to, że obserwowane w 2015 w hodowli karpów koi w Polsce objawy w postaci letargu ryb, białych, nekrotycznych zmian na skrzelach oraz śmiertelności dochodzącej do 90% obsady skłaniały hodowców do przypisania tych zmian infekcji koi-herpes-wirusowej. Niestety obraz kliniczny nie pozwala odróżnić infekcji spowodowanych KHV oraz CEV bez specjalistycznej diagnostyki molekularnej. Potwierdzenie obecności genomu wirusa CEV w trzech lokalizacjach, czyli okolicy Gryfina (gospodarstwa zajmujące się hodowlą ryb) a także w Gospodarstwie Rybackim zlokalizowanym w zlewni rzeki Wełny wskazują na wysokie prawdopodobieństwo, że wirus ten jest przenoszony jak do tej pory tylko pomiędzy gospodarstwami. Jak wskazuje analiza ponad 280 osobników różnych gatunków ryb z wód jeziora Dąbie i Zalewu Szczecińskiego, nie udało się uzyskać izolatu wirusa CEV. Jedynie w przypadku kilku osobników płoci, lina, uklei i karasia, w pierwszej fazie analiz otrzymano pozytywny wynik uwidoczniony w elektroforezie. Nie udało się jednak dla tych prób uzyskać wysokiej jakości sekwencji nukleotydowej. W obu gospodarstwach z okolic Gryfina, w latach poprzedzających niniejsze badania zdiagnozowano również infekcje koi herpes wirusa. Inaczej wygląda sytuacja epidemiologiczna w gospodarstwie zlokalizowanym w zlewni rzeki Wełny. Pomimo braku jakichkolwiek objawów klinicznych oraz ponadnormatywnych śnięć ryb, zdiagnozowano wirusa CEV, pomimo, że w latach intensywnego rozprzestrzeniania się wirusa KHV, to gospodarstwo

zachowało status wolny od tej choroby. Jest to wyjątkowe, ponieważ rzeka Wełna jest dopływem Warty, gdzie w latach 2007-2008 (Kempster i in., 2008) stwierdzono liczne ogniska koi herpes virusa.

Ze względu na brak potwierdzonej w niniejszych badaniach sekwencji CEV u ryb z wód naturalnych, należy przeanalizować dwie hipotezy. Pierwsza zakłada, że wirus CEV w przeciwieństwie do wirusa KHV nie przenosi się w tak szybki i skuteczny sposób z gospodarstw hodowlanych na gatunki bytujące w wodach otwartych. Druga hipoteza to założenie, że ze względu na tak długi czas (ponad cztery dekady) pomiędzy pojawieniem się CEV po raz pierwszy w Japonii i rozprzestrzenianiem się tego patogenu na inne kraje w latach 2009-2020 doszło do wyewoluowania wariantów genetycznych CEV, których nie można zidentyfikować przy wykorzystaniu zaleceń diagnostycznych rekomendowanych przez World Organisation for Animal Health (WOAH). Jak wskazują badania Adamka i in. (2017), bezpośrednia transmisja horyzontalna jest istotną ścieżką przenoszenia się CEV w środowisku a transmisja wertykalna jest mało prawdopodobna. Ze względu na szczątkowe informacje naukowe na temat cech biofizycznych wirusa, trudno jest określić znaczenie i możliwości transmisji pośredniej. Taki typ transmisji został zdefiniowany dla koi herpes virusa dopiero po 6. latach od jego pierwszej detekcji w Polsce. Badania Kiełpińskiego i in. (2010) potwierdziły, że aktywny udział w zarażeniu karpia koi-herpes-virusem mogą odgrywać małże z rodziny Unionidae.

Wirus CEV należy do rodziny pokswirusów (Poxviridae), czyli wirusów DNA o największych rozmiarach, złożonej strukturze oraz obecnym kapsydie, których replikacja zachodzi wyłącznie w cytoplazmie komórek (Collier, 1996). Można przypuszczać, że skrzela ryb utworzone z listków i blaszek skrzelowych, pokrytych cienkim nabłonkiem tworzą idealną przestrzeń komórkową do namnażania wirusa. Jak wskazuje Evans i in. (2005) funkcja skrzeli u ryb nie ogranicza się jedynie do oddychania, ale są również odpowiedzialne za równowagę jonową i usuwanie produktów metabolicznych. Jak wykazała metoda hybrydyzacji *in situ*, partykuły wirusa CEV skumulowane są głównie w okolicach nasady blaszek skrzelowych oraz blaszek skrzelowych. Wraz z replikacją wirusa i utratą funkcjonalności przez poszczególne fragmenty skrzeli, ulegają one oderwaniu od łuków skrzelowych i w tej formie dostają się do wody. Ten mechanizm jest istotny dla określenia roli wody jako medium, z zawieszoną materią organiczną, w tym głównie skrawkami skrzeli w stadium nekrozy, skóry i łusek bytujących w niej ryb – w transmisji CEV pomiędzy gospodarstwami oraz pomiędzy stawami a środowiskiem naturalnym. W gospodarstwach hodowlanych w których w niniejszej pracy potwierdzono obecność CEV nie prowadzi się zamkniętych systemów produkcji. Materiał pozyskuje się w miarę możliwości z własnego tarła, ale większa jego część pochodzi z ośrodków wylęgarniczych. Z informacji od hodowców wynika również, że wszystkie ośrodki dokonują spuszczenia wody ze stawów podczas ich osuszania (lub też z basenów podczas ich czyszczenia) do wód naturalnych, co w sposób bezpośredni może sprzyjać przenikaniu cząstek CEV do dziko żyjącej ichtiofauny.

