



KOI HERPESVIRUS DISEASE (KHVD) IN EUROPEAN AQUACULTURE, PREVENTION AND RISK ASSESSMENT

Chikova V., S.Kirova, E.Mileva
National Diagnostic & Research Veterinary Institute,
BFSA– Sofia

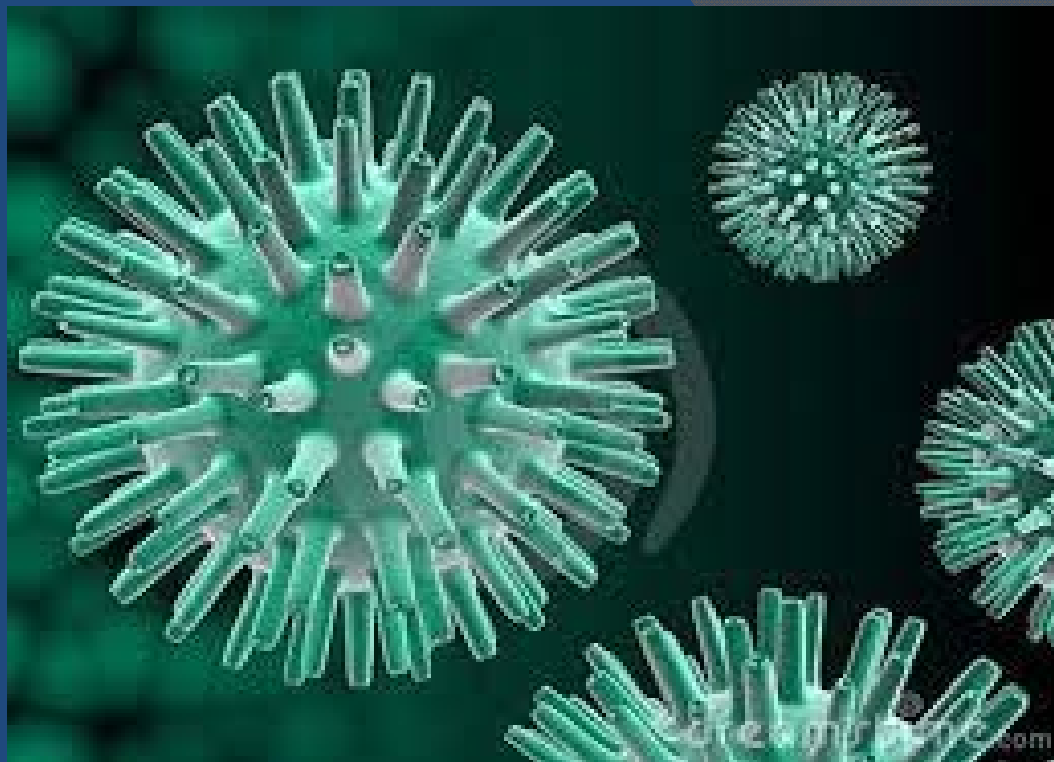
10th SCIENTIFIC CONFERENCE of the BG FP
31st October- 2nd November 2017, Sofia.Bulgaria

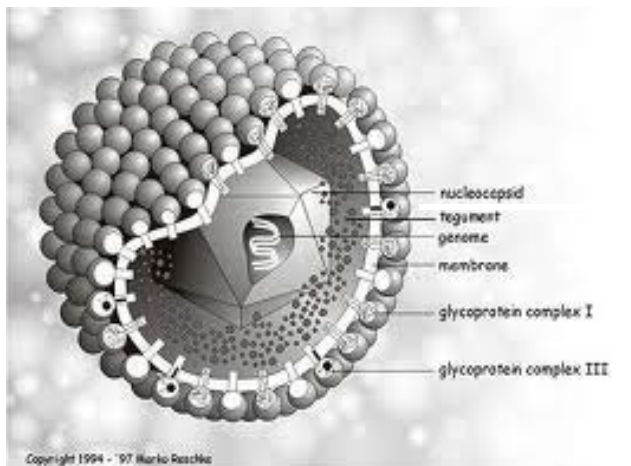
КОИ ХЕРПЕСВИРУСНА ИНФЕКЦИЯ

- Етиологичен агент:
- CyHV-3, KHV dsDNA,
Herpesvirales,
сем. *Alloherpesviridae*,
което включва още:

