



Тракийски Университет
гр. Стара Загора
Ветеринарномедицински
факултет

Катедра „Фармакология, физиология на животните,
биохимия и химия”

Секция „Биохимия с основи на клиничната биохимия”

Димитринка Стойчева Запрянова

АВТОРЕФЕРАТ

за присъждане на научна степен „Доктор на науките” на тема:

Проучване промените на базисни биохимични,
хематологични и хормонални показатели, под влияние на
инфекциозни и неинфекциозни фактори при някои
сладководни видове риби със стопанска значимост

Професионално направление 6.4. Ветеринарна медицина
Научна специалност: „Биохимия“

Стара Загора
2026г.

Дисертацията е написана на 330 стандартни машинописни страници и е онагладена с 37 таблици. Оформена е съобразно изискванията. Библиографската справка съдържа 594 автора, от които 576 са на латиница, а 18 на кирилица. За провеждането на експериментите беше използвана „Учебно – експерименталната база по аквакултура“ при Тракийски университет, гр. Стара Загора.

Основната част от изследванията са извършени в секция „Биохимия с основи на клиничната биохимия“, Лабораторно-диагностичния корпус на Ветеринарномедицински факултет, Тракийски Университет, а малка част от изследванията са осъществени във факултета по Водни науки, Истанбулски университет, гр. Истанбул, Турция и факултета по Аквакултура, Анкарски факултет, гр. Анкара, Турция.

Трудът е обсъден на разширен катедрен съвет на 04.06.2026г.

Номерацията на разделите, фигурите и таблиците в автореферата не съответсват на тези в дисертацията.

БЛАГОДАРНОСТИ

Изказвам своята благодарност на доц. Александър Атанасов за безрезервната подкрепа, неговата всеотдайна помощ и работа през всичките етапи на това научно изследване.

Благодаря на доц. Галин Николов за неговите професионални съвети и опит, които допринесоха за реализирането на настоящото изследване.

Специални благодарности отправям към доц. Чийдем Юркю за нейния споделян опит и безценна помощ при развиването и завършването на този научен труд.

Сърдечни благодарности за подкрепата и помощта на колектива от секция „Биохимия с основи на клиничната биохимия“ на Ветеринарномедицински факултет при Тракийски университет, Стара Загора.

Защитата ще се състои на от часа в
Ветеринарномедицински Факултет, Тракийски Университет – Стара Загора.

Материалите по защитата на дисертацията са на разположение в Научен Отдел на Ветеринарномедицински факултет и на уебсайта на Тракийски Университет (www.uni-sz.bg).

Списък на използваните съкращения

ОФО	остро фазов отговор
ОФР	остро фазова реакция
ОФП	остро фазови протеини
CRP	С-реактивен протеин
hsCRP	високо чувствителен С-реактивен протеин
Ср	церулоплазмин
Fib	фибриноген
IL	интерлевкин
TNF- α	тумор некротизиращият фактор-алфа
ALT	аланинаминотрансфераза
AST	аспартатаминотрансфераза
ALP	алкална фосфатаза
Alb	албумин
СК	креатинкиназа
LDH	лактатдехидрогеназа
TG	триглицериди
T3	трийодтиронин
T4	тироксин
Ch	холестерол
LDL	липопротеини с ниска плътност
VLDL	липопротеини с много ниска плътност
RBC	червени кръвни клетки
WBC	бели кръвни клетки
Ly	лимфоцити
Mo	моноцити
Neu	неутрофили
Hct	хематокрит
Hb	хемоглобин
CYE	скорост на утаяване на еритроцитите
ФАО	Организацията по прехрана и земеделие
RAS	рециркулационна система

СЪДЪРЖАНИЕ

1. УВОД
2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ
3. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ
4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ
5. ОБОБЩЕНИЕ
6. ИЗВОДИ
7. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ
8. ПРАКТИЧЕСКИ ПОЛЗИ
9. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА
10. РЕЗЮМЕ НА АНГЛИЙСКИ ЕЗИК

1. УВОД

Биохимията е дисциплина, която обхваща знания по биология и химия с цел по-добро разбиране на биохимичните процеси протичащи в живите организми и в частност разгледаните тук водните организми. Разбирането на биохимичните процеси протичащи в тях е от съществено значение за оптимизиране на здравния им статус. Биохимията на водните организми и по-специално на рибите, обхваща познания относно метаболизма, влиянието на околната среда, храната, размножителния период и други фактори, които биха могли да окажат въздействие върху нормалното физиологично състояние на този вид животни. Промените в кръвните биохимични показатели при рибите са резултат от промени в околната среда и патогенни инфекциозни агенти, при оценяването на които биха могли да се предприемат навременни и ефективни мерки за подобряване на здравословното им състояние. Чрез разбирането и изучаването на биохимичните процеси при този вид животни, изследователите биха могли да подобрят условията на аквакултурата, да оптимизират производствените практики и здравния статус, като по този начин се гарантира безопасността и за крайните потребители. В това проучване се разглеждат различни аспекти от биохимията на рибите, включително основни процеси в техния метаболизъм, ендокринна функция, нуждите от хранителни вещества и биологично активни съединения, както и измененията, които възникват при тях в резултат на промяна в условията на околната среда, диета, етапите на размножаване и т.н.

Аквакултурата е подотрасъл на селското стопанство, който играе важна роля за икономическото развитие на различните региони в света и за изхранването на човечеството. Едни от основните производствени проблеми при аквакултурата са свързани с трудности при профилактиката и лечението на някои заболявания. Научноизследователската дейност в нашата страна, свързана с аквакултурата е недостатъчна и предоставя некомплексни изследвания, въпреки че са известни индивидуални изследвания, свързани с проекти, дисертации. Въпреки това, референтни данни, които да помогнат в описание и проследяване на благополучието на рибите, липсват. Това даде основание да се предприеме мащабно проучване, обект на настоящия дисертационен труд, който обхваща период от повече от десет години.

С дългогодишно използване в българските аквакултури са известни основно шарана (*Cyprinus carpio*), дъговата пъстърва (*Oncorhynchus mykiss*), речната (балканска) пъстърва (*Salmo trutta*), щуката (*Esox lucius*), но през последните години започнаха да

навлизат видове като руска есетра (*Acipenser gueldenstaedti*), сибирска есетра (*Acipenser baerii*), веслонос (*Polyodon spathula*), африкански сом (*Clarias gariepinus*) и др. Всички те са обект на настоящото проучване.

Биохимичният профил на кръвта може да се използва като обективен и полезен индикатор за физиологичното и здравословно състояние на рибите. Наличието на данни относно референтните стойности на хематологичните, хормоналните и биохимичните параметри на кръвта е в основата на оценката на здравословното състояние на рибите. От друга страна, определянето на тези стойности, предоставя възможност за по-задълбочена преценка на хранителен статус, репродуктивно състояние, темпове на растеж и развитие, откриване и диагностика на метаболитни нарушения и увреждания или болестни процеси придружени с висока смъртност. Лабораторните изследвания са ключов инструмент в диагностиката и профилактиката на заболяванията, това дава основание да се предприемат изследвания, предмет на настоящия научен труд, а именно определяне на референтните стойности на някои от най-често използваните биохимичните, хематологични и хормонални показатели при сладководни риби отглеждани в условия на рециркуляционна система, както и евентуалната промяна, която настъпва в резултат на неинфекционни и инфекционни агенти (паразитна, гъбична и бактериална инфекция).

Като ектотермни животни, рибите са силно чувствителни към промени в околната среда, които могат да доведат и до промяна на техния метаболизъм, а от там да окажат ефект и върху нивата на кръвните показатели. Получената информация за физиологичната толерантност на даден вид риба към различни стресови фактори може да помогне за разработване на по-ефективни стратегии за запазване на техните популации.

Липсата на тясноспециализирана литература, свързана с аквакултурата, по подобие на това, което има в хуманната и ветеринарната медицина, дава основание да се предприеме това проучване. Стремежа е да се обхванат максимален брой животни от различните видове, обект на аквакултурата в нашата страна.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

2.1. Цел на изследването

Във връзка с наличните неизяснени ситуации и публикуваните научни данни, които не предоставят достатъчно практически доказателства, основната цел на настоящия дисертационен труд е да се установят референтните интервали на основни

биохимични, хематологични и хормонални показатели при стопанскозначими сладководни видове риби, отглеждани в България, и да се оцени влиянието на различни инфекциозни и неинфекциозни стресови фактори върху тяхното физиологично състояние.

Цел на проучването е да се установи ефекта на стресови въздействия от неинфекциозен характер (влияния на глад, интоксикации, анестезия) върху сладководните видове риби, които се отглеждат в нашата страна.

Друга важна цел също е да се установят промените във физиологичното състояние на рибите, регистрирани чрез биохимични, хематологични и хормонални изменения, при стресови въздействия от инфекциозен характер (паразитен, бактериален и микотичен инфекциозен агент).

2.2. Задачи

За постигане на набелязаните цели бяха поставени следните конкретни задачи:

I. Да се установят референтните стойности на:

1. Биохимични показатели: общ белтък, албумин, глобулини, албумин/глобулин съотношение, глюкоза, урея, пикочна киселина, креатинин, холестерол, триглицериди, калций, фосфор, амилаза, алкална фосфатаза, фибриноген, церулоплазмин, С-реактивен протеин, аланинаминотрансфераза, креатинфосфокиназа, аспартатаминотрансфераза, ацетилхолинестераза; при следните видове риби: шаран, дъгова пъстърва, кафява пъстърва, руска есетра, сибирска есетра, кръстоска (Руска есетра, женска и Сибирска есетра, мъжка), щука, африкански сом.

2. Хематологични показатели: хемоглобин, хематокрит, скорост на утаяване на еритроцитите, моноцити, неутрофили, лимфоцити при африкански сом.

3. Хормонални показатели: трийодтиронин, тироксин, Т3/Т4 съотношение, тестостерон, 17 β -естрадиол, кортизол, пролактин, при следните видове риби: шаран, дъгова пъстърва, кафява пъстърва, руска есетра, сибирска есетра, кръстоска (Руска есетра, женска и Сибирска есетра, мъжка), щука, африкански сом.

II. Да се изследват концентрациите на горепосочените показатели след стрес, причинен от неинфекциозни агенти (гладуване, анестезия, интоксикация с органични и неорганични вещества) при шарани, африкански сом, руска есетра.

III. Да се изследват концентрациите на горепосочените показатели в състояние на стрес, причинен от паразитни, бактериални и микотични инфекциозни причинители при дъгова пъстърва, африкански сом

3. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

3.1. Обект на изследването - експериментални животни

Изследванията бяха извършени съгласно Насоките на Европейския съюз (Директива 2010/63/ЕС), Наредба №20/1.11.2012г. за минималните изисквания за защита и хуманно отношение към опитните животни, одобрение от Комисията по етика към животните при ВМФ на Тракийски университет, Стара Загора.

За представените резултати е извършена дългосрочна оценка на биохимични, хематологични и хормонални параметри за период от повече от десет години, като са анализирани общо 12210 кръвни проби. Резултатите от кръвните изследвания са записвани систематично в опит да се установят референтни диапазони за приблизително 30 показателя при 9 вида сладководни риби. При всички изследвания бяха използвани сладководни видове риби, които се отглеждат със стопанска цел в нашата страна. След извършване на дългосрочна оценка, резултатите са записвани систематично, за да се предоставят достатъчно статистическо определени, емпирични доказателства за нормалните стойности на посочените кръвни параметрите при здрави популации от стопанскозначими сладководни видове риби.

Всички видове риби, обект на настоящото проучване, са изследвани с цел да се помогне при отглеждането им, да се установят как видовата принадлежност, промените в околната среда, храненето и технологията на аквакултурата, влияят върху благополучието и развитието на заболявания при този вид животни.

Стойностите на биохимичните, хематологичните, хормонални показатели бяха определени при представители от следните семейства:

- семейство *Cyprinidae*:
 - Обикновен шаран (*Cyprinus carpio*);
- семейство *Salmonidae*:
 - Дъгова пъстърва (*Oncorhynchus mychiss*);
 - Кафява пъстърва (Балканска пъстърва/Речна пъстърва) (*Salmo trutta fario*);
 - Сивенът (*Salvelinus fontinalis*)
- семейство *Acipenseridae*:
 - Руска есетра (*Acipenser gueldenstaedtii*);
 - Сибирска есетра (*Acipenser baerii*);
 - кръстоска: Руска есетра, женска и Сибирска есетра, мъжка;
- семейство *Esocidae*:

- Щука (*Esox lucius*);
- семейство *Clariidae*:
- Африкански сом (*Clarias gariepinus*).

В настоящото изследване бяха включени риби, обект на промишлено-производствено отглеждане в България при различни технологии, характерни за аквакултурата на съответния вид: шарани-земнонасипни басейни; пъстърви – бетонни басейни и рециркуляционна система (RAS); есетри-мрежени клетки разположени в язовири; сом-RAS. Технологията за отглеждане на щука е от вида полуинтензивно рибовъдство (производство на поликултура).

В таблица 1 са показани всички изследвани лабораторни показатели при рибите, включени в това проучване.

Таблица 1. Основни биохимични, хематологични и хормонални показатели при стопанскозначими сладководни видове риби, отглеждани в България.

Риби	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Oncorhynchus mychiss</i>	<i>Salmo trutta fario</i>	<i>Salvelinus fontinalis</i>	<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	<i>Acipenser baerii</i>	Кръстоска (руска,сибирска есетра)	<i>Clarias gariepinus</i>	<i>Esox lucius</i>
Параметри									
Общ белтък g/L	550	212	12	12	6*	6*	20*	75	6*
Албумин g/L	1294	112	12	12	100	6*	20*	75	6*
Глобулини g/L	240	12	12	12	6*	6*		75	6*
Глюкоза mmol/L	106	20	20		20	20	20	25	6
Холестерол mmol/L	480	212	12				20*	5	6*
Триглицериди mmol/L	240	*						5	
Креатинин μmol/L	256	212	12		6*	6*	20*	75	*
Урея mmol/L	252	12	12	12	10	6*	20*	75	6*
Пик. кис. μmol/L		*						5	6*
AST U/L	498	12	12	12	10	6*	20*	75	6*
ALT U/L	498	12	12	12	10	6*	20*	75	6*
ALP U/L		*						5	
Амилаза U/L	12	200							
LDH U/L	12								
AchE U/L	12								
CPK U/L	12								
Калций mmol/L	240	212	12	12	6*	6*	20*	75	6*
Фосфор mmol/L	240	212	12	12	6*	6*	20*	75	6*
Кортизол μg/dl	220	20	20		20	20	20	210	6
Пролактин ng/ml		*						30	

Трийодтиронин ng/ml	180	120	120		120	120	120	120	
Тетрайодтиронин µg/dl	180	120	120		120	120	120	120	
17β-естрадиол ng/ml						12			
Тестостерон ng/ml						12			
Церулоплазмин mg/L	414	140	20		120	20	20	180	6
Фибриноген g/L	314	30	20		30	20		180	
CRP µg/ml	*	60						160	
CYE mm/hour								30	
Хематокрит %								30	
Хемоглобин g/dl								30	
Еритроцити x10 ⁶ /mm ³								30	
WBC x10 ³ /mm ³								30	
Мо %								30	
Ly %								30	
Neu %								30	
Общо кръвни проби 12210 Брой животни 2113	6250 947	1930 509	440 84	96 52	590 242	386 44	480 32	1960 177	78 26

* - обозначени са резултати, които все още не са публикувани в научни статии/книги, но се подготвят за такива.

3.2. Продължителното гладуване, като стресов фактор и влиянието на синбиотичен продукт

За експеримента с продължително гладуване бяха използвани 60 шарана, от рибовъдното стопанство „Тунджа 73”, разположено в Централна България и пренесени в базата за експериментална аквакултура към Тракийски университета, Стара Загора. Рибите бяха аклиматизирани в продължение на 2 седмици и разпределени на случаен принцип в 3 групи в рециркулационна система. Първата група - гладувала през целия период на изследването, втората група - гладувала 5 месеца и се хранила 1 месец, а третата група - гладувала 5 месеца и се хранила 2 месеца със суха комбинирана диета (Aqua 1032 Swim, Aqua-Garant©, Garant Tiernahrung Gesellschaft m.b.H.), съдържаща 32% суров протеин, 10% сурови мазнини. Рибите бяха хранени четири пъти дневно в 8:00, 11:00, 14:00 и 17:00 часа, а дажбата беше около 1,5% от телесното тегло.

Друга поставена цел беше да се определи ефекта от добавянето на синбиотичен препарат в дажбите на шаран. В настоящото проучване, след период на дългосрочно гладуване, е изследван ефекта на добавен към храната на синбиотик с шест различни бактериални щамове (*Bifidobacterium animalis* W53, *Lactobacillus acidophilus* W55, *Lactobacillus salivarius* W57, *Enterococcus faecium* W54, *Lactococcus lactis* W58,

Lactobacillus casei W56) и разтворими фибри FOS (фруктоолигозахариди). Препаратът, състоящ се от фруктоолигозахарид, в комбинация с *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* и *Lactococcus* spp., се използва за подобряване на метаболизма, чревния баланс и стимулиране на имунитета.

Опита включваше 60 броя шарани взети от рибовъдно стопанство „Тунджа 73“, България, транспортирани в конвейерен резервоар, подсилен с кислород, до Експерименталната база в Тракийски университет. Животните бяха разпределени в три опитни групи, на случаен принцип в RAS. Рибите са гладували в продължение на пет месеца. Експерименталните риби са подложени на следните протоколи за хранене: контролна група - непрекъснато гладуване до 60-ия ден, първа група - подхранване със суха комбинирана диета (Aqua 1032 Swim, Aqua-Garant©, Garant Tiernahrung GmbH) и втора група - подхранване с комбинирана диета и добавена 2% синбиотична смес (OmniBiotic 6, Institut Allergosan Deutschland GmbH) през следващите 60 дни. Първата и втората група риби започват да се хранят, съответно за време от 4-седмичен и 8-седмичен период на повторно хранене.

3.3 Анестезията, като стресов фактор – опитна постановка

3.3.1. Анестезията, като стресов фактор при шарани (*Cyprinus carpio*)

В първото проучване за ефекта от използвания анестетик бяха използвани шаранови риби. Експериментът е извършен в базата за експериментална аквакултура, Тракийски университет - Стара Загора в съответствие със Закона за Ветеринарномедицинската дейност и Наредба №20. Опитът е одобрен от Комисия по етика към животните към Тракийски университет, Стара Загора, България с разрешение №21/20.01.2009г.

Използвани са 20 броя риби, които бяха разделени на две групи по 10 във всеки резервоар (80x48x30 cm), съдържащ 80 L дехлорирана вода. Адекватното ниво на кислород във всеки резервоар се поддържа чрез изкуствена аерация. Температурата на водата ($^{\circ}\text{C}$), разтворен кислород (mg.L^{-1}), нитрати (mg.L^{-1}) и активна киселинност бяха отчетени с цифров термометър, докато разтвореният кислород, концентрацията на нитрати и pH бяха определени с помощта на следната апаратура: WTW-oxi330, HANNA HI 98312 и REDOX Zac plus. По време на изследването не е имало смъртност. Преди анестезията, животните се лишават от храна за 24 часа, за да се сведе до минимум риска от регургитация. За дълбочината на анестезията се следи чрез

наблюдение на поведението на рибата във водата. В настоящото проучване бяха използвани следните критерии: доброволно плуване, реакция на зрителни и тактилни стимули и отговор на постурални промени, челюстен тон и дихателна честота. Установена е желаната концентрация на анестетичните вещества и се записва времето за индукция, поддържане и възстановяване. Записано е време на индукция от добавяне на анестетичния агент към водата, докато не се наблюдава доброволно плуване, намалена честота на дишане, мускулен тонус и слаб отговор на силни тактилни стимули. Отчетено е време за възстановяване от поставянето на рибата в резервоар (без упойващ агент) до увеличаване на дихателната честота, връщане на мускулния тонус и започване на плвателни движения с прогресивно по-малко атаксия, докато се възстанови пълното равновесие на животното.