Z niniejszych badań określających rolę poszczególnych narządów u karpia z pozytywnym wynikiem obecności genomu CEV wynika, że wirus ten wykazuje tropizm nie tylko do skrzeli karpia, tak jak podaje WOAH (2023). Należy wskazać skórę oraz nerkę jako miejsca, w których jest możliwa replikacja wirusa. Zastosowana metoda hybrydyzacji *in situ*, wskazała obecność genomu CEV, co typuje komórki skóry i nerki do ich wykorzystania w diagnostyce przesiewowej. Wyniki te oznaczają, że prawdopodobnym scenariuszem ekspansji nowych genogrup CEV, które zostały zdefiniowane przez Adamka (2018) są inne narządy niż skrzela. Ma to duże znaczenie w kwestii klinicznej, ponieważ skrzela przy ekspozycji na CEV ulegają jako pierwsze wyniszczeniu (obrzęk i martwica) a możliwość replikacji w innych narządach daje szansę na zwiększenie ilości infekowanych komórek.

Wyjaśnienie i zdefiniowanie patogenezы wirusem CEV (czyli doprowadzenia do choroby) obejmuje zarówno etap dostania się patogenu do organizmu ryby, następnie jego replikację we wrażliwych komórkach, ominięcie linii obrony miejscowej gospodarza, rozprzestrzenianie się do innych narządów i docelowo przeniesienie się z organizmu zakażonego na nowego gospodarza. Określenie nowych narządów takich jak skóra czy nerka wskazuje zatem, iż wirus CEV poprzez mutacje i ewolucję genomu, znalazł nowe typy komórek, gdzie może zachodzić jego namnażanie. Koncentrację cząstek wirusa CEV w tkankach karpia koi, analizował też Adamek (2016). Autor wykorzystał specyficzny ilościowy PCR (qPCR) dla szczepów wirusa, o którym wiadomo, że zakażają karpia koi. Nowo opracowany test qPCR może być użytecznym narzędziem badawczym nad patobiologią CEV. Nie ma jednak badań, które w celu udoskonalenia przyszłej diagnostyki wprowadziłyby inną metodykę niż określanie ilości kopii wirusa w tkankach. Świadczy o tym również ujęcie tej metodologii na liście sieci akredytowanych laboratoriów specjalistycznych do diagnostyki weterynaryjnej „Laboklin”. Świadczone w 38. państwach na całym świecie usługi tej renomowanej firmy, opierają swoją metodologię diagnozowania carp edema virusa na podstawie real-time PCR, zaś materiałem wyjściowym są tylko i wyłącznie skrzela ryb (<https://laboklin.com/en/products/infectious-diseases-pathogens-and-antibody-detection/viruses/carp-edema-virus-cev/carp-edema-virus-cev-pcr/>).

Porównania metod wykorzystujących reakcje PCR do detekcji genetycznych wariantów CEV dokonał Adamek ze współpracownikami w 2017 roku. Przeanalizował 39 próbek pochodzących z różnych regionów geograficznych, poddając je analizie molekularnej według pięciu dostępnych protokołów. Autorzy wykazali, że testy PCR opracowane w Centrum ds. Nauki o Środowisku, Rybołówstwie i Akwakulturze (CEFAS) charakteryzowały się najwyższą czułością diagnostyczną. Jak wskazują niniejsze badania, wykorzystanie reakcji PCR czy też nested PCR nie jest jedyną dostępną metodologią, minimalizującą pozyskanie wyników fałszywie negatywnych. Opracowanie i optymalizacja warunków hybrydyzacji *in situ* przedstawiona w niniejszej pracy pozwala na rozszerzenie diagnostyki w kierunku detekcji CEV o nowe narządy i tkanki. Określa to również kierunek ewolucji genomu CEV, co w przyszłości z dużym prawdopodobieństwem doprowadzi do powstania nowych tzw. „polskich izolatów”, analogicznie jak miało to miejsce w przypadku koi herpes virusa. Świadczy o tym skonstruowane drzewo filogenetyczne, które wykazało, że sekwencje pozyskane w ramach niniejszych badań utworzyły dwa odrębne klady. Wcześniejsze sekwencje z Polski, które stanowiły podstawę do zdefiniowania tzw. genogrup CEV, izolowane w 2016 roku znajdują się pomiędzy sekwencjami z Węgier, Indii, USA oraz Niemiec.

Jak wskazuje Way i in. (2017), poprawa zarządzania środowiskiem wodnym i kontrola chorób jest możliwa a zasady bezpieczeństwa biologicznego zastosowane w przypadku herpeswirusa koi można w równym stopniu zastosować do CEVD (carp-edema-virus-diseases). Way podnosi jednak, że konieczne jest wypełnianie luki w wiedzy na temat patogenezы i epidemiologii chorób, które obecnie uniemożliwiają dokładną ocenę potencjalnego wpływu CEVD na hodowle karpia koi, karpia pospolitego oraz stad karpia dziko żyjących.

