

ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В.Н.КАРАЗІНА
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

КЛИНОВА ОЛЕКСАНДРА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК: 582.28:591.2:(597.8+598)

ДИСЕРТАЦІЯ
ПОШИРЕННЯ, ЕКОЛОГІЯ ТА ВІРУЛЕНТНІСТЬ
ДЕРМАТОМІЦЕТІВ АМФІБІЙ ТА РЕПТИЛІЙ

Спеціальність 091 Біологія

09 Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ О. В. Клинова

Науковий керівник Зіненко Олександр Іванович, кандидат біологічних наук

Харків – 2025

АНОТАЦІЯ

Клинова О. В. Поширення, екологія та вірулентність дерматомицетів амфібій та рептилій. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 — «Біологія». Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Харків, 2025.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню розповсюдженості грибів-патогенів рептилій та амфібій *Ophidiomyces ophidiicola*, *Paranannizziopsis* spp. та *Batrachochytrium dendrobatidis* в Україні та Європі, їх поширеності серед різних видів, а також вивченню патоген-специфічних факторів, що впливають на інфікування змій грибом *O. ophidiicola*. Зокрема, четвертий розділ роботи присвячений вивченню швидкості росту, порівняльній характеристиці проростання спор та вірулентності штамів *O. ophidiicola* різних генотипів, виділених зі змій природніх популяцій у Європі та США. Крім того, у роботі узагальнені рекомендації щодо протидії поширенню патогену *O. ophidiicola* серед змій в природі, а також щодо утримання змій в неволі з метою подальшої реінтродукції в природні популяції.

Дослідження поширеності грибів-патогенів рептилій проводилося на матеріалі, зібраному в рамках дослідження розповсюдження *O. ophidiicola* у Європі колективом з 17 дослідників (Blanvillain et al., 2024). Зібрані зразки були надані Джозефом Хойтом, головою Лабораторії екології хвороб та збереження біорізноманіття Політехнічного інституту штату Вірджинія (США), в якій дисертантка проводила основну частину дисертаційного дослідження. Чисті культури вісімнадцяти штамів *O. ophidiicola*, що використовувалися у дослідженні проростання, росту та вірулентності цього патогену, зберігалися у загальнодоступній колекції культур Національного

центру здоров'я дикої природи Геологічної служби США і були надані для дослідження співробітником центру Джеффом Лорчем. Дослідження поширеності збудника хітридіомікозу *B. dendrobatidis* проводилося на матеріалі, зібраному в рамках дослідження розповсюдження цього патогену в Україні, виконаного колективом з 16 авторів (Jakóbič et al., 2024).

Для дослідження розповсюдження *O. ophidiicola* в Україні був проведений аналіз 156 зразків з 82 змій природніх популяцій, що відносилися до восьми видів, а також восьми зразків з колекції Музею природи ХНУ імені В. Н. Каразіна. Оцінку наявності ДНК патогену у зразках проводили методом кПЛР з використанням специфічних праймерів до ділянки ITS геному цього гриба. Визначення генотипів *O. ophidiicola* було проведено Джеффом Лорчем за допомогою секвенування послідовностей ділянок ITS, ITS2 та *tef* геному патогену.

Аналіз швидкості росту *O. ophidiicola* проводили на восьми штаммах гриба, що відносилися до клональних ліній та рекомбінантних генотипів у межах двох основних філогенетичних клад. Для цього спорову суспензію *O. ophidiicola* сіяли на поживне середовище, після чого вимірювали діаметр колоній, що з'явилися, кожні 24 години протягом 16 діб. Оцінку проростання спор *O. ophidiicola* здійснювали шляхом інкубації спорової суспензії п'ятнадцяти ізолятів гриба у рідкому поживному середовищі при різних температурах протягом 3 годин з подальшим пророщуванням за оптимальної для росту цього гриба температури. Частку пророслих спор оцінювали за допомогою світлової мікроскопії. Вірулентність *O. ophidiicola* оцінювали шляхом інокуляції 105 маїсових полозів сімома штамми патогену. Тварин утримували у лабораторних умовах протягом семи тижнів, щотижнево брали стандартні мазки шкіри, оцінювали тяжкість уражень та фіксували частоту линяння особин в кожній групі.

Для дослідження розповсюдження патогенних грибів роду *Paranannizziopsis* в Європі був проведений аналіз 516 зразків з 405 змій природніх популяцій, що відносилися до 19 видів з 11 країн. Оцінку наявності ДНК патогену у зразках проводили методом кПЛР з використанням специфічних праймерів до ділянки ITS геному цього гриба.

В рамках дослідження поширеності *B. dendrobatidis* на території України було зібрано 446 зразків 11 видів земноводних із 36 локацій по всій території України. Визначення видової приналежності представників роду *Pelophylax* здійснювали шляхом ампліфікації інтрона 1 ядерного сироваткового альбуміну (SAI-1), описаної Hauswaldt et al. (2012). Визначення наявності ДНК *B. dendrobatidis* у зразках проводили методом кПЛР із застосуванням специфічних праймерів. Статистичний аналіз проводили у програмному середовищі R версії 4.4.2, в тому числі за допомогою пакетів glmmTMB, brms, ineq.

Аналіз розповсюдження *O. ophidiicola* в Україні показав присутність патогену двох генотипів в околицях м. Харків, а також у Львівській області. Загальна поширеність уражень шкіри серед всіх обстежених особин складала 30,5%, але лише 40% особин з ураженнями були носіями офідіомікозу. Загалом, носіями *O. ophidiicola* виявилися 13,4% досліджених особин. Патоген було виявлено серед трьох видів змій: *Natrix natrix*, *Vipera berus nikolskii* та *Zamenis longissimus*, але лише *N. natrix* та *Z. longissimus* демонстрували симптоми офідіомікозу. Крім того, було підтверджено присутність *O. ophidiicola* та його здатність викликати явний дерматомікоз вужів звичайних на території Харківської області щонайменше з 2003 року.

В ході аналізу музейних зразків було вперше встановлено присутність *O. ophidiicola* на території Грузії, що також є першою знахідкою цього патогену у Кавказькому регіоні.

Патогенні гриби *Paranannizziopsis* spp. не були зареєстровані на території України. Натомість, було виявлено два нові види-хазяїни для цього патогену у Європі: *Vipera latastei* та *Coronella austriaca*. Крім того, нами були зареєстровані перші знахідки цього патогену в Португалії.

Було узагальнено рекомендації щодо протидії поширенню *O. ophidiicola* у природних популяціях змій. Встановлено, що при утриманні змій в неволі з метою подальшого випуску ключовими факторами контролю захворювання на офідіомікоз є регулярний моніторинг стану здоров'я рептилій, ізоляція симптоматичних особин, розміщення теплових ламп у тераріумах для збільшення швидкості линяння, регулярне очищення тераріумів. Утримання *Natrix tessellata* в неволі рекомендується уникати.

В ході аналізу швидкості росту *O. ophidiicola* встановлено, що ізоляти з Європи мають значно менші темпи росту, ніж ізоляти із США. Крім того, ізоляти, що відносяться до філогенетичної клади I («Європейської») мають значно меншу швидкість росту, ніж ізоляти клади II. Загалом всі досліджені ізоляти були розділені на три групи: повільнозростаючі (I-W та II-D), швидкозростаючі (II-A та II-F) та ізоляти із середньою швидкістю росту (II-E, II-D/E, II-VA).

Встановлено, що проростання спор різних ізолятів *O. ophidiicola* в оптимальних умовах варіює в діапазоні від 4,6% до 93,4%, при цьому швидкозростаючі ізоляти (II-A та II-F) характеризуються найменшим відсотком пророслих спор. Виявлено позитивний вплив теплового шоку на проростання спор 11 з 15 ізолятів. Закономірностей залежності рясності проростання від генотипу чи географічного розподілу нами виявлено не було. Кореляції між швидкістю проростання та температурою по градієнту широти також не спостерігалось.

За результатами експериментального інфікування маїсових полозів конідіями *O. ophidiicola*, були виявлені значні відмінності у тяжкості уражень, викликаних різними штамми патогену, при чому штам рекомбінантного генотипу II-VA характеризувався найбільшою вірулентністю. Встановлено, що штамми філогенетичної клади II викликали значно тяжчі симптоми офідіомікозу та частіші линяння, ніж штам клади I. Частота появи уражень та їх тяжкість були значно вищими за попередньої скарифікації шкіри. Всі заражені змії линяли значно частіше, ніж змії у контрольній групі. Загалом, важчі ураження провокують більш часті ліньки у хворих змій.

Аналіз поширеності *B. dendrobatidis* показав присутність патогену на півночі та заході України. Поширеність гриба серед видів амфібій обмежувалася видами *Bombina bombina*, *B. variegata* та *Pelophylax* sp. Був виявлений статистично значущий зв'язок між придатністю середовища існування, передбаченою моделлю для *B. dendrobatidis* (Tytar et al. 2023) та наявністю патогену, оціненою за допомогою польових зразків.

Був задокументований випадок ураження шкіри гадюки Нікольського (*Vipera berus nikolskii*) з природи ентомопатогенним грибом *Beauveria bassiana* sensu lato.

Наукова новизна роботи полягає в доповненні наявних знань щодо поширення патогенних грибів амфібій та рептилій в Україні та Європі, а також з'ясуванні ролі патоген-специфічних факторів у динаміці захворювання на офідіомікоз. Зокрема, у роботі доповнено вкрай обмежені знання щодо поширення патогенних грибів *Paranannizziopsis* spp. територією континентальної Європи, виявлено перші знахідки цього патогену у Португалії та для двох нових видів змій. Вперше виявлено наявність патогенного гриба *O. ophidiicola* на території Грузії. Узагальнено рекомендації щодо протидії поширенню грибів-патогенів рептилій у природних популяціях

та зменшення негативного впливу захворювання при утримуванні змій в неволі. Виявлено різницю у інтенсивності проростання, швидкості росту та ступені тяжкості інфекції серед ізолятів, генотипів, філогенетичних клад та місць походження *O. ophidiicola*. Вперше для території України досліджено наявність, географічну розповсюдженість та поширеність серед різних видів амфібій патогенного гриба *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Практичне значення роботи полягає в тому, що вона доповнює знання про фактори ризику, яким піддаються такі вразливі і в той самий час важливі для підтримання стабільності екосистем групи тварин, як рептилії та амфібії. Близько 19% видів рептилій перебувають під загрозою зникнення, а для оцінки статусу ще 21% недостатньо даних, тому розуміння факторів зменшення чисельності популяцій рептилій є напроцуд актуальним для розробки оптимальних стратегій збереження. Вивчення генотип-специфічних особливостей, що можуть впливати на вірулентність патогену, важливе для прогнозування швидкості розповсюдження та динаміки захворювання у наївних популяціях, в які потрапляє відповідний штам. Узагальнені на основі проведених досліджень рекомендації щодо протидії поширенню грибів-патогенів рептилій та проведення транслокацій тварин можуть використовуватися для коригування природоохоронних стратегій окремими дослідниками, громадськими організаціями, державними та приватними природоохоронними установами. Результати дослідження можуть бути включені до освітніх програм підготовки спеціалістів з біології, мікології, герпетології, екології, ветеринарії.

Ключові слова: паразитичні гриби, *Ascomycota*, амфібії, *Anura*, рептилії, змії, поширення, Україна, ДНК баркодинг, генетичний аналіз, збереження популяцій, вірулентність, *Ophidiomyces ophidiicola*, *Paranannizziopsis*, *Batrachochytrium dendrobatidis*.

ANNOTATION

Klynova O. V. Dermatomycetes of amphibians and reptiles: ecology, distribution and virulence. – Qualifying scientific work as a manuscript.

Dissertation for obtaining the scientific degree of Doctor of Philosophy in specialty 091 — «Biology». V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, 2025.

The dissertation is devoted to the study of the distribution and prevalence of the reptilian and amphibian fungal pathogens *Ophidiomyces ophidiicola*, *Paranannizziopsis* spp. and *Batrachochytrium dendrobatidis* in Ukraine and Europe, as well as the pathogen-specific factors affecting the dynamic of snake fungal disease. In particular, the fourth chapter of the dissertation is devoted to the study of the growth rate, spore germination, and virulence of *O. ophidiicola* strains of different genotypes isolated from free-ranging snakes in Europe and the USA. In addition, the work summarizes recommendations for controlling the spread of *O. ophidiicola* among free-ranging snakes and among captive snakes that will be reintroduced into natural habitats.

The study of reptiles' fungal pathogens prevalence was conducted using material collected by a team of 17 researchers during a study of *O. ophidiicola* distribution in Europe (Blanvillain et al., 2024). These samples were provided by Dr. Joseph Hoyt, head of the Laboratory of Disease Ecology and Conservation at the Virginia Polytechnic Institute (USA), where the PhD candidate conducted the main part of her dissertation research. Pure cultures of 18 strains of *O. ophidiicola* used in the study of germination, growth rate, and virulence were obtained from the public culture collection of the United States Geological Survey – National Center for Wildlife Health and were provided for the study by Dr. Jeffery Lorch. The study of the prevalence of *B. dendrobatidis* was conducted using material collected as part of

a study of this pathogen distribution in Ukraine, which was carried out by a team of 16 authors (Jakóbić et al., 2024).

To study distribution of *O. ophidiicola* in Ukraine, we analysed 156 samples from 82 free-ranging snakes belonging to eight species, as well as eight samples from the collection of the Museum of Nature of the V. N. Karazin KhNU. The presence of pathogen DNA in the samples was assessed by qPCR using specific primers to the ITS region of the fungal genome. *O. ophidiicola* genotyping was performed by Dr. Jeffery Lorch using sequencing of the ITS, ITS2 and *tef* regions of the pathogen genome.

The analysis of the growth rate of *O. ophidiicola* was performed with eight strains of the fungus belonging to clonal lineages and recombinant genotypes within the two main phylogenetic clades. For this purpose, the spore suspension of *O. ophidiicola* was plated on a nutrient medium. We subsequently measured the diameter of the appeared colonies every 24 hours for 16 days. *O. ophidiicola* spore germination was assessed by incubating spore suspensions of fifteen fungal isolates in liquid nutrient medium at different temperatures for 3 hours, followed by germination at the optimum temperature for the growth of this fungus (25°C). The proportion of germinated spores was assessed using light microscopy. The virulence of *O. ophidiicola* was assessed by inoculating 105 corn snakes with seven strains of the pathogen. The animals were kept for seven weeks, during which standard skin swabs were taken and lesion severity was assessed weekly. Additionally, we recorded the moulting frequency of individuals in each treatment group.

To study the distribution of the pathogenic fungi *Paranannizziopsis* spp. in Europe, we analysed 516 samples from 405 free-ranging snakes belonging to 19 species from 11 countries. The presence of pathogen DNA in the samples was assessed by qPCR using specific primers to the ITS region of the genome of this fungus.

As part of the study of *B. dendrobatidis* distribution in Ukraine, 446 samples of 11 amphibian species were collected from 36 locations throughout Ukraine. Identification of waterfrogs *Pelophylax* was performed using amplification of intron 1 of nuclear serum albumin (SAI-1) as described by Hauswaldt et al. (2012). The presence of *B. dendrobatidis* DNA in the samples was determined by qPCR using specific primers. Statistical analysis was performed in the R software environment version 4.4.2, using the glmmTMB, brms, and ineq packages.

Analysis of *O. ophidiicola* distribution in Ukraine showed the presence of two pathogenic genotypes in the vicinity of Kharkiv city, as well as in Lviv region. The overall prevalence of skin lesions among all examined individuals was 30,5%, but only 40% of individuals with lesions tested positive for *O. ophidiicola* by qPCR. Overall, 13,4% of the examined individuals carried *O. ophidiicola*. The pathogen was detected among three species of snakes: *Natrix natrix*, *Vipera berus nikolskii* and *Zamenis longissimus*, but only *N. natrix* and *Z. longissimus* showed symptoms of snake fungal disease. In addition, the presence of *O. ophidiicola* and its ability to cause apparent dermatomycosis of grass snakes in the Kharkiv region was confirmed as early as 2003.

During the analysis of museum specimens, first finding of *O. ophidiicola* in Georgia was confirmed, which is also the first discovery of this pathogen in the Caucasus region.

Pathogenic fungi *Paranannizziopsis* spp. were not registered in Ukraine. Instead, two new host species for this pathogen were discovered in Europe: *Vipera latastei* and *Coronella austriaca*. In addition, we registered the first findings of this pathogen in Portugal.

Recommendations for controlling the spread of *O. ophidiicola* in free-ranging snake populations were summarized. We found that the key factors for controlling snake fungal disease in captive snakes include thorough monitoring of reptiles'

health, isolation of symptomatic individuals, placement of heat lamps in terrariums to increase the rate of moulting, and regular cleaning of terrariums. It is recommended to avoid keeping *Natrix tessellata* in captivity.

It was found that *O. ophidiicola* isolates from Europe have significantly lower growth rates than isolates from the USA. In addition, we tested one isolate belonging to the phylogenetic clade I ("European"), and we found that it exhibited a significantly lower growth rate than isolates of clade II. In general, all the studied isolates were divided into three groups: slow-growing (I-W and II-D), fast-growing (II-A and II-F) and isolates with an intermediate growth rate (II-E, II-D/E, II-VA).

It was found that the spore germination of different *O. ophidiicola* isolates under optimal conditions varies from 4.6% to 93.4%, while fast-growing isolates (II-A and II-F) are characterized by the lowest percentage of germinated spores. We found that heat shock had a positive effect on spore germination in 11 out of 15 isolates. We did not find any link between germination and genotype or geographical distribution. No correlation was observed between germination rate and temperature along the latitudinal gradient.

According to the results of experimental *O. ophidiicola* infection of corn snakes, we found significant differences in the severity of lesions caused by different strains of the pathogen, with the recombinant strain II-VA having the greatest virulence. It was found that strains of the phylogenetic clade II caused significantly more severe symptoms of ophidiomycosis and more frequent moulting than strain of clade I. The frequency of lesions and their severity were significantly higher after prior skin scarification. All infected snakes moulted significantly more often than snakes in the control group. Overall, more severe lesions provoked more frequent moulting in infected snakes.

Analysis of *B. dendrobatidis* distribution showed the presence of the pathogen in the north and west parts of Ukraine. The prevalence of the fungus among

amphibian species was analysed for the species *Bombina bombina*, *B. variegata* and *Pelophylax* sp. A statistically significant relationship was found between the habitat suitability predicted for *B. dendrobatidis* (Tytar et al. 2023) and the presence of the pathogen estimated using field samples.

A case of a skin lesion on a free-ranging Nikolsky's viper (*Vipera berus nikolskii*) caused by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* sensu lato was documented.

The scientific novelty of the work lies in supplementing the existing knowledge on the pathogenic fungi of amphibians and reptiles distribution in Ukraine and Europe, as well as clarifying the role of pathogen-specific factors in the dynamics of snake fungal disease. In particular, the work supplemented the extremely limited knowledge on the distribution of pathogenic fungi *Paranannizziopsis* spp. in continental Europe. We recorded the first findings of this pathogen in Portugal and for two new snake species. The presence of the pathogenic fungus *O. ophidiicola* was detected for the first time in Georgia. We summarised recommendations for controlling the spread of fungal pathogens in natural population of snakes and reducing the negative impact of the disease during captivity. Differences in germination, growth rate and severity of infection among isolates, genotypes, phylogenetic clades and places of origin of *O. ophidiicola* were revealed. For the first time, the presence, geographical distribution, and prevalence of the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* were studied for the territory of Ukraine.

The practical significance of the work is that it supplements knowledge about risk factors threatening vulnerable populations of reptiles and amphibians that are critical for maintaining ecosystem stability. About 19% of reptile species are threatened with extinction, and there is no data to assess the status of another 21%. Therefore, understanding the factors behind the decline in reptile populations is extremely relevant for the development of optimal conservation strategies. The study

of genotype-specific features that may affect the virulence of fungal pathogens is important for predicting the rate of spread and dynamics of such diseases in naïve populations. Recommendations for how to control the spread of fungal pathogens among free-ranging and captive snakes, which are summarised in this study, can be used to adjust conservation strategies by individual researchers, public organizations, and state and private environmental protection institutions. The results of the study can be included in educational programs for training specialists in biology, mycology, herpetology, ecology, and veterinary medicine.

Keywords: parasitic fungi, *Ascomycota*, amphibians, *Anura*, reptiles, snakes, distribution, Ukraine, DNA barcoding, genetic analysis, population conservation, virulence, *Ophidiomyces ophidiicola*, *Paranannizziopsis*, *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Список публікацій здобувачки, в яких викладено основні наукові
результати дисертації

У виданнях, які включені до міжнародних наукометричних баз даних:

1. **Klynova O.**, Zinenko O. Isolation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* from a skin lesion in a wild Nikolsky's viper (*Vipera berus nikolskii*). *Journal of Comparative Pathology*. 2024. Vol. 210, P. 5–7. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2024.02.004>
2. Jakóbi J., Drohvalenko M., Fernandez Melendez E., Kępa E., **Klynova O.**, Fedorova A., Korshunov O., Marushchak O., Nekrasova O., Suriadna N., Smirnov N., Tkachenko O., Tupikov A., Dufresnes C., Zinenko O., Pabijan M. Countrywide screening supports model-based predictions of the distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Ukraine. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2024. 159, P. 15–27. <https://doi.org/10.3354/dao03802>

Публікації, які засвідчують апробацію результатів дисертації

1. Зіненко О.І., **Клинова О.В.**, Солодянкін О. Роль рептилій та амфібій у циркуляції патогенів збудників грибкових, бактеріальних і вірусних захворювань. *Матеріали XI Міжнародної герпетологічної конференції* (м. Чернігів, 14–17 вересня 2021 р.)
2. **Klynova O.**, Blanvillain G., Zinenko O., Hoyt J. The first report of snake fungal disease (SFD) in Ukraine. 22 *Європейський герпетологічний конгрес* (університет Вулвергемптона, Великобританія, 4–8 вересня 2023 р.)
3. **Клинова О.В.**, Бланвілон Г., Зіненко О.І., Хойт Дж. Р. Перші відомості про поширення патогену змій *Ophidiomyces ophidiicola* Sigler, Hambleton & Paré (2013) в Україні. *Матеріали Конференції молодих дослідників-*

зоологів (Інститут зоології імені І.І. Шмальгаузена НАН України, Київ, 25–26 жовтня 2023 р.).

4. **Klynova O.**, Lorch J. M., Hoyt J. R. Effect of temperature shock on pathogen germination: implications for infectious dose. *Ecology and Evolution of Infectious Diseases Conference* (Стенфордський університет, США, 24–27 червня 2024 р.)