За първата група животни като анестетик е използвано масло от карамфил (карамфил, Етерика, България) съдържащ евгенол, като активна съставка. Разтворът се добавя директно към водата при концентрация 40 mg.L^{-1} вода и се разбърква старателно. Втората група шарани бяха подложени на въздействие на електрически ток с високо напрежение ($\sim 300 \text{ V}$), нисък капацитет ($47 \text{ }\mu\text{F}$) и нисък ампераж ($4,7 \text{ mA}$) в продължение на 3s. Записани бяха изминалите времена между точката, в която всяка риба изпада в безсъзнание, и точките, в които тя възобновява нормалните си поведенчески функции.

3.3.2. Анестезията, като стресов фактор при африкански сом (*Clarias gariepinus*)

Проучването на ефекта на анестезия върху африкански сом е проведено съгласно Препоръките на Европейския съюз (Директива 2010/63/ЕС) и Наредба №20. Четиридесет африкански сома (средно тегло - $152,31 \pm 17,6 \text{ g}$, дължина - $27,15 \pm 3,61 \text{ cm}$) са получени от RAS (Cell Aquaculture Netherlands Holdings BV) в частна рибовъдна ферма, разположена в близост до град Стара Загора, България. Рибите бяха разделени в две групи (20 риби в група): първата група (ES) беше подложена на въздействие от електрически ток (DC) с високо напрежение ($\sim 300 \text{ V}$). Преди анестезията животните се лишават от храната в продължение на 24 часа, за да се сведе до минимум рискът от регургитация. Рибите бяха зашеметени с електрически ток от мобилно устройство с нисък капацитет ($47 \text{ }\mu\text{F}$) и нисък ампераж ($4,7 \text{ mA}$) за 3 секунди през две медни плочи (електроди). Втората група (K) е контролна, без да е прилагана анестезия върху нея.

Извън водата, вземане на кръвни проби става с използването на латексови ръкавици, за да се сведе до минимум увреждането на кожата.

3.4. Влияние на фосфорорганична интоксикация, като стресов фактор при риби

За провеждане на проучването относно влиянието на фосфорорганичната интоксикация бяха използвани шаранови риби. Пробите бяха взети през пролетния сезон от риби от ферма „Тунджа 73“ край град Николаево. Районът е избран заради селскостопанските дейности, които се извършват в областта. Наблюдавани са редица промени в поведението им. Бяха изследвани сто проби от шаран, взети два пъти и транспортирани в транспортен резервоар, подсилен с кислород до базата за експериментална аквакултура към Тракийски университет. Рибите се електроанестезират чрез подлагане на електрически ток. Извън водата се взеха кръвни проби, като бяха използвани латексови ръкавици, за да се сведе до минимум увреждането на кожата и слюзестата покривка. Кръв за изследване (2,0-2,5 ml) бе получена от *v. caudalis* с помощта на игла (18G) в контейнер с хепарин, като антикоагулант. Центрофугираше се при 2500 rpm в продължение на 15 минути (Janetzki T30, Германия). Плазмата се отделяше веднага и се съхраняваше при -20 °C до извършването на анализа.

Шараните бяха електроанестезирани чрез подлагане на електрически ток (DC) с високо напрежение (~ 300 V), нисък капацитет (47 µF) и нисък ампераж (4,7 mA) в продължение на 3 s. След вземането на кръвни проби, рибите бяха умъртвени чрез обезглавяване, бяха взети за хистопатологичен анализ черен дроб и бъбреци. Пробите за хистопатологично изследване бяха фиксираха в 10% неутрален формалин и обработени рутинно. Сеченията от 4 µm бяха оцветени с хематоксилин-еозин (H/E). Измерено беше телесното тегло и дължината на животните (средно тегло 1529,3±15,2 g и 49,5±2,3 cm).

3.5. Влияние на нитратната интоксикация, като стресов фактор при риби

За проучване ефекта на нитратно отравяне бяха използвани десет есетри (*Acipenser gueldenstaedtii*) (средно тегло 316,08 ± 13,2 g и средна дължина 43,9±2,7 cm) от ферма за есетра, близо до град Стара Загора. Те бяха подложени на електроанестезия и бе взета 2-2,5 ml от *v. caudalis* в контейнер с хепарин, като антикоагулант.

Изследването бе проведено през пролетния сезон. Активността на аланин трансаминаза, аспартат трансаминаза и концентрации на урея бе определена с автоматичен биохимичен анализатор (Reflotron, Roche Diagnostics, Германия). Концентрацията на фибриноген се определи с помощта на BN2 System (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH). Токсикологичният анализ на водните проби от RAS е извършен с колориметрична тест лента (Merckoquant, Merck KGa, Германия).

3.6. Влияние на бактериална инфекция, като стресов фактор при риби

За проучване влиянието на бактериална инфекция бяха използвани десет дъгови пъстърви (тегло 200-250 г), показващи клинични признаци на заболяване. Определянето на стойностите на церулоплазмин и С-реактивен протеин беше изследвано в серумни проби, получени от кръв (приблизително 2 ml), взета от опашната вена на болни риби преди аутопсия. Серум, получен от здрави риби (15 броя), беше използван като контролна група. Методът за определяне на церулоплазмин се основава на оксидазната активност, която церулоплазминът показва с р-фенилендиамин. Оцветен продукт от окислението се образува от окислението на PPD от Ср (метода на Revin, описан от Bestujeva и Kolb, 1982). ELISA комплектът за високочувствителен CRP (рибен CRP) е предварително покрит с антитяло, специфично за CRP. В ямките за проби се добавят 10 µl проби, разредени в 40 µl буфер за разреждане на проби, инкубират се при 37°C за 30 минути и се промиват 5 пъти с промивен разтвор. Към всяка ямка се добавят 50 µl CRP-конюгиран реагент и плаките се инкубират за 30 минути при 37°C. Несвързаният конюгат беше отмит и към всяка ямка бяха добавени 50 µl хромогенен разтвор А и 50 µl хромогенен разтвор Б и инкубирани при 37°C за 15 минути. Ензимната реакция беше спряна чрез добавяне на 50 µl стоп разтвор към всяка ямка. Оптичната плътност беше измерена при 450 nm.

Бактериологични проби от бъбреци, черен дроб, далак и кръв бяха посеяни върху триптичен соев агар (TSA) и мозъчно-сърдечен инфузионен агар (BHIA). Плаките бяха инкубирани при 19-20°C за 24-48 часа. Изолирани бактерии (n=15), възстановени от болна дъгова пъстърва, бяха идентифицирани чрез използване на различни методи за идентификация, като конвенционални методи, автоматизирани системи за идентификация (MALDI-TOF) (Akter, 2017) и анализ на 16S rRNA последователност с универсален набор от бактериални праймери 27F (5'

AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') и 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT3'), както е съобщено от Weisburg et al. (1991).

3.7. Влияние на паразитна инфекция, като стресов фактор при риби

За проучване влиянието на паразитна инфекция бяха използвани четиридесет болни дъгови пъстърви (5–10 г) от частно рибовъдно стопанство в близост до град Пловдив, България, които са регистрирали 45% смъртност. Рибите са били ръчно извлечени с мрежи от бетонните резервоари и бързо прехвърлени в транспортен резервоар, обогатен с кислород. След това са били приети във Ветеринарната болница за животни към Тракийски университет, Стара Загора, България. Болните риби са имали анамнеза за аномални промени в поведението, като плуване близо до водната повърхност с вихрови движения, както и анатомични проблеми, като сколиоза и скъсяване на оперкулума и черна опашка. Вземането на проби от риба и клиничното изследване са извършени съгласно техниките и процедурите, описани от Whitman (2004) и в съответствие с Регламент (ЕС) 1099/2009 на Съвета.

Молекулярна идентификация, изолиране на ДНК, оптимизация на праймери и синтез (Zapryanova et al., 2025): Некропсията е извършена при симптоматични риби дъгова пъстърва при асептични условия и са взети 25 mg тъканни проби от мозъчната област на шест болни риби. За проектиране на праймери е извършен синтез на праймери от генната област 18S rDNA. Генната област 18S rDNA на *M. cerebralis* е права 811F, 5'-TGAATAAATCAGAGTGCTCAAAGC-3' и обратна 937R, 5'-TTGGTGCTGTATGCTGTAAGT-3' праймери са проектирани да амплифицират регион от 140 базови двойки от генната област 18S rDNA за *M. cerebralis* (Cavender et al., 2004). Профилът на амплификация се състои от първоначално денатуриране при 95°C за 10 минути, последвано от 40 цикъла от 15 секунди при 95°C и 1 минута при 62°C. Всички проби са анализирани повторно, за да се демонстрира повторваемост.

PCR анализ в реално време: Комбинациите от праймери за генния регион 18S rDNA бяха изследвани с помощта на PCR анализ в реално време. Реакционните обеми бяха 25 µL и съдържаха 12,5 µL SYBRGreen qPCR Master Mix (Qiagen), 1 µL от всеки праймер (2 µL), 5 µL ДНК и 5,5 µL ултрачиста вода. Бяха проведени молекулярни анализи, за да се потвърди откриването на *M. cerebralis*, диагностициран чрез хистопатология и PDT (пепсин-трипсиново смилане) анализи (Zapryanova et al., 2025).

За извършване на биохимичния анализ, кръвни проби (приблизително 1 ml) бяха събрани след електроанестезия от болни риби. Десет хематокритни епруветки бяха използвани за събиране на кръвта, като първоначалните капки бяха отстранени. Биохимичните параметри бяха определени с автоматизирана система за ветеринарна биохимия Mindray BS-120 (Mindray Bio-Medical Electronics, Китай), използвайки стандартни лабораторни китове на Biolabo SAS (Франция). Плазмените нива на кортизол и пролактин бяха определени чрез лазерен флуоресцентен четец (i-chroma™ Reader, Boditech Med Incorporated, Германия).

3.8. Влияние на гъбична инфекция

Изследванията за влиянието на гъбична инфекция бяха проведени с африкански сом (средно тегло 605 ± 45.98 гр.) от Експерименталната база за аквакултури към Тракийски университет в Стара Загора, България. Снета е медицинската история на болните риби (анамнеза на начин на живот и анамнеза на заболяването), като при физическия преглед са наблюдавани клинични находки (кръвоизлив и бели лезии по цялата повърхност на тялото). Кръв за анализ е взета от каудалната вена, използвайки асептична техника в контейнери за биохимичен анализ (K_2EDTA). Биохимичните параметри са анализирани с помощта на Auto Chemistry Analyser (Mindray BS-240VET, Mindray Bio-Medical, Китай). Кортизолът е определен с помощта на лазерен флуоресцентен четец (i-chroma™ Reader, Boditech Med, Корея). Концентрацията на фибриноген е измерена с помощта на BN2 System (Siemens Healthcare Diagnostics). За доказване наличието на гъбички, проби бяха взети от белите лезии на болните риби и инокуирани върху плаки Sabouraud Dextrose Agar (SDA) за гъбичен анализ, тъй като *Rhizopus* sp. расте само върху SDA и PDA (Potato Dextrose Agar).

3.9. Биохимични показатели - лабораторни методи и апаратура, използвани при определянето им

За да се установят стойностите на изследваните кръвните показатели бяха използвани кръвна плазма, серум и цяла кръв. В настоящото проучване се определиха концентрациите на следните биохимични параметри: общ протеин (TP), албумин (Alb), глобулини (Glb), съотношение албумин/глобулини, аланинаминотрансфераза (ALT), аспаратаминотрансфераза (AST), алкална фосфатаза (ALP), ацетилхолинестераза

(AChE), лактатдехидрогеназа (LDH), креатинфосфокиназа (CPK), амилаза, холестерол (Ch), триглицериди (TG), урея (U) и креатинин (Cr), глюкоза (Glu), калций (Ca), фосфор (P), фибриноген (Fib), церулоплазмин (Cp), С-реактивен протеин (CRP).

Биохимичните параметри бяха анализирани с помощта на полуавтоматичен анализатор (Mindray BA-88, Mindray Bio-Medical Electronics, Китай) с търговски диагностични комплекти (Giese, Diagnostics, Италия), както и ветеринарна биохимична автоматизирана система Mindray BS-120 (Mindray Bio-Medical Electronics, Китай), използвайки стандартни лабораторни комплекти, доставени от Biolabo SAS (Франция).

Концентрацията на общия протеин при рибите беше определена по биуретовия метод с колориметричен тест на фирма Giese Diagnostics, Италия. Медните йони образуват в алкална среда с протеините комплексно съединение с виолетов цвят. Абсорбцията на този комплекс е пропорционална на протеиновата концентрация в пробата.

Концентрацията на албумин беше определена с тест на фирмата Giese Diagnostics, съдържащ бром-крезолово-зелено, като 10 μ L плазма се смесваха с 1 mL от готовия реактив. След 3 мин. пробата се отчиташе при 546 nm и резултатът се изчисляваше чрез стандартна проба с известна концентрация (40g/L).

Определянето на глобулини се изчисляваше като разлика между стойностите на общия белтък и албумина. От резултатите на албумина и глобулина се изчисляваше съотношението албумин/глобулин (А/Г).

Определяне на концентрацията на урея

Определянето на концентрацията на урея беше извършено на автоматичен биохимичен анализатор (Mindray BA-88, Mindray Bio-Medical Electronics, China) с кит на фирма Giese Diagnostics, Italy – Enzymatic colorimetric method. Ензимът уреаза разгражда уреята в присъствието на вода до въглероден двуокис и амониеви йони. Амониите йони реагират в алкална среда със салицилат и нитроферицианид до образуване на зелено оцветен компонент, чийто интензитет е правопрпорционален на концентрацията на уреята.

Определяне на пикочна киселина

Определяне на концентрацията на пикочна киселина беше извършено чрез ензимно-колориметричен метод (Uricase-POD). Пикочната киселина се разгражда до алантоин, въглероден диоксид и водороден пероксид чрез ензима уриказа. Водородният

пероксид, дихлорохидроксibenzenсулфонат и антипирин образуват под въздействието на ензима пероксидаза куинонемин, червено оцветен комплекс. Интензитета на оцветяването е правопрпорционален на количеството пикочна киселина в изследваната проба.

Определяне на концентрацията на креатинин

Определянето на концентрацията на креатинин беше извършено на автоматичен биохимичен анализатор (Mindray BA-88, Mindray Bio-Medical Electronics, China) с кит на фирма Giese Diagnostics, Italy – Kinetic modified Jaffè method. Креатининът реагира в алкална среда с пикринова киселина и се образува оранжево-жълто съединение, чийто интензитет е пропорционален на количеството креатинин в пробата.

Определянето концентрацията на триглицеридите в плазмата бе провеждано по ензимен колориметричен метод с кит на фирма Giese Diagnostics (colorimetric enzymatic GPO-POD method) Italy. Принципът на метода се състои в следното: първо триглицеридите се разграждат от липаза до глицерол и мастни киселини, след което глицерола се фосфорилира до глицерофосфат, който след окисление се превръща в цветно съединение, което абсорбира при λ 546 nm.

Определянето на концентрацията беше извършено на автоматичен биохимичен анализатор (Mindray BA-88, Mindray Bio-Medical Electronics, China).

Определяне концентрацията на общия холестерол бе проведено с кит на фирма Giese Diagnostics, Italy – Colorimetric enzymatic method (CHOD-PAP). Използва се ензимен метод, при който холестероловите естери се хидролизират до холестерол и мастни киселини, а след което холестеролът се окислява, като се получава и H_2O_2 . В присъствието на пероксидаза, H_2O_2 реагира с фенол и 4-аминоантипирин, при което се получава червеноцветно съединение, чиято абсorption е пропорционално на общия холестерол в пробата. Определянето на концентрацията беше извършено на автоматичен биохимичен анализатор (Mindray BA-88, Mindray Bio-Medical Electronics, China).

Определяне на концентрацията на трансферазите: аспаратаминотрансфераза (АСТ) и аланнаминотрансфераза (АЛТ)

Активностите на АСТ и АЛТ са определени с китове на фирма Giese Diagnostics, Italy. Първият ензим катализира прехвърлянето на аминокислоти от L-аспартат върху α -кетоглутарат, при което се получават оксалацетат и L-глутамат. Малатдехидрогеназата катализира редукцията на оксалацетата с едновременно окисление на НАДН до НАД. Скоростта на образуване на НАД, свързана с намаление на абсорбцията при 340 nm, е правопропорционална на активността на АСТ.

Аланнаминотрансферазата катализира прехвърлянето на аминокислоти от L-аланин върху α -кетоглутарат, при което се получават пируват и L-глутамат. Лактатдехидрогеназата катализира редукцията на пирувата с едновременно окисление на НАДН до НАД. Скоростта на образуване на НАД, свързана с намаление на абсорбцията при 340 nm, е правопропорционална на активността на АЛТ.

Определяне на активността на креатин киназа (креатин фосфокиназа) (CK/CPK)

Активността на креатинкиназата се определя чрез свързана ензимна реакция, водеща до производството на NADPH, измерена при 340 nm, пропорционално на CK активността, налична в пробата. Всъщност, скоростта на преобразуване на NADP/NADPH е пропорционална на активността на ензима. В тази реакция фосфокреатинът и АДФ се превръщат в креатин и АТФ. Генерираният АТФ се използва от хексокиназата за фосфорилиране на глюкоза, в резултат на което се получава глюкозо-6-фосфат, който се окислява от NADP в присъствието на глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа за получаване на NADPH и 6-фосфо-D-глюконат.

Определяне на концентрацията на лактатдехидрогеназа (LDH)

В присъствието на NADH, LDH трансформира пирувата в лактат и NAD^+ . Окисляването на NADH за единица време, измерено при 340 nm, е пропорционално на концентрацията на LDH в пробата.

Определяне на концентрацията на α -амилаза

α -амилазата хидролизира 2-хлоро-4-нитрофенил- α -D-малтотриозид (CNP3), за да освободи 2-хлоро-4-нитрофенол (CPNP) и образува 2-хлоро-4-нитрофенил- α -D-малтозид (CNP2), малтотриоза и глюкоза. Скоростта на образуване на 2-хлоро-4-нитрофенол (измерена при $\lambda = 405 \text{ nm}$) е пропорционална на ензимната активност в пробата.

Определяне на концентрацията на алкална фосфатаза (ALP)

Алкалната фосфатаза се анализира чрез измерване на скоростта на хидролиза на синтетичен фосфатен естер (субстрат), като се използва спектрофотометричен метод за откриване на оцветения продукт. Ензимът хидролизира р-нитрофенил фосфата (pNPP) до р-нитрофенол (pNP). В алкални условия, р-нитрофенолът се йонизира много бързо и полученият р-нитрофенолатен йон (pNPi) абсорбира видимата светлина доста интензивно. Алкалната фосфатаза катализира разцепването на фосфатната група от pNPP, за да даде продукта pNP (р-нитрофенол). Въпреки това, абсорбцията на pNP не се измерва директно. Едва след като продуктът се йонизира и стане жълт, може да се измери абсорбцията и да се определи концентрацията на pNP. Йонизираният продукт, р-нитрофенолат, се абсорбира при 405 nm.

Определяне на концентрацията на ацетилхолинестераза (AChE)

Протоколът за анализ на ацетилхолинестеразата използва DTNB (5,5'-дитиобис (2-нитробензоена киселина) за количествено определяне на тиохолина, произведен от хидролизата на ацетилтиохолин от AChE. Интензитетът на абсорбция на DTNB (410 nm) се използва за измерване на количеството образуван тиохолин, което е пропорционално на активността на AChE. Анализ на ацетилхолинестераза се основава на подобрен метод на Ellman, при който тиохолинът, произведен от действието на ацетилхолинестеразата, образува жълт цвят с 5,5'-дитиобис (2-нитробензоена киселина). Интензитетът на цвета на продукта, измерен при 412 nm, е пропорционален на ензимната активност в пробата.