Obecność w wodach naturalnych wielu potencjalnych wektorów umożliwiających transmisję CEV w środowisku i zdefiniowanie jedynie kilku gatunków tzn. lin, ukleja, płoci i karaś spośród badanych wskazuje na zdecydowanie niskie zagęszczenie cząstek wirusa nawet w pobliżu ośrodków hodowli, gdzie stwierdzono obecność ryb zainfekowanych CEV. Matras i in. (2019) również wykazali obecność wirusa CEV u lina, karasia pospolitego i karasia srebrzystego, płoci, uklei i okonia. Różnica polega jednak na tym, że autorzy wykorzystali metodę eksperymentalnej kohabitacji, czyli zarażenia ww. gatunków poprzez umieszczenie ich w wspólnych basenach przy

optymalnej temperaturze 16°C. Taki sposób definiowania wektorów znacznie różni się od ich identyfikacji w wodach naturalnych ze względu na inny profil termiki wód strefy klimatu umiarkowanego w odniesieniu do temperatur optymalnych do replikacji wirusa CEV w tkankach.

Znamiennym jest pojawienie się sekwencji z Wielkiej Brytanii, pośród sekwencji wyizolowanych w Chinach oraz kladu z sekwencjami izolowanymi w Polsce w roku 2016 (wszystkie) wraz z tymi, pochodzącymi z USA, Niemiec i Węgier. Handel karpami koi pochodzącymi z Chin oraz handel materiałem zarybieniowym pochodzącym w dużej mierze z Węgier może stanowić jedną z potencjalnych ścieżek epidemiologicznych wpływających na transmisję CEV na teren Polski. Bardzo prawdopodobne, że odrębność genetyczna sekwencji z Korei Południowej, wynika z ograniczonej skali importu ryb z tego państwa.

Analiza drzewa filogenetycznego wskazuje również na konieczność zweryfikowania i poddania testom czułości obecnie wykorzystywanych starterów do detekcji CEV. Ze względu na odrębność genetyczną sekwencji wirusa CEV, które były izolowane w latach 2009–2014 oraz izolowanych po roku 2019 można przypuszczać, że zachodzi proces ewolucyjnego wyłaniania się lokalnych izolatów, analogicznie jak miało to miejsce w przypadku koi herpes virusa. Daje to niestety możliwość potencjalnego uzyskiwania coraz większej ilości wyników fałszywie negatywnych. Oznacza to, że startery wykorzystywane między innymi przez akredytowane specjalistyczne laboratoria do diagnostyki weterynaryjnej, świadczące usługi na całym świecie (Laboklin) powinny otrzymać uaktualnione protokoły ze starterami do reakcji real time PCR, uznanej za obowiązkową dla CEV, z uwzględnieniem zmienności pomiędzy izolatami, pozyskanymi z różnych rejonów geograficznych. Ma to ogromne znaczenie w minimalizowaniu efektu niezamierzonej transmisji wirusa CEV pomiędzy państwami, które dokonują obrotu żywymi karpami, głównie karpami koi. Również wszelkiego rodzaju wystawy i giełdy karpki koi, gdzie wystawcy/hodowcy nie podlegają obowiązkowym badaniom na obecność genomu wirusa CEV u oferowanych ryb, stanowią bardzo poważne źródło jego rozprzestrzeniania się na całym świecie.

Transmisja wirusów infekujących ryby w środowisku wodnym stanowi ogromny problem ze względu na niekontrolowane przemieszczanie się osobników chorych w tym nosicieli bezobjawowych. Mając na uwadze, że przenoszenie się wirusów może mieć charakter horyzontalny (głównie przez cząstki materii organicznej pochodzącej z zainfekowanych ryb) lub wertykalny (transmisja pomiędzy tarlakami a wylęgiem) w przypadku pojawiania się nowych chorób wirusowych istnieje konieczność analizy ścieżek ich transmisji. Carp edema virus podlega transmisji poprzez kontakt ryba-ryba, oraz ryba – gatunki wektorowe, co zostało stwierdzone poprzez doświadczenia kohabitacji ryb zdrowych (tzw. specific pathogen free – SPF) oraz zainfekowanych wirusem CEV (dane niepublikowane, S.M. Bergmann). Ze względu na konieczność zminimalizowania ryzyka dostania się wirusów do obiektów hodowli ryb, na przykład podczas zalewania stawów, podejmuje się próby ich eliminacji z wody. Bergmann i in. (2017) przeprowadzili badania nad środkiem dezynfekującym stosowanym przy produkcji żywności. Eksperymenty wykazały, że woda poddana ekspozycji na dezynfektant przez określony czas może zapobiec przenoszeniu infekcyjnych cząstek koi-herpes-virusa na ryby nie mające wcześniej kontaktu z wirusem a współżyjące z karpami zainfekowanymi. Takie wyniki dają szansę gospodarstwom tylko o małej kubaturze basenów do hodowli ryb. Nie są jednak użyteczne w systemie stawów ziemnych. Goodwin i in. (2004) wskazuje na jeszcze jeden element w środowisku wodnym, oprócz osobników zainfekowanych wirusami w sposób naturalny. Według naukowca, problem stanowi przenoszenie ryb, wykorzystywanych w wędkarstwie sportowym jako przynęty żywe lub mrożone, na zlewnie, z których nie pochodzą. Jest to ogromny problem w ochronie zdrowia ryb, nieuregulowany przepisami krajowymi w USA. Odpowiedzialne zarządzanie środowiskiem wodnym to także dbałość