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
ANNOTATION	8
Список публікацій здобувачки, в яких викладено основні наукові результати дисертації	14
ЗМІСТ	16
Перелік умовних позначень	19
ВСТУП	20
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	28
1.1. Перші знахідки та таксономічне положення <i>Ophidiomyces ophidiicola</i> , збудника офідіомікозу змії	28
1.2. Поширеність у світі, походження та вплив <i>O. ophidiicola</i> на популяції змії	29
1.3. Патогенез та симптоми офідіомікозу	33
1.4. Діагностика та лікування офідіомікозу	35
1.5. Роль сезонності, статі, розміру тіла та травматизації у поширеності офідіомікозу	40
1.6. Патоген-специфічні фактори, що впливають на патогенність та вірулентність <i>O. ophidiicola</i>	42
1.7. Протидія поширенню <i>O. ophidiicola</i> та рекомендації щодо консерваційних заходів	45
1.8. Таксономія, поширення та випадки інфікування рептилій грибами роду <i>Paranannizziopsis</i>	52
1.9. Вплив гриба <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> на популяції амфібій у світі та фактори його поширеності в Україні	55
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	58

2.1 Збір матеріалу	58
2.2 Оцінка успішності утримання змій в неволі як консерваційного заходу.....	60
2.2.1 Транслокація популяції <i>Natrix tessellata</i> у Відні, Австрія.....	60
2.2.2 Транслокація популяції <i>Natrix maura</i> у Безансоні, Франція	61
2.3 Молекулярний аналіз.....	62
2.3.1 Виділення ДНК.....	62
2.3.2 кПЛР, ПЛР, електрофорез	63
2.2.3. Секвенування послідовностей ДНК	65
2.4 Визначення швидкості росту колоній гриба	66
2.5 Оцінка проростання конідій за впливу різних температур.....	68
2.6 Методи експериментального інфікування змій патогенним грибом <i>Ophidiomyces ophidiicola</i>	69
2.6.1 Утримання змій в лабораторії	70
2.6.2 Інокуляція змій патогенним грибом.....	70
2.6.3 Методи забору зразків	71
2.6.4 Евтаназія	72
2.7 Статистичний аналіз	73
РОЗДІЛ 3. ПОШИРЕНІСТЬ ПАТОГЕННИХ ГРИБІВ <i>OPHIDIOMYCES OPHIDIICOLA</i> ТА <i>PARANANNIZZIOPSIS</i> SPP. В УКРАЇНІ ТА ЄВРОПІ	77
3.1 Поширеність <i>Ophidiomyces ophidiicola</i> в Україні	77
3.2 Оцінка успішності транслокації рептилій як консерваційного заходу	87
3.3 Поширеність патогенних грибів <i>Paranannizziopsis</i> spp. в Європі	95
РОЗДІЛ 4. ОСОБЛИВОСТІ РОСТУ ТА ВІРУЛЕНТНІСТЬ <i>O.OPHIDIICOLA</i>	101

4.1 Аналіз швидкості росту <i>O.ophidiicola</i> в культурі	101
4.2 Рясність проростання спор <i>O.ophidiicola</i> за попереднього впливу холодового та теплового шоку	106
4.3 Порівняльна оцінка вірулентності та динаміки захворювання у маїсових полозів, інфікованих різними штамами <i>O.ophidiicola</i>	111
РОЗДІЛ 5. ІНШІ ГРИБИ-ПАТОГЕНИ АМФІБІЙ ТА РЕПТИЛІЙ, ЩО ТРАПЛЯЮТЬСЯ В УКРАЇНІ	118
5.1 Поширеність патогенного гриба амфібій <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> в Україні	118
5.2 Виділення ентомопатогенного гриба <i>Beauveria bassiana</i> з ураження шкіри гадюки Нікольського (<i>Vipera berus nikolskii</i>) з природи	122
ВИСНОВКИ.....	127
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	129
ДОДАТКИ.....	161

Перелік умовних позначень

ПЛР — полімеразно-ланцюгова реакція

кПЛР — кількісна полімеразно-ланцюгова реакція

ITS — внутрішній транскрибувальний спейсер (internal transcribed spacer)

PBS — фосфатно-сольовий буфер (phosphate buffered saline)

PBST — фосфатно-сольовий буфер з додаванням полісорбату (твін) 20

DTM — тест-середовище для дерматофітів (dermatophyte test medium)

ВПС — відсоток пророслих спор

μ — коефіцієнт рівняння Гомперца, що характеризує швидкість росту колонії у логарифмічній фазі

λ — коефіцієнт рівняння Гомперца, що характеризує довжину лаг-фази росту колонії

фг/мкл — фемтограми на мікролітр, 10^{-15} грам на мікролітр

ВСТУП

Актуальність теми. З 60-х років XX століття світова глобалізація нарощує темпи. Цей процес має свої наслідки не лише у всіх сферах життя людини, але й впливає на екологічні процеси у всьому світі. Глобальна торгівля тваринами приборала бар'єри, сприяючи розповсюдженню захворювань, що загрожують біорізноманіттю. Найяскравішим прикладом є хітрідіомікоз, що характеризується як панзоотія, пов'язана з найбільшими зафіксованими втратами біорізноманіття, спричиненими хворобою (Sachs et al. 2020). Наразі доведена роль хітрідіомікозу у скороченні популяцій щонайменше 501 виду амфібій за останні півстоліття, включаючи 90 передбачуваних зникнень (Scheele et al. 2019). Негативні наслідки хітрідіомікозу досягли максимуму в 1980-х роках, і лише 12% видів, що зазнали шкоди, демонструють ознаки відновлення, тоді як популяції 39% видів постійно скорочуються (Scheele et al. 2019). Іншими прикладами панзоотій, асоційованих з антропогенним поширенням збудників хвороб, є синдром білого носа (збудник *Pseudogymnoascus destructans*) у кажанів (Blehert et al., 2009) або вірус Західного Нілу (*Flavivirus* sp.) у птахів (Campbell et al. 2002).

Останніми десятиліттями почали з'являтися дані, що викликають занепокоєння можливістю виникнення нової панзоотії, цього разу серед рептилій (Allender et al., 2013; Franklinos et al. 2017, Peterson et al. 2020).

Пойкілотермні таксони особливо вразливі до грибних збудників (Robert et al., 2009), і в останні десятиліття герпетофауна зазнала серйозного впливу нових захворювань (Lorch et al., 2016). Починаючи з кінця 1990-х років, у всьому світі почастишали повідомлення про важкий мікоз у плазунів, спричинений збудниками, що належать до родів *Nannizziopsis*, *Paranannizziopsis* та *Ophidiomyces* (порядок *Onygenales*) (Peterson et al., 2020).

Nannizziopsis spp. є патогенними для ящірок, в той час як *Ophidiomyces* spp. викликають захворювання змій.

Хоча мікози добре відомі у рептилій, що перебувають у неволі у всьому світі, але вони також з'являються у природних популяціях змій, та вже набули статусу епізоотії у Сполучених Штатах (Allender et al., 2013). Захворювання змій, спричинене грибом *Ophidiomyces ophiodiicola* у Північній Америці, вперше привернуло широку увагу в 2008 році (Allender et al., 2011). Хвороба спричиняє не лише легкі інфекції, але й серйозну захворюваність та смертність із подальшим зменшенням популяції у змій, у тому числі у деяких видів, що перебувають під загрозою зникнення (Franklinos et al., 2017). З 2010 року почали з'являтися відомості про знахідки *O. ophiodiicola* в Європі (Schmidt, 2015, Franklinos et al., 2017), а з 2020 – у Азії (Китай, Японія, Тайвань) (Groini et al., 2021, Takami et al., 2021, Sun et al., 2022).

Невтішна перспектива виникнення нової епізоотії рептилій у Європі за сценарієм *B. dendrobatidis*, а також перші повідомлення про виявлення рептилій, заражених патогенним грибом *O. ophiodiicola* у Великобританії та Чехії (Franklinos et al., 2017), обумовлюють необхідність досліджень стану популяцій рептилій в Україні та Європі, вивчення патогенних грибів рептилій, а також розробку рекомендацій щодо природоохоронних заходів, оснований на отриманих даних.

Саме тому для майбутнього дослідження було обрано тему «Поширення, екологія та вірулентність дерматомицетів амфібій та рептилій».

Об'єкт досліджень. Об'єктом дослідження є гриби-дерматомицети рептилій та амфібій, а саме *Ophidiomyces ophiodiicola*, *Paranannizziopsis* spp., *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Предмет досліджень. Предметом досліджень є поширення та екологія патогенів рептилій та амфібій *O. ophiodiicola*, *Paranannizziopsis* spp. та

B. dendrobatidis, культуральні та фізіологічні особливості, а також вірулентність різних штамів гриба *O. ophiodiicola*.

Мета і завдання роботи. Метою роботи є доповнення знань щодо поширення патогенних грибів амфібій та рептилій в Україні та Європі, узагальнення рекомендацій щодо протидії поширенню патогенів рептилій у природніх популяціях, вивчення особливостей різних штамів гриба *O. ophiodiicola*, що впливають на розвиток захворювання змій.

В межах обраної мети були поставлені наступні завдання:

1. Встановити географічне розповсюдження патогенного гриба *O. ophiodiicola* в Україні, а також його відносну поширеність серед різних видів змій, в тому числі за допомоги ревізії колекції Музею природи ХНУ імені В.Н. Каразіна.

2. Визначити та порівняти показники швидкості росту восьми штамів гриба *O. ophiodiicola*.

3. Вивчити відмінності у проростанні конідій п'ятнадцяти штамів гриба *O. ophiodiicola* за впливу різних температур (холодовий шок, оптимальні температури, тепловий шок).

4. Визначити відмінності у здатності семи штамів гриба *O. ophiodiicola* викликати захворювання в маїсових полозів (*Pantherophis guttatus*), порівняти особливості перебігу захворювання.

5. Визначити географічне розповсюдження та відносну поширеність серед різних видів змій патогенного гриба *Paranannizziopsis* spp. в Європі, отримати додаткові дані щодо інших збудників мікозів змій в природі.

6. Узагальнити рекомендації щодо протидії поширенню патогенів рептилій у природніх популяціях та зменшення негативного впливу захворювання при утримуванні змій в неволі.

7. Визначити наявність, географічний розподіл та поширеність серед видів амфібій патогенного гриба *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Методи дослідження

1. Збирання мазків та зразків тканин шкіри різних видів змій та амфібій з природних місцеперебувань.
2. Відбір зразків ураженої шкіри від музейних препаратів змій, що зберігаються в етанолі.
3. Виділення ДНК з мазків та зразків тканин шкіри.
4. Ампліфікація виділеної ДНК методами ПЛР та кПЛР.
5. Електрофорез продуктів ПЛР в агарозному гелі.
6. Культивування ізолятів грибів на твердому поживному середовищі.
7. Вимірювання діаметру колоній *O. ophiodiicola*.
8. Вимірювання оптичної густини суспензії конідій *O. ophiodiicola* у рідкому поживному середовищі.
9. Світлова мікроскопія суспензії конідій *O. ophiodiicola*.
10. Інокуляція змій суспензією конідій *O. ophiodiicola*.
11. Статистичні методи (побудова узагальнених лінійних моделей, змішаних моделей та байесівських моделей в середовищі R, розрахунок коефіцієнта Джині, розрахунок критерію Уїлкоксона).

Наукова новизна отриманих результатів. У роботі доповнено вкрай обмежені знання щодо поширення патогенних грибів *Paranannizziopsis* spp. територією континентальної Європи, підтверджено наявність патогену для двох нових видів змій. Вперше виявлено наявність патогенного гриба *O. ophiodiicola* на території Грузії та у Кавказькому регіоні загалом. Узагальнено рекомендації щодо протидії поширенню грибів-патогенів рептилій у природних популяціях та зменшення негативного впливу захворювання при утримуванні змій в неволі. Виявлено різницю у морфологічних ознаках,

інтенсивності проростання, швидкості росту та ступені тяжкості інфекції не лише серед різних генотипів гриба *O. ophiodiicola*, а й серед різних ізолятів одного генотипу, що доповнює знання про внесок мінливості патогену у систему патоген-хазяїн-середовище. Вперше для території України досліджено наявність, географічну розповсюдженість та поширеність серед різних видів амфібій патогенного гриба *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Особистий внесок здобувачки.

Дисертаційна робота є самостійним дослідженням здобувачки. Здобувачка провела аналіз літературних джерел за темою дисертаційного дослідження. Більша частина роботи проведена на базі Лабораторії екології хвороб та збереження біорізноманіття Політехнічного інституту штату Вірджинія (США). Для дослідження поширеності гриба *O. ophiodiicola* в Україні здобувачкою були проведені кПЛР ДНК, яка була виділена Gaëlle Blanvillain у рамках дослідження поширеності цього патогену в Європі (Blanvillain et al., 2024), а також статистичний аналіз та інтерпретація результатів для території України. Здобувачкою було проведено виділення ДНК зразків для дослідження успішності транслокації як природоохоронного заходу. Експериментальна робота з чистими культурами ізолятів *O. ophiodiicola* для визначення швидкості росту та відмінностей у проростанні за попередньої інкубації при різних температурах виконана здобувачкою самостійно. Інокуляція змії патогенним грибом *O. ophiodiicola* виконана сумісно із Gaëlle Blanvillain та іншими співробітниками Політехнічного інституту штату Вірджинія за безпосередньої участі здобувачки на всіх етапах роботи, зокрема у проведенні експерименту та у сліпому оцінюванні тяжкості уражень за фотографіями (3552 зображень). Для дослідження поширеності *Paranannizziopsis* spp. в Європі здобувачкою були проведені кПЛР зразків ДНК, а також статистичний аналіз та інтерпретація результатів. В рамках

дослідження поширеності *Batrachochytrium dendrobatidis* на території України здобувачкою було здійснено генотипування жаб на базі Інституту зоології та біомедичних досліджень Ягеллонського університету (Польща). Ідентифікація гриба, що спричинив ураження шкіри гадюки Нікольського, була здійснена здобувачкою на базі кафедри мікології та фітоїмунології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Здобувачка самостійно провела статистичний аналіз представлений в дисертаційному дослідженні. Написання та оформлення публікацій здійснено за безпосередньої участі здобувачки або нею самостійно.

Публікації. За темою дисертаційної роботи опубліковано 6 наукових праць, з них 2 статті у закордонних наукових виданнях, що індексуються в Scopus та/або Web of Science (обидва журнали в Q2 відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank), та 4 тези доповідей.

Апробація матеріалів дисертації. За результатами дисертаційного дослідження були представлені доповіді та опубліковані тези доповідей на наступних конференціях:

1. XI Міжнародна герпетологічна конференція (Чернігів, 14–17 вересня 2021 року).
2. 22nd European Congress of Herpetology (університет Вулвергемптона, Великобританія, 4–8 вересня 2023 року).
3. Конференція молодих дослідників-зоологів — 2023 (Інститут зоології імені І.І. Шмальгаузена НАН України, Київ, 25–26 жовтня 2023 року).
4. 2024 Ecology and Evolution of Infectious Diseases Conference (Стенфордський університет, США, 24–27 червня 2024 року).

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 179 сторінках, складається з анотації, змісту, основної частини, списку використаних джерел (223 посилання) та 6 додатків. Основна частина

складається з наступних розділів: вступ, огляд літератури (розділ 1), матеріали і методи дослідження (розділ 2), результати та обговорення (розділи 3-5), висновки, та викладена на 109 сторінках. Текст дисертації містить 22 ілюстрації та 7 таблиць.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Частина роботи, пов'язана з інокуляцією змії патогенним грибом *O. ophiodiicola*, кількісні ПЛР та робота з чистими культурами *O. ophiodiicola* виконані за фінансової підтримки Міжнародного центру Фогарті при Національному інституті здоров'я США (дослідницький проєкт «Sit-and-wait pathogens: Consequences of heterogeneity in pathogen exposure dynamics for environmentally persistent pathogens», номер гранту 1R01GM152978-01). Участь у дослідженні поширеності патогену *B. dendrobatidis* на території України взято завдяки двосторонній програмі обміну з Інститутом зоології та біомедичних досліджень (IZBR) Ягеллонського університету (м. Краків, Польща): «Коеволюція мітохондріального та ядерного геномів у гібридизуючих видів» за договором від 26.09.2023 № М/91-2023.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані дані щодо поширення патогенних грибів доповнюють знання про фактори ризику, яким піддаються природні популяції рептилій, в тому числі ті, що мають природоохоронний статус. Розроблені на основі проведених досліджень рекомендації щодо протидії поширенню грибів-патогенів рептилій можуть використовуватися для коригування природоохоронних стратегій на рівні окремих дослідників, громадських організацій, заповідників, біосферних заповідників, національних парків, а також на рівні програм Міністерства захисту довкілля та природних ресурсів України. Результати дослідження можуть бути включені до освітніх програм підготовки спеціалістів з біології, мікології, герпетології, екології, ветеринарії.

Подяки. Висловлюю подяку моєму науковому керівнику Олександрові Івановичу Зіненко за керівництво проведенням дослідження, допомогу та підтримку на всіх етапах роботи. Також висловлюю подяку співробітникам Лабораторії екології хвороб та збереження біорізноманіття Політехнічного інституту штату Вірджинія та особисто Joseph Hoyt за надання можливості продовжувати роботу під час війни, залучення до цікавих проєктів, розширення мого наукового кругозору та всебічну підтримку. Окрема подяка Gaelle Blanvillain за передачу знань та досвіду, мотивацію та особистий приклад. Також я вдячна Kate Langwig за відкриття світу аналізу в R, який широко використовувався при роботі над дисертацією. Також висловлюю подяку Олександрові Юрійовичу Акулову за ініціативу створення молекулярної лабораторії на кафедрі мікології та фітоїмунології, в якій почалося дане дослідження. Подяка Jeffery Lorch за надання матеріалів та консультацій. Також висловлюю подяку Maciej Rabijan, Joanna Jakóbiak та всьому колективу кафедри порівняльної анатомії Ягеллонського університету за можливість взяти участь у проєкті з вивчення *B. dendrobatidis*. Я вдячна численним співавторам, бо тільки в колаборації народжується справжня наука. Також висловлюю подяку членам Європейського консорціуму здоров'я диких рептилій (European Wild Reptile Health Consortium) за обговорення ідей, багато з яких лягли в основу даної дисертації.

Особливу подяку хочу висловити моїй родині, яка роками вкладала час та ресурси у мій розвиток, підтримувала та вірила в мене за будь-яких обставин. І найважливіша подяка Збройним Силам України, завдяки яким ми маємо змогу жити та продовжувати досліджувати світ.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Перші знахідки та таксономічне положення *Ophidiomyces ophidiicola*, збудника офідіомікозу змій

Ophidiomyces ophidiicola (Guarro, Deanna A. Sutton, Wickes & Rajeev) Sigler, Hambl. & Paré (2013) є збудником захворювання змій, широко відомого як офідіомікоз або snake fungal disease (SFD) (Lorch et al., 2015). Вперше цей вид був описаний під назвою *Chrysosporium ophidiicola* Guarro, Deanna A. Sutton, Wickes & Rajeev (2009). Культура була виділена з мікотичної гранульоми полозу щурячого (*Pantherophis obsoletus*), що був виловлений на південному сході США та утримувався в неволі. За результатами аналізу послідовностей різних фрагментів рибосомних генів вид віднесли до родини *Onygenaceae* порядку *Onygenales*, та відзначили, що він генетично відрізняється від інших морфологічно подібних видів *Chrysosporium*. Гриби роду *Chrysosporium* вважали анаморфою *Nannizziopsis vriesii* комплексу (CANV), що викликають дерматомікози рептилій та людей (Sigler et al., 2013). В ході ревізії цієї групи рід *Chrysosporium* розділили на дванадцять видів та три роди, включаючи єдиний представник роду *Ophidiomyces*, *O. ophidiicola*, що інфікує лише змій. Майже одночасно іншою групою дослідників було встановлено таксономічне положення кількох інших ізолятів роду *Chrysosporium*, патогенних для рептилій, та запропоновано віднести *O. ophidiicola* до родини *Nannizziopsiaceae*, але гриб було визнано філогенетично ближчим до *Onygenaceae* (Stchigel et al., 2013).

За результатами досліджень як свіжих, так і музейних зразків, у період з 1983 по 2021 роки офідіомікоз було діагностовано або запідозрено у 69 з 388 змій, як виведених в неволі, так і таких, що були виловлені у природних

оселищах та утримувалися в неволі (Anderson et al., 2021, Davy et al., 2021, Grioni et al., 2021, Patterson et al., 2021, Takami et al., 2021, Přibyl et al., 2023).

1.2. Поширеність у світі, походження та вплив *O. ophidiicola* на популяції змій

У природніх популяціях змій патогенний гриб *O. ophidiicola* було зареєстровано вперше під назвою *Chrysosporium ophiodiicola* у 2008 році в околицях Карлайла, Іллінойс, США на зміях виду *Sistrurus catenatus* з сильним набряком та деформацією голови (Allender et al., 2011). Однак спалахи хвороби, що відповідали офідіомікозу, спостерігалися ще на початку 2000-х у карликових гримучих змій (*Sistrurus miliarius*) та деревних гримучих змій (*Crotalus horridus*) (Clark et al., 2011, Cheatwood et al., 2003). Станом на 2025 рік присутність *O. ophidiicola* у природніх популяціях змій підтверджена у Північній Америці (Сполучені Штати та південь Канади), Європі, Китаї та Тайвані, а також у колоніях в неволі по всьому світу (Franklinos et al., 2017, Allender et al., 2020, Grioni et al., 2021, Haynes et al., 2022, Sun et al., 2022, Ladner et al., 2022, Přibyl et al., 2023, Blanvillain et al., 2024, Stark et al., 2024, Di Nicola et al., 2025) (Рис. 1.1). У дослідженнях 1999–2020 років офідіомікоз діагностували або підозрювали у 441 з 2384 змій з природи, з яких пряма смертність була зафіксована у 43 особин (9,8%) (Davy et al., 2021).