Определяне на концентрацията на глюкоза

Кръвната захар беше определена веднага след вземане на пробите. За количествено определяне на глюкоза се използва колориметричен GOD/POD метод, който се основава на активността на глюкозооксидаза (GOD) и пероксидаза (POD). GOD катализира окисляването на глюкозата до глюконова киселина и водороден пероксид. H_2O_2 с 4-хидроксибензоена киселина и 4-аминоантипирин образува комплекс с червен цвят, чийто интензитет е пропорционален на количеството глюкоза в пробата и се измерва с фотометър при дължина на вълната $\lambda = 505 \text{ nm}$.

Определяне на концентрацията на калций

Определянето на концентрацията беше извършено на автоматичен биохимичен анализатор (Mindray BA-88, Mindray Bio-Medical Electronics, China)– Arsenazo III Colorimetric method. Arsenazo III реагира с калциевите йони до образуване на виолетовосин комплекс. Интензитетът на цвета е право пропорционален на концентрацията на калций в изследваната проба.

Определяне на концентрацията на фосфор

Определянето на концентрацията беше извършено на автоматичен биохимичен анализатор (Mindray BA-88, Mindray Bio-Medical Electronics, China) - Ammonium molybdate method. В кисела среда амониевия молибдат реагира с неорганичен фосфор, при което се образува амониев фосфомолибдат. Абсорбцията на това съединение при 340 nm е пропорционална на фосфор в пробата.

Концентрацията на плазменния фибриноген бе определяна по нефелометричния метод на Podmore с 10% Na₂SO₄ при 570 nm (Тодоров, 1975). Определянето се извършва до 2-ия час от вземането на кръвта.

Към 0,25 ml плазма се прибавят 2,5 ml 10,5 % Na₂SO₄. Подготвя се контролна проба съдържаща 0,25 ml плазма и 2,5 ml 0,9 % p-p на NaCl. Екстинкцията се отчита след 3 min. при дължина на вълната 570 nm, а резултатът се изчислява чрез умножаване с коефициент, изчислен по стандартна крива, построена на базата на различни разреждания на плазмата, в които концентрацията на фибриноген е определена келдалометрично.

Концентрация на C-реактивен белтък

Комплект ELISA за високочувствителен C-реактивен протеин (hs-CRP) за риби беше използван за това изследване.

В ямките за проби се добавят 10 µl проби, разредени в 40 µl буфер за разреждане на пробата, инкубират се при 37° C за 30 минути и се промиват 5 пъти с промивен разтвор. 50 µl CRP-конюгиран реагент се добавя към всяка ямка и плаките се инкубират в продължение на 30 минути при 37°C. Несвързаният конюгиран се отмива и 50 µl хромогенен разтвор А и 50 µl хромогенен разтвор В се добавят към всяка ямка и се инкубират при 37°C за 15 минути. Ензимната реакция се спира чрез добавяне на 50 µl стоп разтвор към всяка ямка. Оптичната плътност се измерва при 450 nm.

Концентрацията на церулоплазмина бе определена по метода на Ravin, базиращ се на окисление на р-фенилендиамин (Bestujeva & Kolb, 1982). През 1951 г. Holmberg & Laurell, намират, че р-фенилендиаминът (PPD) е удобен като субстрат за измерване на оксидазната активност, поради образуването на червено оцветен продукт на PPD, измерващ се спектрофотометрично. Оттогава досега съществуват много модификации на метода, но PPD-оксидазната процедура е широко адаптирана за рутинно използване в клиничните лаборатории. Принципът е следният: р-фенилендиамина при рН 5,5 се окислява от церулоплазмина, като се образува цветен окислен продукт, който се абсорбира при λ 530 nm.

3.10. Хематологични изследвания

Хематологичните параметри, които се изследваха са хемоглобин (Hb), хематокрит (Hct), скорост на утаяване на еритроцитите (CUE), моноцити (Mo), неутрофили (Neu), лимфоцити (Ly).

Определяне на скоростта на утаяване на еритроцитите

Скоростта на утаяване на еритроцитите (CUE) се отчита чрез микро-Wintrobe метод (Akinrotimi et al., 2012).

Определяне на хематокрит

Кръвта се състои от червени кръвни клетки (RBC), бели кръвни клетки (WBC) и тромбоцити, суспендирани в течна част, наречена плазма. Хематокритът е съотношение на обема на червените кръвни клетки към обема на всички кръвни компоненти заедно, наречени пълна кръв. Стойността се изразява като процент или дроб. Референтният метод за определяне на хематокрита е центрофугирането. При този метод кръвната проба се изтегля в капиляр и се центрофугира, след което съотношението се измерва и се изразява като десетична или процентна част. Хематокритът (Ht) се определя по метода на Yildiz, (2009).

Определяне на хемоглобин

Хемоглобинът (Hb) беше колориметрично определен чрез хеометър (Superior Marienfeld, Lauda-Königshofen, Германия) според Херман Сали. В метода на Sahli, хемоглобинометърът съдържа хемоглобинова тръба, пипета и бъркалка, както и сравнител. Солна киселина преобразува хемоглобина в кисел хематин, който след това се разрежда, докато цветът на разтвора съвпада с цвета на блока за сравнение.

Определяне на общ брой бели кръвни клетки (WBC), червени кръвни клетки (RBC) моноцити (Mo), лимфоцити (Ly), неутрофили (Neu)

Кръвните проби бяха обработени с помощта на метода на разреждане на Natt-Herrick (Natt & Herrick, 1952) и анализирани с подобрен хемокитометър Neubauer (Blaxhall & Daisley, 1973; Erhunmwunse, 2013; Witeska et al, 2022). Процедура беше извършена по метода, описан от Pal et al., (2008) и Parida et al., (2011). Бяха приготвени кръвни натривки от същите проби, оцветени по тип Romanowsky (Hemacolor® Merck KGaA, Дармшат, Германия). Изследването е извършено под маслена иммерсионна сонография x100 и x40 сух обектив. За диференциалното броене са идентифицирани и оценени най-малко 100 жизнеспособни левкоцити на натривка според техните характеристики (Witeska et al, 2022).

3.11. Хормонални изследвания

От хормоналните показатели се определи кортизол, трийодтиронин (T3), тироксин (T4), тестостерон, естрадиол и пролактин.

Определяне на концентрацията на кортизол

Най-често методът за измерване на съдържанието на кортизол в серума или плазмата е имуноанализ. Количествено изместените от неговите свързващи протеини и измерени имунометрично, като се използват антитела, за които се предполага, че са специфични за кортизола. Плазменият кортизол се анализира от лазерно флуоресцентен четец (i-chroma TM Reader, Boditech Med Incorporated, Германия).

Тестът използва конкурентен метод за имунооткриване, при който целевият материал в пробата се свързва с белязаното с флуоресценция (FL) анти тяло за откриване. Този комплекс се зарежда върху нитроцелулозната матрица, където ковалентна двойка кортизол и говежди серумен албумин (BSA) е имобилизирана върху тест лента и пречи на свързването на таргетния материал FL-белязано анти тяло.

Определяне на концентрацията на общ трийодтиронин (T3), общ тироксин (T4) и T3/T4 съотношение

Определянето на общ трийодтиронин (T3) и общ тироксин (T4) са извършени с анализатор Elisa, HumaReader HS (Human GmbH, Wiesbaden, Германия) и неговия измервателен комплект Elisa (Monobind, Inc., САЩ).

Определяне на концентрацията на пролактин

Пролактинът се определя с лазерно флуоресцентен четец (i-chroma TM Reader, Boditech Med Incorporated, Германия), като се използва конкурентен метод за имунооткриване, при който целевият материал в пробата се свързва с белязаното с флуоресценция (FL) антитяло за откриване.

Определянето на тестостерон

Използва се метод на имунофлуоресценция. Специфични антитела, маркиран с флуорофор, се свързват с тестостерона в изследваната проба. Използван е лазерно флуоресцентен четец (i-chroma TM Reader, Boditech Med Incorporated, Германия).

Определянето на 17- β -естрадиол

За количественото определяне на 17- β -естрадиол в кръвта се използва имунохимичен анализ с химилуминесценция в автоматизирани анализатори.

3.12. Микологично, паразитологично и бактериално изследване

3.12.1. Бактериална идентификация

Бяха взети бактериологични проби от черен дроб, далак, бъбрек и кръв и инокулирани върху триптичен соев агар (TSA) и агар за мозъчна и сърдечна инфузия (BHIA). Изолираните бактерии бяха идентифицирани с помощта на конвенционалния бактериологичен метод (Austin and Austin, 2016). Плаките се инкубираха при 19-20 °C за 24-48 часа. Изолираните бактерии бяха идентифицирани чрез използване на различни методи за идентификация като конвенционални методи, автоматизирани системи за идентификация (MALDI-TOF) (Akter, 2017) и анализ на 16S rRNA последователност с универсален набор от бактериални праймери 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') и 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT3'), както се съобщава от Weisburg et al. (1991).

3.12.2. Гъбична идентификация

Пробите са взети от лезии на риба и са инокулирани върху плаки с декстрозен агар Sabouraud (SDA) за анализ на гъбички (Bautista-Baños et al., 2014). Изборът на хранителна среда се основава на това, че *Rhizopus sp.* расте само на PDA и SDA. Гъбичките от кожни лезии на болните риби, бяха идентифицирани според микроскопичния характер и структура на колонията.

3.12.3. Паразитологично изследване

Рибите бяха дисектирани при стерилни условия и главите бяха отстранени и изследвани под микроскоп. Тъканните проби от мозък, прешлени, скелетни мускули, очи и хриле бяха незабавно фиксирани в 10% буфериран формалин при стайна температура в продължение на 24 часа, дехидратирани в 70% етанол, третирани с ксилен и обработени за парафиново вграждане. Наличието на външни паразити беше изследвано чрез вземане на пресни проби от хеморагични и бели лезии.

За идентифициране на паразити беше приложен метод за разграждане чрез пепсин-трипсин - метод. Този метод на разграждане е най-често срещаният подход за предполагаемо идентифициране на *M. cerebralis*. Нефиксираните тъканни проби от риба бяха замразени при -20°C . Тези тъканни проби бяха отстранени от -20°C и доведени до стайна температура в паразитологичната лаборатория за откриване на причинителя. Методът е описан от Kelley et al., (2004).

Аутопсията е извършена при симптоматични индивиди риби при асептични условия. Взети са 25 mg тъканни проби от мозъчната област. За проектиране на праймер се извършва синтез на праймер от 18S rDNA генната област.

3.13. Статистическа обработка на резултатите

Получените първични резултати бяха обработени статистически чрез софтуерен продукт Statistica v. 10 (StatSoft Inc., 2002). За определяне на средните стойности бяха използвани методите на дескриптивната статистика.

При отчитане влиянието на двата фактора (инфекциозен и неинфекциозен агент) върху средните стойности на наблюдаваните показатели беше използван Post hoc анализ и LSD test, като бяха взети под внимание следните три нива на статистическа достоверност: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ и *** $P < 0,001$.

4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

4.1. Изследване на биохимични показатели за определяне на референтни диапазони при стопанскозначими сладководни видове риби, отглеждани в България

Стойностите на биохимичните параметрите, които се смятат за едни от най-важните физиологични маркери определящи здравословното състояние на животните, са специфични за всеки отделен вид и зависят от много абиотични (напр. околна среда) и биотични (напр. патогени) фактори. Разбира се, правилното тълкуване на тези

параметри зависи от наличието на референтни интервали за сравнение с цел прецизно диагностициране на различни патологични състояния. Тази област на ветеринарната медицина е недостатъчно проучена и доколкото позволява достъпа до налични литературни данни, това може би е първото изследване за установяване на референтни, клинично значими, кръвни показатели при девет вида сладководни риби, отглеждани в България със стопанска цел. Липсата на обобщени данни за физиологичните параметри при риби, отглеждани на територията на нашата страна, допълнително се затруднява и от факта, че те са силно повлияни от пол, възраст, фаза на жизнения цикъл, полова зрялост, хранене, фактори на околната среда и т.н.

4.1.1. Общ белтък

Общият протеин може да се счита за един от най-важните показатели за хранителния и здравословен статус при рибите. Също така, трябва да се има предвид, че някои фактори (сезон, възраст, диета, полова зрялост, температура на водата, различни заболявания и др.) могат да окажат влияние върху общата концентрация на протеините.

Данните за стойностите на общия белтък при изследваните видове риби са представени в таблица 2.

Таблица 2: Концентрация на общ белтък (g/L) при сладководни видове риби, отглеждани със стопанска цел в България.

Видове риби	Общ белтък (g/L)
Шаран (<i>Cyprinus carpio</i>)	36,46±10,36 (24-48)
Дъгова пъстърва; Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mychiss</i>)	34,16±4,83 (28-40)
Кафява пъстърва; Brown trout (<i>Salmo trutta fario</i>)	36,83±4,44 (31-42)
Сивен; Brook trout (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	29,5±6,34 (20-35)
Африкански сом (<i>Clarias gariepinus</i>)	15,93±2,70 (10-26)

Сибирска есетра (<i>Acipenser baerii</i>)	24,57±1,65 (19-31)
Руска есетра (<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>)	24,50±2,67 (8-37)
Кръстоска (<i>Acipenser gueldenstaedtii</i> x <i>Acipenser baerii</i>)	24,8±2,25 (21-36)
Щука (<i>Esox lucius</i>)	31,5±2,46 (25-46)

От получените резултати в това проучване е видно, че стойностите на общия белтък са най-ниски при африканския сом (15,93±2,70 g/L). Като цяло, концентрациите на ТР при изследваните есетрови риби са по-ниски в сравнение с тези при пъстървовите видове, шарана и щуката. При есетрите нивата на общия протеин са еднакви: 24,57±1,65 g/L, 24,50±2,67 g/L и 24,8±2,25 g/L, съответно за сибирска, руска есетра и кръстоска. По-високи нива на ТР се отчитат при пъстървите, съответно 34,16±4,83 g/L дъгова пъстърва, 36,83±4,45 g/L кафява пъстърва и 29,5±6,34 g/L сивен. Средните стойностите при шарана са същите, както при кафявата пъстърва, но има разлики в минималните и максимални граници.

4.1.2. Албумин

Данните за стойностите на албумина при изследваните видове риби са представени в таблица 3.

Таблица 3: Концентрация на албумин (g/L) при сладководни видове риби, отглеждани със стопанска цел в България.

Видове риби	Албумин (g/L)
Шаран (<i>Cyprinus carpio</i>)	21,60±1,14 (5-22)
Дъгова пъстърва; Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mychiss</i>)	22,33±7,91 (10-30)
Кафява пъстърва; Brown trout (<i>Salmo trutta fario</i>)	28±3,16 (24-33)
Сивен; Brook trout (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	20,33±9,89

	(11-34)
Африкански сом (<i>Clarias gariepinus</i>)	8,28±2,02 (8-21)
Сибирска есетра (<i>Acipenser baerii</i>)	-
Руска есетра (<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>)	7,00±1,60 (2,5-20)
Кръстоска (<i>Acipenser gueldenstaedtii</i> x <i>Acipenser baerii</i>)	7,85±1,22 (4,5-11)
Щука (<i>Esox lucius</i>)	7,21±0,87 (4,2-10)

Концентрациите на този показател са много сходни при изследваните видове есетри и се доближават до тези, установени при щука и донякъде до африканския сом. Като цяло, тази група от риби имат по-ниски нива на албумина в сравнение с шараните и пъстървовите видове риби. Много близки са резултатите при руска есетра, кръстоска между руска и сибирска есетра и щука, съответно 7,00±1,60 g/L, 7,85±1,22 g/L и 7,21±0,87 g/L.

Много близки са средните стойности на Alb при шаран (21,60±1,14 g/L) и дъгова пъстърва (22,33±7,91 g/L). От всички проучени видове риби в това изследване най-ниски са нивата на албумин при руска есетра (7,00±1,60 g/L), а най-високи са при кафява пъстърва (28±3,16 g/L).

4.1.3. Глобулини

В настоящото проучване бяха определени стойностите на глобулините в сладководните видове риби, които се отглеждат в България, за да се установи тяхната стойност и различия при отделните видове. Резултатите са отразени в таблица 4.

Таблица 4: Стойности на глобулини (g/L) при сладководни видове риби, отглеждани със стопанска цел в България.

Видове риби	Глобулини (g/L)
Шаран (<i>Cyprinus carpio</i>)	26,16±7,95 (13,16-39,16)

Дъгова пъстърва; Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mychiss</i>)	11,83±4,21 (6-18)
Кафява пъстърва; Brown trout (<i>Salmo trutta fario</i>)	8,83±2,40 (5-11)
Сивен; Brook trout (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	9,33±6,21 (1-20)
Африкански сом (<i>Clarias gariepinus</i>)	7,90±1,83
Сибирска есетра (<i>Acipenser baerii</i>)	-
Руска есетра (<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>)	17,50±0,91
Кръстоска (<i>Acipenser gueldenstaedtii</i> x <i>Acipenser baerii</i>)	16,95±0,98
Щука (<i>Esox lucius</i>)	25,95±1,08

От така представените данни става видно, че най-ниските нива на глобулините са отчетени при африканския сом (7,90±1,83 g/L), последван от кафявата пъстърва (8,83±2,40 g/L). Като цяло, представителите на пъстървовите видове риби изследвани тук са с ниски стойности на глобулини, а именно: сивен (9,33±6,21 g/L) и дъгова пъстърва (11,83±4,21 g/L). В резултат на отчетените данни може да се заключи, че нивата на глобулините при пъстървовите видове риби са в диапазон от 8,83 до 11,83 g/L. От всички проучени видове животни в настоящото проучване най-високи стойности се отчитат при шарановите риби (26,16±7,95 g/L) и щуката (25,95±1,08 g/L).

4.1.4. Съотношение Албумин/Глобулини

В настоящото проучване беше определено съотношението албумин/глобулини в сладководните видове риби, които се отглеждат в България. Резултатите са показани в таблица 5.

Таблица 5: Съотношение албумин/глобулини при сладководни видове риби, отглеждани със стопанска цел в България.

Видове риби	Албумин/Глобулин и
Шаран (<i>Cyprinus carpio</i>)	1,59/1

Дъгова пъстърва; Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mychiss</i>)	1,88/1
Кафява пъстърва; Brown trout (<i>Salmo trutta fario</i>)	3,17/1
Сивен; Brook trout (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	2,17/1
Африкански сом (<i>Clarias gariepinus</i>)	1,05/1
Сибирска есетра (<i>Acipenser baerii</i>)	
Руска есетра (<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>)	0,40/1
Кръстоска (<i>Acipenser gueldenstaedtii</i> x <i>Acipenser baerii</i>)	0,46/1
Щука (<i>Esox lucius</i>)	0,30/1

В резултат на получените резултати се установява, че съотношението албумин/глобулини е най-високо при пъстървовите видове риби, последвано от това при шараните. Най-висока стойност е отчетена при кафявата пъстърва. Най-ниско е съотношението при щуката, като есетровите видове също се отличават със сравнително ниски стойности.

4.1.5. Кръвна захар

Резултатите от получените данни за стойностите на глюкоза в кръвта на изследваните видове риби, отглеждани със стопанска цел в България, са представени в таблица 6.

Таблица 6: Стойности на кръвната захар (mmol/L) при сладководни видове риби, отглеждани със стопанска цел в България.

Видове риби	Глюкоза (mmol/L)
Шаран (<i>Cyprinus carpio</i>)	2,76±0,61 (2,2-3,8)
Дъгова пъстърва; Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mychiss</i>)	6,03±0,43 (5,4-6,5)

Кафява пъстърва; Brown trout (<i>Salmo trutta fario</i>)	5,2±0,30 (4,7-5,5)
Сивен; Brook trout (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	-
Африкански сом (<i>Clarias gariepinus</i>)	8,35±0,18 (8,0--8,5)
Сибирска есетра (<i>Acipenser baerii</i>)	6,5±0,56 (5,9-6,6)
Руска есетра (<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>)	6,48±0,64 (5,9-7,6)
Кръстоска (<i>Acipenser gueldenstaedtii</i> x <i>Acipenser baerii</i>)	6,45±0,31 (6,0-6,7)
Щука (<i>Esox lucius</i>)	1,71±0,17 (1,4-1,9)

От представените данни за концентрацията на кръвната захар при изследваните видове риби става ясно, че най-високи средни стойности се отчитат при африкански сом (8,35±0,18 mmol/L), а най-ниски при щуката (1,71±0,17 mmol/L). При есетровите видове нивата на глюкозата се движат в рамките на много близки граници: от 6,5±0,56 mmol/L при сибирската есетра до 7,6±0,63 mmol/L при руските есетри. Кръстоската на есетровите видове риби заема междинно положение - 6,45±0,31 mmol/L. Като цяло, стойностите на кръвната захар при есетровите видове риби са малко по-високи в сравнение с пъстървовите риби. Нивата на кръвната глюкоза при шарани са по-ниски от тези при пъстървите и есетровите видове риби, но са по-високи от концентрацията отчетена при щуки.