o stan sanitarny wprowadzanego do wód naturalnych materiału zarybieniowego. Z badań Kempter i in. (2009) wynika, że nawet jesiotry, hodowane w gospodarstwach karpowych jako gatunki dodatkowe, mogą brać aktywny udział w transmisji koi-herpes-virusa na karpie. Autorzy pracy zalecają wprowadzenie obowiązku diagnostyki wirusowej dla osobników jesiotra rosyjskiego (*Acipenser gueldenstaedtii*) oraz jesiotra ostronosego (*Acipenser oxyrinchus*) pozyskanych z wód naturalnych a także dla zapłodnionej ikry, narybku i ryb przeznaczonych do zarybiania. Definiowanie potencjalnych ścieżek transmisji wirusów w środowisku wodnym daje zatem możliwość zminimalizowania ich rozprzestrzeniania się a wdrażanie aktualizowanych procedur wykrywania chorób wirusowych jest pilnie potrzebne.

Reasumując, należy zaznaczyć, iż światowa akwakultura ma coraz większe znaczenie ze względu na wzrost zapotrzebowania na wyżywienie populacji ludzkiej na świecie. Gatunek karpia stanowi ważne ogniwo ze względu na jego odporność na deficyty tlenowe i stosunkowo szybkie tempo wzrostu. Na jego produkcję mają ogromny wpływ choroby wirusowe, które zdziesiątkowały gospodarstwa hodowlane w Czechach, Polsce i na Węgrzech w latach 2003-2006. Najpoważniejsze choroby wirusowe to koi herpes virus (KHV), wiosenna wiremia (SCV) oraz odma karpowa (CEV). Jak wynika z danych Państwowego Instytutu Weterynarii w Puławach (dane niepublikowane, 2023) nie ma dostępnych kompleksowych zestawień strat w akwakulturze spowodowanych przez choroby wirusowe. Należy zatem podjąć wszelkie próby ograniczenia ich transmisji zarówno pomiędzy gospodarstwami hodowlanymi jak i pomiędzy gospodarstwami a środowiskiem naturalnym. Możliwe jest to tylko poprzez wskazanie gatunków wektorowych oraz uaktualnienie protokołów jego detekcji. Wszelkie nowe dane na temat biologii wirusów oraz dróg i możliwości ich transmisji stanowią podstawę do nowoczesnego i racjonalnego zarządzania środowiskiem wodnym.

6. WNIOSKI

1. Wśród ichtiofauny stwierdzono gatunki mogące potencjalnie brać udział w transmisji wirusa pomiędzy wodami naturalnymi a ośrodkami hodowli karpia. Zaliczono do nich: płoć, ukleję, karasia pospolitego oraz lina. Stwarza to konieczność rozszerzenia monitoringu wirusologicznego na wskazane gatunki w ciekach wykorzystywanych do zalewania stawów karpiovych.
2. Określenie lokalizacji materiału genetycznego wirusa CEV w narządach i tkankach pozwala na sformułowanie wytycznych dla Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (WOAH). Poza skrzelami, przydatność do diagnostyki molekularnej wykazała skóra oraz nerka karpia, zatem powinny one znaleźć się w protokołach diagnostycznych.
3. Klady uzyskane w drzewie filogenetycznym sekwencji wirusa CEV, pozwalają na skonstruowanie aktualnych starterów do reakcji PCR.
4. Poziom zmienności w obrębie sekwencji genu kodującego białko rdzeniowe P4a wskazuje, że wyewoluowanie odrębnych izolatów CEV trwa zaledwie kilka lat. Należy zatem uwzględnić wysokie ryzyko pojawiania się w diagnostyce coraz większej ilości wyników fałszywie negatywnych.
5. Wyniki stopnia zainfekowania wirusem CEV gospodarstw hodowlanych oraz zdecydowanie niższy stopień jego wykrywania w rybach dziko żyjących pozwala na stwierdzenie, że wirus CEV obecny jest głównie w gospodarstwach hodowli karpia, zatem powinny one zostać objęte obowiązkiem diagnostyki molekularnej.