CyHV-1 – папилома вирус по рибите,
причинява шарка по шарана

CyHV-2 – причинява хематопоетична некроза
по декоративните златисти каракуди





КОИ ХЕРПЕСВИРУС

- големина - 150-295 kbp;
- нуклеокапсид 100-110 nm/d, заобиколен с обвивка;
- секвентният анализ показва тясна връзка с вирусите от сем. *Alloherpesviridae* и далечна с херпесвируса по каналния сом *IcHV-1* и херпесвируса по жабите *RaHV-1*

Кои херпесвирусна инфекция

Епизоотологични особености :

Възприемчиви видове: Cyprinus carpio, C. carpio koi, C. c. Goi и др. разновидности на шарана

Устойчивост на вируса: във вода – до 21 часа при оптимални условия (23-25°C) и до 3 денонощия при 15°C, 4 месеца при 9-11°C (в речна и бавнотечаща вода);

Патогенеза: прониква през хрилете и кожата и се размножава в хрилете, бъбрека и далака. Отделя се в големи количества със слюз, урина и фекалии през акутния период

Вектори: вода, механични преносители, паразити по рибите, други видове риби – есетра, сребриста каракуда, бял амур, толстолоб, мътница, дек. сомчета

Кои херпесвирусна инфекция

При възприемчиви популации - значителна заболяемост и между 80-100% смъртност

Клиничните признаци на заболяването най-често се проявяват при температура на водата между 22° и 27° C.

КЛИНИЧНИ ПРИЗНАЦИ



Кои херпесвирусна инфекция *клинични признаци*



Кои херпесвирусна инфекция

Диференциална диагноза:

*Пролетна виремия по шарана
Шарка по шарана,
интоксикации от различен
характер*



Кои херпесвирусна инфекция

Диагностика:

стандартна лабораторна практика
(клетъчни култури, серологични методи)



vs.



молекулярни методи
(конвенционален PCR, real time PCR, *in situ*)



За стандартен метод, с най-висок процент действително положителни резултати, е приета PCR в различните ѝ вариации.

В НРЛ е адаптирана конвенционална PCR техника, базирана на Наръчника от диагностични тестове за водни животни на OIE, 2016.





Референти щамове:

KHV 07/108b и KHV 07/108b, Anses, France

KHV-TP 30, Taiwan

Реагенти: Използвани бяха за сравнително изпитване три търговски кита за екстракция на вирусна ДНК

- Extraction kit на Guangzhou Geneshun Biotech Ltd, Китай
- Illustra™ Kit на General Electric Company, САЩ
- QIAmp kit, на Qiagen, Германия

За извършване на PCR бяха използвани два търговски кита

- QIAmp kit, на Qiagen, Германия
- Illustra™ Kit на General Electric Company, САЩ



Изпитани са два протокола за конвенционален PCR с доказване на **KHV** и използване на двойка праймери по Gray Sph / Yuasa

Forward = 5'-GAC-ACC-ACA-TCT-GCA-AGG-AG-3'

Reverse = 5'-GAC-ACA-TGT-TAC-AAT-GGT-CGC-3'

Протокол 1: (за обем от 25 μ l)

3 μ l проба

x 1,5 μ l от всеки праймер

19 μ l свободна от биологични ingredienti вода

Протокол 2: (за обем от 50 μ l)

5 μ l проба

25 μ l Taq Mix buffer

x 3 μ l от всеки праймер

14 μ l свободна от биологични ingredienti вода



Температурен режим за амплификация:

1 цикъл от 30 секунди на 94°C - *денатурация*

40 цикъла от

30 секунди на 94°C

30 секунди на 63°C

30 секунди на 72°C

- *намножаване*

време за финално удължаване - 7 минути на 72°C

съхранение – на 4°C



Визуализацията се извършваше чрез 1,5% агар-гел и електрофореза с последваща UV – фотодетекция и търсене на амплификационен бенд на маркерно ниво от 292 kb.