4.1.6. Креатинин

Резултатите от получените данни за стойностите на креатинина в кръвта на изследваните видове риби, отглеждани със стопанска цел в България, са представени в таблица 7.

Таблица 7: Стойности на креатинин (μmol/L) при сладководни видове риби, отглеждани със стопанска цел в България.

Видове риби	Креатинин ($\mu\text{mol/L}$)
Шаран (<i>Cyprinus carpio</i>)	16,72 $\pm$ 0,04 (8-33)
Дъгова пъстърва; Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mychiss</i>)	182,4 $\pm$ 47,35 (118-236)
Кафява пъстърва; Brown trout (<i>Salmo trutta fario</i>)	195,5 $\pm$ 82,66 (71-320)
Сивен; Brook trout (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	-
Африкански сом (<i>Clarias gariepinus</i>)	73,61 $\pm$ 21,33 (45-235)
Сибирска есетра (<i>Acipenser baerii</i>)	319 $\pm$ 48,50 (122-495)
Руска есетра (<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>)	432 $\pm$ 72,57 (212-636)
Кръстоска (<i>Acipenser gueldenstaedtii</i> x <i>Acipenser baerii</i>)	228 $\pm$ 34,14 (140-332)
Щука (<i>Esox lucius</i>)	23,41 $\pm$ 2,19 (20-26)

От получените данни се вижда, че шаранът има най-ниски стойности на креатинина (16,72 $\pm$ 0,04 $\mu\text{mol/L}$) от всички изследвани видове риби, последван от щуката. Концентрациите на креатинина при пъстървовите риби са приблизително сходни и показват много близки стойности: дъгова пъстърва 182,4 $\pm$ 47,35 $\mu\text{mol/L}$ и кафява пъстърва 195,5 $\pm$ 82,66 $\mu\text{mol/L}$. Най-високи са нивата при руската (432 $\pm$ 72,57 $\mu\text{mol/L}$) и сибирската есетра (319 $\pm$ 48,50 $\mu\text{mol/L}$), докато при тяхната кръстоска стойностите са по-ниски, приблизително колкото при пъстървовите видове риби (228 $\pm$ 34,14 $\mu\text{mol/L}$).

4.1.7. Урея

Резултатите от получените данни за стойностите на урея в кръвта на изследваните видове риби, отглеждани със стопанска цел в България, са представени в таблица 8.

Таблица 8: Стойности на урея ($\mu\text{mol/L}$) при сладководни видове риби, отглеждани със стопанска цел в България.

Видове риби	Урея ($\mu\text{mol/L}$)
Шаран (<i>Cyprinus carpio</i>)	1,52 $\pm$ 0,23 (0,78 – 2,20)
Дъгова пъстърва; Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mychiss</i>)	0,59 $\pm$ 0,31 (0,20 – 1,09)
Кафява пъстърва; Brown trout (<i>Salmo trutta fario</i>)	0,61 $\pm$ 0,7 (0,45 – 0,87)
Сивен; Brook trout (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	0,92 $\pm$ 0,26 (0,65 – 1,38)
Африкански сом (<i>Clarias gariepinus</i>)	0,67 $\pm$ 0,18 (0,37 – 2,96)
Сибирска есетра (<i>Acipenser baerii</i>)	0,52 $\pm$ 0,11 (0,14 – 0,93)
Руска есетра (<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>)	0,31 $\pm$ 0,04 (0,14 – 0,65)
Кръстоска (<i>Acipenser gueldenstaedtii</i> x <i>Acipenser baerii</i>)	0,29 $\pm$ 0,08 (0,12 – 0,66)
Щука (<i>Esox lucius</i>)	1,29 $\pm$ 0,40 (1,00 – 1,60)

В резултат на проведеното проучване се установява, че най-високи стойности на урея има при шаран (1,52 $\pm$ 0,23 $\mu\text{mol/L}$) и щука (1,29 $\pm$ 0,40 $\mu\text{mol/L}$). От изследваните видове риби най-ниски стойности има при есетровите видове риби, като при кръстоската между руска и сибирска есетра е отчетена най-ниската концентрация - 0,29 $\pm$ 0,08 $\mu\text{mol/L}$. Тези стойности са много близки до тези при руска есетра - 0,31 $\pm$ 0,04 $\mu\text{mol/L}$. Средно положение в референтния диапазон заемат стойностите на уреята при пъстървовите риби, като при кафявата и дъгова пъстърва нивата са приблизително еднакви (0,61 $\pm$ 0,7 $\mu\text{mol/L}$ и 0,59 $\pm$ 0,31 $\mu\text{mol/L}$, съответно).

4.1.8. Пикочна киселина

Резултатите от получените данни за стойностите на пикочна киселина при дъгова пъстърва, отглеждана със стопанска цел в България, са представени в таблица 19. Единственият представител от изследваните видове риби в това проучване, на който е имало възможност за изследване на пикочна киселина е дъговата пъстърва.

Таблица 19: Стойности на пикочна киселина ($\mu\text{mol/L}$) при дъгова пъстърва, отглеждани със стопанска цел в България.

Видове риби	Пикочна киселина ($\mu\text{mol/L}$)
Дъгова пъстърва; Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mychiss</i>)	3,83 $\pm$ 0,60 (2-6)

4.1.9. Холестерол

Резултатите от получените данни за стойностите на холестерола в кръвта при някои видове сладководни риби, отглеждани със стопанска цел в България, са представени в таблица 10.

Таблица 10: Стойности на холестерола (mmol/L) при шаран, дъгова пъстърва, кафява пъстърва, кръстоска (*Acipenser gueldenstaedtii* x *Acipenser baerii*) и щука, отглеждани със стопанска цел в България.

Видове риби	Холестерол (mmol/L)
Шаран (<i>Cyprinus carpio</i>)	6,02 $\pm$ 14,98 (1,14-10,9)
Дъгова пъстърва; Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mychiss</i>)	4,47 $\pm$ 0,25 (3,89-5,52)
Кафява пъстърва; Brown trout (<i>Salmo trutta fario</i>)	0,57 $\pm$ 0,11 (0,44-0,76)
Кръстоска (<i>Acipenser gueldenstaedtii</i> x <i>Acipenser baerii</i>)	4,75 $\pm$ 0,1 (2,50 – 7,00)
Щука (<i>Esox lucius</i>)	3,5 $\pm$ 0,2 (3,00 – 4,00)

От наличните данни става ясно, че шаранът е с най-високи нива на холестерола ($6,02 \pm 14,98$ mmol/L), последван от кръстоската между руска и сибирска есетра ($4,75 \pm 0,1$ mmol/L) и дъгова пъстърва ($4,47 \pm 0,25$ mmol/L). Най-ниски измерени стойности от изследваните видове риби са отчетени при кафявата пъстърва ($0,57 \pm 0,11$ mmol/L).

4.1.10. Триглицериди

Резултатите от получените изследвания за стойностите на триглицеридите в кръвта на видове риби, отглеждани със стопанска цел в България, са представени в таблица 11. От изследваните видове риби данни има само за шарани и дъгова пъстърва.

Таблица 11: Стойности на триглицеридите (mmol/L) при шаран и дъгова пъстърва, отглеждани със стопанска цел в България.

Видове риби	триглицериди (mmol/L)
Шаран (<i>Cyprinus carpio</i>)	$6,81 \pm 18,5$ (3,89– 9,73)
Дъгова пъстърва; Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mychiss</i>)	$2,43 \pm 0,10$ (2,07-2,74)

4.1.11. Аланинаминотрансфераза

Данните от проучването за ензима аланинаминотрансфераза (ЕС 2.6.1.2) в плазмата на изследваните видове риби са представени в таблица 12.

Таблица 12: Стойности на ензима аланинаминотрансфераза (U/L) при сладководни видове риби, отглеждани със стопанска цел в България.

Видове риби	Аланинаминотрансфераза за (U/L)
Шаран (<i>Cyprinus carpio</i>)	$22,36 \pm 2,65$ (6,73 - 38)
Дъгова пъстърва; Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mychiss</i>)	$28,00 \pm 10,6$ (10-43)
Кафява пъстърва; Brown trout (<i>Salmo trutta fario</i>)	$20,83 \pm 6,11$ (13-30)

Сивен; Brook trout (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	29,50±9,46 (20-47)
Африкански сом (<i>Clarias gariepinus</i>)	14,71±3,67 (6-36)
Сибирска есетра (<i>Acipenser baerii</i>)	7,00±1,09 (4-12)
Руска есетра (<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>)	7,00±1,60 (2-20)
Кръстоска (<i>Acipenser gueldenstaedtii</i> x <i>Acipenser baerii</i>)	12,50±1,65 (4-15)
Щука (<i>Esox lucius</i>)	14,35±1,41 (10-18)

Данните получени от изследването показват по-ниска активност на ензима при есетровите видове риби в сравнение с останалите изследвани в това проучване представители. Резултатите показват, че стойностите при сибирска есетра (7,00±1,09 U/L) и руска есетра (7,00±1,60 U/L) са еднакви. При кръстоската между двата вида есетра нивата са малко по-високи в сравнение с останалите от този вид - 12,50±1,65 U/L. Щуката и сомове се открояват с еднакви средни стойности и сравнително ниски активности на ензима в сравнение с останалите видове риби (съответно 14,35±1,41 U/L и 14,71±3,67 U/L). От получените резултати в това изследване е видно, че по-високи са отчетените средни величини при пълтървовите видове риби: кафява пълтърва 20,83±6,11 U/L, дъгова пълтърва 28,00±10,6 U/L и сивен 29,50±9,46 U/L. Най-висока активност на ензима от изследваните видове риби се наблюдава при сивена (29,50±9,46 U/L).

4.1.12. Аспартатаминотрансфераза

Получените стойности за активността на ензима аспартатаминотрансфераза (EC 2.6.1.1) при изследваните видове риби са представени в таблица 13.

Таблица 13: Стойности на ензима аспартатаминотрансфераза (U/L) при сладководни видове риби, отглеждани със стопанска цел в България.

Видове риби	Аспартатаминотрансфераза (U/L)
Шаран (<i>Cyprinus carpio</i>)	66,58±5,08 (35-99)
Дъгова пъстърва; Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mychiss</i>)	378,3±111 (280-570)
Кафява пъстърва; Brown trout (<i>Salmo trutta fario</i>)	405 ±107,2 (263-594)
Сивен; Brook trout (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	532,8±207,7 (349-908)
Африкански сом (<i>Clarias gariepinus</i>)	73,78±28,06 (62-160)
Сибирска есетра (<i>Acipenser baerii</i>)	327±4,33 (179-514)
Руска есетра (<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>)	185±28,6 (82-364)
Кръстоска (<i>Acipenser gueldenstaedtii</i> x <i>Acipenser baerii</i>)	273,16±16,7 (234-349)
Щука (<i>Esox lucius</i>)	90,11±4,34 (80-98)

От получените резултати е видно, че при шараните, сомовете и щуците нивата на ензима аспартатаминотрансфераза (съответно 66,58±5,08 U/L, 73,78±28,06 U/L и 90,11±4,34 U/L) са по-ниски в сравнение с останалите видове животни, като най-ниски са стойностите при шаран. Като цяло, активността на този ензим е по-голяма при пъстървовите видове риби в сравнение с есетровите. Най-високи активности са отчетени при сивена (532,8±207,7 U/L), последвани от кафявата пъстърва (405 ±107,2 U/L) и дъгова пъстърва (378,3±111 U/L). При есетровите видове диапазонът на активност на AST е от 185±28,6 U/L при руска есетра до 327±4,33 U/L при сибирска есетра. Кръстоската между тях заема междинно положение на стойностите - 273,16±16,7 U/L.

4.1.13. Алкална фосфатаза

Данни за активността на ензима алакалната фосфатаза (ЕС 2.7.3.2) има само за дъгова пъстърва, представени в таблица 14.

Таблица 14: Стойности на ензима алкална фосфатаза (U/L) при дъгови пъстърви, отглеждани със стопанска цел в България.

Видове риби	Алкална фосфатаза (U/L)
Дъгова пъстърва; Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mychiss</i>)	91,47±7,23 (68,3-134,2)

4.1.14. α-амилаза

Данните за активността на α-амилазата (ЕС 3.2.1.1) има само за шарани, представени в таблица 15.

Таблица 15: Стойности на ензима α-амилаза (U/L) при шарани и дъгова пъстърва, отглеждани със стопанска цел в България.

Видове риби	α-амилаза (U/L)
Шаран (<i>Cyprinus carpio</i>)	54,00±6,56

4.1.15. Ацетилхолинестераза

Данните за активността на ацетилхолинестераза (ЕС 3.1.1.7) има само за шарани и са представени в таблица 16.

Таблица 16: Стойности на ензима ацетилхолинестераза (U/L) при шарани, отглеждани със стопанска цел в България.

Видове риби	Ацетилхолинестераза (U/L)
Шаран (<i>Cyprinus carpio</i>)	327,885±56,89 (280,8-374,97)

4.1.16. Лактатдехидрогеназа

Информацията за активността на лактатдехидрогеназата (ЕС 1.1.1.27) има само за шарани и са представени в таблица 17.

Таблица 17: Стойности на ензима лактатдехидрогеназа (U/L) при шарани, отглеждани със стопанска цел в България.

Видове риби	Лактатдехидроген аза (U/L)
Шаран (<i>Cyprinus carpio</i>)	187,67±24,79

4.1.17. Креатинфосфокиназа

Данните за активността на креатинфосфокиназата (ЕС 2.7.3.2) има само за шарани и са представени в таблица 18.

Таблица 18: Стойности на ензима креатинфосфокиназа (U/L) при шарани, отглеждани със стопанска цел в България.

Видове риби	Креатинфосфокина за (U/L)
Шаран (<i>Cyprinus carpio</i>)	1691,7±17,1 (910 – 2453)

4.1.18. Калций

Резултатите от получените данни за стойностите на калция в кръвта на изследваните видове риби, отглеждани със стопанска цел в България, са представени в таблица 19.

Таблица 19: Стойности на калций (mmol/L) при сладководни видове риби, отглеждани със стопанска цел в България.

Видове риби	Калций (mmol/L)
Шаран (<i>Cyprinus carpio</i>)	3,51±0,12 (2,96-4,05)
Дъгова пъстърва; Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mychiss</i>)	3,26±0,26 (2,88-3,58)
Кафява пъстърва; Brown trout (<i>Salmo trutta fario</i>)	3,47±0,40

	(3,1-4,21)
Сивен; Brook trout (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	3,26±0,3 (2,87-3,66)
Африкански сом (<i>Clarias gariepinus</i>)	1,76±0,36 (1,42-3,01)
Сибирска есетра (<i>Acipenser baerii</i>)	3,07±0,14 (2,41-3,65)
Руска есетра (<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>)	2,52±0,07 (2,14-2,86)
Кръстоска (<i>Acipenser gueldenstaedtii</i> x <i>Acipenser baerii</i>)	3,44±0,20 (3,04-4,10)
Щука (<i>Esox lucius</i>)	3,42±0,21 (1,45-3,58)

От резултатите получени в настоящото изследване, става видно, че концентрациите на калция при представителите на сладководните риби, включени в това проучване, са в границите от 1,76 до 3,51 mmol/L. Най-ниски стойности са отчетени при африкански сом (1,76±0,36 mmol/L), а най-високи са при шарановите риби (3,51±0,12 mmol/L), последвани от кафява пъстърва (3,47±0,40 mmol/L) и кръстоската на есетровите риби (3,44±0,20 mmol/L). Нивата на електролита при сивена и дъговата пъстърва са еднакви - 3,26±0,3 mmol/L и 3,26±0,26 mmol/L. Като цяло, концентрацията на калцият при есетровите видове риби показва малко по-ниски стойности в сравнение с пъстървовите риби.

4.1.19. Фосфор

Резултатите от получените данни за стойностите на фосфора в кръвта на изследваните видове риби, отглеждани със стопанска цел в България, са представени в таблица 20.

Таблица 20: Стойности на фосфора (mmol/L) при сладководни видове риби, отглеждани със стопанска цел в България.

Видове риби	Фосфор (mmol/L)
-------------	--------------------

Шаран (<i>Cyprinus carpio</i>)	5,51±0,38 (3,00-8,00)
Дъгова пъстърва; Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mychiss</i>)	4,47±1,71 (3,05-7,73)
Кафява пъстърва; Brown trout (<i>Salmo trutta fario</i>)	3,42 ±0,52 (2,89-4,27)
Сивен; Brook trout (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	4,05±0,75 (3,02-4,95)
Африкански сом (<i>Clarias gariepinus</i>)	0,94±0,22 (1,55 – 2,84)
Сибирска есетра (<i>Acipenser baerii</i>)	3,29±0,21 (2,45-3,58)
Руска есетра (<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>)	1,91±0,23 (0,97-3,47)
Кръстоска (<i>Acipenser gueldenstaedtii</i> x <i>Acipenser baerii</i>)	3,27±0,39 (2,10-4,20)
Щука (<i>Esox lucius</i>)	4,11±0,21 (3,00-5,00)

От данните получени от настоящото проучване, стойностите на фосфора при представителите на сладководните риби, включени в това проучване, са в границите от 0,94 до 5,51 mmol/L. Най-ниски стойности се отчитат при африкански сом (0,94±0,22 mmol/L), а с най-високи са при шарановите риби (5,51±0,38 mmol/L), тенденция, която се забелязва и при другия изследван макроелемент. Също по-високи, в сравнение с другите представители, са нивата при дъговата пъстърва (4,47±1,71 mmol/L). Приблизително еднакви стойности се наблюдават при сибирска есетра и кръстоската на руска и сибирска есетра (съответно 3,29±0,21 mmol/L и 3,27±0,39 mmol/L), като спрямо тях при руската есетра нива се отчитат по-ниски (1,91±0,23 mmol/L). От изнесените данни се вижда, че пъстървовите риби имат по-високи концентрации на фосфор спрямо есетровите видове риби. Стойностите на фосфора при щуките са близко с тези получени при пъстървовите видове риби.

Изследване на някои основни хормонални показатели при сладководни видове риби за определяне на референтни диапазони

Изследването на ключови хормонални показатели се извърши чрез кръвни тестове с цел получаване на информация за физиологичното състояние и здравния статус на изследваните видове риби. Стойностите на някои от най-важните хормонални показатели са изследвани в здрави представители на сладководни видове риба отглеждани в България със стопанска цел:

- семейство *Cyprinidae* - Обикновен шаран (*Cyprinus carpio*);
- семейство *Salmonidae* - Дъгова пъстърва (*Oncorhynchus mychiss*), Кафява пъстърва (Балканска пъстърва/Речна пъстърва) (*Salmo trutta fario*);
- семейство *Acipenseridae* - Руска есетра (*Acipenser gueldenstaedtii*), Сибирска есетра (*Acipenser baerii*), Руска есетра, женска кръстоска със Сибирска мъжка есетра;
- семейство *Esocidae* - Щука (*Esox lucius*);
- семейство *Clariidae* - Африкански сом (*Clarias gariepinus*), за да се определят специфичните за вида референтни интервали.

4.1.20. Трийодтиронин (Т3), тироксин (Т4), Т3/Т4 съотношение

Установени са стойности на общия трийодтиронин, общия тироксин и тяхното съотношение при представители от семейство *Salmonidae*, *Acipenseridae*, *Cyprinidae* и *Clariidae*. Получените резултати са отразени в таблица 21.