7. LITERATURA

1. Adamek M., Baska F., Vincze B., Steinhagen D. (2017). Carp edema virus from three genogroups is present in common carp in Hungary. *J. Fish Dis.* 41, 463-468.
2. Adamek M., Jung-Schroers V., Hellmann J., Teitge F., Bergmann S. M., Runge M., Kleingeld D. W., Way K., Stone D. M., Steinhagen D. (2016). Concentration of carp edema virus (CEV) DNA in koi tissues affected by koi sleepy disease (KSD). *Dis. Aquat. Org.* 119 (3), 245-251.
3. Adamek M., Matras M., Jung-Schroers V., Teitge F., Heling M., Bergmann S.M, Reichert M., Way K., Stone D. M., Steinhagen D. (2017). Comparison of PCR methods for the detection of genetic variants of carp edema virus. *Dis. Aquat. Org.* 126 (1), 75-81.
4. Adamek M., Hellmann J., Jung-Schroers V., Teitge F., Steinhagen D. (2018). CyHV-2 transmission in traded goldfish stocks in Germany – a case study. *J. Fish Dis.* 41(2), 401–404.
5. Ahne W. (1976). Untersuchungen über die Stabilität des karpfenpathogenen Virusstammes 10/3. *Fisch und Umwelt.* 2, 121 – 127.
6. Ahne W., Bjorklund H.V., Essbauer S., Fijan N., Kurath G., Winton J.R. (2002). Spring wiremia of carp (SVC). *Dis. Aquat. Org.* 52, 261 – 272.
7. Antychowicz J. (2004). Choroby karpia choroby środowiskowe, wirusowe i bakteryjne. Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut badawczy, Puławy.
8. Antychowicz J. (2014). Ewolucja rabdowirusów ryb, ze szczególnym uwzględnieniem wirusa wirusowej posocznicy krwotocznej. *Życie Wet.* 89(8), 655 – 661.
9. Antychowicz J. (2014). Najnowsze badania nad etiologią, patogenezą, diagnostyką i zwalczaniem zakażenia karpia wirusem herpes karpia koi. *Życie Wet.* 89(11), 923 – 927.
10. Antychowicz J. (2017). Przyczyny strat w hodowli karpia i ich leczenie. *Życie Wet.* 92(3), 190 – 200.
11. Becker J.A., Tweedie, A. Rimmer, M. Landos, M. Lintermans, R.J. Whittington. (2014). Incursions of cyprinid herpesvirus 2 in goldfish populations in Australia despite quarantine practices. *Aquaculture.* 432, 53 – 59.
12. Bekesi L., Csontos L. (1985). Isolation of spring viraemia of carp virus from asymptomatic broodstock carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Dis.* 8, 471 – 472.
13. Bergmann S. M., Kempter J., Sadowski J., Fichtner. (2006). First detection, confirmation and isolation of koi herpesvirus (KHV) in cultured common carp (*Cyprinus carpio* L.) in Poland. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 26(2), 97 – 104.
14. Bergmann S.M., Monro E.S., Kempter J. (2017). Can water disinfection prevent the transmission of infectious koi herpesvirus to naïve carp? – a case report. *J. Fish Dis.* 40, 885-893.
15. Bretzinger A., Fischer-Scherl T., Oumouma M., Hoffmann R., Truyen U. (1999). Mass mortalities in koi *Cyprinus carpio* associated with gill and skin disease. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 19, 182 – 185.
16. Brylińska M. (1986). Ryby słodkowodne Polski. Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN.
17. Collier L., Oxford J. (1996). *Wirusologia*. PZWL. pp. 467
18. Council Directive 91/67/EEC of 28 January 1991, concerning the animal health conditions governing the placing on the market of aquaculture animals and products.

19. Crane M., Sano M., Komar C. (2004). Infection with koi herpes virus – disease card. Developed to support the NACA/FAO/OIE regional quarterly aquatic animal disease (QAAD) reporting system in the Asia-Pacific. NACA, Bangkok. 1 – 11.
20. Dixon P.F. (2008). Virus diseases of cyprinids. [In: Fish Diseases. Vol. 1. Eiras J.C., Segner H., Wahli, T., Kapoor, B.G. (eds.)]. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, USA. 87 – 184.
21. Evans D. H, Piermarini P. M, Choe K. P. (2005). The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol Rev.* 85(1), 97 – 177.
22. Gilad O., Yun S., Andree K.B, Adkison M.A., Way K., Willits N.H., Bercovier H., Hedrick R.P. (2003). Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, the koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi. *J. Gen. Virol.* 84, 1 – 8.
23. Goodwin A.E., Peterson J.E., Meyers T.R., Money D.J. (2004). Transmission of exotic fish viruses: The relative risks of wild and cultured bait. *Fisheries* 29, 19-23.
24. Goodwin A.E., Khoo L., Lapatra S.E., Bonar C., Key D.W., Garner M., Lee M.V., Hanson L. (2006). Goldfish Hematopoietic Necrosis herpesvirus (Cyprinid herpesvirus 2) in the USA: molecular confirmation of isolates from diseased fish. *J. Aquat. Anim. Health*, 18(1), 11 – 18.
25. Goodwin, A. (2003). Differential diagnosis: SVC vs KHV in Koi. *Fish Health Newsletter*. 31, 9 –13.
26. Gorda, S., Bakos, J., Liska, J., Kakuk, C. (1995). Live gene bank of common carp strains at the Fish-Culture-Research-Institute, Szarvas. *Aquaculture*. 129, 199 – 202.
27. Haenen O., Way K., Stone D. & Engelsma M. (2013) Koi Sleepy Disease (KSD) door ‘Carp Edema Virus’: eerste detectie in Nederlandse koi. *Aquacultuur* 5, 27 – 29.
28. Haenen O.L.M., Way K., Bergmann S.M., Ariel E. (2004). The emergence of koi herpesvirus and its significance to European aquaculture. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 24, 293 – 307.
29. Halver J.E. (1954). Fish diseases and nutrition. *Trans. Am. Fish. Soc.* 83, 254 – 261.
30. Hedrick R.P., Gilad O., Tun S., Spangenberg J.V., Marty G.D, Nordhausen R.W, Kebus M.J, Bercovier H., Eldar A. (2000). A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of a common carp. *J. Aquat. Anim. Health*. 12, 44 – 57.
31. Heljasvaara R., Rodriguez D., Risco C., Carrascosa J. L., Esteban M., Rodriguez J. R. (2001). The major core protein P4a (A10L gene) of vaccinia virus is essential for correct assembly of viral DNA into the nucleoprotein complex to form immature viral particles. *J. Virol.* 75(13), 5778 – 5795.
32. Hryszko K., (2023). Aktualne informacje rynkowe. *Przegląd Rybacki*, 2 (188), 8-9.
33. Hryszko K., Lirski A. (2013). Wpływ importu karpia konsumpcyjnych na ich produkcję i ceny w Polsce. *Komunikaty Rybackie*. 6, 2 – 6.
34. Jeffery K.R., Bateman K., A. Bayley, Feist S.W., Hulland J., Longshaw C., Stone D., Woolford D., Way K. (2007). Isolation of a cyprinid herpesvirus 2 from goldfish, *Carassius auratus* (L.), in the UK. *J. Fish Dis.* 30, 649 – 656.
35. Jung-Schroers V., Adamek M., Teige F., Hellman J., Bergman M.S., Schütze H., Kleingeld D.W., Stone D., Runge M., Keller B., Hesami Sch. Waltzek T., Steinhagen D. (2015). Another potential carp killer? Carp edema virus disease in Germany. *BMC Vet. Res.* 11, 114.
36. Jurecka P. (2008). Transferrin polymorphism of common carp: link with disease resistance. PhD Thesis. Wageningen University, The Netherlands.