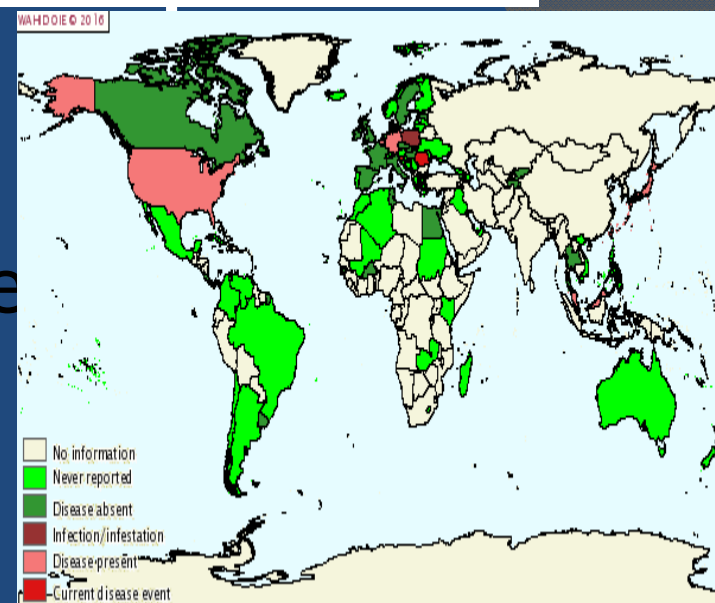


маркер + контрола KHV 7, KHV 8

Кои херпесвирусна инфекция



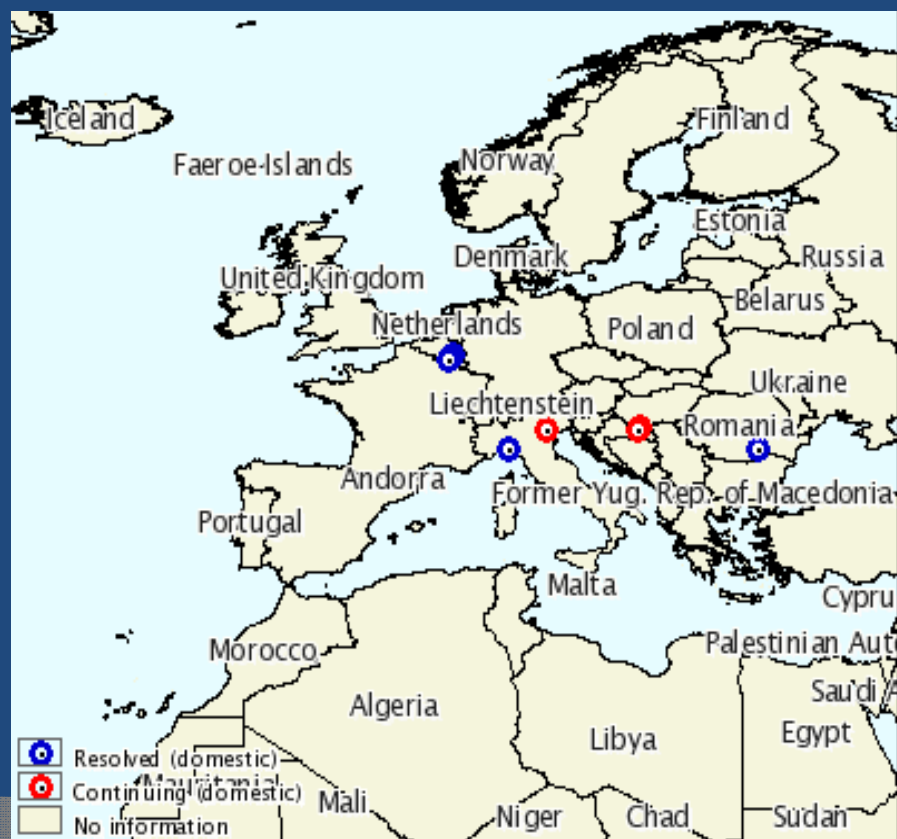
Географско разпространение
С. и И.Азия, 2008