Офідіомікоз різного ступеня тяжкості був зареєстрований у понад 70 видів змій з природи, варіюючи від безсимптомного перебігу до помірних уражень шкіри або тяжких форм захворювання, залежно від виду змії, штаму патогену та інших факторів (Lorch et al., 2016, Franklinos et al., 2017, Grioni et al., 2021, Sun et al., 2022, Di Nicola et al., 2022, Ladner et al., 2022, Blanvillain et al., 2024). Дослідження поширеності офідіомікозу у США показали відносно високий відсоток інфікованих особин видів родини Гадюкових (*Viperidae*)

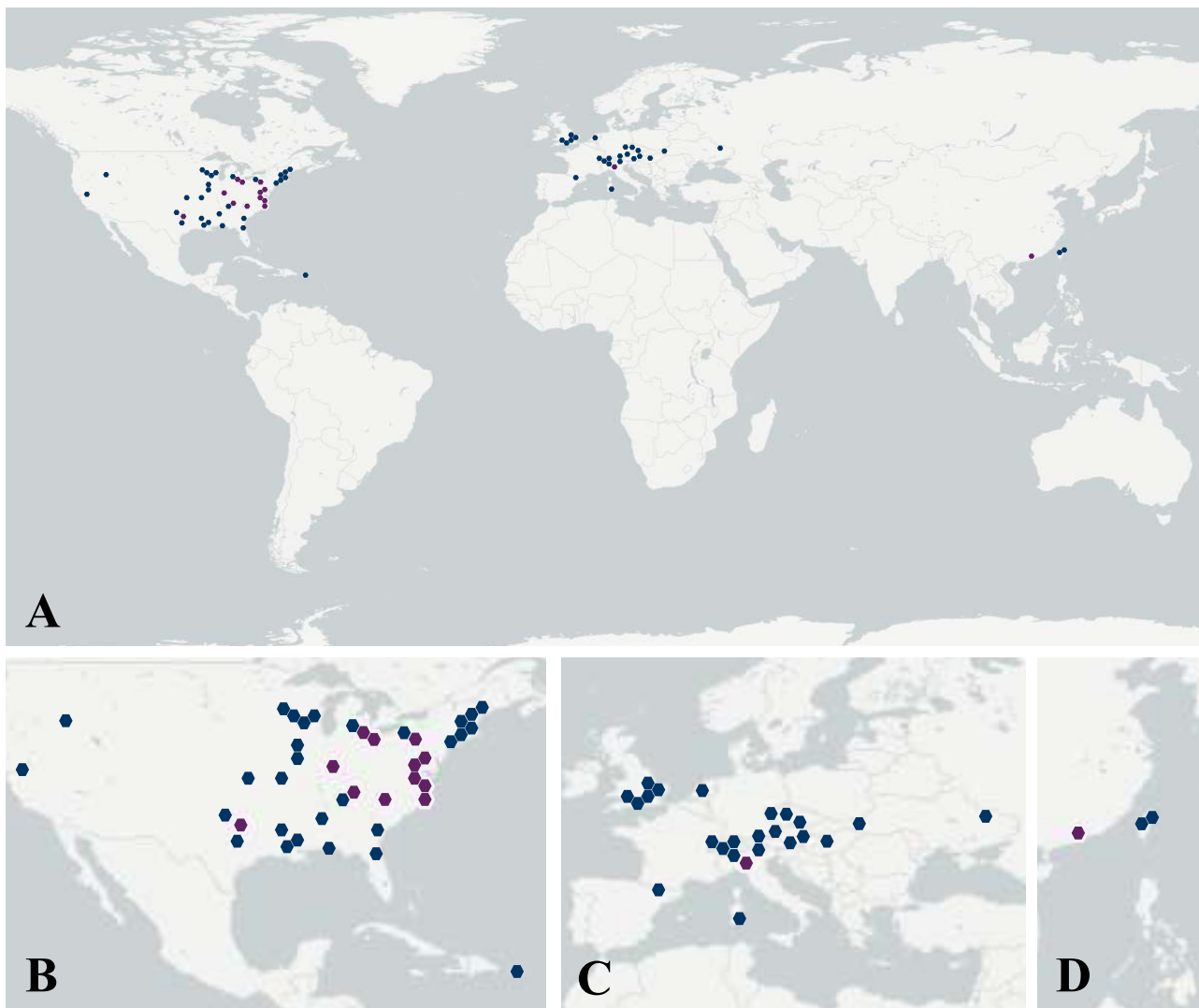


Рис. 1.1. Поширення *O. ophidiicola* серед змій природніх популяцій у світі (A), у Північній Америці (B), в Європі (C) та в Азії (D, Гонконг та Тайвань).

Фіолетові точки відображають місця виявлення *O. ophidiicola* за даними Global Biodiversity Information Facility (GBIF), сині точки – місця виявлення *O. ophidiicola* за літературними даними

(Clark et al., 2011, McBride et al., 2015, Tetzlaff et al., 2015), а також представників родини Полозові (*Colubridae*), зокрема американських вужів *Nerodia* spp. (Snyder et al., 2020). У Європі офідіомікоз найбільш поширений

серед окремих видів родини Полозові (*Colubridae*), а саме у видів *Natrix tessellata*, *N. natrix*, *N. helvetica*, *Hierophis viridiflavus* та *Zamenis longissimus* (Blanvillain et al., 2024). Напівводні змії мають більшу вірогідність бути інфікованими офідіомікозом як у Європі, так і в Північній Америці (McKenzie et al., 2018, Joudrier et al., 2024). Деякі дослідники вважають *O. ophidiicola* опортуністичним патогеном змій через його екологічну пластичність. *In vitro* *O. ophidiicola* може використовувати різноманітні кератиновмісні субстрати як джерело вуглецю: стерилізовану біомасу комах, риб і грибів, а також демінералізований екзоскелет ракоподібних (Allender et al., 2015). Крім того, *O. ophidiicola* здатний рости в стерильному ґрунті, але не в ґрунтах з високою міколітичною активністю внаслідок життєдіяльності едафону (Campbell et al., 2021).

Хоча ретроспективні дослідження музейних зразків довели присутність *O. ophidiicola* у популяціях змій в природі в Європі щонайменше з 1959 року (Origgi et al., 2022) а у США — з 1945 року (Lorch et al., 2021), за останні два десятиліття кількість повідомлень про офідіомікоз зростає (Lorch et al., 2016). Є дані, які свідчать про те, що підвищена сприйнятливість змій з природи до захворювань може бути пов'язана з такими факторами, як втрата генетичного різноманіття та інбридинг через ізольовані популяції внаслідок деградації середовища існування (Clark et al., 2011, Allender et al., 2015, Lorch et al., 2016). Офідіомікоз все частіше визнають значною загрозою для популяцій змій у всьому світі, хоча його вплив на природні популяції недостатньо вивчений через обмежені дослідження, здебільшого зосереджені на наявності *O. ophidiicola* в окремих випадках (Allender et al., 2015; McKenzie et al., 2021). Найбільша кількість досліджень цієї хвороби була проведена у Північній Америці, де було зафіксовано кілька випадків скорочення популяції змій, пов'язаних з офідіомікозом. Приклади включають скорочення чисельності

популяції деревних гримучих змій (*Crotalus horridus*) у 2006 році (Clark et al., 2011), смертність понад 90% у східній популяції ланцюгових карликових гримучників (*Sistrurus catenatus*) (Allender et al., 2018) та зменшення популяції *Nerodia sipedon insularum* на 18% у 2009 році (Lorch et al., 2016). В той самий час у деяких видів, незважаючи на високий рівень поширеності *O. ophidiicola*, не було виявлено прямого впливу захворювання на виживання, наприклад у королівського вужа (*Regina septemvittata*; 37,9%) і північного американського вужа (*N. sipedon*; 20,5%) у Північній Америці (McKenzie et al., 2021). Шестирічні спостереження за популяцією полозів-лисиць (*Pantherophis vulpinus*) у Канаді не показали прямого впливу інфекції *O. ophidiicola* на виживання, хоча інфіковані особини переміщувалися на більші території та потенційно мали підвищений ризик стати здобиччю хижаків (Dillon et al., 2024). У популяціях змій в Європі смертності, обумовленої офідіомікозом, зареєстровано не було (Blanvillain et al., 2024). Загалом, в сучасній літературі бракує досліджень, які б висвітлювали вплив офідіомікозу на популяційному рівні (Dillon et al., 2024).

Походження *O. ophidiicola* залишається нез'ясованим. На даний момент за допомогою філогенетичного аналізу різних ізолятів ідентифіковано три клади: клада I була зареєстрована виключно в Європі, клада II широко поширена в Північній Америці та Європі та складається з чотирьох клональних ліній із високим ступенем рекомбінації, і клада III, яка була знайдена лише у змій в неволі (Ladner et al., 2022). Оцінка найнещодавнішого спільного предка міжкладами I і II (приблизно 2000 років тому), а також нестача проміжних нерекомбінантних штамів у Північній Америці між клональними лініями клади II переконливо вказують на те, що *O. ophidiicola* не еволюціонував у Північній Америці, а був завезений в ході декількох інтродукцій (Ladner et al., 2022). Інтродукції трьох найпоширеніших у

Північній Америці nereкомбінантних ліній, ймовірно, відбулися між 1731 і 2012 роками для IID і між 1902 і 2009 роками для IIE і IIF.

Помірніший характер протікання захворювання на офідіомікоз у змій в Європі, а також присутність на континенті двох клад, дозволяють припустити давнішу присутність *O. ophidiicola* в цьому регіоні. Крім того, за оцінкою Ladner et al., 2022, найнещодавніший спільний предок ізолятів з Європи датований 100–500 роками тому, передуючи широкопоширеному антропогенному пересуванню змій (Hierink et al., 2020), що вважається основним фактором поширення патогену планетою. Що стосується Азії, дослідження поширеності *O. ophidiicola* вкрай спорадичні. *O. ophidiicola* був виявлений у ґрунті в Малайзії (Ali et al., 2016), у бірманського пітона з природи (*Python bivittatus*) у Гонконзі (Grioni et al., 2021), та у Тайвані (Sun et al., 2022). Ізоляти *O. ophidiicola*, виділені зі змій з природи у Тайвані, належали до класу II та, ймовірно, класу III. Нещодавнє дослідження, що включало понад 2000 особин 42 родів змій в Тайвані, виявило напрочуд низький відсоток поширеності *O. ophidiicola* (0,21%), легкі клінічні ознаки захворювання та широкий діапазон хазяїв. Вкупі з поширенням в Тайвані філогенетично різноманітних штамів, це може свідчити про ендемізм захворювання для Південно-Східної Азії (Lai et al., 2024).

1.3. Патогенез та симптоми офідіомікозу

Експериментальні дослідження показали, що дерматомікоз спричиняється контактом з конідіями *O. ophidiicola*, як за попередньої травматизації шкірних покривів, так і без неї (Lorch et al., 2015, McKenzie et al., 2020). Механізми поширення офідіомікозу між особинами наразі залишаються неясними, але розглядаються два шляхи передачі захворювання:

через контакт із носіями, в тому числі безсимптомними, або через заражений субстрат (Di Nicola et al., 2022).

Дерматомікоз, викликаний *O. ophidiicola*, може охоплювати окремі лусочки (Bickinese, 2009) або значною мірою уражувати поверхню дорсальних, вентральних і головних лусочок (McKenzie et al., 2020). Ураження шкіри, які розвиваються під час експериментального інфікування *O. ophidiicola*, включають локальний набряк, появу водянок, зміну кольору/пожовтіння лусочок, утворення везикул і скоринок (Lorch et al., 2015; McKenzie et al., 2020). Під скоринками виникають ерозії та виразки (Lorch et al., 2016; Meier et al., 2018). Уражені лусочки можуть поступово перетворюватися на дермальні гранульоми, які згодом стають виразковими (Baker et al., 2019). Проникаючи крізь епідерміс, гриб може спричинити чисельні підшкірні гранульоми, які містять центральну ділянку некрозу та часто помітні зовні як вузлики (Allender et al., 2011; Ohkura et al., 2016). Ця картина свідчить про можливе гематогенне поширення в дермі (McKenzie et al., 2020). Іноді підшкірні гранульоми можуть досягати ціломічної порожнини, ціломічної жирової тканини та нирок, поширюючись через сполучні тканини та скелетні м'язи (Robertson et al., 2016; Steeil et al., 2018).

Ознаки дерматомікозу, які спостерігаються в інфікованих тварин природніх популяцій, включають ерозію та потемніння країв лусочок, утворення шрамів та зморшок, появу набряку та виразок, дисектиз (Meier et al., 2018, Allain et al., 2024). Переважна більшість уражень у змії з природи виникає на вентральній поверхні тіла, а також в області голови та очей. У найтяжчих випадках *O. ophidiicola* викликає деформацію області голови, очей та щелепи, порушуючи харчову поведінку, що призводить до летальних наслідків (Allender et al., 2011). Крім того, смертність від офідіомікозу може

бути спричинена зменшенням об'єму вісцеральної жирової тканини, внаслідок чого виникає постійний негативний енергетичний баланс (Pohly, 2020).

Незважаючи на наявні дані, що вказують на гематогенне поширення *O. ophiodiicola* (McKenzie et al., 2020), доказів адаптивної імунної відповіді хазяїна поки що не виявлено (Pohly, 2020). На ранніх стадіях розвитку захворювання, коли інфекція обмежена поверхневими шарами епідермісу, однією з форм захисту є процес линяння (Lorch et al., 2015). Проте цей механізм не є ефективним у разі проникнення інфекції в глибші шари шкіри (Di Nicola et al., 2022).

Зараження *O. ophiodiicola* викликає не лише симптоми дерматомікозу, але й поведінкові зміни хазяїв. Згідно з Tetzlaff et al., 2017, інфіковані особини є менш рухливими, проводячи більше часу гріючись на сонці. Підвищення температури тіла через активну терморегуляцію відіграє важливу роль у боротьбі з інфекцією в рептилій, стимулюючи імунну відповідь та процес линяння (Burns et al., 1996; Zimmerman et al., 2010). Це часто спостерігається восени (Clark et al., 2011; Tetzlaff et al., 2017) і взимку (McBride et al., 2015) у змій з природи, які мають ознаки зараження *O. ophiodiicola*. Однак, менш потайна поведінка може мати і негативні наслідки, підвищуючи ризик хижацтва для інфікованих особин (Sperry et al., 2021).

1.4. Діагностика та лікування офідіомікозу

Для діагностики офідіомікозу в польових умовах рекомендовано орієнтуватися на наявність характерних уражень шкірних поривів змій (McKenzie et al., 2019; Fuchs et al., 2020). Ультрафіолетова флуоресценція також показала свою ефективність як неінвазійний метод скринінгу на офідіомікоз, що може бути використаний у польових умовах (Vivirito et al., 2021). Незважаючи на те, що цей метод ефективний переважно для змій з

явними симптомами захворювання, він може використовуватися для виявлення менш помітних уражень (наприклад, на темних ділянках шкіри) для подальшого діагностичного дослідження (Vivirito et al., 2021).

Найбільш надійним та таким, що широко використовується, методом виявлення *O. ophidiicola* є діагностика за допомогою кПЛР, а саме з використанням специфічних праймерів, націлених на ділянку внутрішнього транскрибувального спейсера 2 (ITS2) або ген субодиниці 1 мітохондріальної NADH дегідрогенази (*nad1*) (Bohuski et al., 2015, Lorch et al., 2021). При цьому, не було виявлено значних відмінностей між відбором мазків поверхні шкіри та забором зразка тканини (відрізання краю лусочки) як у ідентифікації присутності *O. ophidiicola* методом кПЛР, так і у визначенні концентрації ДНК патогену у зразку. Таким чином, як найменш інвазійний метод відбору зразків для кПЛР рекомендовано використовувати взяття мазків всієї поверхні тіла змії або безпосередньо уражень (McKenzie et al., 2018). При цьому необхідно проводити аплікатором по поверхні шкіри декілька разів докладаючи зусилля (Baker et al. 2019), а також відбирати щонайменше два окремих мазки, оскільки відсоток хибнонегативних результатів кПЛР на матеріалі, зібраному одним аплікатором, доволі високий (> 70%, Hileman et al., 2018).

Підтвердження наявності ДНК *O. ophidiicola* у зразку з поверхні шкіри змії саме по собі ще не є свідченням захворювання на офідімікоз. Канадський кооператив охорони здоров'я дикої природи (CWHC) визначив наступні критерії діагностики офідіомікозу (CWHC 2017; Davy et al., 2021):

- підтвердження наявності гриба молекулярними або культуральними методами без виявлення явних уражень та гістологічних змін, що спостерігаються при захворюванні (наприклад, наявність гіф гриба у тканинах або гранульом) визначається як присутність *O. ophidiicola*;

- присутність характерних симптомів захворювання та підтвердження наявності гриба молекулярними або культуральними методами, за відсутності висновку про гістопатологічні зміни визначається як підозра на офідіомікоз;
- присутність характерних симптомів захворювання та підтвердження наявності гриба гістологічними методами за відсутності підтвердження молекулярними або культуральними методами теж визначається як підозра на офідіомікоз;
- підтвердження наявності *O. ophidiicola* молекулярними або культуральними методами, за наявності гістологічного підтвердження діагностується як офідіомікоз;

Baker et al. (2019) запропонували зміни до критеріїв Канадського кооперативу охорони здоров'я дикої природи, які загалом полягали у необхідності підтвердження наявності артроконідій всередині ураження для поставлення діагнозу «офідіомікоз» (Табл. 1.1).

Хоча для підтвердження захворювання на офідіомікоз виділення чистої культури гриба з ураження не є необхідним та програє молекулярній діагностиці у часі, точності та трудомісткості (Pohly, 2020), культура гриба є необхідною для визначення морфологічних, фізіологічних, генетичних та інших особливостей ізолятів (Franklinos et al., 2017). Показано, що найуспішнішим методом є виділення чистої культури *O. ophidiicola* зі зразка ураженої тканини (Baker et al., 2019) на поживний агар Сабуро (Dolinski et al., 2014; Allender et al., 2015) або середовище для виявлення дерматоміцетів DTM, що є середовищем Сабуро з додаванням фенолового червоного та циклогексаміду для пригнічення росту сапротрофних грибів (Lorch et al., 2015). Застосовується як метод прямого посіву тканинного зразка на середовище, так і метод змивів з подальшим розведенням та посівом

отриманої суспензії (Lorch et al., 2015). Мазки зі шкіри або ураження часто вважаються непридатними для виділення чистої культури *O. ophidiicola* (Davy

Таблиця 1.1

Порівняння критеріїв діагностики офідіомікозу за версією Канадського кооперативу охорони здоров'я дикої природи (CWHC) та за Baker et al., 2019

Наявність характерних симптомів	Молекулярне/ культуральне виявлення	Наявність гіф у тканинах	Наявність артроконідій у тканинах	За CWHC	За Baker et al., 2019
—	+	—	—	<i>O. ophidiicola</i> присутній	<i>O. ophidiicola</i> присутній
+	—	—	—		Підозра на офідіомікоз
+	—	+	—	Підозра на офідіомікоз	Підозра на офідіомікоз
+	—	+	+	Підозра на офідіомікоз	Явний офідіомікоз
+	+	—	—	Підозра на офідіомікоз	Явний офідіомікоз
— або +	+	+	—	Офідіомікоз	Явний офідіомікоз
— або +	+	+	+	Офідіомікоз	Офідіомікоз

et al. 2021). Проте, в літературі трапляються приклади успішного виділення з мазків за умови посіву на середовище, що містить декілька антибіотиків та/або

антимікотиків: неоміцину сульфат, еритроміцин, пеніцилін G і ампіцилін (Hill et al., 2018) або циклогексамід, гентаміцин та хлорамфенікол (Sun et al., 2022).

У чистій культурі колонії *O. ophidiicola* мають білий до блідо-жовтого колір, із реверзумом такого ж кольору, правильної округлої форми з пухнастою щільною поверхнею, яка з віком стає оксамитовою до зернистої та порошкоподібної, набуваючи жовтого відтінку. Край колоній рівний, іноді погано виражений, профіль опуклий, з часом стає пласким. Іноді спостерігається наявність прозорого або жовтуватого ексудату, а також концентричних кіл, сформованих міцелієм різного ступеню щільності та відтінку блідо-жовтого. Культури *O. ophidiicola* мають специфічний різкий запах. Формування плодових тіл та статевих спор для *O. ophidiicola* невідомо, структури поширення представлені анаморфними конідіями, а саме алевріоспорами та артроконідіями (Rajeev et al., 2009; Sigler et al., 2013).

Для підтвердження наявності гіф та артроконідій *O. ophidiicola* у тканинах тварин, отриманих шляхом розтину або біопсії, зазвичай використовуються такі гістологічні методи: фарбування Гоморі (Grisnik et al., 2018; McKenzie et al., 2020), Грокотта-Гоморі (McBride et al., 2015; Ohkura et al., 2016), Грокотта (Allender et al., 2011; Lorch et al., 2021). Додатково, забарвлення гематоксиліном та еозином (HE) використовується для візуалізації ділянок запалення, некрозу та гранульом всередині тканин (Lorch et al., 2015).

Для лікування особин, заражених офідіомікозом у неволі використовуються найбільш поширені фунгіцидні препарати: тербінафін, ітраконазол та вориконазол (Paré et al., 2005, Van Waeyenberghe et al., 2010, Woodburn et al., 2018). В той самий час, спорадичний характер опублікованих даних про спроби лікування не дозволяє узагальнити рекомендації щодо дозування даних препаратів. Вориконазол вважається більш ефективним, ніж

тербінафін, і ітраконазол, але й найменш безпечним фунгіцидом через повідомлення про підвищену світлочутливість та летальні випадки від застосування цього препарату (Lindemann et al., 2017). Відомо, що і тербінафін, і ітраконазол накопичуються в епідермісі та кератині. На основі цієї властивості були розроблені схеми пульс-терапії для лікування стригучого лишая та оніхомікозу у людей (Ungprakorn et al., 2004). Такі схеми може бути застосовані і для рептилій, якщо захворювання обмежене шкірою (Paré et al., 2020). Найбільш успішним є одночасне застосування перорального (або ін'єкційного) та поверхневого шляхів доставки фунгіцидного препарату (Paré et al., 2020). Тривалість лікування залежить від конкретного випадку, але не має перериватися після зникнення уражень або отримання негативного ПЛР тесту на наявність гриба. Показано, що симптоми офідіомікозу можуть зникати після линьки та з'являтися знову через 7-11 днів у випадку, якщо гриб зберігає життєздатність, знаходячись у глибших шарах тканин (Pisquet et al., 2018). Перспективним методом лікування вважається вживлення імплантів, що поступово вивільняють фунгіцидний препарат. Таке лікування забезпечує тривалий вплив на патоген та викликає найменший стрес у тварини. Не менш важливим вважається хірургічне видалення ушкоджених тканин. Утримання тварин у належних умовах теж відіграє важливу роль у лікуванні захворювання (Pisquet et al., 2018). Так, необхідно підтримувати оптимальну для тварини температуру середовища та забезпечувати джерело тепла для самостійної терморегуляції твариною (Paré et al., 2020).

1.5. Роль сезонності, статі, розміру тіла та травматизації у поширеності офідіомікозу

Низка досліджень вказують на виражену сезонність появи та ступеню важкості клінічних ознак офідіомікозу змії у Північній Америці (Lorch et al.,

2016, McCoy et al., 2017, McKenzie et al., 2019 та 2020). Офідіомікоз найчастіше спостерігається у тварин одразу після виходу з підземної гібернації (Lorch et al., 2016). Це може бути пов'язано з підвищеним ризиком інфікування під час сплячки, так як концентрація грибних пропагул вища у ґрунтах гібернакул порівняно з верхнім шаром ґрунту (Campbell et al., 2021). Крім того, розвиненню інфекції під час сплячки сприяють такі фактори як збільшений час контакту з патогеном через відсутність руху, передача патогену від інфікованих змій здоровим через скупчення особин під час сплячки (Klauber, 1956; Parker and Brown, 1973, 1974), ослаблення імунної функції змій за низьких температур (Nelson and Demas 1996). Згідно з дослідженням McKenzie et al., 2020, гібернація та низькі температури знижували вірогідність виживання інфікованих змій. Було зареєстровано горизонтальну передачу захворювання від інфікованих змій до однієї неінокульованої особини, які утримувалися разом під час сплячки. За Kendall et al., 2023, утримування інфікованих змій за температури нижче оптимуму навіть на декілька градусів Цельсія викликає важчий перебіг захворювання та більшу смертність. Щодо ефекту сезонності на перебіг захворювання змій природніх популяцій, McCoy et al., 2017 також підтверджують гіпотезу про те, що вираженість клінічних ознак офідіомікозу залежить від сезонних коливань температури повітря та середнього енергетичного статусу, вираженого індексом стану тіла (BCI, модифікований індекс маси тіла). Незалежно від статі особин, піки вираженості клінічних ознак офідіомікозу припадають на місяці, коли середній енергетичний статус і температура повітря є найнижчими. Змії з помірною та важкою інфекцією мали нижчий BCI порівняно зі зміями з незначними ознаками інфекції або без них, але залишається неясним, чи виснаження енергетичних запасів призвело до більшої сприйнятливості до захворювання, чи боротьба із захворюванням призвела до більших

енергетичних витрат інфікованих особин. Наразі залишається неясним, чи спалахи офідіомікозу наприкінці зими – початку весни пов’язані із зараженням змій у гібернакулах або з прогресуванням хронічного захворювання під час періоду сплячки (Campbell et al., 2021).