37. Kadhim R. A. (2009). Resistance of common carp fishes *Cyprinus carpio* (L.) to re-infection by anchor worm *Lernaea cyprinacea* (L.) QJAS. 14(3), 49 – 58.
38. Karnai L., Szűcs I. (2018). Outlooks and perspectives of the common carp production. Rocz. Nauk. Stow. Ekon. Rol. Agrobiz. XX (1) 64 – 71.
39. Kempster J., Kiełpiński M., Panicz R., Sadowski J. (2008). Określenie nosicielstwa i podatności na infekcje Koi-Herpes-Virusem wybranych gatunków ryb karpiowatych i ich krzyżówek pochodzących z wód otwartych i obiektów hodowlanych położonych w zlewni Odry. Wydawnictwo Akademii Rolniczej, Szczecin.
40. Kempster J., Sadowski J., Schutze H., Fischer U., Dauber M., Fichtner D., Panicz R., Bergmann S.M. (2009). Koi-herpes-virus: do acipenserid restitution programs pose a threat to carp farms in the disease-free zones? Acta Ichthyologica et Piscatoria, 39 (2), 119-126.
41. Kiełpiński M., Kempster J., Panicz R., Sadowski J., Schutze H., Ohlemeyer S., Bergmann S.M. (2010). Detection of KHV in freshwater mussels and crustaceans from ponds with KHV history in common carp (*Cyprinus carpio*). Isr. J. Aquac. - Bamidgeh. 62 (1), 28 –37.
42. Kim S.W., Jun J. W., Giri S. S., Chi C., Yun S., Kim H. J., Kim S. G., Kang J. W., Park S. C. (2017). First report of carp oedema virus infection of koi (*Cyprinus carpio haematopterus*) in the Republic of Korea. Transbound Emerg Dis. 65:315-320.
43. Lewisch E., Gorgoglione B., Way K., El-Matbouli M. (2015). Carp edema virus/Koi sleepy diseases: an emerging disease in Central-East Europe. Transbound. Emerg. Dis. 62, 6 – 12.
44. Lirski A. (2007). Wybrane informacje o karpniu i historii jego chowu na ziemiach polskich. [W: Wybrane zagadnienia dobrostanu karpia. Lirski A., Siwicki A.K., Wolnicki J. (red.)]. Instytut Rybactwa Śródlądowego, Olsztyn. 11 – 24.
45. Lirski A. (2021). Krajowa akwakultura w 2020 roku w świetle badań statystycznych. [W: Materiały szkoleniowe. Porozmawiajmy o przyszłości karpia]. Polskie Towarzystwo Rybackie, Poznań. 15 – 2.
46. Lirski A., Hryszko K. (2013). Ekstensywnie, intensywnie, czyli ile należy produkować karpia w Unii Europejskiej? [W: Chów karpia w Europie. Lirski A., Pyć A., Zaremba A. (red.)]. Aller Aqua Polska Sp. z o.o. Nożynko. 10 – 12.
47. Lirski A., Myszkowski L. (2008). Common carp *Cyprinus carpio* L. production in Poland at the beginning of the XXI century. [W: Resource Management, natural, human, and material resources for the sustainable development of aquaculture. Kamler E., Dąbrowski K. (red.)]. European Aquaculture Society. 381 – 382.
48. Lirski A., Myszkowski L. (2017). Polska akwakultura w 2016 roku na podstawie analizy kwestionariuszy RRW-22. Część 1. Komunikaty Rybackie. 6, 20 – 27.
49. Lovy J., Friend S. E., Al.-Hussine L., Waltzek T. B. (2018). First report of carp edema virus in the mortality of wild common carp *Cyprinus carpio* in North America. Dis. Aquat. Org. 131 (3), 177-186.
50. Luu-The V., Paquet N., Calvo E., Cumps J. (2005) Improved real-time RT-PCR method for high-throughput measurements using second derivative calculation and double correction. BioTechniques. 38, 287-293.
51. Matějčková K., Pojezdal L., Pokorová D., Reschová S., Piačková V., Palíková M., Veselý T., Papežíková I. (2020). Carp oedema virus disease outbreaks in Czech and Slovak aquaculture. J. Fish Dis. 43(9), 971-978.
52. Matras M., Borzym E., Stone D., Way K., Stachnik M., Maj-Paluch J., Palusińska M., Reichert M. (2017). Carp edema virus in Polish aquaculture – evidence of significant sequence