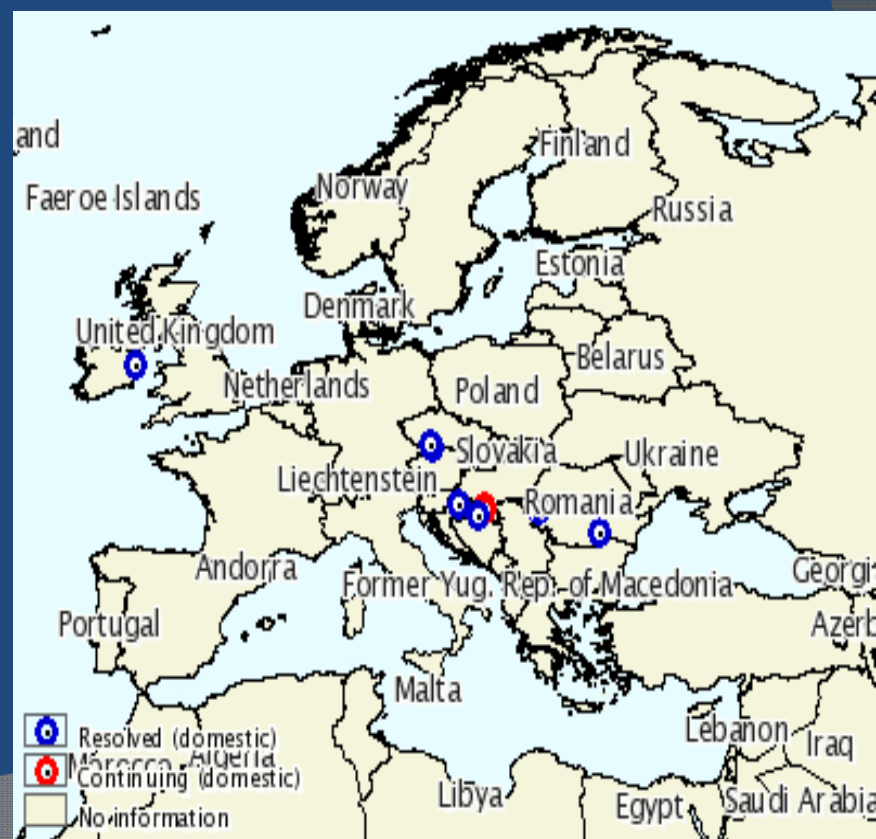
- ❖ 1998 – Израел
- ❖ 1999, 2013 – Германия
- ❖ 2000 – Великобритания (2008, 2009, 2010 г)
- ❖ 2004 - Холандия
- ❖ 2004 – САЩ (2005, 2006 и до момента)
- ❖ 2003 – Япония (2005, 2006 г)
- ❖ Вече и в редица други страни от Европа – Франция, Финландия, Дания, Италия, Полша
- ❖ За Русия и Турция – няма данни

Географско разпространение на KHVD

2016 г.



2017 г.



Оценка на риска от Кои херпесвирусна инфекция

Стъпка 1 — Определяне на опасностите от проникване и разпространение на КХВ в рибовъдните ферми и водната екосистема

Стъпка 2 - Характеризиране на опасността : възприемчиви популации, разпространение посредством търговия и внос на шаранов зарибителен материал и декоративни риби от Азия

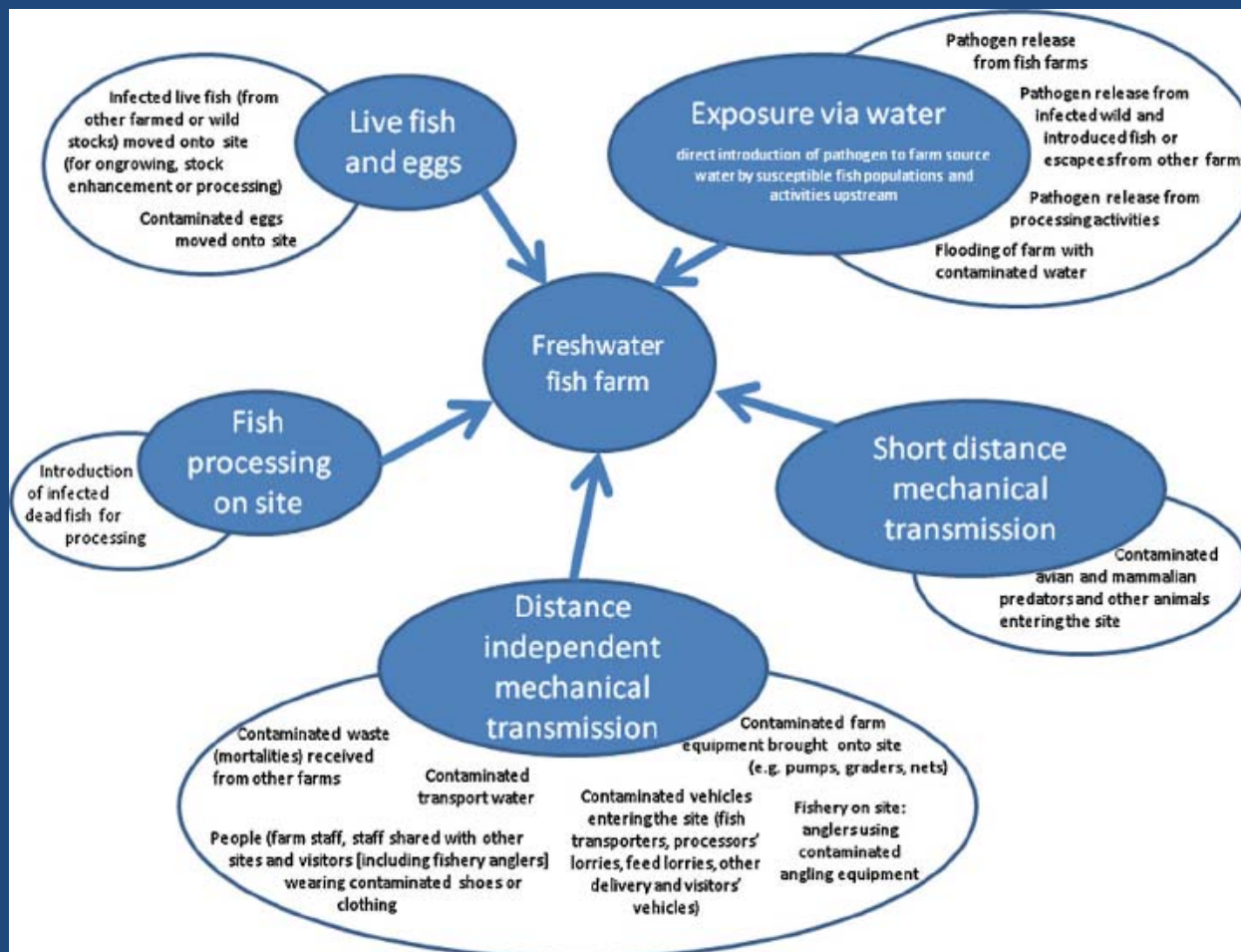
Стъпка 3 – Оценка на въздействието – потенциални икономически загуби и влияние върху водната екосистема