Вірогідність зараження змій у Північній Америці вища весною та влітку, ніж восени, при чому як наявність, так і тяжкість клінічних ознак негативно корелює з підвищенням температури повітря (McKenzie et al., 2019). У Європі яскраво вираженої сезонності захворювання виявлено не було (Blavillain et al., 2024, Joudrier et al. 2024), однак Allain et al., 2024 виявили нижчу поширеність уражень шкіри у змій Великобританії в липні порівняно з травнем.

Наразі немає переконливих доказів різниці поширеності офідіомікозу у змій різних статей (Lind et al., 2022), але за даними Allain et al., 2024, у самців поширеність уражень дещо вища, ніж у самок. Довжина тіла не впливає на вірогідність появи клінічних ознак офідіомікозу в лабораторних умовах (McKenzie et al., 2020), але у природніх популяціях спостерігається позитивна кореляція між довжиною тіла та появою уражень, вказуючи на більшу поширеність захворювання серед дорослих змій (Harding et al., 2022, Allain et al., 2024). Спостерігається позитивна кореляція вірогідності зараження офідіомікозом та наявності ознак механічних травм (Allain 2024, McKenzie et al., 2019).

1.6 Патоген-специфічні фактори, що впливають на патогенність та вірулентність *O. ophidiicola*

З’ясованими факторами виникнення відмінностей у динаміці захворювання на офідіомікоз є різна сприйнятливість видів-хазяїв, сезонні коливання температури та енергетичний статус особин, наявність травм

(McCoy et al., 2017, McKenzie et al., 2019, McKenzie et al., 2021). Blanvillain et al., 2024 виявили суттєві відмінності у тяжкості захворювання, які залежали не лише від виду змії, але й від кладі патогену: ізоляти, що відносяться до кладі I, викликають помірніші симптоми, ніж ізоляти з кладі II. В той самий час, механізми виникнення різниці у вірулентності різних штамів *O. ophidiicola* всередині клад залишаються нез'ясованими.

Варіабельність патоген-специфічних факторів може впливати на зміну ризику інфікування та вірулентності (Leggett et al., 2017). Класична теорія еволюції вірулентності базується на компромісі між ростом патогену, передачею та виживанням хазяїна, який передбачає, що більша швидкість росту всередині хазяїна спричиняє більшу вірулентність та швидшу поширюваність, але і коротший період поширення через підвищену смертність хазяїна (Anderson and May, 1982, Frank, 1996). За даними інших досліджень, патогени, що ростуть повільніше, є більш вірулентними, ніж швидкозростаючі патогени, що робить швидкість росту патогену одним з визначників динаміки захворювання (Leggett et al., 2017). Іншим ключовим поняттям у екології хвороб є інфекційна доза, що може впливати на динаміку захворювання починаючи від прогнозу щодо окремого хазяїна закінчуючи успішністю та темпами передачі захворювання між особинами (Johnson, 2003). У випадку захворювань, що викликаються грибними патогенами, на інфекційну дозу впливають такі патоген-специфічні фактори як рясність утворення спор, їх життєздатність, а також рясність проростання після входження у контакт з хазяїном, так як не всі спори проростають (Cochrane, 1974).

Після утворення спори переходять у стан спокою, який може бути ендогенним, що досягається внаслідок внутрішнього фізіологічного стану, або екзогенним, що зберігається через несприятливі умови для проростання (Cochrane, 1974). Як правило, статеві спори (зигоспори, базидіоспори та

аскоспори) перебувають у стані ендogenousного спокою, що вимагає спеціального впливу для проростання (зміни температури, освітлення, рН, осмолярності, входження певних молекул у контакт зі спорою) (Sephton-Clark and Voelz, 2018). Відомо, що екстремальні температури викликають проростання спор багатьох видів грибів. Приклади видів, які потребують нагрівання для подолання стану спокою в статевих спорах, включають *Ascobolus* spp. (Dodge, 1912), *Neurospora* spp. (Shear and Dodge, 1927), *Talaromyces* spp. (Kikoku, 2003), *Cryptococcus neoformans* (Forsythe et al., 2016). Екзогенний спокій характерний для нестатевих спор грибів і порушується після припинення несприятливих умов, таких як відсутність води та/або поживних речовин (Doran, 1922, Lamarre et al., 2008, Osharov, 2001). У цьому випадку оптимальні умови середовища вважаються як необхідними, так і достатніми для проростання всіх зрілих нестатевих спор, проте кілька досліджень свідчать про необхідність пов'язаної з температурою активації для переривання безстатевого стану спокою. Наприклад, артроспори *Trichophyton mentagrophytes*, збудника дерматомікозів людини, можуть бути активовані короткочасним впливом сублетальних доз тепла (45°C протягом 10-20 хвилин) (Hashimoto et al., 1977). Холодова активація грибних пропагул є відносно рідкісним явищем, хоча деякі випадки були описані. Попередня обробка холодом є важливою для проростання склероціїв *Claviceps purpurea* (Uppala et al., 2016). Christine Juge et al., 2002 продемонстрували, що інкубація в холоді довше 14 днів значно підвищує яскравість проростання спор арбускулярного мікоризного (АМ) гриба *Glomus intraradices*. Крім того, довший період зберігання в холоді зменшив смертність спор з 90% до 50%. Це спостереження узгоджується з екологічною стратегією АМ грибів, оскільки їх стан спокою відіграє вирішальну роль у виживанні, координуючи проростання спор з

періодами швидкого росту коренів і сприятливими умовами для їх колонізації (Tommerup 1985).

Наразі фактори, що сприяють проростанню спор *O. ophidiicola* залишаються нез'ясованими. Для патогену раптові зміни температури можуть сигналізувати про те, що спора вступила у контакт з хазяїном або що хазяїн перебуває у фізіологічному стані, сприятливому для розвитку хвороби. В умовах змін клімату, що призводять до змін поведінки змії та динаміки патогенів, розуміння ролі температури у зв'язку між життєвими циклами хазяїна та патогену набуває особливого значення.

1.7 Протидія поширенню *O. ophidiicola* та рекомендації щодо консерваційних заходів

У 21 столітті з'являється все більше документальних підтверджень світового зменшення чисельності амфібій і вимирання ряду видів амфібій і рептилій через низку факторів (Gibbons et al. 2000; Stuart et al. 2004; Mendelson et al. 2006). На фоні нових загроз для природних популяцій, таких як зміни клімату та інтродуковані патогени, стає зрозумілим, що необхідно запроваджувати проактивні заходи зі збереження природніх угруповань рептилій та амфібій та їх середовища існування.

Згідно з Böhm et al., (2013), близько 19% видів рептилій перебувають під загрозою зникнення, а для оцінки статусу ще 21% недостатньо даних (за класифікацією Міжнародного союзу охорони природи). Стресори для популяцій рептилій у Європі включають руйнування, фрагментацію та зміни середовища існування (Doherty et al., 2020; Tan et al., 2023), інтенсивне сільське господарство (Guiller et al., 2022, Băncilă et al., 2023), використання пестицидів (Wagner et al., 2015), заростання оселищ чагарниками (Edgar et al., 2010, Jofré et al., 2016), часті лісові пожежі (Hailey, 2000), посилення ефектів тривалої

спеки, посух, падіння рівня ґрунтових вод і повеней, спричинених зміною клімату (Le Galliard et al., 2012, Ferreira et al., 2018, Biber et al., 2023), і масове скорочення популяції безхребетних у Північно-Західній Європі (Eisenhauer et al., 2023; Mancini et al., 2023).

Екологічну роль рептилій в природніх угрупованнях часто недооцінюють у порівнянні з великими або більш привабливими тваринами (de Miranda, 2017). В той самий час, рептилії відіграють важливу роль у транспорті речовин та енергії між екосистемами (наприклад, напівводні види пов'язують водні середовища існування з наземними угрупованнями), відіграють вирішальну роль у трофічних ланцюгах як здобич і хижак, визначаючи устрій екосистеми через регуляцію чисельності інших організмів, беруть участь у транспортуванні генів через розповсюдження насіння, запилювання, епібіоз (Valencia-Aguilar et al., 2013, de Miranda, 2017). Є докази того, що деякі види ящірок у Північній Америці мають зоопрофілактичну дію на збудника хвороби Лайма (*Borrelia burgdorferi*) і гранулоцитарного анаплазмозу, спричиненого *Anaplasma phagocytophilum*, шляхом зменшення щільності німф кліщів, створюючи так званий ефект розрідження (Giery et Ostfeld, 2007). Прудкі ящірки (*Lacerta agilis*) відіграють таку саму роль у Європі, допомагаючи зменшити кількість випадків захворювання людей (Köhler et al., 2023). Усе вище сказане не залишає сумнівів, що збереження популяцій рептилій, зокрема й через попередження розповсюдження хвороб, є актуальним завданням сьогодення.

Першим кроком на шляху до обмеження поширення нових хвороб є визначення шляхів потрапляння патогенів у природні популяції тварин. Згідно з Fisher et al., 2007, розповсюдженню хітридіомікозу сприяє торгівля земноводними через поширення заражених тварин по всьому світу, випуск місцевих заражених тварин у наївну популяцію та розмноження патогену

через спільне розміщення тварин з подальшим неконтрольованим визволом інфекційних зооспор у систему водопостачання. Цілком ймовірно, що *Ophidiomyces ophidiicola*, *Paranannizziopsis* spp. та потенційно інші патогени також можуть поширюватися в результаті торгівлі рептиліями в неволі та з природи (Ladner et al., 2022, Di Nicola et al., 2022). Це створює ризики як інтродукції патогенів у імунологічно наївні популяції, так і потрапляння нових штамів у популяції, що вже зазнали впливу патогену. Так, викликає занепокоєння можливість інтродукції у природні популяції змій штамів *O. ophidiicola*, що відносяться до клади III, та потенційної появи рекомбінантних штамів міжкладами I/III та II/III з новими характеристиками (наприклад, більш вірулентних) (Schilliger et al., 2023). Особливо небезпечною є інтродукція патогенів у ізолювані та/або інбридні популяції, які вже знаходяться під загрозою зникнення, або в популяції, що зазнають стресу через дію інших факторів (антропогенний вплив, скорочення через конкуренцію з інтродукованими немісцевими видами, ендокринні, метаболічні та імунні порушення внаслідок дії пестицидів/біоцидів або інших ксенобіотиків) (Joudrier et al., 2024).

Для боротьби з інтродукцією патогенів рептилій у природні популяції ми рекомендуємо наступні кроки:

1. Впровадження вимоги щодо ПЛР тестування змій, що ввозяться з-за кордону, на наявність патогенних грибів *Ophidiomyces ophidiicola* та *Paranannizziopsis* spp. На даний момент згідно з Законом України про ветеринарну медицину, тварини, що ввозяться на територію України, повинні бути вільними від хвороб, що входять у список Міжнародного епізоотичного бюро (МЕБ). Офідіомікоз вказаний на сайті МЕБ, але на сьогоднішній момент не входить до переліку особливо небезпечних хвороб, тому не контролюється. Згідно з пунктом 56 Постанови

Кабінету міністрів України від 16 листопада 2011 р. №1402 «Про затвердження Правил транспортування тварин», перевезення диких тварин здійснюється на підставі супровідних ветеринарних документів (ветеринарно-санітарний паспорт, ветеринарне свідоцтво). Пункт щодо тестування змії на наявність патогенних грибів *Ophidiomyces ophidiicola* та *Paranannizziopsis* spp. може бути включений до цих документів.

2. Дотримання карантинних заходів для тварин, що виявилися позитивними на наявність даних патогенів за результатами кПЛР. Згідно зі статтею 92 Закону України про ветеринарну медицину, тварини, які ввозяться на територію України підлягають профілактичному карантину з метою перевірки стану їх здоров'я. Якщо інфекція була виявлена, для завершення карантину недостатньо дочекатися негативного результату на ПЛР або зникнення уражень. Для особин цінних видів рекомендується застосування лікування (див. Розділ 1.4). Для запобігання повторному зараженню необхідні утримування тварини у тераріумі з мінімальною кількістю об'єктів та регулярна дезінфекція середовища. Лікування та карантин необхідно продовжувати до відсутності появи нових уражень протягом щонайменше двох циклів линьки. У великих цінних колекціях доцільно розглянути можливість евтаназії та утилізації хворих рептилій, щоб запобігти поширенню на решту колекції.
3. Контроль органами державної влади дотримання вимог щодо відлову змії з природи або несанкціонованих маніпуляцій з ними, а також випуску змії з неволі у природу.
4. Проведення просвітницької роботи серед заводчиків та утримувачів рептилій щодо недопустимості випуску тварин у природні екосистеми.

5. Запровадження утримувачами змій та реабілітаційними центрами мікробіологічного або молекулярного скринінгу на *O. ophidiicola* та *Paranannizziopsis* spp. та дотримання карантину протягом принаймні 90 днів, коли нова особина потрапляє в колекцію (Rivera 2019; Rossi 2019).
6. Утилізація субстрату для тераріумів лише після попередньої стерилізації. Рекомендованими методами стерилізації субстрату є кип'ятіння у 2% водному розчині харчової соди протягом 15–30 хвилин або замочування у свіжоприготованому 3–10% розчині хлорного вапна протягом п'яти хвилин (Rzadkowska et al., 2016). Допускається спалювання гілок та колод, прожарювання каміння за дотримання необхідних протипожежних заходів. Особливу увагу слід приділяти стерилізації шкіри рептилій, скинутої внаслідок линьки, яка є основним джерелом патогену, слугуючи субстратом для його виживання, росту та розмноження поза організмом змій.

Наступним кроком є запобігання поширенню патогенів між популяціями рептилій в природі, обумовленому діяльністю професійних герпетологів та аматорів. Герпетолог, що подорожує країною з однією рукавицею для ловлі змій, яку він не дезінфікує, становить чи не найбільшу загрозу інтродукції патогену у ізольовані та віддалені популяції. У зв'язку з цим необхідним є розповсюдження знань щодо патогенів рептилій та необхідності їх контролю у професійному середовищі. Ми рекомендуємо впровадження наступних заходів:

1. Проведення доповідей щодо запобігання поширенню патогенних грибів рептилій на наукових та практичних герпетологічних конференціях в Україні.

2. Використання асептичних практик під час неопосередкованого контакту зі зміями природніх популяцій.
- a. Використання одноразових рукавичок і їх заміна після контакту з кожною твариною.
 - b. Дезінфекція рукавичок для відлову отруйних змій за допомогою обприскування достатньою кількістю 70% етанолу. За використання цього способу патоген гине, що робить неможливим розповсюдження інфекції. Однак, ДНК патогену залишається на рукавичці після обробки, тому для досліджень поширення патогену слід використовувати лише одноразові рукавички.
 - c. Використання для тимчасового утримання рептилій індивідуальних одноразових паперових пакетів або індивідуальних тканинних мішків з подальшою дезінфекцією після використання.
 - d. Дезінфекція ізопропіловим спиртом або 70% етанолом обладнання, що контактувало з твариною (прилади вимірювання довжини, зондові термометри, ваги), а також обладнання, до якого торкалися в рукавичках (фотокамера, телефон, інфрачервоний термометр, олівець тощо). Час контакту етанолу з поверхнями, що стерилізуються, має становити щонайменше одну хвилину.
 - e. Автоклавування використаних одноразових рукавичок та паперових пакетів у лабораторії перед утилізацією. Дезінфекція тканинних мішків за допомогою прання у гарячій воді з додаванням відбілювача.

Третім кроком на шляху до обмеження поширення патогенів рептилій у природніх популяціях є створення та збереження оптимального середовища існування. Дослідження показали, що змії, які мешкають у місцях з інтенсивним антропогенним впливом, мають вищу ймовірність інфікування

O. ophioidicola (Joudrier et al., 2024). Така закономірність спостерігається і для інших патогенів: серед пустельних черепах Агацці (*Gopherus agassizii*) поширеність *Mycoplasma agassizii* та *M. testudineum* була вищою в регіонах, розташованих ближче до населених пунктів. (Berry et al., 2015). Таким чином, ми рекомендуємо запровадження та дотримання природоохоронного статусу для територій, де мешкають вразливі популяції змій рідкісних видів, а також малочисельні інбридингові популяції.

Окремо слід відзначити інші заходи зі збереження природніх популяцій рептилій. Переміщення тварин за допомогою розведення в неволі та випуску, або переселення особин природніх популяцій з однієї території на іншу показали себе як успішний метод відновлення популяцій, що зазнали скорочення, а також збільшення генетичного різноманіття для мінімізації інбридингової депресії в ізольованих популяціях (Griffith et al., 1989, Foley et al., 2005, Seddon et al., 2007). Наприклад, Amphibian Ark успішно реалізував програми збереження численних видів земноводних, що перебувають під загрозою зникнення (Gagliardo et al., 2008, Zippel et al., 2011). Однак такі практики часто погано задокументовані, що дає мало можливостей вчитися на минулих помилках та/або успіхах (Germano et al., 2015, Bradley et al., 2022). У червні 2023 року внаслідок руйнування дамби Каховської ГЕС, десятки тритонів *Triturus* sp. були винесені до узбережжя Чорного моря в Одеській області. Завдяки роботі працівників НПП «Тузлівські лимани», Одеського зоопарку та небайдужих людей, 32 тритони були зібрані та утримувалися у зоопарку протягом трьох місяців з подальшою реінтродукцією у природні місця поширення науковцями Українського герпетологічного товариства Сурядною Наталією та Олександром Зіненком, в тому числі за підтримки автора, у співпраці з Нижньодніпровським НПП та Одеським зоопарком. Точки випуску були обрані з урахуванням відомих місць знахідок виду та

відносної безпеки для тварин та співробітників через обстріли. Ця подія є прикладом транслокації у екстремальних умовах за неможливості подальшого моніторингу реінтродукованих особин та оцінки успішності транслокації. Потенційна наявність патогенів, які можуть інфікувати тварин на всіх стадіях процесу транслокації та призвести до їх загибелі або розповсюдження патогену на нові території, запроваджує нові складнощі у організацію успішного консерваційного заходу.

Утримання змії з природи та інших рептилій у неволі, як на короткий термін, так і назавжди, зазвичай спричиняє високий рівень стресу для тварин, а тривалість та інтенсивність стресора може вплинути як на їхню нормальну поведінку, так і на загальний стан здоров'я (Warwick et al., 2013, Silvestre, 2014, Van Waeyenberge et al., 2018). Тривалі стресори, такі як невідповідні умови утримання, фізичні контакти та зміна харчування, можуть порушити нормальний рівень гормонів і перенаправити доступну енергію, що призведе до пригнічення росту та розмноження (Peterson et al., 1999, Sykes & Klukowski, 2008, Vitousek et al., 2010, Gormally & Romero, 2020). Стрес також може знизити ефективність імунної системи та сприяти активізації прихованих інфекцій, що призводить до значної смертності нещодавно відловлених рептилій (Jacobson, 1993). Виходячи з вищезазначеного, виникає необхідність ретельного моніторингу консерваційних заходів, що включають вилов та утримання тварин в неволі протягом значного часу, а також вплив патогенів на успішність цих заходів.

1.8. Таксономія, поширення та випадки інфікування рептилій грибами роду *Paranannizziopsis*

Патогенні гриби, що відносяться до роду *Paranannizziopsis*, вперше були описані у 2013 році під час ревізії групи, раніше відомої під назвою «анаморфа

Chrysosporium комплексу *Nannizziopsis vriesii*» (CANV) (Sigler et al., 2013; Stchigel et al., 2013). В рамках ревізії було описано 4 види роду *Paranannizziopsis*: *P. australasiensis*, *P. californiensis*, *P. crustacea*, та *P. longispora* (раніше *Chrysosporium longisporum*), що викликають ураження шкіри представників ряду лускатих (*Squamata*) та гатерій (ряд *Rhynchocephalia*) (Paré & Sigler, 2016). У 2019 році був описаний п'ятий вид роду, *P. tardicrescens*, виділений в культуру з ураження шкіри храмової гадюки Ваглера (*Tropidolaemus wagleri*) (Rainwater et al., 2019). Види *P. crustacea*, *P. californiensis* і *P. longispora* відомі по єдиному спалаху захворювання щупальцевих змій (*Erpeton tentaculatum*) у Північній Америці, де вони стали причиною важкого некротичного дерматиту, поширеного у зоологічних установах (Bertelsen et al., 2005, Sigler et al., 2013, Stchigel et al., 2013). Було зареєстровано декілька летальних випадків, незважаючи на спроби терапії (Nichols, 2009; Sigler et al., 2013). Вид *P. australasiensis* було виділено з групи хазяїв у неволі, до якої входять ящірки, змії та гатерії в Австралії, Новій Зеландії та США (Sigler et al., 2013; Díaz-Delgado et al., 2020; Mack et al., 2021, Lorch et al. 2023). *P. australasiensis* викликав круглі або точкові білуваті ураження шкіри у змій (Paré & Jacobson, 2007), вузликовий до виразкового дерматит у гатерій (Sigler et al., 2013; Masters et al., 2016), ураження шкіри та гранульоми з гіфами в печінці у бородатої ящірки (*Pogona barbata*). У гатерій інфекція прогресувала повільніше і не призвела до летальних випадків (Masters et al., 2016).

Першим випадком виділення *P. australasiensis* з тварини з природи стало дослідження дерматиту інвазійних леопардових хамелеонів (*Furcifer pardalis*) у Флориді, США (Claunch et al., 2023). Тварини були виловлені та утримувалися в неволі протягом десяти місяців. Приблизно через 3 місяці після зниження температури утримання у хамелеонів з'явилися некротичні

ураження шкіри та запалення, що були успішно вилікувані вориконазолом та тербінафіном перорально. Пізніші дослідження показали, що гриби роду *Paranannizziopsis* spp. були асоційовані з 10 випадками мікозів шкіри у змії природніх популяцій США та Канади щонайменше з 2014 року (Lorch et al., 2023).

Першим і єдиним на момент початку дисертаційного дослідження випадком реєстрації *Paranannizziopsis* spp. на території Європи стало діагностування захворювання у двох сеоанських гадюк (*Vipera seoanei*) в Іспанії, відловлених у 2021 році (Blanvillain et al., 2024). В цьому випадку *Paranannizziopsis* sp. викликав важкі чисельні ураження шкіри, і одна з тварин, імовірно, загинула з цієї причини. Ділянка ITS виявлених ізолятів найбільше відповідала послідовностям ITS ДНК *P. australasiensis*, розміщеним у GenBank. Секвенування гену циклооксигенази-3 (*cox3*) *Paranannizziopsis* spp. не мало належної роздільної здатності, тому ця послідовність виявилася на 99.9–100% ідентичною послідовностям, що належать *P. australasiensis*, *P. californiensis* та *P. tardicrescens*, розміщеним у GenBank. Таким чином, видову приналежність ізолятів *Paranannizziopsis* spp. з Європи не вдалося визначити точно.