- divergence and a new lineage in common carp *Cyprinus carpio* (L.). J. Fish Dis. 40, 319 – 325.
53. Matras M., Stachnik M., Borzym E., Maj – Paluch J., Reichert M. (2019). Potential vector species of carp edema virus (CEV). J. Fish. Dis. 42, 959-964.
 54. Matras M., Stachnik M., Borzym E., Maj – Paluch J., Reichert M. (2022). Zagrożenie ze strony CEV w hodowli stawowej karpia. [W: Karp w obliczu nowych wyzwań. Materiały Szkoleniowe]. Polskie Towarzystwo Rybackie. Poznań. 61-67.
 55. Minamoto T., Honjo M.N., Yamanaka H., Tanaka N., Itayama T., Kawabata Z. (2011). Detection of cyprinid herpesvirus-3 DNA in lake plankton. Res. Vet. Sci., 90, 530 – 532.
 56. Miyazaki T., Isshiki T., Katsuyuki H. (2005). Histopathological and electron microscopy studies on sleepy disease of koi *Cyprinus carpio* koi in Japan. Dis. Aquat. Organ. 2005. 65, 197 – 207.
 57. Myszkowski L. (2022). Krajowa akwakultura w 2021 roku w świetle badań statystycznych. [W: Karp w obliczu nowych wyzwań. Materiały Szkoleniowe]. Polskie Towarzystwo Rybackie. Poznań. 7-13.
 58. Nowak Z., Gruszczyńska J. (2007). Wybrane techniki i metody analizy DNA. Wydawnictwo SGGW, Warszawa Wydanie I. 26 – 35.
 59. Ødegård J., Olesen I., Dixon P., Jeney Z., Nielsen H.M., Way K., Joiner C., Jeney G., Ardó L., Rónyai A., Gjerde B. (2010). Genetic analysis of common carp (*Cyprinus carpio*) strains. II: Resistance to koi herpesvirus and *Aeromonas hydrophila* and their relationship with pond survival. Aquaculture. 304(1/4), 7 – 13.
 60. Ono S., Nagai A., Sugai N. (1986). A histopathological study on juvenile colorcarp, *Cyprinus carpio*, showing edema. Fish Pathol. 21, 167 – 175.
 61. Panicz R., Sadowski J., Eljasik P. (2019). Detection of Cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) in symptomatic ornamental types of goldfish (*Carassius auratus*) and asymptomatic common carp (*Cyprinus carpio*) reared in warm-water cage culture. Aquaculture. 504, 131 –138.
 62. Perelberg A., Smirnov M., Hutoran M., Diamant A., Bejerano Y., Kotler M. (2003). Epidemiological description of new viral disease afflicting cultured *Cyprinus carpio* in Israel. Isr. In. J. Aqua. – Bamidgeh. 55(1), 5 – 12.
 63. Pikulkaew S., Phatwan K., Banlunara W., Intanon M, Bernard J. K. (2020). First Evidence of Carp Edema Virus Infection of Koi *Cyprinus carpio* in Chiang Mai Province, Thailand. Viruses. 12 (12), 1400.
 64. Pramoda K. S., Sabyasachi P., Anirban P., Manoj K. S., Pasim R.K. (2020.) Carp edema virus in ornamental fish farming in India: A potential threat to koi carps but not to co-cultured Indian major carp or goldfish. Indian J. Exp. Biol. 58, 254-262.
 65. Radosavljević V., Maksimović-Zorić Jelena, Veljović Ljubiša, Ljubojević Dragana, Ćirković Miroslav, Marković Zoran, Milićević Vesna. (2017). Cyprinid herpesvirus disease. Arch. Vet. Med. 10(1), 51 – 60.
 66. Rahmati-Holasoo H., Ahmadvand S., Shokrpoor S., El-Matbouli M. (2020). Detection of Carp pox virus (CyHV-1) from koi (*Cyprinus carpio* L.) in Iran; clinico-pathological and molecular characterization. Mol Cell Probes. 54.
 67. Ruszczyk A. (2004). Nowa herpeswirusowa choroba karpia. Życie Wet. 79(11), 609 – 612.
 68. Ruzauskas M., Armalyte J., Lastauskiene E., Šiugždinienė R., Klimiene I., Mockeliunas R., Bartkiene E. (2021). Microbial and antimicrobial resistance profiles of microbiota in