Оценяване на съществуващите рискове (тежест, вероятност и др.) и подреждането им по степен на важност.

Стъпка 4 – Управление на риска

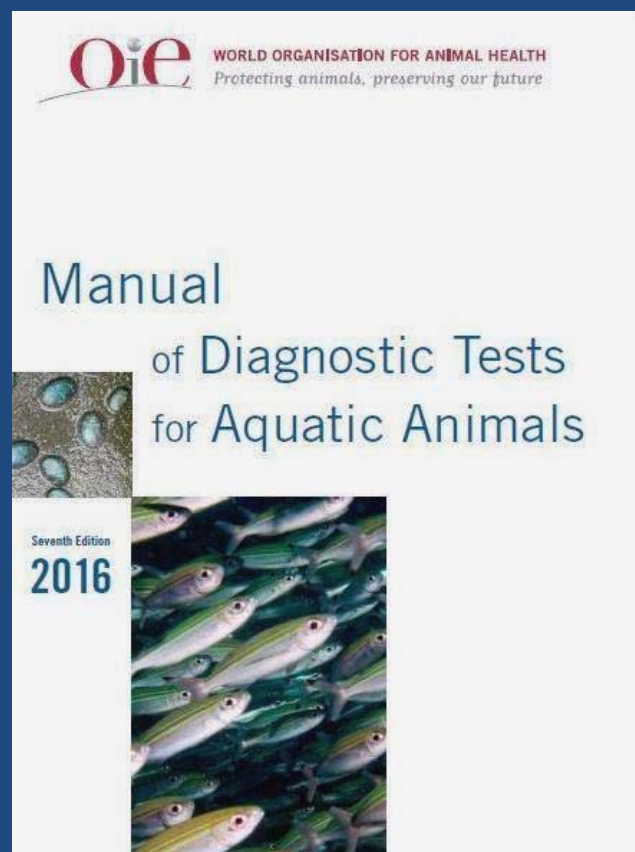
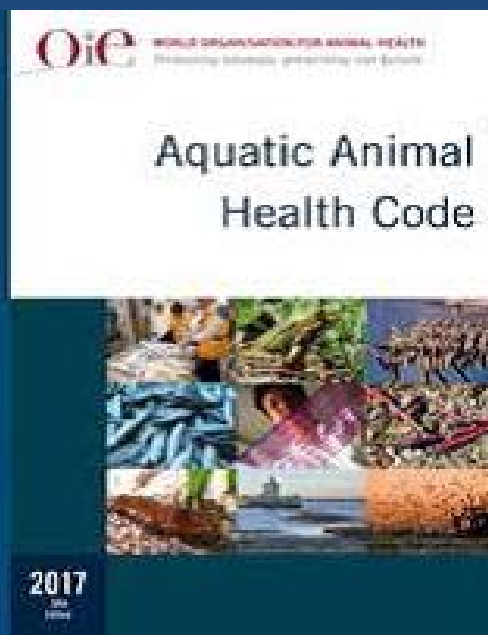
Акцентирането върху дейностите за превенция е от първостепенно значение. Нормативна база

Схематично илюстриране на пътя за въвеждането на патогените в сладководни рибовъдни стопанства е представено на фиг.1.