Регіон походження грибів роду *Paranannizziopsis* залишається нез'ясованим. Згідно з Lorch et al., 2023, зареєстровані випадки інфікування *P. australasiensis* в Австралазії були викликані ізолятами, що належать до однієї клональної лінії. Навпаки, ізоляти *P. australasiensis* із США були більш генетично різноманітними, і жоден не був ідентичним один одному за всіма дослідженими локусами, що може свідчити про присутність там патогену протягом тривалого часу. Іншою гіпотезою є те, що *Paranannizziopsis* spp. був інтродукований до Північної Америки з іншої частини світу неодноразово завдяки зростанню частоти імпорту рептилій.

1.9. Вплив гриба *Batrachochytrium dendrobatidis* на популяції амфібій у світі та фактори його поширеності в Україні

Гриб *Batrachochytrium dendrobatidis* Longcore, Pessier & D.K. Nichols (1999) — єдиний відомий представник родини *Batrachochytriaceae* типу *Chytridiomycota* (Doweld, 2013), що є етіологічним збудником хітрідіомікозу (захворювання, що уражує всі ряди земноводних). *B. dendrobatidis* є кератинофільним грибом, що порушує осморегуляторну функцію шкіри дорослих амфібій, призводячи до дисбалансу електролітів і, в деяких випадках, до смерті внаслідок асистолічної зупинки серця. (Sewell et al., 2021). Джгутикові зооспори *B. dendrobatidis* переміщуються у воді, шукаючи земноводних за допомогою хемотаксису. Після прикріплення, ростова трубка зооспори проникає всередину клітин, де пізніше розвиваються зооспорангії. Після дозрівання, зооспорангії відкриваються у середовище, вивільнюючи нове покоління зооспор та замикаючи життєвий цикл (Sewell et al., 2021). Симптоми хітрідіомікозу включають депігментацію або почервоніння шкіри, появу виразок, ерозій та некрозів, млявість, анорексію, периферичну еритему (Grogan et al., 2018, Piotrowski et al., 2004). У пуголовків *B. dendrobatidis* уражує ротовий апарат, зрідка призводячи до порушення харчової поведінки та пов'язаної з цим смертності (Grogan et al., 2018).

Виділений та описаний у 1999 році з дереволазу блакитного (*Dendrobates tinctorius azureus*), померлого внаслідок розвитку дерматомікозу в зоопарку Вашингтона, США, цей гриб виявився причиною різкого скорочення популяцій та вимирання видів амфібій по всьому світу (Fisher et al., 2009). Вважається, що п'ять генетичних ліній *B. dendrobatidis* виникли в Східній Азії протягом минулого століття та розповсюдилися світом внаслідок глобальної торгівлі амфібіями, що призвело до складного філогеографічного розподілу.

Особливо драматичними наслідки панзоотії хітрідіомікозу були для природніх популяцій амфібій у Центральній та Південній Америці, де скорочення популяцій на більш ніж 90% зазнали десятки видів (Fisher & Garner, 2020). Наразі доведена роль хітрідіомікозу у скороченні популяцій щонайменше 501 виду амфібій за останні півстоліття, включаючи вимирання 90 видів (Scheele et al., 2019). Негативні наслідки хітрідіомікозу досягли максимуму в 1980-х роках, і лише 12% уражений видів демонструють ознаки відновлення, тоді як популяції 39% видів продовжують скорочуватися (Scheele et al., 2019). В той самий час, для деяких видів амфібій *B. dendrobatidis* не становить значної загрози (Fisher & Garner, 2020). Значна частина такої мінливості пояснюється факторами, асоційованими з організмом-хазяїном, такими як індивідуальна імунна відповідь, мікробіом шкіри, історія життя та поведінка (Lips, 2016, Pabijan et al. 2020), а також генотипом і фенотипом інфікуючого штаму *B. dendrobatidis* (O’Hanlon et al., 2018). Фактори навколишнього середовища, такі як висота над рівнем моря та сезонні коливання температури й опадів, в основному впливають на географічний розподіл гриба (Rödger et al., 2009, Liu et al., 2013, Olson et al., 2013), у той час як дрібномасштабні кліматичні градієнти, а також землекористування та властивості водної системи серед інших факторів впливають на місцеву динаміку патоген-хазяїн (Kriger & Hero, 2007a, Gervasi et al., 2017, Palomar et al., 2021). Континентальність, що в даному випадку визначається як річний діапазон температур, має особливо сильний параболічний зв’язок із придатністю середовища для існування *B. dendrobatidis* (Tytar et al., 2023). Згідно з моделлю Tytar et al., 2023, в Україні найбільш придатними регіонами для поширення цього патогену є захід та північний захід – Карпатські гори та їх передгір’я або низинні форми рельєфу, переважно покриті лісом. Центральні та східні регіони України з більш континентальним кліматом

мають низьку придатність середовища існування для *B. dendrobatidis*, що свідчить про те, що ці території можуть функціонувати як екологічні рефугіуми для земноводних, сприяючи збереженню здорових популяцій амфібій.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Збір матеріалу

Відлов змій проводився у 2020–2024 рр. у восьми областях України та 11 країнах Європи (Blanvillain et al., 2024) за допомогою маршрутного методу, керуючись наявними знаннями про присутність тварин на тій чи іншій території або обираючи для пошуку потенційні середовища існування. Відразу після відлову змій поміщали в окремі тканинні мішки для тимчасового утримання перед вимірюванням та відбором проб. Щоб уникнути перенесення патогену від однієї змії до іншої, під час збору зразків використовували стерильні інструменти та дотримувались асептичних процедур, включаючи зміну одноразових рукавичок і стерилізацію спорядження етиловим спиртом після кожної змії. Для кожної спійманої змії було зафіксовано інформацію щодо виду змії, наявності ознак захворювання, часу та місця вилову (місяць та рік, широта та довгота, назва локації за найближчими географічними орієнтирами, область), а також за можливості стать, поведінка змії, поверхнева та клоакальна температура, морфометричні дані (довжина від морди до клоаки, довжина хвоста, вага). Для підтвердження присутності патогенних грибів були відібрані мазки з використанням поліестерових тампонів, змочених стерильною водою, якими п'ять разів проводили по вентральній та дорсальній поверхнях тіла змії, а також два рази по області голови та очей. Від кожної змії було відібрано по два зразки. Якщо спостерігалось ураження шкіри, окремим тампоном проводили по ураженню і шкірі, що безпосередньо прилягає до нього, докладаючи зусилля. Наконечники тампонів, що безпосередньо торкалися поверхні шкіри змії, окремо зберігалися в стерильних пластикових пробірках при температурі від -4°C до -20°C до подальшого аналізу.

В одному випадку відбирали зразок шкіри для виділення в чисту культуру патогену, що викликав ураження шкіри гадюки Нікольського. Уражену ділянку ретельно протерли етанолом для усунення поверхневого забруднення. Край ураженої лусочки відрізали стерильними ножицями та помістили в суху стерильну пробірку. В подальшому відібраний зразок шкіри помістили на агаризоване середовище Сабуро та культивували при температурі 25°C.

Протоколи відлову та відбору зразків змій були попередньо погоджені Комітетом з догляду та використання тварин Політехнічного інституту штату Вірджинія, США (протокол 20-055 від 20.03.2020, Додаток Е).

Зразки амфібій збирали в 36 населених пунктах по всій Україні у 2017, 2020 та 2021 роках (Jakóbič et al., 2024). Від кожної особини відбирали мазки шкіри за допомогою стерильних поліестерових тампонів за методикою Nyatt et al., 2007, а також зразки тканин шляхом відрізання фаланги пальця; в окремих випадках обидва типи зразків відбирали у тих самих особин. Зразки тканин амфібій зберігали в 95% спирті, тоді як поліестерові тампони зберігали або сухими, або в 95% спирті до подальшого аналізу. Методи відбору зразків мали на меті мінімізувати страждання тварин відповідно до директиви 2010/63/EU Європейського союзу із захисту тварин, що використовуються для наукових досліджень (OJ L 276, 20.10.2010) та закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Відбір зразків з музейних препаратів змій проводили у Державному музеї природи Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Для попереднього перегляду обирали зафіксовані у етанолі препарати. Пріоритет надавався видам, що належать до родини *Colubridae*. Екземпляри оцінювали візуально на предмет наявності уражень шкіри, звертаючи особливу увагу на вентральну сторону тіла (див. Додаток Б). Від препаратів з ураженнями відбирали зразки шкіри та прилеглих тканин. Для цього, дотримуючись

асептичних технік та використовуючи стерильні інструменти, препарати діставали з банки, робили фото ураження, та ножицями або скальпелем обережно відрізали шматочок ураженої тканини розміром до 5 мм х 5 мм. Тканини поміщали у пробірки типу Eppendorf об'ємом 2 мл з 0,5 мл 70% етанолу. Зразки зберігалися за кімнатної температури до проведення подальшого аналізу.

2.2. Оцінка успішності утримання змій в неволі як консерваційного заходу

2.2.1 Транслокація популяції *Natrix tessellata* у Відні, Австрія

У липні 2010 року співробітниками Австрійського герпетологічного товариства було вилучено популяцію водяних вужів (*N. tessellata*) з їхнього природного середовища існування в гавані Альберн у зв'язку з будівельними роботами. Змій планувалося випустити на прилеглій природоохоронній території після завершення робіт навесні або влітку 2011 року. Відлов проводили вручну, після чого змії утримувалися у зоопарку Шенбрюнна. По прибутті було здійснено фізичний огляд усіх особин, і майже всі змії продемонстрували нормальну поведінку (одна особина виглядала млявою). Змій розділили на групи по 3–4 тварини та помістили в скляні тераріуми, які містили укриття та воду, в приміщенні, де рептилії ніколи раніше не утримувалися. Особину, яка виглядала млявою, утримували окремо. Корм у вигляді живої та мертвої риби пропонувався зміям щоденно. Пізніше змій перемістили у дерев'яні вуличні загони (120 см х 100 см х 79 см), що були обладнані укриттями та резервуарами з живою рибою. Після загибелі декількох особин, патологоанатомічні дослідження підтвердили наявність бактерій (зокрема родів *Salmonella* та *Aeromonas*) та ендопаразитів, у зв'язку з

чим було застосоване лікування у вигляді оприскування поверхні шкіри змій препаратом Borgal 24% (40 мг триметоприму та 200 мг сульфадоксину на мл), розведеному у фізіологічному розчині. Додатково було впроваджене лікування Байтрилом (енрофлоксацин) щоденно у кількості 1 мг на 100 г ваги. Стан змій коливався, але загальне погіршення зрештою призвело до 100% смертності на початку січня 2011 року. Усі тварини були передані до герпетологічної колекції Музею природознавства у Відні, де їх зберігали в 75% етанолі в двох окремих банках ($n_1 = 12$, $n_2 = 8$).

Зразки для встановлення причини смертності змій були відібрані Gaelle Blanvillain у 2021 році. Змій з першої банки ($n = 7$) промивали 75% етанолом та оцінювали на наявність уражень шкіри. Невеликий зразок тканини (5 мм x 5 мм) був відібраний за допомогою стерильних ножиць і поміщений в пробірку з 75% етанолом. Із другої банки як зразки тканин, так і мазки шкіри були відібрані з усіх восьми змій. Зразки зберігали в стерильних пробірках при -20°C до проведення аналізу.

ДНК зі зразків була виділена за допомогою набору Qiagen Blood and Tissue (див. розділ 2.3.1). Наявність ДНК *O. ophidiicola* у зразках визначали за допомогою аналізу кПЛР з використанням QuantiFast Master Mix (див. розділ 2.3.2).

2.2.2. Транслокація популяції *Natrix taurica* у Безансоні, Франція

З квітня по липень 2021 р. у східній Франції співробітниками Французької ліги захисту птахів та волонтерами було проведено природоохоронний захід, що мав на меті тимчасове утримання змій виду *N. taurica* в неволі на час проведення будівельних робіт у природному оселищі. Змій було відловлено за допомогою маршрутного методу, а також розміщення штучних укриттів (Michon and Cheveau, 2021). Після відлову визначали довжину тіла, вагу та

стать кожної змії. Була проведена діагностика паразитарних інфекцій з подальшим лікуванням за потреби. Змій розміщували групами по 3–15 особин у загонах, що склалися з 3–4 резервуарів ($d = 1,7$ м, $h = 60$ см), з'єднаних трубами ПВХ та обладнаних водним резервуаром з живою рибою. Кожен наземний резервуар включав укриття, питну воду, нагрівальну лампу та затінок. Змій діагностували на наявність *O. ophidiicola* за допомогою кПЛР, після чого позитивних розміщували окремо. Мазки шкіри відбирали стандартним методом протягом 5–60 днів після відлову, а також за 2 тижні до моменту випуску.

ДНК зі зразків була виділена за допомогою реагенту PrepMan Ultra (див. розділ 2.3.1). Наявність ДНК *O. ophidiicola* у зразках визначали за допомогою аналізу кПЛР з використанням QuantiFast Master Mix (див. розділ 2.3.2). Крім того, була виділена чиста культура *O. ophidiicola* з лінки шкіри однієї з особин з ураженнями. Для цього зразок ураженої шкіри подрібнювали та ресуспендували у стерильній воді, готували серію 10-кратних розведень, сіяли на середовище для тестування дерматофітів (DTM) та інкубували при 28°C. Приналежність отриманих чистих культур до виду *O. ophidiicola* визначали за кПЛР.

2.3 Молекулярний аналіз

2.3.1 Виділення ДНК

Для виділення ДНК з мазків шкіри змій та амфібій з природи, а також зі зразків тканин препаратів з Музею Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна, використовували 250 мкл реагенту PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems, Каліфорнія, США) з додаванням 100 мг кульок цирконію/кремнезему, дотримуючись протоколів Hyatt et al. (2007).

Коротко, зразки поміщали в пробірки з реагентом та кульками та піддавали гомогенізації протягом 45 с. Далі зразки центрифугували 30 с. за 13000 g, повторювали гомогенізацію та центрифугування та надалі інкубували за 100°C протягом 10 хв. Після охолодження зразків та центрифугування протягом 3 хв. за 13000 g відбирали супернатант та зберігали за –80°C до подальшого аналізу.

ДНК з мазків і тканин препаратів, що зберігалися в колекції Музею природознавства у Відні, а також зі зразків тканин амфібій, виділяли за допомогою набору Qiagen Blood and Tissue (Qiagen, Venlo, Нідерланди) відповідно до інструкцій виробника. Виділення ДНК зі зразків змії включало додатковий попередній етап руйнування клітинних стінок гриба літіказою (200U) протягом 30 хвилин за 30°C. Для зразків амфібій інкубацію з протеїназою К проводили при 70°C замість 56°C, передбачених протоколом виробника. Зразки ДНК з амфібій розводили дистильованою водою у 5–10 разів перед проведенням подальшого аналізу.

ДНК з культури гриба, виділеного з ураження шкіри гадюки Нікольського, виділяли за допомогою набору Neo-Prep100 DNA plant DNA (Neogene, Україна) згідно з протоколом виробника.

2.3.2. кПЛР, ПЛР, електрофорез

Виділену ДНК перевіряли на наявність послідовностей ITS *O. ophidiicola* за допомогою аналізу кПЛР у реальному часі з використанням специфічних праймерів (Bohuski et al. 2015). QuantiFast Master Mix (QuantiFast Probe PCR + ROX vial kit, Qiagen, Germantown, USA) готували відповідно до рекомендацій виробника для кінцевого реакційного об'єму 25 мкл, що включав 5 мкл виділеної ДНК. Умови циклу були наступними: 95°C протягом 3 хвилин, далі 95°C протягом 3 секунд і 60°C протягом 30 секунд, загалом 40 циклів.

У рамках дослідження розповсюдженості *Paranannizziopsis* spp. у Європі, було проаналізовано зразки ДНК змій, отримані в ході дослідження Blanvillain et al., 2024. Для цього проводили кПЛР у реальному часі з використанням специфічних праймерів до ділянки ITS грибів цього роду (Lorch et al., 2023). Ампліфікацію проводили за допомогою QuantiNova Master Mix (QuantiNova Probe PCR + ROX Reference Dye, Qiagen, MD, USA) який готували відповідно до рекомендацій виробника для кінцевого реакційного об'єму 20 мкл, включаючи 5 мкл виділеної ДНК. Умови циклу були наступними: 95°C протягом 2 хвилин, далі 95°C протягом 5 секунд та 60°C протягом 5 секунд, загалом 40 циклів.

Для визначення наявності ДНК *B. dendrobatidis* у зразках з амфібій проводили кПЛР за протоколом Boyle et al., 2004, використовуючи праймери ITS1-3 Chytr / 5.8S Chytr та зонд Chytr MGB2 (детальніше у Jakóbič et al., 2024).

Всі кПЛР проводили за допомогою ампліфікатора QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific, MA, США). У кожну реакцію, що включала до 77 зразків, були додані негативний контроль (вода замість виділеної ДНК) та позитивний контроль у вигляді 6 стандартних розведень синтетичної ДНК ділянки ITS досліджуваного гриба (кожне розведення в трьох повторностях): 10^2 , 10^1 , 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} фг/мкл. У випадках аналізування більш ніж одного зразка з однієї особини присутність патогенного гриба вважалася підтвердженою, якщо хоча б один зразок був позитивним за кПЛР.

Для ДНК, виділеної з культури гриба, що спричинив ураження шкіри гадюки Нікольського, ділянки геному ITS та LSU були ампліфіковані за допомогою DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific) з використанням пар праймерів ITS1/ITS4 та LROR/LR5 відповідно, умови реакцій стандартні (White et al., 1990, Rehner and Samuels, 1994). Реакційний об'єм складався з 6,25 мкл DreamTaq Green PCR Master Mix (2X), 0,5 мкл

суміші розчинів прямого та зворотного праймерів в рівних частках, 2 мкл ДНК та був доведений до 12,5 мкл водою. Результати реакції візуалізували за допомогою електрофорезу 2 мкл продуктів ПЛР в агарозному гелі з додаванням етидіум броміду.

Для визначення видової приналежності представників роду *Pelophylax* було застосовано ампліфікацію інтрона 1 ядерного сироваткового альбуміну (SAI-1), описану Hauswaldt et al. (2012). Продукти ампліфікації відрізняються за розміром для *P. lessonae*, *P. ridibundus* і *P. cf bedriagae*, і тому дозволяють розрізнити як ці таксони, так і їхні гібриди. Візуалізацію продуктів ПЛР проводили у агарозному гелі з додаванням Midori Green.

2.3.3 Секвенування послідовностей ДНК

Сумісно з Jeffery Lorch та Gaelle Blanvillain, було встановлено приналежність позитивних на *O. ophidiicola* зразків, зібраних зі змії в Україні, до раніше встановлених генотипів (Ladner et al., 2022). Для цього проводили ампліфікацію ділянки ITS2 з використанням праймерів ITS3 та ITS453 (Blanvillain et al., 2024). Продукти ПЛР секвенували в обох напрямках за допомогою методу Сенгера з праймерами ITS3 та Oo-rt-ITS-R. Індивідуальні послідовності ITS2 були віднесені до генотипів. Послідовності зі 100% ідентичністю в регіоні ITS2 *O. ophidiicola* вважалися однаковим генотипом; будь-яка послідовність, що відрізнялася від іншої принаймні однією парою нуклеотидів, була класифікована як унікальний генотип. Цей метод було також застосовано для генотипування 4 зразків ДНК *O. ophidiicola* з тканин *N. tessellata*, отриманих з Музею природознавства у Відні. Крім того, для цих зразків було ампліфіковано та секвеновано частину гена фактора елонгації транскрипції 1- α (*tef*) відповідно до раніше опублікованого протоколу Franklinos et al. (2017). ДНК чистої культури *O. ophidiicola*, отриманої з лінки

шкіри змії, що утримувалася в Безансоні, Франція, генотипували як описано вище, за винятком того, що ділянку ITS секвенували повністю (Lorch et al., 2016).

Продукти ПЛР, отримані від гриба, що інфікував гадюку Нікольського, секвенували за Сенгером в лабораторії Macrogen, Нідерланди. Отримані послідовності нуклеотидів редагували відповідно до хроматограм і після обрізання неякісних початкових і кінцевих фрагментів завантажили в GenBank (номери доступу OQ346203, OQ346204). Подібні послідовності шукали серед еталонних у базі даних GenBank за допомогою алгоритму BLAST.

2.4. Визначення швидкості росту колоній гриба

Для порівняння показників росту ізолятів *O. ophidiicola* використовували класичне визначення лінійного росту за допомогою вимірювання діаметру колоній (Дудка, 1982).

Для отримання суспензій життєздатних спор, 8 ізолятів *O. ophidiicola* сіяли у чашки Петрі ($d = 90$ мм) на агаризоване поживне середовище Сабуро (5 г пептону, 5 г казеїну, 40 г декстрози, 15 г агар-агару на літр середовища) шляхом інокуляції 100 мкл спорової суспензії та розподілення її по всій поверхні середовища за допомогою стерильної бактеріальної петлі. Чашки Петрі з чистою культурою восьми штамів *O. ophidiicola* інкубували за 27°C протягом 20 днів. Температура 27°C була обрана тому, що вона лежить в оптимальному діапазоні для гриба (Allender et al., 2015) та збігається з середньою температурою тіла, що підтримується зміями (Brattstrom, 1965). Для приготування суспензії конідій *O. ophidiicola* у буферному розчині PBS з додаванням 0,5% Tween 20, 20 мл буферу виливали у чашку Петрі на спорулюючу культуру та обережно зіскрібали за допомогою стерильної бактеріальної петлі, після чого автоматичним дозатором збирали отриману

суспензію у стерильну пробірку. Отриману суспензію розводили у 10 разів у 0,5% PBS–Tween 20, щоб позбутися скупчень гіф.

Для визначення концентрації конідій в отриманій суспензії використовували результати раніше проведеного експерименту, у якому визначали залежність оптичної густини культури від концентрації спор, передбачену лінійною моделлю у програмному середовищі R (Рис 2.1).