- common carps (*Cyprinus carpio*) from aquacultured and wild fish populations. *Animals*. 11, 929.
69. Sahoo P.K., Pattanayak S., Paul A., Sahoo M.K., Kumar P.R. (2020). Carp edema virus in ornamental fish farming in india: a potential threat to koi carps but not to co-cultured Indian major carp or goldfish. *Indian J. Exp. Biol.* 58, 254 – 262.
 70. Schubert G. (1966). The infective agent in carp pox. *Bull Off Int Epizoot.* 65, 1011 – 1022.
 71. Seno R., Hata N., Oymatsu T., Fukuda H. (2003). Curative effect of 0.5% salt water treatment on carp, *Cyprinus carpio*, infected with Carp Edema Virus (CEV). Results mainly from reviving the physiological condition of the host. *Suisanzoshoku*. 51 (1), 123-124.
 72. Soliman H., Lewisch E., El-Matbouli M. (2019). Identification of new genogroups in Austrian carp edema virus isolates. *Dis. Aquat. Org.* 136 (2), 193-197.
 73. Su H., Su J. (2018). Cyprinid viral diseases and vaccine development. *Fish Shellfish Immunol.* 83, 84 – 95.
 74. Torres-Meza O. A., Loza-Rubio E., Martínez-Maya J.J., García-Espinosa G. (2020). The first detection of koi herpesvirus (CyHV3) in migratory wild ducks in North America. *J. Aquat. Anim. Health.* 32(1), 28 – 31.
 75. Tyburski J., Studzińska A., Dąca P., Tretyn A. (2008). PCR w czasie rzeczywistym. Metody analizy danych. *Biotechnologia*. 1(80), 86 – 96.
 76. Vanslyke J.K., Whitehead S.S., Wilson E.M, Hruby D.E. (1991). The multistep proteolytic maturation pathway utilized by vaccinia virus P4a protein: a degenerate conserved cleavage motif within core proteins. *Virology*. 183(2), 467 – 78.
 77. Vendramin N., Olsen N. J. (2021). Overview of the disease situation in Europe. 25th Annual Workshop of the National Reference Laboratories for Fish Diseases. Kgs. Lyngby, Denmark, June 1.
 78. Walster C. (1999). Clinical observations of severe mortalities in koi carp, *Cyprinus carpio*, with gill disease. *Fish Vet. J.* 3, 54 – 58.
 79. Way K., Haenen O., Stone M., Adamek M., Bergmann S. M., Bigarré L., Diserens N., El-Matbouli M., Gjessing M. C., Jung-Schroers V., Lehuay E., Matras M., Olesen N. J., Panzarin V., Piac̣ková V., Toffan A., Vendramin N., Veselý T., Waltzek T. (2017). Emergence of carp edema virus (CEV) and its significance to European common carp and koi *Cyprinus carpio*. *Dis. Aquat. Org.* 126(2), 155 – 166.
 80. Way K., Stone D. (2013). Emergence of carp edema virus-like (CEV-like) disease in the UK. *Finfish News*. 15, 32 – 34.
 81. Wojda Ryszard. (2004). Karp. Chów i hodowla. Poradnik hodowcy. Instytut Rybactwa Śródlądowego, Olsztyn.
 82. Zrnčić S., Oraić D., Zupičić I. G., Pavlinec Ž., Brnić D., Rogić Ž. A., Sućec I., Steinhagen D., Adamek M. (2020). Koi herpesvirus and carp edema virus threaten common carp aquaculture in Croatia *J. Fish Dis.* 43, 673-685.

Źródła internetowe

2021. Infection with spring viraemia of carp virus. [In: Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2021]. Online Access, 18.03.2023: <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/aquatic-manual-online-access/>

2022. Infection of Koi Herpesvirus. [In: Aquatic Animal Health Code]. Online Access, 18.03.2023:
<https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/aquatic-code-online-access/>
2023. Infection with carp edema virus (CEV). [In: Diseases]. Online Access, 4.04.2023:
<https://www.woah.org/app/uploads/2023/03/a-woah-cev-disease-card-nov-2022.pdf>

PODZIĘKOWANIA

Z całego serca chciałabym podziękować Pani Profesor dr hab. Jolancie Kiełpińskiej za wsparcie, radę, pomoc, cierpliwość i wyznaczanie kierunku zarówno w nauce jak i w życiu. Nie mogłabym trafić lepiej.

Bardzo dziękuję Panu Profesorowi dr hab. inż. Remigiuszowi Paniczowi za naukę pracy w laboratorium i cenne rady.

Szczególne podziękowania dla Profesora dr hab. Svena Bergmanna za możliwość rozwijania mojego warsztatu o tajniki hybrydyzacji *in situ* oraz przeprowadzenia analiz w laboratorium Rządowego Instytutu Chorób Wirusowych w Riems.

Dziękuję mojej Rodzinie za motywację i otuchę oraz ambicję, którą wpoiliście mi od dziecka. Zrobiłam to dla siebie, ale i dla Was. Bez Was nie byłabym tu, gdzie teraz.

Przyjaciele, dziękuję Wam za bezinteresowną pomoc. Wasze wsparcie w trakcie pisania pracy i wiara we mnie wiele dla mnie znaczy.