- Принципът и целите на наблюдението при водните животни са аналогични на тези за сухоземните животни.
- Въпреки това, налагат се специални предизвикателства за планиране на надзора предвид факта, че водата е основен фактор в системата за отглеждане , важен елемент е и плътността на рибната посадка във фермата и интензитета на технологичните връзки, свързани с разпространение на заразени популации.

НОРМАТИВНИ ДОКУМЕНТИ НА МЕЖДУНАРОДНАТА ОРГАНИЗАЦИЯ ПО ЗДРАВЕОПАЗВАНЕ НА ЖИВОТНИТЕ - OIE



Наръчник от
диагностични тестове за
водните животни на
Международното бюро по
епизоотии, 2016

Ветеринарно-санитарен
кодекс на водните
животни

ДИРЕКТИВА 2006/88/ЕС

НОВИ МОМЕНТИ В СРАВНЕНИЕ С ПРЕДИШНОТО ЗАКОНОДАТЕЛСТВО:

1. Обединени са всички изисквания за аквакултурите в обща Директива (All in one)
2. Въвежда се регистрация на всички бизнес оператори на аквакултури.
3. Въвежда категоризация на рибовъдните ферми в зависимост от техния здравен статус.
4. Регламентира провеждането на официален контрол за здравен статус (съгл. §7) и здравен надзор (съгл. §10)
5. Надзор, базиран на анализ на риска
6. Включват се нови заболявания –
ISA (инфекциозна анемия по съомгите)
KHV (Koi херпес вирус при шарана)
EHN (епизоотична хемопоеична некроза при пъстървите)

- Списъкът със заболявания сега включва и екзотични и неекзотични болести по риби, мекотели и ракообразни.
- Разширяване на акцента и обхвата на приложение - като освен първоначално се включат и морски аквакултури от Средиземно море и култивирани шаранови видове.
- Директивата включва много по-широк обхват от предприятия, както и планове за непредвидени ситуации, свързани с всички екзотични болести
- Прилага контрол, но като част от подход за оценка на риска. Така се гарантират най-добре изискванията за здравен статус на водните животни по възможно най-икономичен начин, като същевременно се осъществява и повишен надзор в рамките на цяла Европа.
- Отделя се повече внимание на профилактиката на заболяванията, а не на контрола чрез биосигурност
- Контрол, насочен към аквакултурите по определен модел, но и опазване на здравия статус на дивата природа и рибните запаси, тъй като всички те са в една екосистема.
- Контрол, насочен към аквакултурите по определен модел, но и опазване на здравия статус на дивата природа и рибните запаси, тъй като всички те са в една екосистема.
- Паралелно с това се залага като условие на търгуващите с ЕС трети страни да могат да покрият изискванията с еквивалентен стандарт.

Задължения

КОМПЕТЕНТЕН ОРГАН
БИЗНЕС ОПЕРАТОРИ в системата на
на производството на
аквакултури



Установяване на пълен надзор
на аквакултурите
и свързаната с
преработка им индустрия в ЕС

- Име & Адрес
- Регистрационен BG номер
- GIS позиция
- Продукция – тип на производство
- Детайли относно водоизточника
- Информация за здравния статус

Електронно въвеждане на
данните
(Article 59)

Решение /2015/1554/ ЕС визира:

- Лабораторно-диагностичните методи за откриване и потвърждаване на някои особено опасни заболявания по рибите
- Определя минималните изисквания към плановете за пробовземане.
- Критериите и ръководните принципи на програмата за здравно инспектиране , документиращи в исторически план отсъствие или наличие на заболяванията вирусна хеморагична септицемия и инфекциозна хемопоеична некроза по пъстървовите видове риба, както и кой херпесвирусна инфекция (KHVD) по шарана