Таблица 21: Стойности на общия трийодтиронин, общия тироксин и тяхното съотношение при сладководни видове риби от семейство *Salmonidae*, *Acipenseridae*, *Cyprinidae* и *Clariidae*, отглеждани със стопанска цел в България.

Видове риби	Трийодтиронин (Т3)* ng/mL	Тироксин (Т4)* mcg/dL	Т3/Т4 *
Руска есетра; Russian sturgeon (<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>)	4,49±0,5 (3,27-5,45)	5,33±0,72 (2,15-8,11)	0,84

Сибирска есетра; Siberian sturgeon (<i>Acipenser baerii</i>)	2,10±0,43 (1,65-2,96)	3,15±0,83 (1,50-4,16)	0,66
Кръстоска: Russian sturgeon female x Siberian sturgeon male	1,14±0,43 (0,71-1,53)	1,57±0,43 (1,35-1,86)	0,72
Дъгова пъстърва; Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mychiss</i>)	0,84±0,13 (0,68-1,11)	2,53±0,08 (1,23-3,76)	0,33
Кафява пъстърва; Brown trout (<i>Salmo trutta fario</i>)	1,91±0,48 (1,42-2,89)	1,31±0,09 (1,14-1,49)	1,45
Шаран; Common carp (<i>Cyprinus carpio</i>)	2,60±0,28 (1,73-4,17)	1,80±0,23 (1,34-2,08)	1,44
Африкански сом; African catfish (<i>Clarias gariepinus</i>)	0,81±0,15 (0,64-1,12)	1,67±0,16 (1,43-1,95)	0,47

От получените резултати се вижда, че при руската есетра са най-високи стойностите на Т3, последвана от шаран и сибирска есетра. Сравнително високи спрямо останалите представители са и при кафява пъстърва. Най-ниски са при сомове и дъгова пъстърва. Тироксина е с най-високи концентрации отново при руска есетра и сибирска есетра. Също високи са стойностите и при дъгова пъстърва. Най-ниска нива има при кафява пъстърва, последвана от африканския сом. При представителите на семейство *Acipenseridae*, се наблюдават високи нива на тироксин и трийодтиронин в сравнение с другите семейства. Интересен е факта, че въпреки най-високи концентрации на двата хормона при руски и сибирски есетри, това не се наблюдава при тяхната кръстоска. Стойностите на двата хормона при кръстоската са сравнително ниски.

От извършените анализи, като обобщение може да се заключи, че вариации са наблюдавани в плазмените нива на Т3 и Т4 при всички изследвани видове. Данните разкриват, че най-ниското ниво на общия трийодтиронин е при *Clarias gariepinus* (0.81 ng/ml), докато най-високо (4.49 ng/ml) се наблюдава при руската естра (*Acipenser gueldenstaedtii*). При останалите видове риби се откриват сходни стойности на

изследвания параметър. Както е видно от таблица 22, средните концентрации на общия тироксин са най-високи при есетровите риби (*Acipenser baerii* - 3,15 mcg/dL и *Acipenser gueldenstaedtii* - 5,33 mcg/dL) в сравнение с другите изследвани видове животни, при които средните стойности са в границите от 1,31 (най-ниски при кафявата пъстърва) до 1,80 mcg/dL. Освен отделните нива за T3 и T4, се изчислиха и съотношенията на концентрации T3/T4 за всеки вид. При повечето проучвани видове те бяха около 0.6, докато при *Salmo trutta fario* и *Cyprinus carpio* са по-високи, съответно 1,45 и 1,44. Съотношението на T3/T4 се изчислява, като се използват конвенционалните стойности. Стойностите за представителните видове са: руска есетра ($r = 0,84$), сибирска есетра, ($r = 0,66$), африкански сом ($r = 0,47$), кафява пъстърва, ($r = 1,45$) и шаран ($r = 1,44$).

4.1.21. Кортикостероид-стрес хормона кортизол и пролактин

Установени са стойности на кортизол и пролактин при представители от семейство *Salmonidae*, *Acipenseridae*, *Cyprinidae*, *Esocidae* и *Clariidae*. Получените резултати са отразени в таблица 22.

Таблица 22: Стойности на кортизол и пролактин при сладководни видове риби от семейство *Salmonidae*, *Acipenseridae*, *Cyprinidae*, *Esocidae* и *Clariidae*, отглеждани със стопанска цел в България.

Видове риби	Кортизол ($\mu\text{g/dL}$)	Пролактин (ng/mL)
Руска есетра; Russian sturgeon (<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>)	<2.9	
Сибирска есетра; Siberian sturgeon (<i>Acipenser baerii</i>)	<2.9	
Кръстоска: Russian sturgeon female x Siberian sturgeon male	<2.9	
Дъгова пъстърва; Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mychiss</i>)	13,16 $\pm$ 1,14 (9,13-16,92)	1,18 $\pm$ 0,09
Кафява пъстърва; Brown trout (<i>Salmo trutta fario</i>)	19,1 $\pm$ 0,84 (18,1-20,31)	
Шаран; Common carp (<i>Cyprinus carpio</i>)	17,31 $\pm$ 0,37 (16,7-17,6)	

Африкански сом; African catfish (<i>Clarias gariepinus</i>)	17,27±2,02 (14,91-20,86)	0,95±0,18
Щука (<i>Esox lucius</i>)	0,65±0,23 (0,05 – 1,25)	

От наличните данни за кортизола е видно, че представителите на семейство *Acipenseridae* и *Esocidae* са с най-ниски концентрации, докато останалите видове сладководни риби имат по-високи.

Един от основните фактори на стрес - кортизолът, показва значителни разлики между семейство *Acipenseridae* (*Acipenser gueldenstaedtii*, *Acipenser baerii*), *Oncorhynchus mychiss* и *Esox lucius*, които имат много по-ниски стойности (<2,9 µg/dL) в сравнение с останалите три вида съответно: шаран (17,53±0,03 µg/dL), кафява пъстърва (19,51±0,72 µg/dL) и африкански сом (17,3±3,1 µg/dL). *Cyprinus carpio* и *Clarias gariepinus* имат еднакви средни стойности на плазмения кортизол (17,31±0,37 и 17,27±2,02 µg/dL).

За пролактина има данни само за дъгова пъстърва и африкански сом, съответно 1,18±0,09 ng/mL и 0,95±0,18 ng/mL.

4.1.22. 17β-естрадиол и тестостерон

При видовете есетрови риби стероидните хормони са неразпознаваеми, докато не настъпи полова диференциация. Настоящото изследване определя на пола и репродуктивния стадий на сибирската есетра чрез проследяване на някои от стероидните хормони, 17β-естрадиол и тестостерон, както в мъжки, така и в женски екземпляри. Резултатите са отразени в таблица 23. Установено е, че средната серумна концентрация на тестостерон на сибирска есетра е по-висока при мъжките (11,85±0,71 ng/ml), отколкото при женските (2,28±0,02 ng/ml).

Таблица 23: Стойности на 17β-естрадиол и тестостерон при мъжки и женски сибирски есетри (*Acipenser baerii*).

Вид риба Сибирска есетра; Siberian sturgeon (<i>Acipenser baerii</i>)	17 β -естрадиол	Тестостерон ng/mL
Мъжки екземпляри	0,2 $\pm$ 0,03	11,85 $\pm$ 0,71
Женски екземпляри	0,35 $\pm$ 0,19	2,28 $\pm$ 0,02

4.1.23. Определяне на референтни диапазони на някои основни хематологични параметри при сладководни видове риби

Измерени са стойностите на определени хематологични параметри при африкански сом (*Clarias gariepinus*), които най-често се използват в лабораторната практика (Secer et al, 2018). Резултати от изследването са представени в таблица 24. Също така е включена и част от диференциална кръвна картина, която представлява процентно съотношение между различните видове бели кръвни клетки - неутрофилни, базофилни и еозинофилни гранулирани левкоцити; лимфоцити и моноцити.

Таблица 24. Стойности на хематологични показатели при африкански сом (*Clarias gariepinus*) (n=30).

Параметри	Средни стойности
Erythrocyte sedimentation (mm/hour)	17.9 $\pm$ 0.94
Hematocrit (%)	27.47 $\pm$ 3.10
Hemoglobin (g/dL)	15.96 $\pm$ 2.58
Er x10 ⁶ /mm ³	4.42 $\pm$ 0.23
WBC x10 ³ /mm ³	21.13 $\pm$ 2.79
Mo %	4.55 $\pm$ 1.73
Ly %	63.59 $\pm$ 4.19
Neu %	30.06 $\pm$ 3.79

Основните вида бели кръвни клетки са лимфоцити, моноцити, и гранулоцити (неутрофилни, базофилни и еозинофилни). При текущото изследване, средните стойности на хематокрита бяха 27.47 $\pm$ 3.10, който е процентът на общия кръвен обем, а стойностите на хемоглобина - 15.96 $\pm$ 2.58 g/dL. Еритроцитните индекси - MCV

(корпускуларен обем) измерва средния обем на еритроцитите в кръвта; МСН (среден корпускуларен хемоглобин) отнася се до средното количество Нб в еритроцитите (в един еритроцит); МСНС (средна концентрация на корпускуларен хемоглобин; средна концентрация на Нб в еритроцитите) могат да бъдат изчислени по стандартни формули (Ajah, 2018):

$$MCV \text{ (fl)} = Hct \text{ (\%)} / \text{брой на еритроцитите в милиони/mm}^3 \times 10$$

$$MCH \text{ (pg)} = Hb \text{ (g/dl)} \times \text{брой на еритроцитите в милиони/mm}^3 \times 10$$

$$MCHC \text{ (g/dl)} = Hb \text{ (g/dl)} / Hct \text{ (\%)} \times 100$$

Изчисленията показват стойности за MCV 62,15 fl, MCH 36,11 pg и MCHC 58,09 g/dl.

4.1.23. Определяне референтни стойности на някои острофазови протеини при сладководни видове риби отглеждани в нашата страна

Установени са стойностите на фибриноген, церулоплазмин и С-реактивен протеин, измерени в кръвта на представители на сладководни видове риба от семейства *Cyprinidae*, *Salmonidae*, *Acipenseridae*, *Esocidae* и *Clariidae*. Данните от проучването са представени в таблица 25.

Таблица 25. Стойностите на фибриноген и церулоплазмин в кръвта на представители на сладководни видове риби от семейства *Cyprinidae*, *Salmonidae*, *Acipenseridae* и *Esocidae*, както и hsC-реактивен протеин при шаран, дъгова пъстърва и африкански сом.

	Фибриноген (g/L)	Церулоплазмин (mg/L)	hsC-реактивен протеин (µg/ml)
Шаран; (<i>Cyprinus carpio</i>)	1,37±0,43 (0,80-1,99)	26,97±11,09 (11,7-44,6)	0,455±0,15 (0,243-0,654)
Дъгова пъстърва; (<i>Oncorhynchus mychiss</i>)	1,63±0,21 (1,41-1,94)	27,32±1,77 (11,37-35,87)	0,386±0,083 (0,278-0,489)
Кафява пъстърва; (<i>Salmo trutta fario</i>)	1,83±0,61 (1,05-2,66)	23,33±6,25 (11,37-29,75)	
Руска есетра; (<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>)	0,91±0,12 (0,66-1,00)	81,22±40,79 (8,75-119)	
Сибирска есетра; (<i>Acipenser baerii</i>)	1,15±0,48 (0,62-1,90)	86,32±24,23 (60,37-122,5)	

Кръстоска; (<i>Acipenser gueldenstaedtii</i> x <i>Acipenser baerii</i>)	n.d	45,06±29,62 (15,75-85,75)	
Африкански сом; (<i>Clarias gariepinus</i>)	1,48±0,38 (1,08- 1,98)	51,91±19,53 (34,12-85,75)	0,442±0,17 (0,176-0,660)
Щука; (<i>Esox lucius</i>)	n.d.	82,54±38,50 (52,5-156,62)	

Анализът на стойностите на фибриногена разкрива наличие на разлики между изследваните видове риби. Най-ниските концентрации на Fib са отчетени при руската есетра (0,91±0,12 g/L) в сравнение с другите видове, а най-високите - при кафява пъстърва (1,83±0,61 g/L). Всъщност, като цяло, според настоящото изследване нивата на този параметър са най-ниски в семейство *Acipenseridae* в сравнение с останалите семейства.

Другият острофазов протеин, церулоплазминът показва най-високи средни стойности при *Acipenser baerii* (86,32±24,23 mg/L) и *Esox lucius* (82,54±38,5 mg/L) в сравнение с другите видове риби. *Clarias gariepinus* също показва високи нива (51,91±19,53 mg/L). Наблюдават се несъществени разлики между семейство *Cyprinidae* и семейство *Salmonidae* за разглеждания параметър. Стойностите при шарана (26,97±11,09 mg/L) са сходни с тези получени от дъгова пъстърва (27,32±1,77 mg/L). Най-ниските стойности на церулоплазмин в изследваните видове са отчетени при кафява пъстърва (23,33±6,25 mg/L), а най-високите в сибирската есетра (86,32±24,23 mg/L).

От наличните данни за С-реактивен протеин става ясно, че при изследваните видове риби, средните стойности на този показател са много сходни – между 0.386 и 0.455 µg/ml, като тези при шаран и африкански сом са почти еднакви (0.455 µg/ml и 0,442±0,17 µg/ml).

4.2.Влиянието на някои неинфекциозни агенти върху кръвните показатели при риби

4.2.1. Резултати от кръвта, свързани с продължително гладуване и последващо хранене

Изследван е ефектът от дългосрочно гладуване и последващо приложение на търговски препарат – синбиотик, за оценка на някои биохимични показатели на кръвта при риби.

От получените кръвни проби бяха определени стойностите на следните биохимични параметри: общ белтък, албумин, глобулини, урея, креатинин, аланин аминотрансфераза, аспартат аминотрансфераза, калций, фосфор, холестерол.

В първия опит (изследване влиянието на продължително гладуване при шарани, таблица 26), както и във втория опит (прилагане на синбиотик към храната на рибите за период от 52 дни, таблица 27) са изследвани и сравнени всички горепосочени параметри. За двата експеримента се използва контролна група риби (гладували в продължение на пет месеца), от които също се взеха кръвни проби.

Целта на това изследване е да се проучат ефектите от повторното хранене, след период на продължително гладуване, върху някои основни биохимични параметри на кръвта при шарани (*Cyprinus carpio*). Три групи животни са гладували в продължение на пет месеца. Една група риби продължават да гладуват, втората и третата група започват да се хранят, съответно за време на 4-седмичен и 8-седмичен период на повторно хранене. Резултатите от изследването показват, че повторното хранене в продължение на един месец води до леко повишаване стойностите на холестерол, общ белтък, албумин, глобулини и аспартат аминотрансфераза. Тези резултати разкриват, че гладуването в продължение на 5 месеца и последващото повторно захранване в продължение на поне един месец нямат значителен отрицателен ефект върху изследваните биохимични параметри.

Таблица 26. Биохимични параметри при шаран (*Cyprinus carpio*) и след дългосрочно гладуване и последващо захранване за период от 30 и период от 60 дни.

Параметри	150 дни гладуване	30 дни от началото на захранването	180 дни гладуване	60 дни от началото на захранването	210 дни гладуване
Общ белтък (g/L)	19.83±8.08	34.5±7.5***	20.66±7.58	30.16±4.91*	30±4.97*
Албумин (g/L)	6.50 ±2.16	9.33±2.16*a	5.50±1.51* **	15.33±1.63** *b	11.83±2.04** *

Глобулини (g/L)	13,33 ± 6.02	25.1±5.94***a	15.5±6.41	13.16±3.43	17.33±4.58
Урея (mM/L)	2.18± 0.71	2.05±0.47	2.06±0.63	2.95±2.78	2.87±0.71
Креатинин (μmol/L)	32,38±13.03	36.58±7.46	27.81±11.4 2	29.68±18.59	24.61±8.96
AST (U/L)	65.5±17.55	86.5±40.27	74±64.51	91.16±32.30	87.66±35.43
ALT (U/L)	17±13.44	12.16±3.25	12.83±2.48	22.13±7.38	17.03±15.19
Холестерол (mM/L)	1.21±0.41	3.12±0.78**	2.89±1.06* *	2.31±1.16	2.51±1.4*
Калций (mM/L)	1.24±0.77	1.47±0.36	1.54±1.10	1.45±0.37	1.09±0.30
Фосфор (mM/L)	1.4±0.58	1.55±0.59	1.22±0.25	1.47±0.35	1.45±0.33

* ($P<0.05$), ** ($P<0.01$) and *** ($P<0.001$) показват статистически значимите различия според периода от 150 дни гладуване.

Буквите: a ($P<0.05$) и b ($P<0.01$) показват статистически значимите различия спрямо периода от 210 дни гладуване.

Таблица 27. Биохимични параметри при шаран (*Cyprinus carpio*) след дългосрочно гладуване и последващо захранване със стандартна диета и с прибавен синбиотик към храната.

Параметри	Контролна група	Хранени със стандартна диета	Хранени със стандартна диета и синбиотик
Общ белтък (g/L)	24,33 ± 6,02	48,6±14,7**	44,5±8,73**
Албумин (g/L)	2,33 ± 1,03	9,5±3,44***	8,66±2,42***
Глобулини (g/L)	22 ± 5,17	39,16±12,48**	35,83±6,4*
Урея (mM/L)	1,42±0,83	1,53±0,36	1,42±0,46

Креатинин (μmol/L)	31,76±8,2	42,63±7,55*	42,83±7,86*
AST (U/L)	99±31,81	154,6±32,3*	162,5±50,43*
ALT (U/L)	25,5±5,43	38±5,21**	36,5±7,76**
Холестерол (mM/L)	1,14±0,17	3,20±0,78***	3,07±0,73***
Калций (mM/L)	0,75±0,16	1,24±0,44*	1,31±0,33*
Глюкоза (mM/L)	2,76±0,55	2,76±0,61	2,20±0,48
Фосфор (mM/L)	1,38±0,32	1,76±0,23	2,36±0,86*
Фибриноген (g/L)	1,14±0,39	1,37± 0,43	1,37± 0,37
Церулоплазмин (mg/L)	26,97±11,09	52,76± 20,99**	55,33± 4,04**

*($P<0.05$), **($P<0.01$) и ***($P<0.001$) показват статистически значимите различия спрямо периода от 150 дни гладуване.

От представените данни се отчита липса на значителен ефект от продължителното гладуване и последващо захранване върху нивата на изследваните електролити, както и на аминотрансферазите, уреята и креатинина. От друга страна, след захранване се забелязва значителна промяна в стойностите на следните параметри: общ белтък, албумин, глобулини и холестерол. След едномесечен период, през който животните се хранят отново, концентрацията на общия протеин се увеличава значително ($34,5\pm7,5$ g /L) спрямо тази при гладуващите риби ($19,83\pm8,08$ g/L). Подобни промени се наблюдават и в стойностите на албумина и глобулините. При албумин се отчита наличие на постоянна възходяща тенденция, като 60 дни след захранването нивата достигат значително повишение - $15,3\pm1,63$ g/L в сравнение с рибите подложени на гладуване ($6,5\pm2,16$ g/L) и в сравнение с ден 30-ти след захранване ($9,3\pm2,16$ g /L). Също така, месец след като рибите отново се хранят, се забелязва статистическо значимо ($P<0,001$) повишаване ($25,16\pm5,94$ g/L) на концентрацията на глобулините в сравнение с гладуващите риби ($13,33\pm6,02$ g /L), а два месеца по-късно те се връщат към изходните си стойности (13.16 ± 6.02 g/L). От получените резултати се вижда, че плазмения холестерол има значително по-високи ($P<0,01$) нива, когато рибите започват да се хранят в сравнение с периода на гладуване ($1,21\pm0,41$ mM/L). Като цяло, гладът предизвиква намаляване на нивата на холестерола

в кръвта на шараните. След 5-месечен период на лишаване от храна стойностите на холестерола са $1,21 \pm 0,41$ mM/L mM/L, а след като рибите започват да се хранят те достига до стойности до 3,1 mM/L. Повторното хранване води до повишаване в рамките на 30 дни (3.12 ± 0.78 mM/L), както и за период от 60 дни (2.3 ± 1.16 mM/L). След един месец нивата на холестерола се възстановяват до нормалните стойности за този вид животни. Изследвана е и ензимната активност на аспартат аминотрансферазата и аланин аминотрансферазата. Получените данни разкриват, че няма статистически значими разлики по време на изследването с единственото изключение на 60-я ден след хранването, когато стойностите и на двата ензима се увеличават статистически незначимо: AST- от 65,5 U/L при гладуващите риби до 91,16 U/L в референтната група и ALT-от 17 U/L до 22,13 U/L, съответно. В настоящото проучване са изследвани и концентрациите на урея и креатинин. Резултатите показват, че не се наблюдава съществена промяна след периода на гладуване, както и след последващото хранване. Нивата на креатинина са по-ниски при гладуващите риби, но не са отчетени статистически значими разлики, въпреки че след 150 дни гладуване има понижение на креатинина ($32,3 \mu\text{mol/L}$), което се коригира след едномесечното хранване. При удължаване на периода на гладуване (210 дни) се наблюдава запазване на тенденцията за намаляване на концентрацията на креатинин ($24,6 \mu\text{mol/L}$).