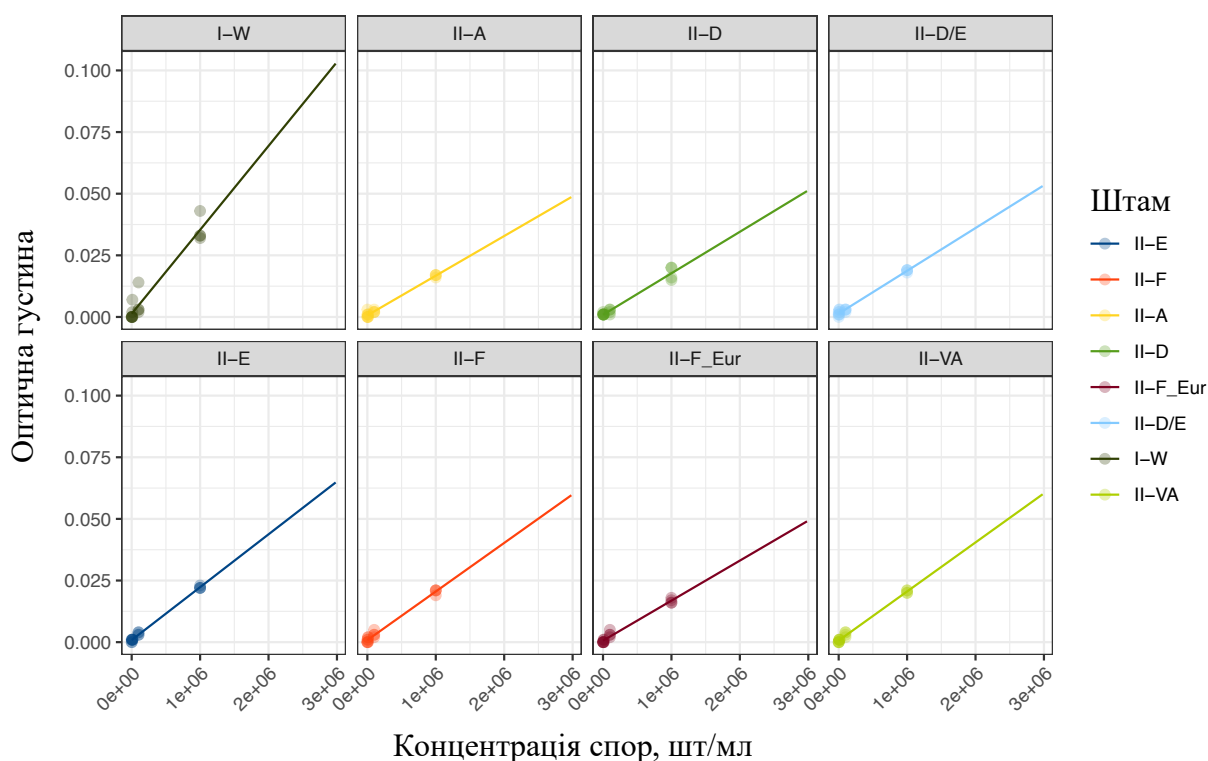


Рис 2.1. Оптична густина суспензії спор восьми штамів *Ophidiomyces ophidiicola* в залежності від їх концентрацій. Точки представляють виміри, прямі – лінії регресії, побудовані за допомогою лінійної моделі.

Оптичну гуστину вимірювали за довжини хвилі 405 нм, що була рекомендована Meletiadis et al., 2001 як оптимальне значення. Крім того, за результатами пілотного експерименту з вимірювання оптичної густини різних концентрацій суспензії конідій *O.ophidiicola* за довжин хвилі 405 нм, 450 нм,

490 нм, 540 нм та 570 нм, вимірювання оптичної густини за довжини хвилі 405 нм має найбільшу розділову здатність для *O. ophidiicola*. Отримані суспензії розводили до необхідних концентрацій для посіву на поживне середовище.

Для визначення життєздатності конідій проводили посів на поживне середовище та підрахунок колонієутворюючих одиниць після 10 днів інкубації за 27°C. Вихідну суспензію розводили до концентрації $2,4 \times 10^4$ життєздатних спор/мл у 0,5% PBS–Tween 20. Отриманою суспензією в кількості 5 мкл інокулювати дві чашки Петрі з агаризованим поживним середовищем Сабуро, кожен у трьох рівновіддалених місцях. Таким чином, для кожного ізоляту гриба колонії сіяли у шести повторностях. Чашки Петрі інкубували при 27°C протягом 15 днів. Кожні 24 години після перших 42 годин заміряли два взаємоперпендикулярні діаметри кожної колонії.

2.5 Оцінка проростання конідій за впливу різних температур

Дослідження включало п'ятнадцять ізолятів гриба *O. ophidiicola*, отриманих із загальнодоступних колекцій культур, що зберігаються в Національному центрі здоров'я дикої природи Геологічної служби США. Ізоляти були зібрані протягом 2012–2022 років від змій природніх популяцій у 12 штатах східної частини США (Додаток Д). Десять ізолятів належали до чотирьох нерекомбінантних клональних ліній: II-A (n=1), II-D (n=6), II-E (n=2), II-F (n=1). П'ять ізолятів були представниками рекомбінантних штамів, один II-D/E та чотири II-D/F (включаючи II-VA, ізоляти генотипу II-D/F, що спричинили смертність змій у Вірджинії). Літери, розділені скісною рисою, вказують на генетичні ознаки відповідних нерекомбінантних ліній, присутніх у цих рекомбінантах.

Культури ізолятів (2×10^7 конідій/мл) зберігали у фосфатно-сольовому буфері (1x PBS) з додаванням 0,5% Tween20 та 20% гліцерину за –80°C. Після

розморожування 100 мкл конідіальної суспензії сіяли у стерильні пластикові чашки Петрі на поживне середовище Сабуро (5 г пептону, 5 г казеїну, 40 г декстрази, 15 г агару на 1 л середовища). Чашки Петрі інкубували протягом 16 днів при 25°C для отримання спорулюючих культур.

Для приготування суспензії конідій кожної культури у чашку додавали 20 мл рідкого поживного середовища Сабуро (5 г пептону, 5 г казеїну, 20 г декстрази на 1 л середовища) та обережно зіскрібали за допомогою стерильної бактеріальної петлі. Отриману суспензію збирали дозатором і розбавляли тим самим середовищем у десять разів для видалення гіф. Остаточне розведення до концентрації $\sim 1 \times 10^6$ конідій/мл проводили за результатами пілотного експерименту, який визначав залежність між концентрацією конідій *O. ophidiicola* та оптичною густиною суспензії (див. Розділ 2.4). Отриману суспензію конідій розливали по 1 мл у 20 пробірок. Пробірки піддавали впливу різних температур (5°C [холодовий шок], 25°C і 30°C [контроль], 35°C [тепловий шок]) протягом 3 годин відразу після приготування суспензії. Потім усі пробірки інкубували при 25°C протягом 24 годин.

Після інкубації 10 мкл суспензії конідій з кожної пробірки переглядали під мікроскопом Olympus CH-2 (окуляр CWHK 10x/18L, об'єктив E A40 160/0.17). Кожну окрему конідію враховували та позначали як пророслу або непророслу на основі наявності помітної зародкової трубки. Підрахунок продовжували, поки не було враховано 100 конідій у кожній повторності. Відсоток проростання визначали як відношення пророслих конідій, що спостерігалися за допомогою мікроскопії, до загальної кількості підрахованих конідій.

2.6 Методи експериментального інфікування змій патогенним грибом *Ophidiomyces ophidiicola*

2.6.1 Утримання змій в лабораторії

Для експерименту було взято 120 виведених у неволі майсових полозів (*Pantherophis guttatus*) віком 4–17 місяців. Перед початком експерименту для кожної змії реєстрували стать, масу тіла, довжину від морди до клоаки, довжину хвоста, а також брали стандартні мазки шкіри для визначення присутності *O. ophidiicola* методом кПЛР. Кожну особину утримували окремо у пластикових контейнерах (45,7 см x 19 см x 8,9 см), обладнаних укриттям та резервуаром з питною водою, за постійної температури 27°C та 60% вологості, з циклом 12 годин світла та 12 годин темряви. Поведінку змій та стадію линьки реєстрували кожного дня, а годування розмороженими мишами проводили раз на тиждень. Перед інокуляцією патогеном було проведено двотижневий період адаптації змій до нових умов утримання.

2.6.2 Інокуляція змій патогенним грибом

Для експериментального зараження було відібрано сім штамів *O. ophidiicola*. Три штами були виділені зі змій природніх популяцій у Європі: один з кладу I і два з кладу II. Чотири штами походили зі США, з них три представляли чисті клональні лінії, а один був рекомбінантним. Суспензію конідій для інокуляції готували методом, описаним у розділі 2.4., за винятком того, що інкубація культур здійснювалася протягом 12–16 днів при 25°C. Концентрація суспензій була визначена за допомогою підрахунку спор на гемоцитометрі та доведена до 2×10^7 конідій/мл. Перед інокуляцією суспензії зберігали за –80°C з додаванням 15% гліцерину.

Кожним штамом було інфіковано 15 змій, ще 15 особин складали контрольну групу (інокуляція стерильним розчином PBST). Змій інфікували у двох місцях вентральної поверхні тіла та у двох місцях дорсальної

поверхні. У трьох місцях перед інокуляцією приблизно 1 см² поверхні шкіри змії зтирали дрібнозернистим наждачним папером, одну ділянку на вентральній стороні тіла інокулювали без пошкодження шкіри. Для інокуляції використовували 20 мл суспензії конідій.

2.6.3 Методи відбору зразків

Для оцінки наявності та динаміки захворювання, щотижня відбирали стандартні мазки шкіри (див. розділ 2.1), з кожного місця інокуляції окремо. Крім того, реєстрували поведінку змії та, в разі наявності уражень, оцінювали їх важкість за шкалою від 0 до 4 (Табл. 2.1.). Критерії оцінки відрізнялися для гострої запальної реакції, що спостерігалася протягом перших двох тижнів після інокуляції змії патогеном, та етапу загоєння уражень та переходу захворювання у хронічний стан протягом наступних тижнів експерименту.

Таблиця 2.1

Критерії оцінки тяжкості уражень шкіри, спричинених офідіомікозом

Бал важкості ураження	Перший та другий тиждень після інокуляції	Третій – сьомий тижні після інокуляції
0	Ознаки інфекції відсутні, допускаються легкі подряпини від затирання наждачним папером	Ознаки інфекції відсутні, допускаються легкі подряпини від затирання наждачним папером
1	Легкі ознаки запалення (<0,5 см завдовжки), кілька піднятих лусочок на дорсальній стороні	Кілька деформованих та/або знебарвлених лусочок
2	Вентральна сторона: середній набряк на більшій частині площі інокуляції. Дорсальна сторона: кілька піднятих	Вентральна сторона: світло-коричневе забарвлення лусок та/або сильно деформовані луски. Дорсальна сторона: знебарвлені

	запалених лусочок на більшій частині площі інокуляції	лусочки (темні/чорнуваті) на більшій частині інокульованого місця
3	Наявність везикул заповнених гноем або рідиною, сильний набряк	Вентральна сторона: наявність ділянок некрозу темно-коричневого кольору, але $<0,5 \text{ см}^2$. Дорсальна сторона: зажила шкіра з відсутністю пігментації на більшості площі інокуляції
4		Вентральна сторона: наявність ділянок некрозу темно-коричневого кольору $> 0,5 \text{ см}^2$. Дорсальна сторона: наявність кірок

Якщо в контейнері була присутня скинута шкіра, з неї також брали мазки для порівняння патогенного навантаження «до» та «після» процесу линьки. Для забезпечення стерильності після взяття зразків з кожної змії змінювали рукавички та стерилізували інструменти та робочі поверхні за допомогою 70% етанолу.

2.6.4 Евтаназія

Критерії для евтаназії включали сильну млявість, відсутність реакції на дотики та відсутність тону. Евтаназію проводили шляхом інгаляції надмірної дози анестетика (5% ізофлурану) протягом 5 хвилин з наступною декапітацією за умови відсутності рефлексів. Усіх змій, крім семи, піддали евтаназії через 49 днів після зараження.

Усі процедури поводження з тваринами були попередньо узгоджені з Комітетом з догляду та використання тварин Політехнічного інституту штату Вірджинія, США, протокол 20-055 від 20.03.2020 (Додаток Е).

2.7 Статистичний аналіз

Статистичний аналіз проводили у програмному середовищі R версії 4.4.2 (R Core Team, 2022). Моделі змішаних ефектів конструювали з використанням пакету glmmTMB (Brooks et al., 2017).

Поширеність *O. ophidiicola* та *Paranannizziopsis* spp. серед різних видів змій визначали за допомогою побудови байєсівської моделі, створеної в обчислювальній системі Stan (<http://mc-stan.org/>), доступ до якої здійснюється за допомогою пакета «brms» у програмі R (Bürkner 2017). Щоб покращити збіжність і уникнути надмірної підгонки, ми вказали слабо інформативні пріоритети (нормальний розподіл із середнім значенням нуль і стандартним відхиленням п'ять). Байєсівський аналіз поширеності *O. ophidiicola* проводили із наступними параметрами: кількість поколінь – 4000, число паралельних ланцюгів – 4, параметр відпалу – 50%. Параметри для аналізу поширеності *Paranannizziopsis* spp. були наступними: кількість поколінь – 6000, число паралельних ланцюгів – 4, параметр відпалу – 50%, цільовий рівень прийняття для Гамільтонова методу Монте-Карло (НМС) – 0,99. В аналіз були включені лише види, розмір вибірки зразків з яких перевищує або рівний десяти. Мапу географічного розподілу зібраних зразків змій в Україні будували у програмі QGIS версія 3.32.2-Lima.

Успішність заходів, що були застосовані для покращення стану змій під час тимчасового утримання у Безансоні, Франція, оцінювали за допомоги порівняння вірогідності присутності ДНК *O. ophidiicola* у мазках шкіри змій на початку утримання в неволі та наприкінці. Для цього використовували лінійні моделі змішаних ефектів із статусом інфікування змій за кПЛР або наявністю уражень в якості залежних змінних (0|1, біноміальний розподіл), часом відбору зразка в якості предиктора та ідентифікатором змій у якості

випадкового ефекту. Крім того, розраховували різницю у вазі змій під час вилову та після утримання. Для цього використовувалася аналогічна лінійна модель змішаних ефектів, за винятком використання нормального розподілу та ваги змій у якості змінної відповіді.

Для аналізу відмінностей у проростанні конідій (%) кожного ізоляту використовували узагальнену лінійну модель змішаних ефектів із біноміальним розподілом. У якості предиктора використовували ізолят, у якості змінної відповіді — статус проростання кожної окремої спори (0|1), а в якості випадкового ефекту — повторність (номер пробірки). Для визначення впливу різних температур на зміни у проростанні (%), статус проростання кожної конідії (0|1) моделювали як функцію предикторів ізоляту та температури, використовуючи узагальнену лінійну змішану модель із біноміальним розподілом. Для побудувати графіку відмінностей між ізолятами прогнозовані частки пророслих спор і 95% достовірні інтервали були відняті від базового рівня проростання (%) за 25°C, врахованого за допомогою першої моделі. Для визначення показника варіації проростання спор в межах генотипів, розраховували коефіцієнт Джині, масштабно-інваріантний показник, що коливається у межах від 0–1 (ідеальна рівномірність до абсолютної нерівномірності). Коефіцієнт Джині розраховували за допомогою пакета *ineq* (Zeileis, 2000).

Для аналізу відмінностей у рості культур різних штамів *O. ophidiicola* будували криві росту в середовищі R за допомогою функції *nls* та модифікованого рівняння Гомперца (Zwietering et al., 1990):

$$d(t) = A \exp \left(- \exp \left(\frac{\mu_e}{A} (\lambda - t) + 1 \right) \right), \text{ де} \quad (2.1)$$

A – асимптота або максимальне можливе значення діаметру колонії в даних умовах,

μ – константа, що характеризує максимальну швидкість росту колоній під час експоненційної фази росту,

λ – константа, що характеризує тривалість лаг-фази кривої росту,

t – момент часу (годин після інокуляції).

Параметри μ та λ порівнювали попарно за допомогою t -тесту.

Визначення відмінностей та змін у тяжкості захворювання в ході експериментального інфікування проводили за допомогою побудови моделей змішаних ефектів, де предикторами виступали штам патогену (або контрольна група) та тиждень експерименту, а залежними змінними — бал тяжкості уражень шкіри та кількість ДНК *O. ophidiicola*, визначена за допомогою кПЛР ДНК з мазків шкіри. Для більш точної інтерпретації даних у моделях вказували Пуассонівський розподіл залежної змінної. Різницю у тяжкості уражень між інфуванням за попередньої травматизації та без такої визначали за допомогою моделі змішаних ефектів із використанням розподілу Пуассона та ідентифікатором змії в якості випадкового ефекту. Відмінності у частоті ліньки між варіантами досліду визначали за допомогою лінійної моделі змішаних ефектів, де в якості залежної змінної використовувалася кількість днів між линяннями для кожної окремої змії. Крім того, за допомогою розрахування критерію Уїлкоксона (Манна-Уїтні) визначали, чи середня частота ліньки була вищою для змії, уражених штамами, що провокували тяжчі ураження. Перевірка значущості різниці між варіантами досліду проводилася за допомогою тесту χ^2 .

Поширеність *B. dendrobatidis* розраховувалася для локалітетів з принаймні десятима підтвердженими знахідками патогену, а також для найбільш численних таксонів (*Pelophylax* spp., *Bombina bombina* та

B. variegata) шляхом ділення кількості позитивних за кПЛР зразків на загальну кількість зразків у відповідній місцевості. Довірчі інтервали Клоппера-Пірсона розраховували за допомогою пакета PropCIs у програмному середовищі R (Scherer, 2018). Для перевірки наявності зв'язку між придатністю середовища та наявністю *B. dendrobatidis*, місця відбору проб були розділені на дві групи: 16 локалітетів на півночі та заході України з високою придатністю середовища ($0,68 \pm 0,091$) та 20 локалітетів у центральній, східній та південній частині України з низькою придатністю середовища для *B. dendrobatidis* ($0,25 \pm 0,146$). Наявність значущої різниці у поширеності патогену в двох групах локалітетів перевіряли за допомогою критерію Фішера. Крім того, за допомогою розрахування критерію Краскла-Уолліса визначали, чи значення придатності середовища для *B. dendrobatidis* були вищими в місцях виявлення патогену порівняно з місцями, де патогену виявлено не було (Jakóbk et al., 2024).

РОЗДІЛ 3. ПОШИРЕНІСТЬ ПАТОГЕННИХ ГРИБІВ *OPHIDIOMYCES* *OPHIDIICOLA* ТА *PARANANNIZZIOSIS* SPP. В УКРАЇНІ ТА ЄВРОПІ

3.1 Поширеність *Ophidiomyces ophidiicola* в Україні

Для отримання даних щодо розповсюдження *O. ophidiicola* на території України, а також щодо поширеності захворювання серед різних видів, було зібрано 156 зразків з 82 змій з природи, що відносяться до восьми видів: *Natrix natrix* (n = 11), *Natrix tessellata* (n = 5), *Vipera berus* (n = 38, включаючи *Vipera berus nikolskii*), *Vipera renardi* (n = 13), *Coronella austriaca* (n = 4), *Dolichophis caspius* (n = 4), *Elaphe sauromates* (n = 3), *Zamenis longissimus* (n = 4).

Присутність *Ophidiomyces ophidiicola* на території України була вперше зареєстрована у дослідженні Blanvillain et al., 2024 у двох популяціях звичайних вужів (*Natrix natrix*) в околицях м. Харків, Харківська область. Нами була виявлена ще одна знахідка патогену у однієї особини *Z. longissimus* у Львівській області.

З 82 обстежених змій, ураження шкіри важкістю від легких до середніх були присутні у дев'яти особин *N. natrix* (82% всіх виловлених особин цього виду), дев'яти особин *V. b. nikolskii* (26%), чотирьох особин *N. tessellata* (80%) та трьох особин *Z. longissimus* (43%). Загальна поширеність уражень серед всіх обстежених особин складала 30,5%.

В усіх дев'яти особин *N. natrix*, що мали ураження, методом кПЛР було підтверджено наявність *O. ophidiicola*. Натомість, жодна з особин *V. b. nikolskii* та *N. tessellata* з ураженнями не виявилася позитивною на офідіомікоз. З трьох особин *Z. longissimus* з ураженнями шкіри лише одна виявилася позитивною на *O. ophidiicola* за результатами кПЛР. Ця особина була здоровою на час вилову в червні 2022 року (за результатами огляду на симптоми офідіомікозу та кПЛР мазка шкіри), після чого утримувалася в неволі протягом восьми

місяців. За цей час в неї розвинулося ураження шкіри на дорсальній стороні тіла, походження якого від інфекції *O. ophidiicola* було пізніше підтверджено кПЛР. Ми припускаємо, що на момент вилову пропагули патогену були присутні на цій особині в малій кількості не провокуючи симптомів, а в умовах пригніченого стресом стану організму змії в неволі викликали одиночне ураження шкіри. Таким чином, лише 40% особин з ураженнями шкіри були носіями офідіомікозу (Табл. 3.1).

Таблиця 3.1

	Ураження відсутні	Ураження присутні
<i>O. ophidiicola</i> не підтверджений кПЛР	56 особин	15 особин
<i>O. ophidiicola</i> підтверджений кПЛР	1 особина	10 особин

З усіх інших змії, що не мали уражень шкіри, зразки лише з однієї особини виду *V. b. nikolskii* були позитивними на присутність *O. ophidiicola* за результатами кПЛР. Загалом, 11 з 82 особин виявилися носіями *O. ophidiicola* (13,4%; Рис. 3.1).