Категоризация на фермите

категория	Здравен статус на фермата	от/за	Технологични връзки
I	СВОБОДНИ ОТ ЗАБОЛЯВАНЕ	I	I-V
II	ПРОГРАМА ЗА НАДЗОР	I	III+V
III	НЕИЗЯСНЕН СТАТУС (не е известно да е била инфектирана и не е прилагана програма за ерадикация за достигане на статут свободна от заболяване)	I, II & III	III+V
IV	ЕРАДИКАЦИОННА ПРОГРАМА	I	V
V	ИНФЕКТИРАНИ	I-V	V

Модел А – двугодишна програма за надзор
Отсъствие на клинични признаци и негативни резултати от лабораторните изследвания по време на двугодишен контролен период, предшестващ получаването на статут на одобрено

Вид рибовъдни Ферми	Бр.клинични инспекции	Бр.лабор. изследвания	Бр. Изсл. риби
шаранови	2	2	75/

Модел Б – програма за надзор с ограничен размер на пробата

- Документирано исторически доказано отсъствие на клинични признаци най-малко в продължение на 4 години;
- Отсъствие на клинични признаци и негативни резултати от лабораторните изследвания два пъти годишно в продължение на двугодишен контролен период, предшестващ получаването на статут на одобреност.

Вид рибовъдни Ферми	Бр.клинични инспекции	Бр.лабор. изследвания	Бр. Изсл. риби
Шаранови През първите две години	1	1	30
Шаранови През следващите две години N=2/pool	2	2	30

Програма за надзор

Ниво на риска	Бр.клинични инспекции	Бр.лабор. изследвания	Бр. Изсл. риби
Високо	2 всяка година	2	30
Средно ниво на риск	1 всяка година	1	30
ниско ниво на риск	1 на всеки две години	1	30

ПРОГРАМА ЗА НАДЗОР ВЪРХУ ЗДРАВΟΣЛОВНОТО СЪСТОЯНИЕ НА РИБИТЕ В РИБОВЪДНИТЕ ОБЕКТИ

съобразена с европейските нормативни документи за превенция и контрол на стопански значимите заболявания при рибите.

- Програмата за здравно инспектиране се основава едновременно на клинични инспектирания и лабораторни изследвания. В този нормативен документ са посочени изискванията за провеждане на клинични инспекции и вземане на проби за диагностични изследвания.
- В случаите, когато фермите подлежат на клинично инспектиране два пъти годишно, интервалите между тези инспекции не трябва да са по-малко от 4 месеца.
- В случаите на повече от един водоизточник в пробите трябва да бъдат включени риби от производствените единици, представляващи всички водоизточници.
- Регламентирани са и условията за транспортиране на пробите като пакетиране, етиктиране и температурно съхранение трябва да отговарят на действащата нормативна уредба.
- Специфичните разпоредби за извършване на клинични инспекции, събиране и подбор на проби за надзор, за да се получи или запази статута на одобрено

- Провежданите наблюдения върху епизоотичното състояние на рибовъдните ферми в нашата страна ни позволяват да анализираме новите тенденции и значението на всеки един от елементите в епизоотичния процес.
- Осъществяването на неконтролируеми технологични връзки, липсата на системен диагностичен контрол и нарушаването на основни ветеринарносанитарни изисквания при окомплектоване на стадата /транспортирането на зарибителен материал без ветеринарни сертификати или издаването им на база клиничен преглед без съответни лабораторно-диагностични изследвания, използването на непочистени и дезинфекцирани съдове, контейнери и транспортни средства/, както и липсата на категоризиране на рибовъдните ферми съобразно техния здравен статус е основната причина за разпространение на заболяванията в нашите рибовъдни ферми.