Добавянето на синбиотик в дажбите след продължителен период на гладуване показва положително влияние от включването на този вид продукти върху видимата смилаемост при шарани и подобряване на растежа при експерименталните риби.

В хода на настоящото проучване е изследван ефекта на продължителното гладуване върху кръвни показатели, които се използват като основни индикатори за стрес при рибите: кортизол и глюкоза. Освен това са определени стойностите и на два от острофазовите протеини, реагиращи при нарушаване на хомеостазата (таблица 28).

Таблица 28. Стойности на кортизол, глюкоза, фибриноген и церулоплазмин при шаран (*Cyprinus carpio*) след продължителен период на глад.

Параметри	Продължителност на гладуване (дни)		
	150	180	210
Кортизол ($\mu\text{g/dL}$)	17.31 ± 0.37	17.81 ± 0.90	18.42 ± 0.22
Глюкоза (mM/L)	2.76 ± 0.55	2.48 ± 0.31	2.15 ± 0.46

Церулоплазмин (mg/L)	26.27±5.22	32.50±5.87	31.93±4.21
Фибриноген (g/L)	1.17±0.86	0.96±0.28	0.83±0.16

В резултат на получените данни е видно, че продължителното гладуване при шарана води до повишаване нивата на кортизола, което не е статистически значимо, през изследваните периоди, както следва: 150 дни - 17.31±0.37 µg/dL; 180 дни - 17,81±0,90 µg/dL; 210 дни - 18,42±0,22 µg/dL. Тази тенденция се запазва до края на експерименталния период. В настоящото проучване, ефект от продължителното гладуване се забелязва и върху плазмените нива на глюкозата. Отчита се понижение на стойностите, като тенденцията за намаляване на концентрациите се запазва и продължава до края на изследвания период (210 дни) (съответно 2.76±0.55, 2.48±0.31 и 2,15±0,46 mM/L). Във връзка със острофазовата реакция на организма се изследват и някои острофазови протеини, като церулоплазмин и фибриноген. Данните при шарана показват, че е налице увеличаване на концентрацията на церулоплазмина, което не е статистическо значимо през шести и седми месец на гладуването (32,50±5,87 mg/L и 31,93±4,21 mg/L, съответно) в сравнение с предходните стойности от пети месец (26,27±5,22 mg/L). Макар че се отчитат най-високи нива на шестия месец от експеримента, то те са приблизително еднакви със стойностите през седми месец от гладуването. Установява се също така, че нивата на този ОФП, като цяло са по-ниски в рамките на първите пет месеца. Другият ОФП, който е изследван в настоящото проучване е фибриноген. Получените резултати разкриват, че няма статистически значими промени в средната стойност на фибриногена през изследваните периоди, макар да се наблюдава тенденция за понижаване на концентрацията с увеличаване времето на гладуване: 1.17±0.86 g/L; 0.96±0.28 g/L и 0.83±0.16 g/L, респективно пети, шести и седми месец.

4.2.2. Резултати от кръвта, свързани с влияние на анестезията

4.2.2.1. Влияние на различни видове анестезии при шаран (*Cyprinus carpio*)

Изследвани са някои основни биохимични показатели, както и настъпилите промени в тях, след прилагане на карамфилово масло, чиято основна активна съставка е евгенол, както и прилагане на електрически ток, като средство за постигане на електрическо зашеметяване. Получените резултати са представени в таблица 29.

Таблица 29. Ефект на анестезията върху някои биохимичните показатели на кръвната плазма при шарани (*Cyprinus carpio*) (средно $\pm$ SD).

Параметри	Група 1 (с карамфилово масло)	Група 2 (електрическо зашеметяване)	Референтни стойности
AST U/L	106,64 $\pm$ 5,09	61,67 $\pm$ 4,14*	26-54
ALT U/L	6,73 $\pm$ 0,09	7,28 $\pm$ 0,16	9-23
Глюкоза mmol/L	3,8 $\pm$ 0,59	3,6 $\pm$ 0,48	3,5-4,8
Креатинин μ mol/L	31,83 $\pm$ 0,09	29,18 $\pm$ 0,05	2,65-27,41
BUN mmol/L	6,82 $\pm$ 0,33	5,98 $\pm$ 0,23	2,86-17

*** $p < 0,001$ срещу масло от карамфил; Nicula et al., 2010 - референтни нива

В резултат на направени изследвания се отчита статистически значимо увеличение ($P < 0,05$) на активността на ензима аспартатаминотрансфераза при използване на масло от карамфил ($106,64 \pm 5,09$) спрямо стойностите получени при използванена електрическо зашеметяване, като метод за анестезия. Нивата на аланинаминотрансфераза не показват статистическо значимо намалява при карамфиловото масло ($6,73 \pm 0,09$) спрямо електрическото зашеметяване ($7,28 \pm 0,16$). И двете средни стойности са близки до долните референтни нива за този ензим. Стойностите за глюкоза, креатинин и азотен карбамид са сходни между двете групи животни. При референтни граници на кръвната захар при риби между 3,5 и 4,8 mmol/L в първата група нивата са $3,8 \pm 0,59$ mmol/L, а във втората $3,6 \pm 0,48$ mmol/L, което показва че стойностите остават в референтния обхват. Кръвните концентрации на креатинина също са сходни при двете групи риби, съответно $31,83 \pm 0,09$ mmol/L и $29,18 \pm 0,05$ mmol/L. В горната норма са стойностите на BUN, като за групата, при която се използва карамфиловото масло са $6,82 \pm 0,33$ mmol/L, а при рибите зашеметени с електричество са $5,98 \pm 0,23$ mmol/L.

4.2.2.2. Влияние на електрическия ток, използван като средство за анестезия, върху африкански сом (*Clarias gariepinus*)

В това проучване са изследвани ефектът на електрическия ток, приложен, като средство за електрическо зашеметяване и промените, които настъпват след това, сравнени с липсата на използване на ток, върху основни биохимични параметри при африканския сом (*Clarias gariepinus*). Получените данни са отразени в таблица 30.

Таблица 30. Кръвни биохимични показатели при африкански сом (*Clarias gariepinus*) след използване на електрически ток, като метод за зашеметяване, изразени като средни стойности $\pm$ SD.

Показатели	с електрическо зашеметяване	без използване на електрически ток
Общ белтък g/L	14,5 $\pm$ 3,01 (10-19)	16,33 $\pm$ 2,50 (14-21)
Албумин g/L	6,66 $\pm$ 1,63 (5-9)	8,5 $\pm$ 1,64 (7-11)
Глобулини g/L	7,83 $\pm$ 2,56 (5-10)	7,83 $\pm$ 1,94 (4-11)
Урея mM/L	0,67 $\pm$ 0,24 (0,20-0,85)	0,67 $\pm$ 0,14 (0,54-0,90)
Креатинин μ mol/L	68,53 $\pm$ 28,43 (20-97,5)	76,43 $\pm$ 17,73 (44,6-92,2)
AST U/L	76,16 $\pm$ 12,27 (56-89)	76,33 $\pm$ 41,29 (42-133)
ALT U/L	13,66 $\pm$ 1,96 (9-23)	15,83 $\pm$ 5,30 (11-17)
Калций mM/L	1,76 $\pm$ 0,33 (1,26-2,6)	1,76 $\pm$ 0,45 (1,48-2,39)
Фосфор mM/L	0,83 $\pm$ 0,12 (0,66-1,45)	1,03 $\pm$ 0,30 (0,68-0,99)

В групата с приложено електрическо зашеметяване средните нива на общ протеин и албумин са съответно 14,5 $\pm$ 3,01 g/L и 6,66 $\pm$ 1,63 g/L не са значително по-ниски от тези в контролната група, където стойностите са 16,33 $\pm$ 2,50 g/L и 8,5 $\pm$ 1,64 g/L, съответно. Същата тенденция се наблюдава и при концентрациите на креатинин, ALT и фосфор, при които не се отчита значителна промяна. Без да бъде прилагано електрическо зашеметяване концентрациите на тези параметри са: съответно 76,43 $\pm$ 17,73 μ mol/L, 15,83 $\pm$ 5,30 U/L, 1,03 $\pm$ 0,30 mM/L. След прилагане на електрическо

зашеметяване налице е леко понижаване на стойностите без статистическа значимост са $68,53 \pm 28,43 \mu\text{mol/L}$, $13,66 \pm 1,96 \text{ U/L}$ и $0,83 \pm 0,12 \text{ mM/L}$, респективно.

4.2.3. Резултати от кръвта, свързани с влияние на интоксикацията

4.2.3.1. Нитратна интоксикация

Аланин – и аспаратаминотрансферазите са най-честия индикатор за увреждане на черния дроб, поради което техните стойности са важни за диагнозата при патологични състояния. При изследваните руски есетри, след дълъг период на излагане на повишени нива на нитрити, се отчитат стойности на трансаминазите, а именно $81,2 \pm 2,13 \text{ U/L}$ за аланинаминотрансферазата и $205 \pm 7,54 \text{ U/L}$ за аспаратаминотрансфераза. Също така, нивата на уреята в това проучване са $15,3 \pm 1,2 \text{ mmol/L}$, а средните стойности на фибриногена са $1,20 \pm 0,05 \text{ g/L}$.

4.2.3.2. Фосфорорганична интоксикация

Проучванията върху някои основни биохимични показатели при шарани, изложени на действието на фосфорорганични съединения са отразени в таблица 31.

Таблица 31. Биохимични параметри при шаран преди (контролни животни) и след краткосрочно излагане на фосфорорганични съединения.

Параметри	Групи	Mean $\pm$ SD
Урея (mmol/L)	Контрола	$1,48 \pm 0,24$
	Експериментална	$1,85 \pm 0,05$
Креатинин ($\mu\text{mol/L}$)	Контрола	$38,33 \pm 11,68$
	Експериментална	$9,00 \pm 5,29^*$
AST (U/L)	Контрола	$70,33 \pm 8,50$
	Експериментална	$105,67 \pm 13,61^*$
ALT (U/L)	Контрола	$26,33 \pm 7,09$
	Експериментална	$32,00 \pm 4,36$
Амилаза (U/L)	Контрола	$54,00 \pm 6,56$
	Експериментална	$67,33 \pm 41,43$
LDH (U/L)	Контрола	$187,67 \pm 24,79$
	Експериментална	$581,67 \pm 79,78^{**}$
CPK (U/L)	Контрола	$1691,67 \pm 170,12$
	Експериментална	$2153,33 \pm 62,50^*$
AChE (U/L)	Контрола	$374,97 \pm 28,04$
	Експериментална	$280,80 \pm 85,74$

*($p < 0.05$) и **($p < 0.01$) показват статистически значима разлика между контролната и експерименталната група.

В това изследване, активността на AChE е слабо повлияна. В контролната група, нивата са $374,97 \pm 28,04$ U/L, докато средните стойности на AChE при интоксикаираните риби се понижават на $280,80 \pm 85,74$ U/L.

Стойностите на аланин- и аспартат аминотрансферазите са по-високи от контролните, особено за AST. Наблюдава се значително ($P < 0,05$) увеличение на активността на AST ($105,67 \pm 13,61$ U/L) в сравнение с контролите ($70,33 \pm 8,50$ U/L), докато повишаването на ALT не е достоверно ($32,00 \pm 4,36$ U / L в сравнение с контролните проби $26,33 \pm 7,09$ U/L). Активността на лактат дехидрогеназата е значително по-висока ($581,67 \pm 79,78$ U/L) в експерименталната група животни в сравнение с контролната ($187,67 \pm 24,79$ U/L). При експериментални риби има статистически по-високи ($P < 0,05$) нива ($2153,33 \pm 62,50$ U/L) на креатинфосфокиназата в сравнение с базовите стойности $1691,67 \pm 170,12$ U/L. Не се наблюдава статистически значима разлика в активността на ензима амилаза при експерименталните риби ($67,33 \pm 41,43$ U/L) в сравнение с контролните ($54,00 \pm 6,56$ U/L). Базовите нива на креатинина получени тук са $38,33 \pm 11,68$ $\mu\text{mol/L}$. Отчетено е статистически значимо понижаване в нивата на креатинина в експерименталната група. Нормалната концентрация на урея при сладководните костни риби е по-малка от $3,57$ mmol/L (Thrall et al., 2012), което кореспондира и с резултатите от настоящото изследване.

Промените в концентрациите на изследваните положителни (фибриноген и церулоплазмин) и отрицателни (албумин) ОФП в настоящото проучване са отразени в таблица 32.

Таблица 32. Плазмени концентрации на фибриноген (g/L), церулоплазмин (mg/L) и албумин (g/L) при шарани.

Параметри	Контролна група (means $\pm$ SE)	Интоксикаирана група (means $\pm$ SE)
Фибриноген (g/L)	1.23 ± 0.05	$1.54 \pm 0.06^*$
Албумин (g/L)	21.60 ± 1.14	$17.00 \pm 1.17^*$
Церулоплазмин (mg/L)	28.22 ± 2.09	28.87 ± 2.49

* ($P < 0,05$) показват значителни разлики между интоксикаираните и контролните шарани.

От получените резултати е видно, че концентрациите на фибриноген в кръвта са леко повлияни от ефекта на пестицидите. В контролната група нивата на фибриногена са $1,23 \pm 0,05$ g/L, а при интоксикираниите риби са и леко повишени $1,54 \pm 0,06$ g/L ($P < 0,05$). Церулоплазминът остава непроменен и в двете групи животни. Стойностите му са еднакви - $28,22 \pm 2,09$ mg/L при контролите и $28,87 \pm 2,49$ mg/L при интоксикираниите риби. Получените данни показват наличие на статистически разлики ($P < 0,05$) в стойностите на албумина в третираната група ($17,00 \pm 1,17$ g/L) в сравнение с контролната група ($21,60 \pm 1,14$ g/L). Налице е понижение на този ОФП, характеризиран като отрицателен острофазов протеин при рибите.

Като потвърждаващ фактор за наличие на интоксикация се използва хидрохимичен анализ на водата. И при двете изследвани (интоксикирани и контролна) проби е налице почти неутрално рН от 6,9. Твърдостта на водата е $13,3$ ° dH за интоксикираниите проби и $7,84$ ° dH за контролната проба. Окислението на калиев перманганат (в ml O₂/L) е 1.6 за контролната проба и 2.8 за интоксикираниите проба. Останалите измерени химични параметри са показани на таблица 33.

Таблица 33. Химични параметри на водата от река Тунджа, използвана за отглеждане на риба (в mg/L).

Индикатор (mg/L)	Интоксикирани проби	Контролни проби	Норми*
Fe	0.03	0.04	-
Mn	0.0	0.0	-
Zn	0.0	0.0	1-2
CN	0.004	0.007	-
Cl	0.08	0.11	<0005
SO ₄	20.0	34.0	-
PO ₄	6.86	5.43	0.4
NH ₄	0.0	0.29	<0.2
NO ₂	0.014	0.038	<0.03-
NO ₃	40.28	19.48	-

* Наредба № 4 за качеството на водата за развъждане на риба и миди (Държавен вестник №88 / 2000 г.).

Съгласно действащото национално законодателство за качеството на речните води, резултатите за рН, тежки метали, амоний (NH₄) и нитрити (NO₂) в

експерименталната проба показаха добър химичен статус, но резултатите за нитрати и фосфати надхвърлиха нормите повече от десет пъти (Наредба № Н-4, 2012 г.). В контролната проба NH_4 и NO_2 леко надвишават нормите, докато количеството на нитратите (NO_3) в експерименталните проби са двойно по-големи от контролните.

4.3. Резултати от кръвта, свързани с влиянието на някои инфекциозни агенти (бактериални, гъбични и паразитни инфекциозни агенти)

4.3.1. Резултати от кръвта, свързани с влиянието на паразитна инфекция

Изследваните биохимични параметри при дъгови пъстърви, заразени с *Myxobolus cerebralis*, са отразени в таблица 34.

Таблица 34. Биохимични параметри, изследвани при дъгови пъстърви (*Oncorhynchus mychiss*) заразени с *Myxobolus cerebralis*.

Показатели	Mean $\pm$ SE	Minimum- Maximum Range	References
ALP (U/L)	873.16 $\pm$ 106.71	636-1342	68-72 ⁽⁴⁾
ALT (U/L)	22.5 $\pm$ 2.14	13-28	10-40 ⁽¹⁾
Кортизол ($\mu\text{g/dL}$)	13.16 $\pm$ 1.14	9.13-16.92	<2.9 ⁽³⁾
Глюкоза (mmol/L)	4.38 $\pm$ 0.42	3.01-5.43	5.4-6.5 ⁽³⁾
Общ белтък (g/L)	42.39 $\pm$ 1.55	36.9-47.2	28-40 ⁽¹⁾
Албумин (g/L)	4.56 $\pm$ 0.76	2.7-7.9	10-30 ⁽¹⁾
Глобулини (g/L)	37.83 $\pm$ 1.09	32.9-40.7	6-18 ⁽¹⁾
Калций (mmol/L)	2.72 $\pm$ 0.09	2.42-3.04	2.88-3.58 ⁽¹⁾
Фосфор (mmol/L)	6.96 $\pm$ 0.49	4.83-8.05	3.00-7.73 ⁽¹⁾
Креатинин ($\mu\text{mol/L}$)	26 $\pm$ 0.36	25-27	118-236 ⁽¹⁾
Пикочна киселина ($\mu\text{mol/L}$)	3.83 $\pm$ 0.60	2-6	59.5 ⁽⁴⁾
Холестерол (mmol/L)	4.47 $\pm$ 0.25	3.89-5.52	0.24-0.62 ⁽¹⁾
Триглицериди (mmol/L)	2.43 $\pm$ 0.10	2.07-2.74	6.15-6.30 ⁽⁴⁾
Пролактин (ng/ml)	1.18 $\pm$ 0.09	1-1.64	2-15 ⁽²⁾

(1) – Zapryanova et al., 2018; (2) - Prunet et al., 1985; Pottinnger et al., 1992; (3) - Zapryanova et al., 2018; (4) – Nicula et al., 2010

В настоящото проучване, анализът на биохимичните параметри не показва значителни разлики между заразени и здрави риби, въпреки че се наблюдават отклонения в някои показатели. От изследваните кръвни параметри, общият протеин,

глобулините, холестеролът, алкалната фосфатаза и кортизолът показват по-високи стойности в сравнение с референтните граници. От друга страна, концентрациите на креатинин, пикочна киселина, албумин, калций и пролактин са по-ниски от нормалните нива за този вид риби.

4.3.2. Резултати от кръвта, свързани с влиянието на бактериална инфекция

Данните от изследваните кръвни показатели при дъгова пъстърва, инфектирана с Грам (+) бактерия *Lactococcus garvieae*, са показани в таблица 35.