Поширеність офідіомікозу серед різних видів змії варіює. Прогнозована за допомогою байєсівського аналізу частка особин *N. natrix*, що є носіями офідіомікозу, становить 79,8% (95% достовірний інтервал 52,2% – 96,6%). Такий високий показник пояснюється тим, що більшість позитивних зразків була відібрана з однієї ураженої патогеном популяції, але тренд узгоджується з даними щодо поширеності *O. ophidiicola* в Європі. Згідно з Blanvillain et al., 2024, офідіомікоз має більшу поширеність серед видів роду *Natrix*, ніж серед інших родів, за винятком *Hierophis* і *Zamenis*. Це вказує на те, що види цих родів можуть бути більш чутливими до захворювання. Крім того, серед видів

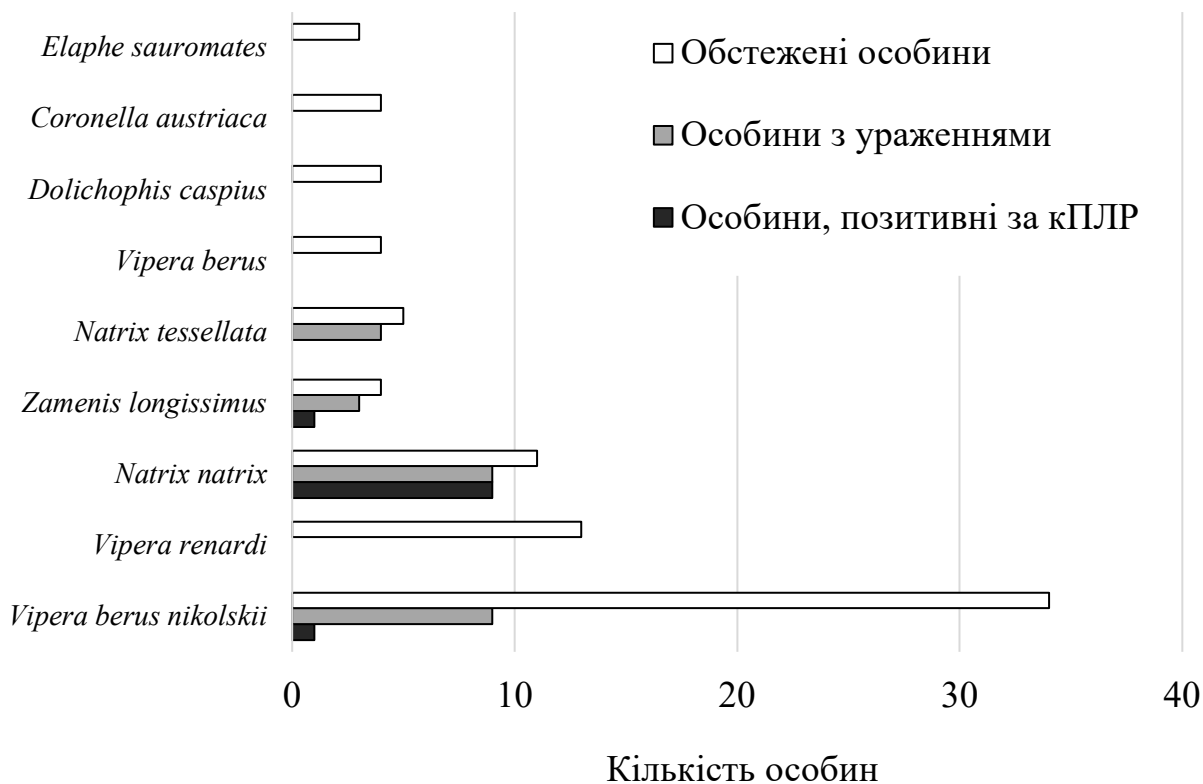


Рис 3.1. Кількість особин з ураженнями та переносників *O.ophidiicola* серед обстежених видів змій. Кількість особин з ураженнями та кількість особин, в яких присутність *O. ophidiicola* була підтверджена за результатами кПЛР, входить у загальну кількість обстежених особин

роду *Natrix* види *N. tessellata*, *N. helvetica* та *N. natrix* характеризуються більшою поширеністю офідіомікозу, ніж *N. astreptophora* і *N. maura*. Прогнозована поширеність *O. ophidiicola* серед інших досліджених видів змій в Україні наступна: *C. austriaca* – 2,4% (0% – 15,1%), *D. caspius* – 2,4% (0% – 21,6%), *E. sauromates* – 2,9% (0% – 26,1%), *N. tessellata* – 2,1% (0% – 18,1%), *V. berus* – 2,6% (0% – 22,6%), *V. b. nikolskii* – 3,3% (0,2% – 11,2%), *V. renardi* – 1,1% (0% – 8,5%), *Z. longissimus* – 22,5% (0,7% – 67,2%) (Рис. 3.2).

Поширеність *O. ophidiicola* варіює не лише серед різних видів змій, але й географічно (Рис. 3.3). Дослідження охоплювало територію Харківської,

наслідок, рідшим контактам патогену та хазяїна та меншій поширеності захворювання.

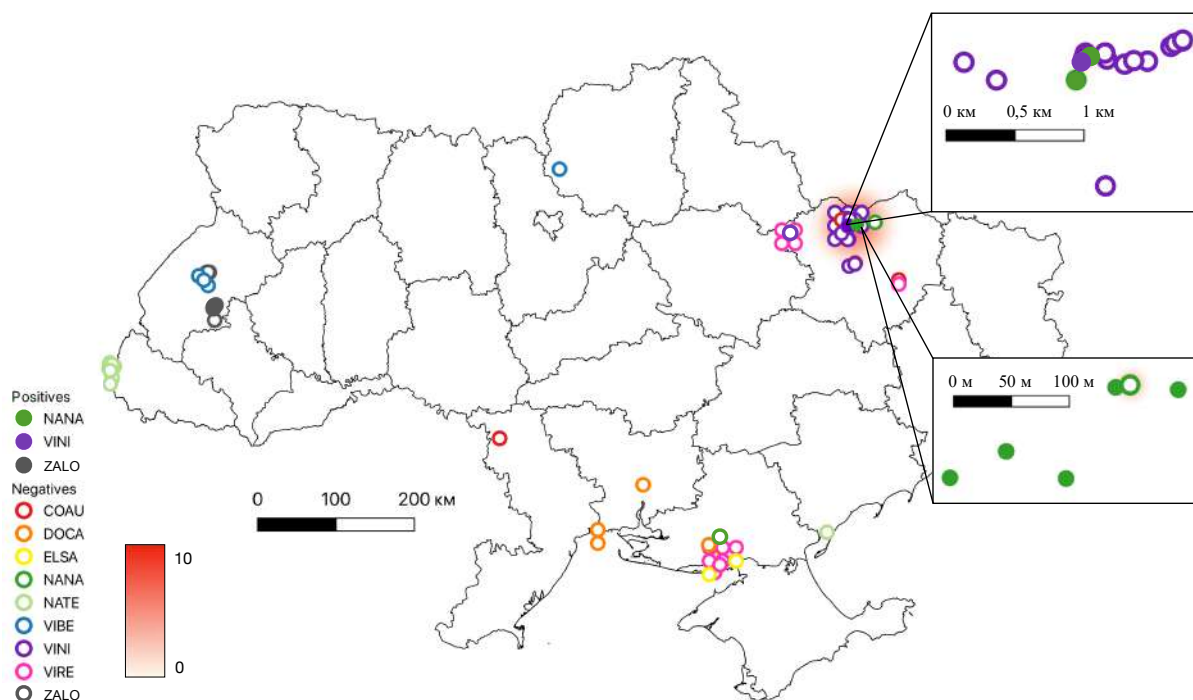


Рис 3.3. Просторовий розподіл місць збору зразків та виявлення *O. ophidiicola*. Точки знахідок були дещо зміщені для кращої видимості. Теплова карта показує місця найбільшого поширення патогену. Окремі панелі демонструють місця поширення *O. ophidiicola* в околицях м. Харків (верхня – с. П'ятихатки, нижня – В'ялівське водосховище)

Найбільша кількість зібраних зразків походила з Харківщини ($n = 49$). В цьому регіоні дослідженням були охоплені 80% видів змій, характерних для Харківської області: *N. natrix* ($n = 8$), *V. b. nikolskii* ($n = 32$), *V. renardi* ($n = 6$), *C. austriaca* ($n = 3$). Усі позитивні за кПЛР результати походили з двох локацій в околицях м. Харків.

Перша локація знаходиться на північній околиці м. Харків (с. П'ятихатки) на кордоні з Харківським лісопарком. Різноманіття змій на цій локації

представлено популяціями гадюк Нікольського та вужів звичайних (кількість зразків – 30, кількість позитивних на офідіомікоз за кПЛР зразків – 3). Окрім наявності популяції вужів, сприйнятливих до захворювання, ця локація характеризується значним впливом людської господарської діяльності, що є одним з факторів поширеності *O. ophidiicola*. Домогосподарства приватного сектора виробляють органічні відходи, забруднюючи середовище, що може пригнічувати імунну систему змій, впливати на мікробіом і бар'єрні властивості шкіри і т. п.

На другій локації, що розташовується в околицях В'ялівського водосховища, Харківська область, була опрацьована популяція вужів звичайних (кількість зразків – 6, кількість позитивних на офідіомікоз за кПЛР зразків – 5). Водосховище представляє собою штучну водойму, оточену полями та будинками. Використання пестицидів на прилеглих полях, а також близькість до людей провокує стрес, що може сприяти розвитку захворювання (Wagner et al., 2015, Joudrier et al., 2024). Забруднення і інші властивості води з водосховища гіпотетично також можуть пояснювати наявність офідіомікозу у напівводних змій таким саме чином як і у попередньому випадку.

Ми також проаналізували поширеність *O. ophidiicola* залежно від місяця вилову змій. Зразки, що виявилися позитивними на *O. ophidiicola* за кПЛР, були зібрані протягом травня – серпня 2020–2021 років. Найвищий відсоток особин, позитивних на *O. ophidiicola* за кПЛР, спостерігався в червні (21,8%, 7,9% – 40,5%). Поширеність *O. ophidiicola* у червні була вищою за поширеність у квітні та вересні, але не в інші теплі місяці. Відсоток заражених особин був найнижчим у квітні та восени (Рис. 3.4). На такий результат найбільшою мірою вплинув той факт, що всі п'ять особин з В'ялівського водосховища, що були носіями патогену, були виловлені в один і той самий час в червні 2020 року, тому виявлена сезонність захворювання потребує

уточнення у подальших дослідженнях. Щодо особин з ураженнями шкіри, найбільший їх відсоток спостерігався у травні (55%, 5 з 9 особин), що збігається з результатами Allain et al., 2024.

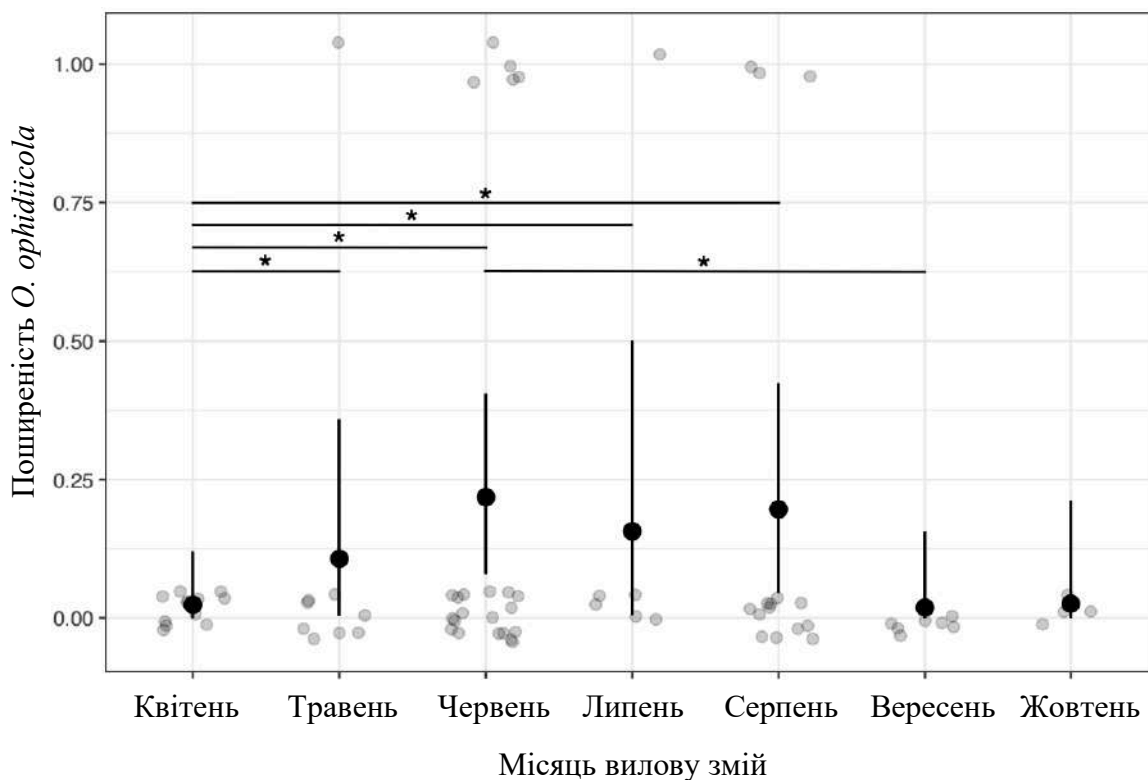


Рис 3.4. Сезонність поширеності *O. ophidiicola*. Чорні точки представляють апостеріорне середнє, а лінії — 95% довірчий інтервал. Кожна сіра точка представляє окрему особину та її результат на наявність *O. ophidiicola* за кПЛР (0|1). Горизонтальні лінії поєднують пари місяців, між якими була статистично значуща різниця у поширеності патогену

За допомогою генетичного аналізу було виявлено два унікальні генотипи, що належать до двох основних клад *O. ophidiicola* (клади I та II) (Табл. 3.2). Генотипи *O. ophidiicola*, що належать до першої клади, були виявлені лише на території Європи (Ladner et al., 2022, Blanvillain et al., 2024), тому вони мають умовну назву «Європейські». Генотип I-B мав послідовність області ITS2,

ідентичну штаму з Чехії (Franklinos et al., 2017), що отримав назву східноєвропейського, навідміну від генотипу I-A, вперше виділеному з Великобританії. Поширеність штамів *O. ophidiicola*, що належать до даного генотипу, була підтверджена в інших країнах східної частини Європи: Чехії, Австрії, Угорщині, Польщі (Blanvillain et al., 2024). Сім з дев'яти позитивних на офідіомікоз зразків за кПЛР, отриманих від вужів звичайних, належали до генотипу I-B. Цей генотип був присутній у популяціях вужів як в околицях Харкова, так і на В'ялівському водосховищі. Для решти двох зразків генотип не був встановлений через недостатню кількість ДНК *O. ophidiicola* у зразку.

Таблиця 3.2

Приналежність виявлених зразків ДНК *O. ophidiicola* до раніше описаних філогенетичних клад

Вид	Місце збору	Ураження шкіри	Клада
<i>Natrix natrix</i>	В'ялівське водосховище	так	Клада I («Східноєвропейський» генотип)
<i>Natrix natrix</i>	В'ялівське водосховище	так	Клада I («Східноєвропейський» генотип)
<i>Natrix natrix</i>	В'ялівське водосховище	так	Клада I («Східноєвропейський» генотип)
<i>Natrix natrix</i>	В'ялівське водосховище	так	невідомо
<i>Natrix natrix</i>	В'ялівське водосховище	так	невідомо
<i>Natrix natrix</i>	Харківський лісопарк	так	Клада I («Східноєвропейський» генотип)
<i>Natrix natrix</i>	Харківський лісопарк	так	Клада I («Східноєвропейський» генотип)
<i>Vipera berus nikolskii</i>	Харківський лісопарк	ні	Клада II («Північно-Американська»)

Єдиний позитивний на присутність *O. ophidiicola* зразок від гадюки Нікольського з Харківського лісопарку належав до клади II і був ідентичний послідовності ділянки ITS2 клональних ліній II-D/E (лінії D і E мають ідентичні послідовності нуклеотидів в ділянці ITS2). В літературі клада II носить назву «Північно-Американської», за місцем перших знахідок генотипів, що належать до цієї клади (Ladner et al., 2022). Штам, виявлений в цьому дослідженні, може не бути представником клональної лінії поширеної в Північній Америці, оскільки рекомбінантні штами можуть мати ідентичні з клональними лініями послідовності ITS2 (Ladner et al., 2022). Генотип II-D/E поширений не лише в Північній Америці, але й в Європі (Франції, Швейцарії, Чехії) (Blanvillain et al., 2024). Крім того, ретроспективні дослідження музейних зразків показали, що штами *O. ophidiicola*, що відносяться до II клади, були присутні у зразках зі Швейцарії датованих 1959 роком, що свідчить про ймовірність інтродукції до Європи принаймні 60 років тому (Origgi et al., 2022).

Згідно з Blanvillain et al., 2024, штами *O. ophidiicola*, що належать до клади II, пов'язані з тяжчим протіканням захворювання, ніж штами клади I. Очевидно, наші результати свідчать про більший вклад сприйнятливості хазяїна у динаміку розвитку захворювання, ніж генотип патогену. Таким чином, більш вірулентний штам II-D/E не провокує уражень шкіри у гадюки Нікольського, що є менш сприйнятною до захворювання загалом. Навпаки, менш вірулентний штам здатний провокувати ураження у більш сприйнятливих вужів звичайних. Наявність двох генотипів *O. ophidiicola* на одній території викликає занепокоєння щодо можливої гібридизації патогену з виникненням більш вірулентних штамів, а також щодо коінфекції особин штамами двох генотипів, з потенційно тяжчим прогнозом захворювання.

В рамках опрацювання колекції Музею природи ХНУ імені В.Н. Каразіна нами було виявлено вісім препаратів змій, в яких спостерігалися ураження шкіри, схожі на симптом офідіомікозу (Табл. 3.3). Всі вісім препаратів належали до виду *Natrix natrix*, відомого відносно високою сприйнятливістю до *O. ophidiicola* (Blanvillain et al., 2024). Змії були виловлені протягом 1978–2021 рр. на території України (n = 5), Азербайджану (n = 1), Грузії (n = 1) та росії (n = 1) з природніх середовищ існування, окрім однієї особини, що загинула в неволі. Всі препарати зберігалися в етанолі, що дозволило зберегти генетичний матеріал патогену.

Таблиця 3.3

Досліджені музейні препарати змій, що мали ураження шкіри

Вид	Дата відлову	Місце відлову	Результат кПЛР	Порогове значення Ct	Кількість ДНК, фг/мкл	Примітки
<i>N. natrix</i>	4.05.2003	м. Балаклія, Харківська обл.	+	26,736	0,0738	~2 500 копій ДНК
<i>N. natrix</i>	20.04.2004	с. Знам'янка, Харківська обл.	—	—	—	
<i>N. natrix</i>	20.04.2004	с. Знам'янка, Харківська обл.	—	—	—	
<i>N. natrix</i>	1.05.2021	Україна	+	24,879	0,2664	~9 200 копій ДНК
<i>N. natrix</i>	13.08.2021	Україна	+	33,891	0,0006	~21 копія ДНК
<i>N. natrix</i>	—	Машхан, Талиш, Азербайджан	—	—	—	
<i>N. natrix</i>	17.07.1978	Перевал Зекарі, Грузія	+	28,577	0,0206	~ 712 копій ДНК
<i>N. natrix</i>	2004 рік	м. Горячий Ключ, росія	—	—	—	Загинув в неволі

У чотирьох з восьми проаналізованих зразках було виявлено ДНК *O. ophidiicola*, з них у трьох зразках — у доволі високих кількостях. Цей результат підтверджує присутність цього патогену та його здатність викликати дерматомікоз вужів звичайних на території України, а саме в Харківській області, щонайменше з 2003 року. Крім того, нами було виявлено ДНК *O. ophidiicola* у музейному зразку *N. natrix*, зібраному в Грузії в 1978 році, що підтверджує наявність цього патогену на перехресті Європи та Азії щонайменше з другої половини двадцятого сторіччя. Ця знахідка є першою реєстрацією *O. ophidiicola* не тільки для Грузії, але і для Кавказького регіону загалом.

Виходячи з отриманих результатів, явний офідіомікоз (за класифікацією Baker et al., 2019), у природніх популяціях змій в Україні спостерігався лише у вужів звичайних в околицях м. Харків. Крім того, ретроспективне дослідження музейних зразків підтвердило наявність цього захворювання вужів у Харківській області щонайменше з 2003 року. Єдиний підтверджений результатом кПЛР випадок інфікування особини *V. b. nikolskii* патогеном не може вважатися набутим захворюванням через відсутність явних симптомів та гістологічної діагностики хвороби. А єдиний випадок зараження офідіомікозом особини *Z. longissimus* відбувся після тривалого утримання тварини в неволі, і залишається неясним, чи була б динаміка захворювання такою самою у природніх умовах.

3.2. Оцінка успішності транслокації рептилій як консерваційного заходу

Сумісно з Gaelle Blanvillain, співробітниками Віденського зоопарку та Французької ліги захисту птахів, ми дослідили два консерваційні заходи, спрямовані на збереження та реінтродукцію змій з природи, а також вплив офідіомікозу на успішність цих заходів (Blanvillain et al., у друці).

У випадку транслокації популяції *Natrix tessellata* у Відні, Австрія, двадцять одна особина була переміщена з природнього оселища гавані Альберн у зоопарк Шенбрюнна. Смертність впродовж шести місяців після поміщення змій в неволю становила 100%. Посмертний аналіз препаратів загиблих особин, що зберігалися у Природничому музеї Відня, підтвердив захворювання на офідіомікоз за допомогою як молекулярного аналізу методом кПЛР, так і гістологічного дослідження. *O. ophidiicola* був виявлений в усіх зразках, включаючи мазки шкіри та зразки тканин. Кількість ДНК гриба за результатами кПЛР складала 0,346–27,544 фг ДНК на мкл зразка, що відповідає приблизно 12 000 – 952 000 копій ДНК на зразок.

За результатами генетичного аналізу послідовностей ITS2 і *tef*, штами *O. ophidiicola*, що інфікували особин в Австрії, належали до клади I-A з ідентичною послідовністю ITS2 до штамів, раніше виділених із зразків з Великої Британії, Швейцарії, Австрії та Німеччині (Franklinos et al., 2017, Blanvillain et al., 2024). У природніх популяціях змій в Європі ця класа загалом пов'язана з легкими та середніми ураженнями та не призводить до загибелі особин, хоча цей зв'язок був слабшим конкретно для *N. tessellata* (Blanvillain et al., 2024). Це свідчить про те, що цей вид може бути дуже сприйнятливим хазяїном, незалежно від вірулентності клади патогену. Крім того, погана пристосованість *N. tessellata* до умов утримання в неволі могла сприяти розвитку більш тяжкого захворювання, тому ми рекомендуємо уникати утримання цього виду в неволі.

Жодна з утримуваних особин не змогла пристосуватися до умов утримання в неволі. Змії відмовлялися від їжі та, як показала посмертна діагностика, були заражені *O. ophidiicola*, патогенними бактеріями та нематодами. Супутні інфекції та паразити могли збільшити сприйнятливість особин до офідіомікозу або, навпаки, офідіомікоз призвів до загального

ослаблення організму та розвитку супутніх захворювань. На момент утримування змії у зоопарку Шенбрюнна, дослідження *O. ophidiicola* тільки починалися, і тому діагностика наявності цього патогену не проводилася. Однак описи типових симптомів захворювання на офідіомікоз (підняття та зміщення лусочок, широко поширене по всьому тілу), задокументовані співробітниками зоопарку, високі показники вмісту ДНК *O. ophidiicola* у досліджуваних зразках та гістологічне підтвердження некрозу мікогенного походження дозволяють припустити, що змії загинули від офідіомікозу.

Іншими факторами, що могли посприяти більш тяжкому розвитку офідіомікозу у змії в неволі, є неоптимальна температура утримання та застосування антибіотиків. Особини утримувалися у відкритих загонах починаючи з середини вересня, і середньодобові значення температури, ймовірно, не досягали необхідних значень для стимуляції імунної системи змії. Після загибелі перших особин посмертна діагностика показала наявність патогенних бактерій родів *Salmonella* та *Aeromonas*, у зв'язку з чим було впроваджене лікування антибіотиками. Відомо, що пригнічення росту бактерій при застосуванні антибіотиків стимулює ріст грибів, присутніх у мікрофлорі, в тому числі дерматомицетів (Leyden and Marples, 1973). Після впровадження лікування антибіотиками три особини загинули, а стан інших незначно покращився. Слід зазначити, що під час лікування змії були переміщені до тераріумів всередині будівлі, і покращення їх стану могло відбутися завдяки підвищенню температури утримування. Після завершення лікування (початок жовтня) у зв'язку з оптимальним станом здоров'я змії співробітники зоопарку здійснили спробу індукції гібернації, знизивши температуру утримання до 8°C. Ймовірно, зниження температури спровокувало повторне ускладнення симптомів офідіомікозу, і впродовж двох тижнів після зниження температури на шкірі змії з'явилися некротичні

ділянки. При цьому деякі особини все ще залишалися активними, тому температуру утримання знизили до 2°C. Після загибелі ще двох особин в цих умовах, було прийняте рішення підвищити температуру та застосувати лікування антибіотиками знов. Три особини загинули незабаром після цього. Стан інших змій спочатку покращився, але невдовзі всі особини, що залишилися, загинули. Таким чином, в умовах нестачі знань щодо захворювання, спричиненого *O. ophidiicola*, та застосування невірних стратегій лікування, вся популяція була втрачена. Слід відзначити величезну кількість зусиль для збереження життя та здоров'я тварин, докладених співробітниками зоопарку Шенбрюнна, які не могли знати про це захворювання змій у 2010 році.