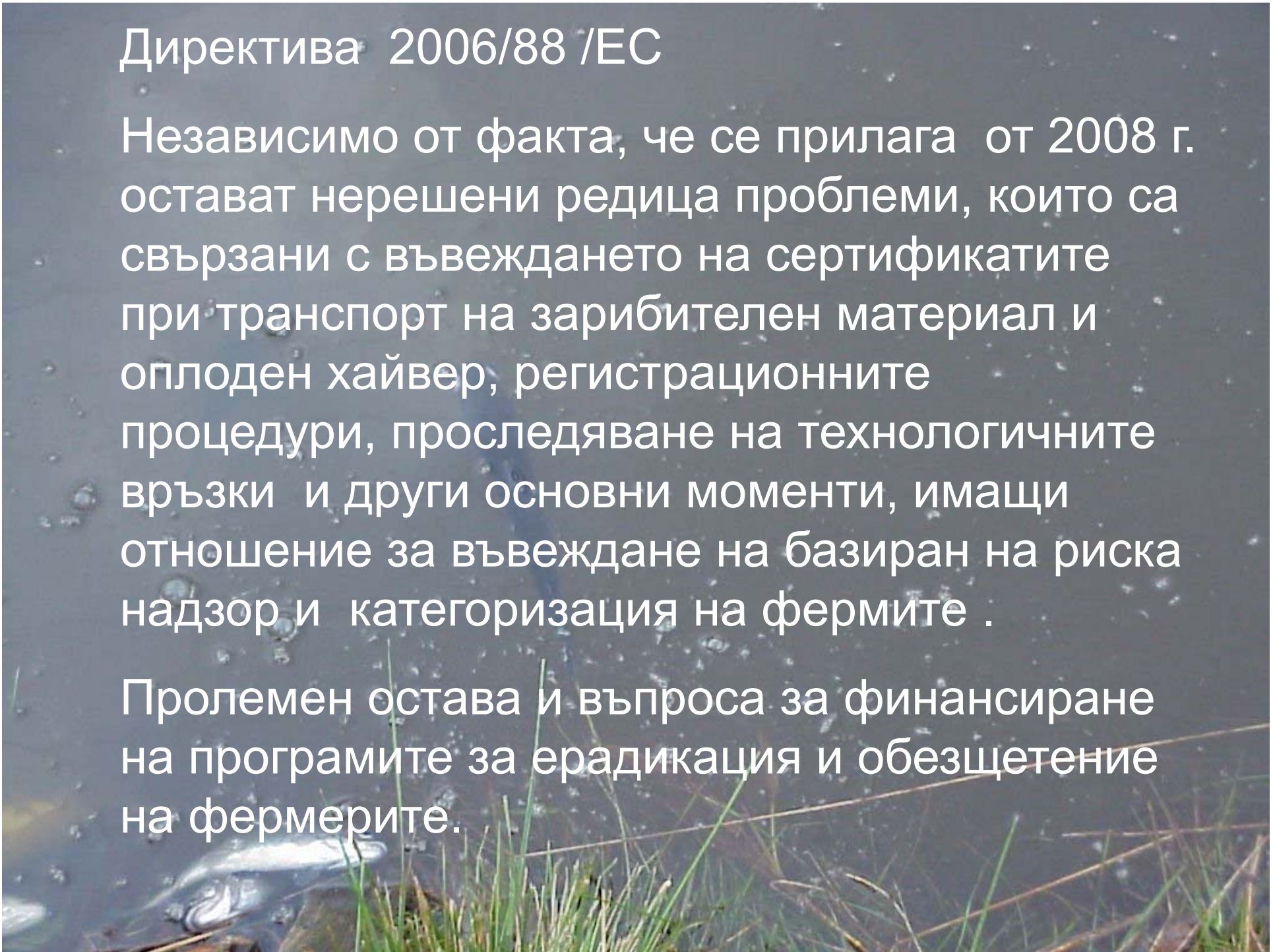
ПЪРВА ЛИНИЯ НА ЗАЩИТА –
НАБЛЮДЕНИЕ И ДОБРА ИНФОРМИРАНост НА
ТЕХНОЛОЗИТЕ И ФЕРМЕРИТЕ

- Ранно откриване на признаци за заболяване!
- Предприемане на действия за изясняване на причините за увеличена смъртност и уведомяване на регионалната структура за официален контрол

Директива 2006/88 /ЕС

Независимо от факта, че се прилага от 2008 г. остават нерешени редица проблеми, които са свързани с въвеждането на сертификатите при транспорт на зарибителен материал и оплоден хайвер, регистрационните процедури, проследяване на технологичните връзки и други основни моменти, имащи отношение за въвеждане на базиран на риска надзор и категоризация на фермите .

Пролемен остава и въпроса за финансиране на програмите за ерадикация и обезщетение на фермерите.



Процесите действително са в прогрес!

УСПЕШНОТО ИМ РЕШАВАНЕ ЗАВИСИ ОТ
ОТКРИТА И ПОЗИТИВНА КОЛАБОРАЦИЯ
МЕЖДУ ФЕРМЕРИТЕ И ТЕХНИТЕ
АСОЦИАЦИИ ОТ ЕДНА СТРАНА И ОТ ДРУГА –
ОТ КОМПЕТЕНТНИТЕ ОРГАНИ ЗА
ОФИЦИАЛЕН КОНТРОЛ



БЛАГОДАРЯ ЗА ВНИМАНИЕТО