Таблица 35. Биохимични параметри, изследвани при дъгови пъстърви (*Oncorhynchus mychiss*) заразени с *Lactococcus garvieae*.

Параметри	Means±SE	Min - Max
Общ белтък (g/L)	25,63±4,47	20,60-43,60
Албумин (g/L)	16,38±2,64	10,80-26,30
Глюкоза (mM/L)	0,73±0,13	0,42-1,17
Холестерол (mM/L)	2,43±0,04	1,80-3,70
Триглицериди (mM/L)	3,52±0,34	3,20-3,77
AST (U/L)	20,33±4,26	10-34
ALT (U/L)	9,16±1,16	5-15
ALP (U/L)	35±6,49	23-59
Креатинин (μmol/L)	72±4,85	59-83
Урея (mM/L)	1,63±0,24	0,90-2,20
Пикочна киселина (μmol/L)	90,53±18,58	56-153
Калций (mM/L)	2,41±0,52	1,40-3,80
Фосфор (mM/L)	3,07±0,25	2,18-4,17

Данните получени от това изследване показват ниски нива на глюкоза, холестерол и общ белтък в заразената дъгова пъстърва спрямо референтния диапазон за този вид животни. Отчита се и намаляване на активността на трансаминазите и алкалната фосфатаза, както и понижени стойности на кръвната захар и креатинина. Повишават се уреята и пикочната киселина. Тестваните електролити не показват

значителни отклонения от нормите, въпреки че са в долните референтни граници за вида. Също така не се наблюдават промени в нивата на албумина, които остават в нормални граници.

4.3.3. Резултати от кръвта, свързани с влиянието на гъбична инфекция

Настоящите резултати, отразени в таблица 36, за основни биохимични параметри отразени като средни стойности и стандартно отклонение, изследвани при сомове (*Clarias gariepinus*), които са с гъбична инфекция, причинена от *Rhizopus* sp.

Таблица 36. Биохимични параметри на кръвта при африкански сом (*Clarias gariepinus*) с гъбична инфекция, причинена от *Rhizopus* sp.

Кръвни показатели	Заразени риби	Здрави риби
Total Protein, g/L	33.07±0.35	41.53±2.91**
Албумин (g/L)	13.83±0.23	16.89±1.61**
Глобулини (g/L)	19.16±0.35	24.79±3.06**
А/Г	0.72/1	0.68/1
Глюкоза (mmol/L)	13.09±0.23	5.19±2.25**
Триглицериди (mM/L)	2.32±0.11	2.46±2.07
Холестерол (mM/L)	3.44±0.37	5.45±2.08
AST, U/L	94.5±34.9	76±2.12
ALT (U/L)	23.67±7.77	24.1±2.54
ALP (U/L)	11±2.41	27.95±16.82*
Креатинин (μmol/L)	21.16±7.86	19.01±1.79
Урея (mM/L)	0.66±0.11	0.57±0.19
Пикочна киселина (μmol/L)	23.17±11.83	8.4±4.11*
Калций (mM/L)	6.12±1.47	4.55±0.83*
Фосфор (mM/L)	2.88±0.07	2.73±0.35

Различните индекси - *($p < 0,05$) и **($p < 0,01$) показват наличието на статистически значими разлики

От получените данни е видно, че стойностите на общия протеин, албумин и глобулини в настоящото изследване са по-ниски при инфектирани екземпляри в сравнение с тези при здрави животни. Въпреки че се отчита слабо увеличение в нивата на уреята, креатинина и фосфора, то не е статистическо значимо и нивата остават

приблизително сходни с тези при неинфектираните риби. Стойностите на пикочната киселина са повишени и индикират хиперурикемия при инфектираните риби. При изследване на калция се отчита статистическо значимо повишение ($p < 0,05$) при болните риби в сравнение със здрави такива. Наблюдава се статистически незначимо увеличаване на активността на аспартатаминотрансферазата и многократно повишаване на кръвната захар ($p < 0,01$) при болни риби в сравнение със здравите индивиди. Отчита се статистически незначимо понижаване на концентрациите на триглицеридите и холестерола.

5. ОБОБЩЕНИЕ

Липсата на тясноспециализирана литература, свързана с аквакултурата, по подобие на това, което има в хуманната и ветеринарната медицина, дава основание да се предприеме това проучване. Стремежа е да се обхванат максимален брой животни от различните видове, обект на аквакултурата в нашата страна.

Настоящият дисертационен труд представи голям набор от оригинални данни относно референтните стойности на биохимични, хематологични и хормонални параметри на кръвта при представители от следните семейства: семейство *Cyprinidae*: Обикновен шаран (*Cyprinus carpio*); семейство *Salmonidae*: Дъгова пъстърва (*Oncorhynchus mychiss*), Кафява пъстърва (Балканска пъстърва/Речна пъстърва) (*Salmo trutta fario*), Сивенът (*Salvelinus fontinalis*); семейство *Acipenseridae*: Руска есетра (*Acipenser gueldenstaedtii*), Сибирска есетра (*Acipenser baerii*), кръстоска: Руска есетра, женска и Сибирска есетра, мъжка; семейство *Esocidae*: Щука (*Esox lucius*); семейство *Clariidae*: Африкански сом (*Clarias gariepinus*). В настоящото изследване бяха включени риби, обект на промишлено-производствено отглеждане в България. От друга страна, определянето на тези стойности, предоставя възможност за по-задълбочена преценка на хранителен статус, репродуктивно състояние, темпове на растеж и развитие, откриване и диагностика на метаболитни нарушения и увреждания или болестни процеси придружени с висока смъртност.). Това би позволило правилно интерпретиране на резултатите от лабораторните тестове, идентифициране на здравословни проблеми и наблюдение на промени, дължащи се на различни фактори като стрес, възраст, пол, промени в околната среда и др., които могат да повлияят на базовите стойности. В допълнение към рутинните методи за диагностициране на заболявания и конкретния причинител, се включват допълнително изследвания върху морфологията и цвета на колонията бактерии. Получената информация за

физиологичната толерантност на даден вид риба към различни стресови фактори може да помогне за разработване на по-ефективни стратегии за запазване на техните популации.

6. ИЗВОДИ

- При изследваните инфекциозни (паразитно, бактериално и микотично заболяване) и неинфекциозни (продължително гладуване, интоксикации, анестезия) въздействия не се наблюдават статистически значими промени в концентрацията на фибриноген, което предполага ограничена диагностична стойност на този показател.

- При инфекциозни състояния с бактериален (*Lactococcus garvieae*) и паразитен (*Myxobolus cerebralis*) произход се установява статистически значимо повишение на концентрациите на С-реактивния протеин и церулоплазмина, като по-силно изразени са промените при паразитната инфекция.

- При въздействие на изследваните в настоящия труд неинфекциозни стресови фактори (продължително гладуване, интоксикации, анестезия) се установяват слабо изразени промени в концентрацията на церулоплазмина, което показва ограничена диагностична стойност.

- Изследваните острофазови протеини (церулоплазмин, фибриноген, С-реактивен белтък, албумин) не могат да бъдат използвани като самостоятелни диагностични показатели за оценка на здравния статус и физиологичното състояние на риби.

- Документираната за първи път в България инфекция с *Rhizopus* sp. и опортюнистична бактериална инфекция при африкански сом (*Clarias gariepinus*) е съпроводена с характерни биохимични промени.

- Електрическото зашеметяване може да бъде ефикасен и хуманен метод за анестезия на рибите. Приложението му, като метод за анестезия при шаран и африкански сом, не води до статистически значими промени в изследваните биохимични показатели.

- Нивата на кортизола не се променят статистически значимо при 150 и 180 дни гладуване при шаран (*Cyprinus carpio*). След 210 дни продължително гладуване се установява значимо повишение, което показва активиране на хипоталамо–хипофизо–интерреналната ос.

- Установява се положително влияние на хранителна добавка (синбиотик) върху биохимичните показатели при продължително гладуване на шаран (*Cyprinus carpio*), отглеждан в екстензивна аквакултура.

- Продължителното гладуване при шаран, както и токсичните въздействия (нитратна и фосфорорганична интоксикация) при руска есетра и шаран, предизвикват ограничени промени в биохимичните показатели на съответните видове риби.

7. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ

Оригинални приноси:

- Установяване на референтни диапазони на основни биохимични показатели: общ белтък, албумин, глобулини, албумин/глобулин съотношение, глюкоза, урея, пикочна киселина, креатинин, холестерол, триглицериди, калций, фосфор, амилаза, алкална фосфатаза, фибриноген, церулоплазмин, С-реактивен протеин, аланинаминотрансфераза, креатинфосфокиназа, аспартатаминотрансфераза, ацетилхолинестераза; при следните видове риби: шаран, дъгова пъстърва, кафява пъстърва, руска есетра, сибирска есетра, кръстоска (Руска есетра, женска и Сибирска есетра, мъжка), щука, африкански сом.

- Установяване на референтни диапазони на следните хематологични показатели: хемоглобин, хематокрит, скорост на утаяване на еритроцитите, моноцити, неутрофили, лимфоцити при африкански сом (*Clarias gariepinus*).

- Установяване на референтни диапазони на следните хормонални показатели: трийодтиронин, тироксин, Т3/Т4 съотношение, тестостерон, 17 β -естрадиол, кортизол, пролактин, при шаран, дъгова пъстърва, кафява пъстърва, руска есетра, сибирска есетра, кръстоска (Руска есетра, женска и Сибирска есетра, мъжка), щука, африкански сом.

- За първи път в България се установяват референтни данни за основни биохимични, хематологични показатели и част от диференциална кръвна картина при африкански сом (*Clarias gariepinus*), с оглед на това, че индексите получени тук, ще служат като референтна база данни за бъдещи изследвания на култивираните популации.

- Установени са референтните диапазони на фибриногена при шаран (*Cyprinus carpio*), дъгова пъстърва (*Oncorhynchus mychiss*), кафява пъстърва (*Salmo trutta fario*), руска есетра (*Acipenser gueldenstaedtii*), сибирска есетра (*Acipenser baerii*) и африкански сом (*Clarias gariepinus*), отглеждани в България.

- Установени са референтните диапазони на церулоплазмина при шаран (*Cyprinus carpio*), дъгова пъстърва (*Oncorhynchus mychiss*), кафява пъстърва (*Salmo trutta fario*), руска есетра (*Acipenser gueldenstaedtii*), сибирска есетра (*Acipenser baerii*), кръстоска: Руска есетра, женска и Сибирска есетра, мъжка, щука (*Esox lucius*) и африкански сом (*Clarias gariepinus*), отглеждани в България.

- Установени са референтните диапазони на hsCRP при шаран (*Cyprinus carpio*), дъгова пъстърва (*Oncorhynchus mychiss*) и африкански сом (*Clarias gariepinus*), отглеждани в България.

- Установява се положително влияние на хранителна добавка (синбиотик) върху биохимичните показатели при продължително гладуване на шаран (*Cyprinus carpio*), отглеждан в екстензивна аквакултура.

- Изследваните в настоящия труд инфекциозни и неинфекциозни въздействия не водят до статистически значима промяна в стойностите на фибриногена.

- Изследваните в настоящия труд неинфекциозни въздействия (продължително гладуване, интоксикации, анестезия) не водят до статистически значима промяна в стойностите на церулоплазмина.

- В настоящия труд се описва първия случай на гъбична инфекция с *Rhizopus sp.* и опортюнистична бактериална инфекция при африкански сом (*Clarias gariepinus*) в България и ефекта им върху биохимичните показатели (общ белтък, албумин, глобулини, А/Г, глюкоза, холестерол, триглицериди, креатинин, пикочна киселина, урея, калций, фосфор, ALP, ASA, ALT). Отчитат се увеличени стойности на кръвна захар, креатинин, урея и пикочната киселина, както и повишена активност на ALP и AST, както и понижение на общ белтък, албумин и глобулини.

Потвърдителни приноси:

- Диагностичната стойност на хематологичните параметри като самостоятелен индикатор за здравословния статус и физиологичното състояние на африкански сом (*Clarias gariepinus*) не е надежден, което определя необходимостта от съчетаването му с допълнителни биохимични, хормонални и имунологични изследвания.

- Установените понижения в стойностите на албумина при риби от различни семейства: *Cyprinidae*, *Salmonidae*, *Acipenseridae*, *Clariidae* и *Esocidae*, вследствие на въздействие върху тях от инфекциозен и неинфекциозен характер, дава

основание да се потвърди принадлежността му към групата на отрицателните острофазови протеини.

- При бактериална инфекция при дъгова пъстърва (*Oncorhynchus mychiss*), причинена от *Lactococcus garvieae* и при паразитна инфекция, причинена от *Mухobolus cerebralis*, се установява увеличение на стойностите на С-реактивния протеин и церулоплазмина.

- В процеса на диагностициране на заболявания с различен етиологичен произход при риби е необходимо изследване на повече от един острофазов протеин.

- След прилагане на електрическо зашеметяване, като метод за анестезия при африкански сом (*Clarias gariepinus*), не се наблюдават статистически значими разлики в изследваните показатели (общ белтък, албумин, глобулини, урея, креатинин, калций, фосфор, AST и ALT).

- При сравнение на използването на карамфилово масло и електрическо зашеметяване, като методи за анестезия при шаран (*Cyprinus carpio*), се установиха близки стойности на изследваните биохимични показатели (AST, ALT, BUN, креатинин, глюкоза). Единствено се отчете увеличената активност на AST при прилагане на карамфилово масло.

- След въздействие на фосфорорганични вещества, при шарани (*Cyprinus carpio*) се установява увеличена активност на лактат дехидрогеаза, креатинкиназа, аланин- и аспартат аминотрансфераза. Регистрира се понижение в стойностите на креатинина.

- При проучване влиянието на нитратната интоксикация при руски есетри (*Acipenser gueldenstaedtii*) се установи повишена активност на аланин- и аспартат аминотрансферазите, както и увеличени стойности на урея и фибриноген.

- При изследваната Грам положителна бактериална инфекция с причинител *Lactococcus garvieae* при дъгова пъстърва (*Oncorhynchus mychiss*) се наблюдава слабо повишение на стойностите на С-реактивен протеин, което го причислява по действие към малките ОФП при този вид инфекция.

- Данните получени при дъгова пъстърва, инфектирана с *Lactococcus garvieae*, показват ниски нива на глюкоза, холестерол и общ белтък в заразените индивиди. Отчита се и намалена активност на трансаминазите и алкалната фосфатаза. Повишават се уреята и пикочната киселина. Тестваните електролити не показват значителни отклонения от нормите, не се наблюдават промени в нивата на албумина.

8. ПРАКТИЧЕСКИ ПОЛЗИ

➤ Разширена е базата данни за физиологични норми при риби, отглеждани в условията на България. Данните получени от това проучване, могат да послужат като основа за изработване на справочник, в който да бъде събрана информация за стойностите на основните лабораторни кръвни показатели при сладководните видове риби, отглеждани в България. Това би позволило бърз достъп до референтните диапазони при гореизброените видове риби.

➤ Получените резултати, относно стойностите на кръвните показатели при изследваните в настоящото проучване видове сладководни риби (шаран, дъгова пъстърва, балканска пъстърва, сивен, руска есетра, сибирска есетра, руска есетра, женска кръстоска със сибирска мъжка есетра, щука, африкански сом) биха могли да допринесат за изясняване на някои от биохимичните механизми на метаболизма при този вид животни, след въздействие на стресори от инфекциозен и неинфекциозен характер.

➤ Резултати, измерени в настоящото изследване, формират стойности, които представляват референтния диапазон на хематологични параметри за африкански сом, отглеждан в България. Данните, получени от това проучване, са първите стойности на референтния обхват, публикувани за този вид риба, отглеждана в нашата страна. Тези референтни интервали може да се използват за мониторинг на здравословното състояние, диагностициране на заболявания и подобряване на управлението при отглеждане на африкански сом.

➤ Хематологичните индекси при рибите са важен диагностичен инструмент, който отразява тяхното здравословно състояние, оценката на хематологичните параметри може да улесни ранното откриване и диагностициране на различни патологични състояния, влияещи от своя страна върху производствените показатели. Съставянето на база данни от лабораторни показатели е от съществено значение за аквакултурата и особено при отглеждане на местни видове, тъй като географското местообитание оказва влияние върху физиологията на рибите.

➤ Изследвани бяха стойностите на фибриноген, hsCRP (високочувствителен С-реактивен протеин) и церулоплазмин, за да се определят референтните им граници и да се допълни информацията в съществуващата база данни.

➤ Бяха определени промените в концентрациите на церулоплазмин и hsCRP при дъгова пъстърва (*Oncorhynchus mychiss*) в резултат на бактериална инфекция

(причинител *Lactococcus garvieae*) и при паразитна инфекция (причинител *Mухobolus cerebralis*).

➤ Оценката на хормоналните параметрите, включени в настоящото проучване биха могли да бъдат полезни за определяне влиянието на различни стресови фактори върху нормалната хомеостаза при рибите.

9. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

СПИСЪК

на научни публикации, свързани с дисертационния труд в SCOPUS и Web of Sciences

1. Çağıltay F., A. Atanasoff, R. Roydev, **D. Zapryanova**, N. Bozakova, V. Ivanov. Comparison of effects of clove oil and electro anesthesia on serum biochemical parameters in carp (*Cyprinus carpio*). SYLWAN, 159(1): 449-460, 2015. (**Web of Science** IF=0,322)
2. Koynarski Ts., **D. Zapryanova**, A. Atanasoff, G. Nikolov, D. Hristova, F. S. Secer. Seasonal fluctuations of innate immunity among three phylogenetically diverse fish. Fresenius Environmental Bulletin, (27)12: 8529-8535, 2018. (**Web of Science** IF=0,673)
3. Ürku C., **D. Zapryanova**, R. Simeonov, D. Lalev, G. Nikolov. Histopathological Changes of Liver and Intestine of Common Carp (*Cyprinus carpio*) After Long-Term Starvation. Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 23(6): 36-44, 2020. (**Web of Science**)
4. **Д. Запрянова**. Влиянието на продължителното пълно гладуване върху стресовите показатели кортизол и глюкозата при шаран (*Cyprinus carpio*); Фуражи и хранене, бр. 4, стр. 34, 2020. (**НАЦИД**)
5. Atanasoff A., **D. Zapryanova**, C. Urku, G. Nikolov. Individual serum triiodothyronine and thyroxine levels in seven freshwater fish species. Transylvanian review of systematical and ecological research (Transylv. Rev. Syst. Ecol. Res.) 23.1 (2021), "The Wetlands Diversity", pp. 59-66. (**Web of Science**)
6. Atanasoff A., Secer F. S., **Zapryanova D.**, Urku C., Çağıltay F.. A comparison of the effect of blast chilling and electrical stunning on some hemolymph parameters in red

swamp crayfish (*Procambarus Clarkii*). Transylv. Rev. Syst. Ecol. Res. “The Wetlands Diversity”, 24.1, 75-82, 2022. (**Web of Science**)

7. Bozhkov A., G. Nikolov, C. Urku, **D. Zарryanova**, A. Atanasoff, F.S. Seçer, S. Kandir. Effect of different light intensities on prolactin and cortisol plasma concentration in farming African catfish (*Clarias gariepinus*) in RAS with low-water exchange. The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh, IJA.75.2023.1834930, CCBY-NC-ND-4.0. (**Web of Science** IF=0,5)

СПИСЪК

на научни публикации, свързани с дисертационния труд в нереферирани списания с научно рецензиране

8. Atanasoff A., D. Girginov, **D. Zарryanova**, K. Nedelkov, F. Çağiltay, F. S. Seçer. Effects of Vitasil on proximate composition and some biochemical parameters of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Annals of the University of Craiova vol. XLV/1/2015, pp. 7-13; ISSN 1841-8317, ISSN CD-ROM 2066-950X, 2015.

9. Sandeva G., **Zарryanova D.**, Atanasoff A., Nikolov G., Ivanov V. Chemical analysis of water used for fish farming in Tundzha river, Bulgaria. Annals of the University of Craiova vol. XLV/1/2015, pp. 248-255; ISSN 1841-8317, ISSN CD-ROM 2066-950X, 2015.

10. **Zарryanova D.**, F. Çağiltay, F.S. Seçer, T. Mircheva, V. Ivanov. The effects of short-term exposure to organophosphate insecticides on some biochemical parameters in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Annals of the University of Craiova vol. XLV/1/2015, pp. 289-294; ISSN 1841-8317, ISSN CD-ROM 2066-950X, 2015.

11. **Zарryanova D.**, Atanasoff A., Nikolov G., Petrova Y., Petrova B. Effects of long-term starvation and re-feeding on some plasma biochemical parameters of carp (*Cyprinus Carpio*), Book of proceeding, pp. 411-414. 2nd International Congress on Applied Ichthyology & Aquatic Environment, 10-12 November 2016, Messolonghi – Greece.

12. Sandeva G., Atanasoff A., Nikolov G., **Zарryanova D.** A preliminary study on some chemical parameters of water from probiotic treated common carp (*Cyprinus carpio* L.) enclosures, Book of proceeding, pp. 415-419. 2nd International Congress on Applied Ichthyology & Aquatic Environment, 10-12 November 2016, Messolonghi – Greece.

13. **Zарryanova D.**, Urku C., Seçer F.S., Onalan S., Akayli T. The predictive value of high sensitivity C-reactive protein and ceruloplasmine for lactococcosis in rainbow

trout (*Oncorhynchus mykiss*). 5th HydroMediT Congress 2024, Mytilene, Greece. Proceedings book pp:61-64.

14. Atanasoff A., **Zapryanova D.**, Rusenov A., Seçer S.F. Effect of long-term intake of Vitasil on ultrasound and blood biochemical parameters associated with fatty liver disease in common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Survey in Fisheries Sciences, 3(2) 22-30, 2017.

15. Koynarski T., L. Sotirov, A Atanasoff, G. Nikolov, **D. Zapryanova**, G. Georgiev. Complement pathways and its variations within three distinct trout species. Lucrări științifice medicină veterinară, Vol. L(1): 103-109, 2017.

16. Atanasov A., **D. Zapryanova**, T. Koynarski, G. Georgiev, G. Sandeva. Effect of multi-microbe probiotic product on apparent digestibility coefficient of common carp (*Cyprinus carpio*) after long-term of starvation. Proceeding of the Institute of Fishing Resources, vol. 28, 108-112, 2017.

17. Atanasoff, A., **Zapryanova, D.**, Nikolov, G., Koynarski, T., Sandeva, G. Biochemical and hormonal changes during prolonged starvation in common carp (*Cyprinus carpio*). Albanian Journal of Agricultural Sciences, pp. 138-141, 2018

18. Secer F.S., A. Atanasoff, **D. Zapryanova**, G. Nikolov, F. Cagiltay. Haematological and biochemical reference intervals for African catfish (*Clarias gariepinus*) reared in RAS. Albanian Journal of Agricultural Sciences, pp. 142-145, 2018.

19. **Zapryanova D.**, A. Atanasoff, G. Nikolov, A. Russenov, T. Mircheva. Evaluation of reference values for corticosteroid stress hormone and certain acute phase proteins in 8 fish species from *Cyprinidae*, *Salmonidae*, *Acipenseridae*, *Esocidae* and *Clariidae* family. Albanian Journal of Agricultural Sciences, pp. 158-162, 2018.

20. **Zapryanova D.**, Atanasoff A., Nikolov G., Cagiltay F. Alteration of biochemical parameters after application of electrical stunning on african catfish (*Clarias gariepinus*). 3rd International Congress on Applied Ichthyology & Aquatic Environment, HydromediT 2018, Volos-Greece, Book of Proceedings, pp. 670-672.

21. Sandeva G., Atanasoff A., **Zapryanova D.**, Nikolov G., Mineva R. Effects of rose petal meal supplementation on water quality in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). 3rd International Congress on Applied Ichthyology & Aquatic Environment, HydromediT 2018, Volos-Greece, Book of Proceedings, pp. 647-650.

22. **Zapryanova, D.**, Atanasoff, A., Nikolov, G., Koynarski T. Comparative study on some biochemical parameters in three species of *Salmonidae* family farmed in Bulgaria. *Aquatic Bioresources and Aquaculture*, issue 1, pp. 6-13, 2018, UDC 639.2/.3.

23. Atanasoff A., Ç. Ürkü, A. Roussenov, **D. Zapryanova**, G. Nikolov, F. Çağiltay. Effects of nitrate intoxication of histology and some biochemical parameters of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*). Proceeding II International Fisheries Symposium (IFSC 2018) 4-8 november 2018; Kyrenia / Turkish Republic Of Northern Cyprus (full paper pp.: 115-117).
24. **Zapryanova, D.**, Atanasoff, A., Simeonov, R., Urku, Ç., Nikolov, G., Georgieva, T. Changes in certain acute phase proteins of common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to organophosphate insecticides. *Aquatic Research*, 2(1), 16-23, 2019.
25. **Zapryanova D.**, C. Urku, R. Simeonov, A. Atanasoff, G. Nikolov, G. Sandeva. The effect of dietary addition of a synbiotic after long-term starvation on certain biochemical parameters and liver structure in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Archiva Zootechnika*, 24:2, 37-46, 2021.
26. Popstoilov P., G. Sandeva, **D. Zapryanova**, C. Urku, G. Nikolov. Chemical analysis on water quality in a cultivation of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) affected by whirling disease. pp. 134-135. 23st International Veterinary medicine student's scientific research congress, 2022, Istanbul University, Istanbul, Turkey.

СПИСЪК НА УЧАСТИЯ В КОНГРЕСИ, КОНФЕРЕНЦИИ И СИМПОЗИУМИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. The 13th International Symposium “Prospects for the 3rd millennium agriculture” 25-27.09.2014, Cluj-Napoka, Romania. Effect of clove oil and electric stunning on biochemical blood parameters in carp. A. Atanasov, **D. Zapryanova**, R. Roydev, N. Bozakova, V. Ivanov. Book of Abstracts №1/2014, p.811.
2. Scientific Conferences with International Participation „Sustainable Development in Agriculture and Horticulture”. Craiova, Romania, 12th-13th November 2015. Effects of Vitasil on proximate composition and some biochemical parameters of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Atanasoff A., D. Girginov, **D. Zapryanova**, K. Nedelkov, F. Çağiltay, F. S. Seçer., Third edition, Annals of the University of Craiova vol. XLV/1/2015, pp. 7-13; ISSN 1841-8317, ISSN CD-ROM 2066-950X,
3. Scientific Conferences with International Participation „Sustainable Development in Agriculture and Horticulture”. Craiova, Romania, 12th-13th November 2015. Chemical analysis of water used for fish farming in Tundzha river, Bulgaria. Sandeva G.,

Zapryanova D., Atanasoff A., Nikolov G., Ivanov V. Annals of the University of Craiova vol. XLV/1/2015, pp. 248-255; ISSN 1841-8317, ISSN CD-ROM 2066-950X, 2015.

4. Scientific Conferences with International Participation „Sustainable Development in Agriculture and Horticulture”. Craiova, Romania, 12th-13th November 2015. The effects of short-term exposure to organophosphate insecticides on some biochemical parameters in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Zapryanova D.**, F. Çağıltay, F.S. Seçer, T. Mircheva, V. Ivanov. Annals of the University of Craiova vol. XLV/1/2015, pp. 289-294; ISSN 1841-8317, ISSN CD-ROM 2066-950X, 2015.

5. 2nd International Congress on Applied Ichthyology & Aquatic Environment, 10-12 November 2016, Messolonghi – Greece. Effects of long-term starvation and re-feeding on some plasma biochemical parameters of carp (*Cyprinus Carpio*). **Zapryanova D.**, Atanasoff A., Nikolov G., Petrova Y., Petrova B. Book of proceeding, pp. 411-414.

6. 2nd International Congress on Applied Ichthyology & Aquatic Environment, 10-12 November 2016, Messolonghi – Greece. A preliminary study on some chemical parameters of water from probiotic treated common carp (*Cyprinus carpio* L.) enclosures, Sandeva G., Atanasoff A., Nikolov G., **Zapryanova D.** Book of proceeding, pp. 415-419.

7. 2nd International Congress on Applied Ichthyology & Aquatic Environment, 10-12 November 2016, Messolonghi – Greece. Effect of long-term intake of vitasil on ultrasound and blood biochemical parameters associated with fatty liver disease in common carp (*Cyprinus carpio*). Atanasoff A., **Zapryanova D.**, Rusenov A., Seçer S.F. Book of proceeding, pp. 420-424.

8. 5th International Conference Sustainable Postharvest and Food Technologies - INOPTeP 2017 and 29th National Conference Processing And Energy In Agriculture - PTEP 2017, April 23rd – 28th, 2017, Vršac, Serbia. Effects of clove oil on some blood biochemical parameters in carp (*Cyprinus carpio*). Atanasoff A., **Zapryanova D.**, Sandeva G., Proceeding Book pp 346-348.

9. The 8th edition PROMARE - Protection of the black sea ecosystem and the sustainable management of maritime activities 2017, September 7-9, 2017 Constanta, Romania. Changes in certain acute phase proteins of common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to organophosphate insecticides. **D. S. Zapryanova**, A. P. Atanasoff, R. S. Simeonov, G. Y. Nikolov, V. Raykov, V. A. Ivanov, T. M. Georgieva.

10. 2nd International Conference on Agriculture and Life Sciences “ICOALS”, 7-9 May 2018, Tirana – Albania. Biochemical and hormonal changes during prolonged

starvation in common carp (*Cyprinus carpio*). Atanasoff, A., **Zapryanova, D.**, Nikolov, G., Koynarski, T., Sandeva, G. Albanian Journal of Agricultural Sciences, pp. 138-141, 2018.

11. 2nd International Conference on Agriculture and Life Sciences “ICOALS”, 7-9 May 2018, Tirana – Albania. Haematological and biochemical reference intervals for African catfish (*Clarias gariepinus*) reared in RAS. Secer F.S., A. Atanasoff, **D. Zapryanova**, G. Nikolov, F. Cagiltay. Albanian Journal of Agricultural Sciences, pp. 142-145, 2018.

12. 2nd International Conference on Agriculture and Life Sciences “ICOALS”, 7-9 May 2018, Tirana – Albania. Evaluation of reference values for corticosteroid stress hormone and certain acute phase proteins in 8 fish species from *Cyprinidae*, *Salmonidae*, *Acipenseridae*, *Esocidae* and *Clariidae* family. **Zapryanova D.**, A. Atanasoff, G. Nikolov, A. Russenov, T. Mircheva. Albanian Journal of Agricultural Sciences, pp. 158-162, 2018.

13. Конференция „Устойчиво развитие на Черноморския регион “-31.03.2017г. гр. Варна. Effect of multi-microbe probiotic product on apparent digestibility coefficient of common carp (*Cyprinus carpio*) after long-term of starvation. A. Atanasov, **D. Zapryanova**, T. Koynarski, G. Georgiev, G. Sandeva. Proceeding of the Institute of Fishing Resources, vol. 28, 108-112, 2017.

14. 3rd International Congress on Applied Ichthyology & Aquatic Environment, HydromediT 2018, Volos-Greece. Alteration of biochemical parameters after application of electrical stunning on african catfish (*Clarias gariepinus*). **Zapryanova D.**, Atanasoff A., Nikolov G., Cagiltay F. Book of Proceedings, pp. 670-672.

15. 3rd International Congress on Applied Ichthyology & Aquatic Environment, HydromediT 2018, Volos-Greece. Sandeva G., Atanasoff A., **Zapryanova D.**, Nikolov G., Mineva R. Effects of rose petal meal supplementation on water quality in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Book of Proceedings, pp. 647-650.

16. II International Fisheries Symposium (IFSC 2018) 4-8 november 2018; Kyrenia / Turkish Republic Of Northern Cyprus. Effects of nitrate intoxication of histology and some biochemical parameters of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*). Atanasoff A., Ç. Ürkü, A. Roussenov, **D. Zapryanova**, G. Nikolov, F. Çağiltay. Proceeding (full paper pp.: 115-117).

17. Міжнародна науково-практична конференція «Екологічні проблеми навколишнього середовища та раціонального природокористування в контексті сталого розвитку»: збірник тез доповідей (25-26 жовтня 2018, м.Херсон, Україна). International Scientific and Practical Conference «Ecological problems of the environment and rational

nature management in the context of sustainable development» Kherson, Ukraine, 25-26 октября 2018, Херсон, Украша October 25-26, 2018. Comparative study on some biochemical parameters in three species of salmonidae family farmed in bulgaria. **Zapryanova, D.**, Atanasoff, A., Nikolov, G., Koynarski T.

18. 6th International Conference "Sustainable Postharvest and Food Technologies" – INOPTER 2019, гр. Кладово, Република Сърбия, 07-12.04.2019г. Effect of rose petal meal on some growth and biochemical parameters of fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Book of abstracts, p. 223. **D. Zapryanova**, A. Atanasoff, B. Petrova.

19. 30th Annual Meeting of DAGENE, May 29th –June 1st 2019, Topolčianky, Slovakia. Early determination of gender in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) using ultrasound and biopsy techniques. Rusenov A.; Urku C.; Atanasoff A; **Zapryanova D.**, Nikolov G.; Spasov D. Dagene Abstract Book, p. 21.

20. 21th Veterinary Medicine Student Scientific Research Congress, April 17-19, 2019. Istanbul, Turkey. Plasma acetylcholinesterase inhibition in common carp (*Cyprinus carpio*) after organophosphate insecticides pollution. p.231. K. Uzunova, **D. Zapryanova**, A. Atanasoff, V. Ivanov, G. Nikolov.

21. International scientific conference “Tradition and Modernity in Veterinary Medicine”, Sofia, Bulgaria, 24-26.04.2020; Histopathological changes of liver and intestine of common carp (*Cyprinus carpio*) after long -term starvation. C. Urku, A. Atanasoff, **D. Zapryanova**, G. Nikolov. Book of abstracts, pp.:14-15.

22. 22nd International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress, гр. Истанбул, Р Турция, 8-9 May, 2021. Assessment of effect of different fish diets on the water quality to cultivation of African catfish in recirculation aquaculture system with low water exchange. V. Penev, A. Bozhkov, G. Sandeva, **D. Zapryanova**, G. Nikolov.

23. 16th International Symposium of Animal Biology and Nutrition 50 Years of Research in Biology and Animal Nutrition at IBNA, 30.09. - 01.10. 2021, Balotești, Romania. The effect of dietary addition of a synbiotic after long-term starvation on certain biochemical parameters and liver structure in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **D. Zapryanova**, C. Urku, R. Simeonov, A. Atanasoff, G. Nikolov, G. Sandeva.; pp. 42.

24. 23st International Veterinary medicine student’s scientific research congress, 2022, Istanbul University, Istanbul, Turkey. Chemical analysis on water quality in a cultivation of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) affected by whirling disease. P. Popstoilov, G. Sandeva, **D. Zapryanova**, C. Urku, G. Nikolov. pp. 134-135.

25. 6th National Trout Symposium, 15 - 16 September 2022, Isparta, Turkey. (Registration Number: 017). Histopathological Effect of *Myxobolus cerebralis* Infection in Cultured Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). C. Urku, **D. Zapryanova**, N. Tsandev, G. Sandeva, G. Nikolov.
26. 28th Annual Counselling of Doctors of Veterinary Medicine of Republic of Srpska (Bosnia and Herzegovina) International Scientific Meeting, Trebinje, Grad Sunca, June 15th–17th, 2023. The significance of ceruloplasmin and C-reactive protein as possible markers for the diagnosis of myxobolous infection caused by *Myxobolus cerebralis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **D. Zapryanova**, C. Urku, G. Nikolov, A. Atanasoff. Abstract book, p. 54.
27. XXXI Annual Scientific and Practical Conference with International Participation, 17-19.05. 2023, Velingrad, Bulgaria. Medicated feeds as an innovative tool in the therapy against myxobolosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **D. Zapryanova**, C. Urku.
28. 30 years Trakia University Scientific Conference with International Participation Stara Zagora 16-17.05. 2025. Mycotoxin control in corn of carp farms in several Bulgarian districts. A. Bozhkov, **D. Zapryanova**, N. Kyrkelanov, D. Blajeva, G. Nikolov.
29. International symposium on fisheries and aquatic sciences 2023, October 24-26, Trabzon, Turkey. Reference intervals for basic clinical biochemical parameters and markers of inflammation in a female mature paddlefish (*Polyodon spathula*). T. Pashov, **D. Zapryanova**, A. Atanasoff, C. Urku, G. Nikolov.
30. Dagene, 20-23.06.2024., Stara Zagora, Bulgaria. The effects of stocking density on certain acute phase proteins and corticosteroid stress hormone in African catfish (*Clarias gariepinus*) reared in RAS with low-water exchange. V. Penev, A. Bozhkov, **D. Zapryanova**, C. Urku.
31. 5th HydroMediT Congress 30 May-2 June 2024, Mytilene, Greece. The predictive value of highsensitivity C-reactive protein and ceruloplasmine for lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Zapryanova D.**, Urku C., Seçer F.S., Onalan S., Akayli T. Proceedings book pp:61-64.

10. SUMMARY

The biochemistry of aquatic organisms and in particular fish, encompasses knowledge about metabolism, the influence of the environment, food, the breeding season and other factors that could have an impact on the normal physiological state of this species of animals. Changes in blood biochemical indicators in fish are the result of changes in the environment and pathogenic infectious agents, the assessment of which could lead to timely and effective measures to improve their health status. By understanding and studying the biochemical processes in this species of animals, researchers could improve aquaculture conditions, optimize production practices and health status, thus ensuring safety for end consumers. This study examines various aspects of fish biochemistry, including basic processes in their metabolism, endocrine function, nutrient requirements and biologically active compounds, as well as the changes that occur in them as a result of changes in environmental conditions, diet, reproductive stages, etc.

Aquaculture is a sub-sector of agriculture that plays an important role in the economic development of various regions of the world and in feeding humanity. One of the main production problems in aquaculture is related to difficulties in the prevention and treatment of certain diseases. Research activity in our country related to aquaculture is insufficient and provides uncomplex studies, although individual studies related to projects and dissertations are known. However, reference data that would help in describing and monitoring the well-being of fish are lacking. This gave rise to the undertaking of a large-scale study, the subject of the present dissertation work, which covers a period of more than ten years.

Commonly known species for many years of use in Bulgarian aquaculture are carp (*Cyprinus carpio*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), river (Balkan) trout (*Salmo trutta*), pike (*Esox lucius*), but in recent years species such as Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti*), Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*), paddlefish (*Polyodon spathula*), African catfish (*Clarias gariepinus*), etc. have begun to enter. All of them are the subject of this study.

The biochemical profile of the blood can be used as an objective and useful indicator of the physiological and health status of fish. The availability of data on the reference values of the biochemical, hematological and hormonal parameters of the blood is the basis for assessing the health status of fish. On the other hand, the determination of these values provides an opportunity for a thorough assessment of nutritional status, reproductive status, growth and development rates, detection and diagnosis of metabolic disorders and injuries or disease processes accompanied by high mortality. Laboratory tests are a key tool in the

diagnosis and prevention of diseases, this gives grounds to undertake research, the subject of the present scientific work, namely the determination of the reference values of some of the most commonly used biochemical, hematological and hormonal indicators in freshwater fish, as well as the possible change that occurs as a result of non-infectious and infectious agents (parasitic, fungal and bacterial infection). As ectothermic animals, fish are highly sensitive to environmental changes, which can lead to changes in their metabolism, and from there to have an effect on the levels of blood parameters. The information obtained about the physiological tolerance of a given fish species to various stress factors can help develop more effective strategies for preserving their populations. The lack of highly specialized literature related to aquaculture, similar to what is available in human and veterinary medicine, gives reason to undertake this study. The aim is to cover the maximum number of animals of the various species, the subject of aquaculture in our country.