У Франції транслокація проводилася в 2021 році, а співробітники Французької ліги захисту птахів, що утримували змій, були обізнані щодо ризику захворювання змій на офідіомікоз. Було відловлено 82 особини *N. maura* (за оцінками, вони становлять ~85% популяції на цій території), і 71 особина утримувалася в неволі, як описано у розділі 2.2. Тестування змій на присутність *O. ophidiicola*, проведене на початку утримання за допомогою кПЛР, показало, що 31% змій (20 із 65) були носіями патогену. При цьому у більш ніж у половини змій спостерігалися ураження шкіри, характерні для захворювання на офідіомікоз.

Після шести місяців утримання в неволі, 10 із 71 змій загинули, але лише три з них були позитивними на *O. ophidiicola* за кПЛР, у той час як у двох інших спостерігалися симптоми офідіомікозу (наявність уражень шкіри, поганий загальний стан здоров'я), але результат кПЛР був негативним. Таким чином, смертність від офідіомікозу становила 4,2% (враховуючи тільки позитивні результати кПЛР) або 7,0% (враховуючи особин із симптомами офідіомікозу, непідтвердженого молекулярним аналізом).

Дослідження у Франції дозволило порівняти поширеність патогену і уражень на початку та в кінці періоду утримання, щоб оцінити ефективність втручання, спрямованого на лікування *O. ophidiicola*. Наприкінці періоду утримання лише 2% змій виявилися позитивними на присутність *O. ophidiicola* за кПЛР (1 з 55 протестованих змій). Поширеність *O. ophidiicola* серед особин, розрахована за допомогою моделі змішаних ефектів, була вищою на початку утримання ($31\% \pm 9\%$), ніж наприкінці ($2\% \pm 6\%$) на рівні значущості $p < 0,0001$ (Рис. 3.5). Ми також виявили, що змії на початку утримання мали вищу поширеність уражень шкіри ($59\% \pm 11\%$) порівняно з поширеністю ураження перед випуском у природні оселища ($23\% \pm 12\%$), $p < 0,0001$.

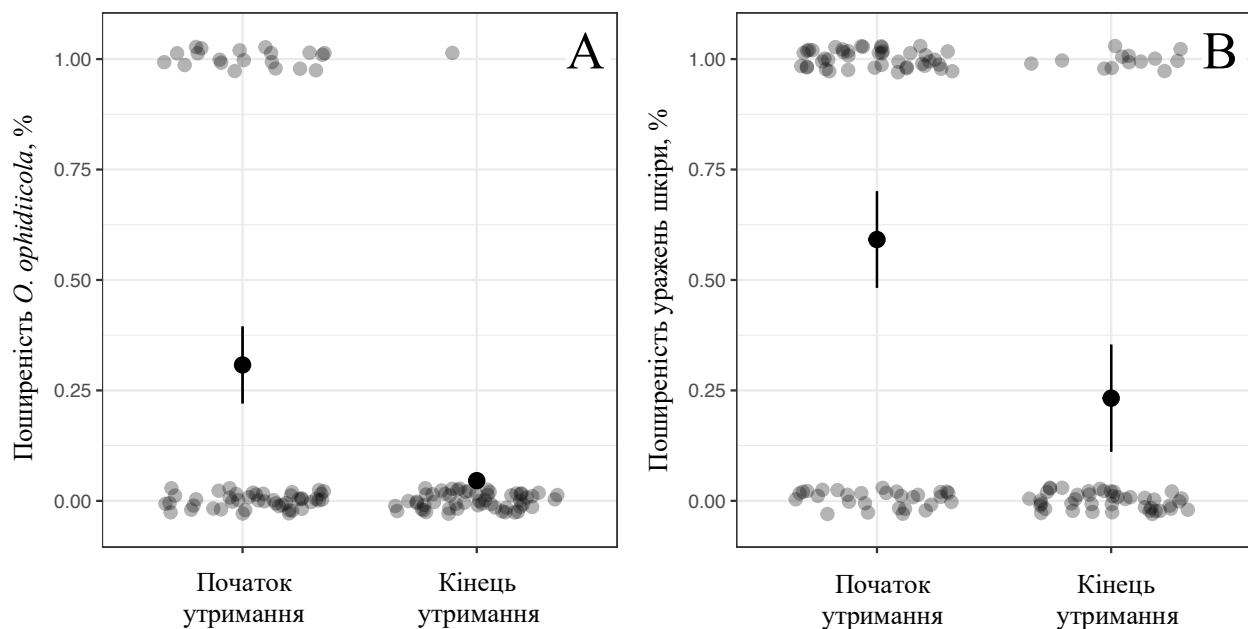


Рис 3.5. Прогнозована поширеність ДНК *O. ophidiicola* (А) та уражень шкіри (В) на момент вилову *N. taura* та після шести місяців в неволі. Чорні точки представляють середнє значення, передбачене моделлю, а лінії — 95% довірчий інтервал. Кожна сіра точка представляє окрему особину та її результат на наявність *O. ophidiicola* за кПЛР (А) або уражень шкіри (В), 0|1

Можливо, що ураження, які все ще були присутні наприкінці утримання, були спричинені іншими патогенами, або що патоген вегетував у глибших шарах шкіри, що зробило виявлення його ДНК у мазку неможливим.

Ми оцінювали стан здоров'я змій, порівнюючи вагу відразу після відлову та наприкінці періоду утримання в неволі, приблизно через 6 місяців. Ми виявили підтвердження того, що вага змій була вищою наприкінці утримання в неволі ($35,4 \pm 3,2$ г) порівняно з вагою, виміряною на початку утримання ($26,9 \pm 2,9$ г), $p = 0,0476$, що свідчить про те, що умови утримання були оптимальними (Рис. 3.6).

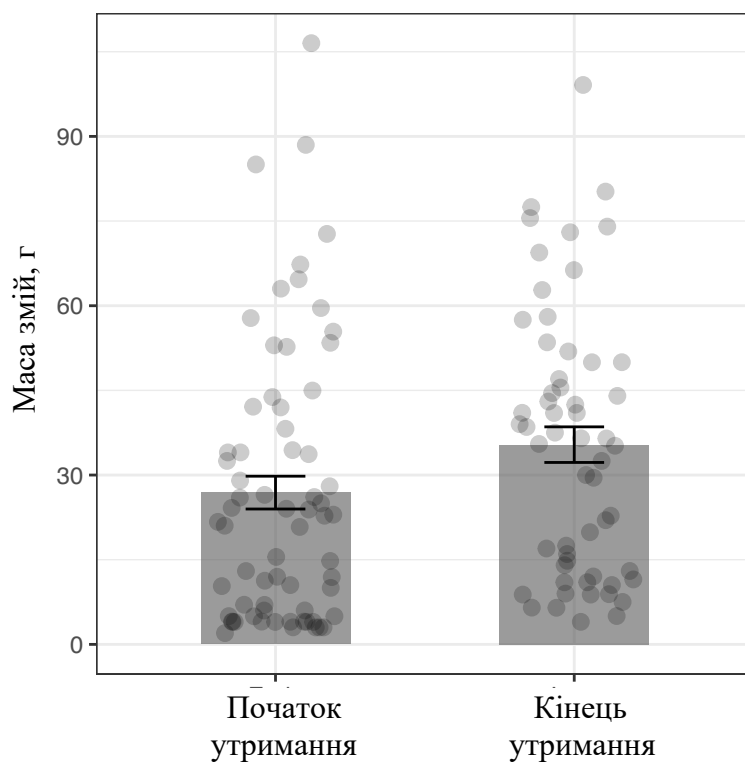


Рис 3.6. Маса особин *N. taura* на момент вилову та після шести місяців в неволі. Сірі точки представляють масу окремих особин, стовпчики та вуса представляють середнє значення згідно з моделлю $\pm$ стандартну помилку середнього

Ми також визначили генотип штаму *O. ophidiicola*, виділено зі скинутої шкіри однієї з особин *N. maura*. Послідовності ДНК ділянок ITS2 і *tef* були ідентичними послідовностям клональних ліній II-D/E і II-D/E/F відповідно (лінії D та E мають ідентичні послідовності в ділянці ITS2, а лінії D, E та F мають ідентичні послідовності *tef*) (Ladner et al., 2022). Виходячи з цих даних, можливо, що цей штам належав до однієї з клональних ліній D або E, або мав рекомбінантне походження між двома чи більше з цих клональних ліній. Таким чином, в даному випадку генотип патогену, раніше описаний як більш вірулентний (Blanvillain et al., 2024), не викликав тяжких уражень або значної смертності. Це може пояснюватися відносною толерантністю *N. maura* до офідіомікозу або оптимальними умовами утримання, що дозволили зміям самостійно подолати захворювання.

Ключовою відмінністю в утримуванні змій у Франції порівняно з Австрією є виявлення присутності *O. ophidiicola* на початку утримання в неволі, що дозволило ветеринарам вжити заходів для боротьби з розвитком та поширенням захворювання: ізоляція симптоматичних особин, розміщення теплових ламп у резервуарах для збільшення швидкості линяння, видалення скинутої шкіри для обмеження ймовірності повторного зараження. Був застосований регулярний моніторинг стану здоров'я тварин за допомогою кПЛР, що дозволило гнучко реагувати на зміни у стані популяції. Ці умови дозволили успішно звільнити 108 особин *N. maura*, у тому числі 49 дитинчат, які вилупилися з двох кладок яєць в неволі та були негативними на *O. ophidiicola* за результатами кПЛР.

Різниця в успішності двох проаналізованих консерваційних заходів підкреслює важливість прийняття до уваги захворюваності при утриманні рептилій в неволі. Пов'язаний з переміщенням та утриманням стрес може спричинити тяжкий перебіг захворювання та смертність рептилій, які не

демонстрували симптоми хвороби на час вилову. В той самий час, застосування заходів протидії захворюванню дозволяє знизити поширеність хвороби навіть без застосування фунгіцидних препаратів. Результати подібних проєктів з утримання та транслокації рептилій мають бути широкодоступними для оцінки пристосованості різних видів до умов неволі та успішності тих чи інших практик утримання.

3.3. Поширеність патогенних грибів *Paranannizziopsis* spp. в Європі

В рамках дослідження поширеності *Paranannizziopsis* spp. території Європи ми проаналізували 516 зразків ДНК, отриманих з мазків поверхні шкіри 405 змій з 11 країн Європи: Австрії (n = 7), Германії (n = 10), Іспанії (n = 119), Італії (n = 1), Польщі (n = 36), Португалії (n = 54), Угорщини (n = 6),

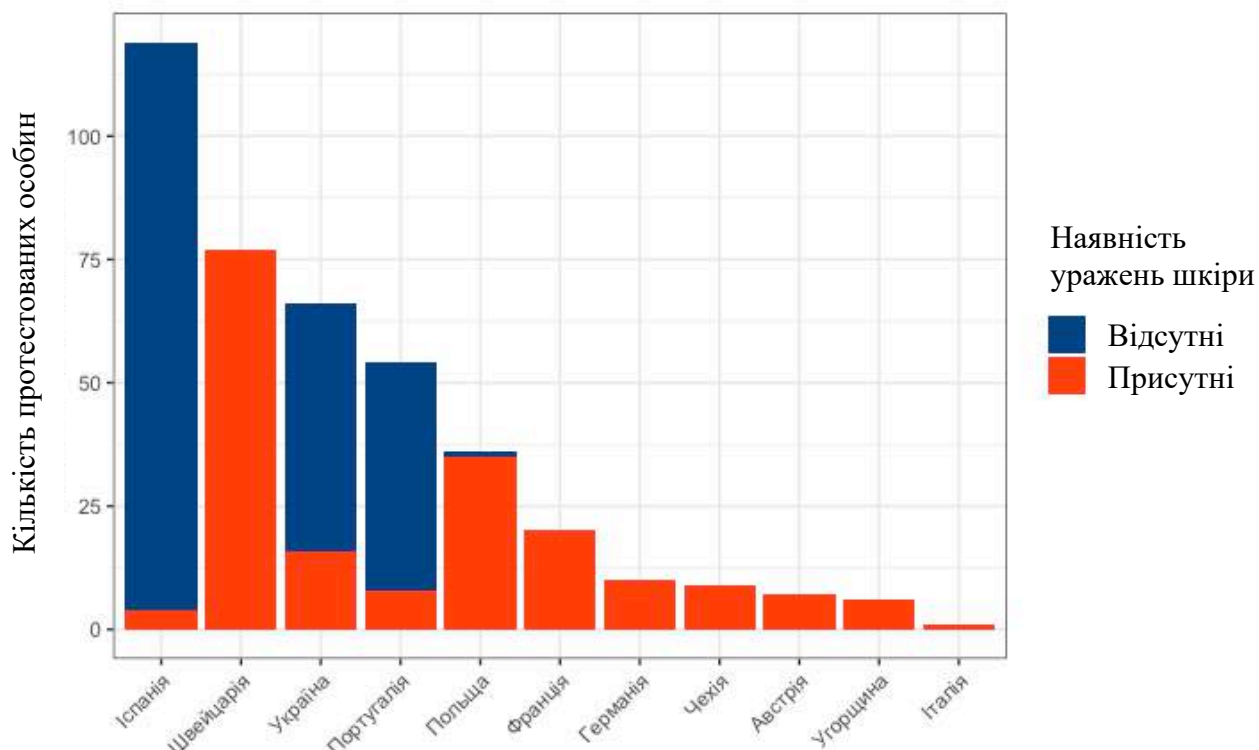


Рис 3.7. Розподіл змій, протестованих на присутність *Paranannizziopsis* spp., за країнами походження

України (n = 66), Франції (n = 20), Чехії (n = 9) та Швейцарії (n = 77). З протестованих змій 193 особини (47,7%) мали ураження шкіри (Рис. 3.7). Пріоритет в аналізі надавався зразкам ДНК, взятим зі змій, що мали ураження шкіри, а також зразкам з країн, де наявність *Paranannizziopsis* spp. була підтверджена попередніми результатами досліджень.

Протестовані змії відносилися до 19 видів: *Vipera latastei* (n = 80), *Natrix tessellata* (n = 50), *Coronella austriaca* (n = 45), *Vipera aspis* (n = 38), *Natrix helvetica* (n = 34), *Vipera berus nikolskii* (n = 32), *Natrix natrix* (n = 27), *Zamenis longissimus* (n = 22), *Natrix astreptophora* (n = 15), *Natrix maura* (n = 13), *Vipera renardi* (n = 12), *Vipera seoanei* (n = 10), *Hierophis viridiflavus* (n = 8), *Dolichophis caspius* (n = 5), *Coronella girondica* (n = 3), *Elaphe sauromates* (n = 3), *Malpolon monspessulanus* (n = 3), *Zamenis scalaris* (n = 3), *Vipera berus* (n = 2). Наявність ДНК *Paranannizziopsis* spp. була підтверджена у шести протестованих зразках, що відносилися до 5 змій з півночі Португалії (Табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Особини, у яких за результатами КПЛР була підтверджена наявність патогенних грибів *Paranannizziopsis* spp.

Вид	Стать	Наявність уражень шкіри	Місяць відлову	Ст	Кількість ДНК <i>Paranannizziopsis</i> spp., фг/мкл
<i>Coronella austriaca</i>	Самець	+	Березень	32,460	0,0394
<i>Vipera latastei</i>	Самець	+	Квітень	33,812	0,0206
<i>Vipera latastei</i>	Самка	+	Травень	37,576	0,0038
<i>Vipera latastei</i>	Самка	—	Листопад	32,697	0,3326
<i>Vipera latastei</i>	Самець	—	Березень	34,336	0,1444

Кількість виявленої ДНК варіювала в межах 0,0038–0,3326 фг/мкл ($C_t = 37,576\text{--}32,460$), що відповідає 131 – 11 500 молекулам ДНК на мкл зразка. Зі змій, позитивних на *Paranannizziopsis* spp., три мали ураження шкіри як на вентральній поверхні тіла, так і на дорсальній та латеральній.

Чотири змії, позитивні на *Paranannizziopsis* spp., відносилися до виду *Vipera latastei*, ендемічного для Піренейського півострова, ще одна – до космополітичного виду *Coronella austriaca*.

Прогнозовану поширеність *Paranannizziopsis* spp. серед різних видів змій визначали за допомогою байєсівської моделі за методикою, описаною в Розділі 2.7. Згідно з моделлю, поширеність *Paranannizziopsis* spp. в Європі варіює від 0,2% до 2,1% серед різних видів змій: *Coronella austriaca* – 0,3% (0% – 1,9%), *Natrix astreptophora* – 0,2% (0% – 1,9%), *Natrix helvetica* – 0,6% (0% – 4,8%), *Natrix maura* – 0,3% (0% – 2,0%), *Natrix natrix* – 0,6% (0% – 3,9%), *Natrix tessellata* – 5,6% (0% – 55,6%), *Vipera aspis* – 1,9% (0% – 19,5%), *Vipera berus nikolskii* – 1,7% (0% – 16,3%), *Vipera latastei* – 1,3% (0% – 8,8%), *Vipera renardi* – 2,1% (0% – 23,4%), *Vipera seoanei* – 0,4% (0% – 3,7%), *Zamenis longissimus* – 0,4% (0% – 3,2%) (Рис. 3.8).

На момент проведення дослідження наявність *Paranannizziopsis* spp. в Європі була підтверджена лише на Піренейському півострові. З одного боку, поширеність патогену може бути обмежена географічно через одиничний випадок інтродукції. З іншого боку, є можливість високої пристосованості патогену до видів, ендемічних для цього регіону. За допомогою байєсівської моделі була визначена прогнозована поширеність *Paranannizziopsis* spp. серед п'яти видів змій лише у Португалії, з яких 3 є ендеміками Піренейського півострова (*N. astreptophora*, *V. latastei* та *V. seoanei*).

Прогнозована поширеність *Paranannizziopsis* spp. серед видів змій в Португалії була наступною: *C. austriaca* – 20,6% (0,6%–63,5%),

N. astreptophora – 2,0% (0%–19,1%), *N. maura* – 2,5% (0%–23,7%), *V. latastei* – 11,3% (3,6%–23,3%), *V. seoanei* – 4,1% (0%–39,7%) (Рис. 3.9).

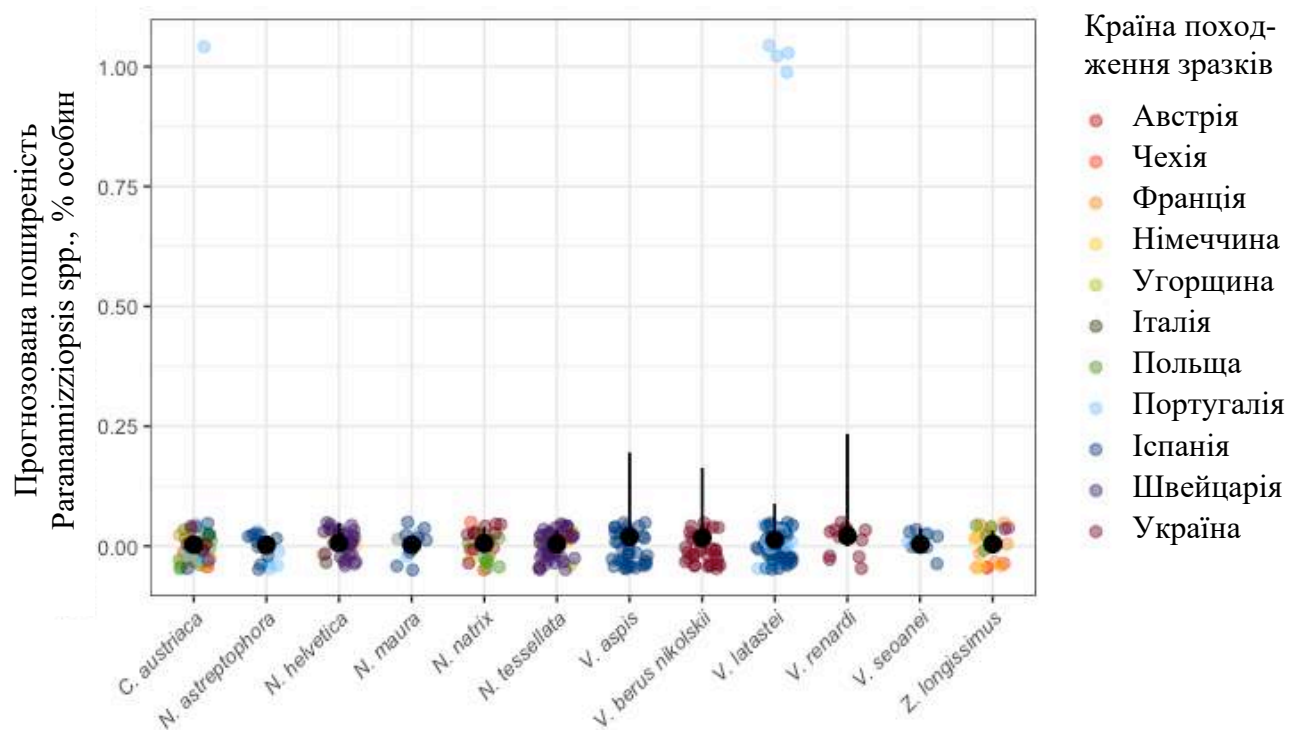


Рис 3.8. Прогнозована поширеність *Paranannizziopsis* spp. серед обстежених видів змій в Європі. Чорні точки представляють апостеріорне середнє, передбачене моделлю, а лінії — 95% довірчий інтервал. Кожна кольорова точка представляє окрему особину та її результат на наявність *Paranannizziopsis* spp. за кПЛР (0|1)

Модель виявила найвищу прогнозовану поширеність *Paranannizziopsis* spp. в Португалії серед представників виду *C. austriaca* – 20,6% (0,6%–63,5%), однак різниця у поширеності патогену між видами змій не була значущою, найімовірніше через замалий розмір вибірки. *C. austriaca* – космополітичний вид, що трапляється на всій території Європи і має східний кордон ареалу близько кордонів Казахстану та Ірану. Факт відсутності реєстрації патогену на

особинах *C. austriaca* з інших країн підтримує гіпотезу щодо одноразової інтродукції патогену саме на Піренейський півострів. Також на користь цієї гіпотези свідчить той факт, що перша знахідка *Paranannizziopsis* spp. в Європі була зареєстрована всього в 98 км на північ від місця поширення патогену, виявленого в даному дослідженні.

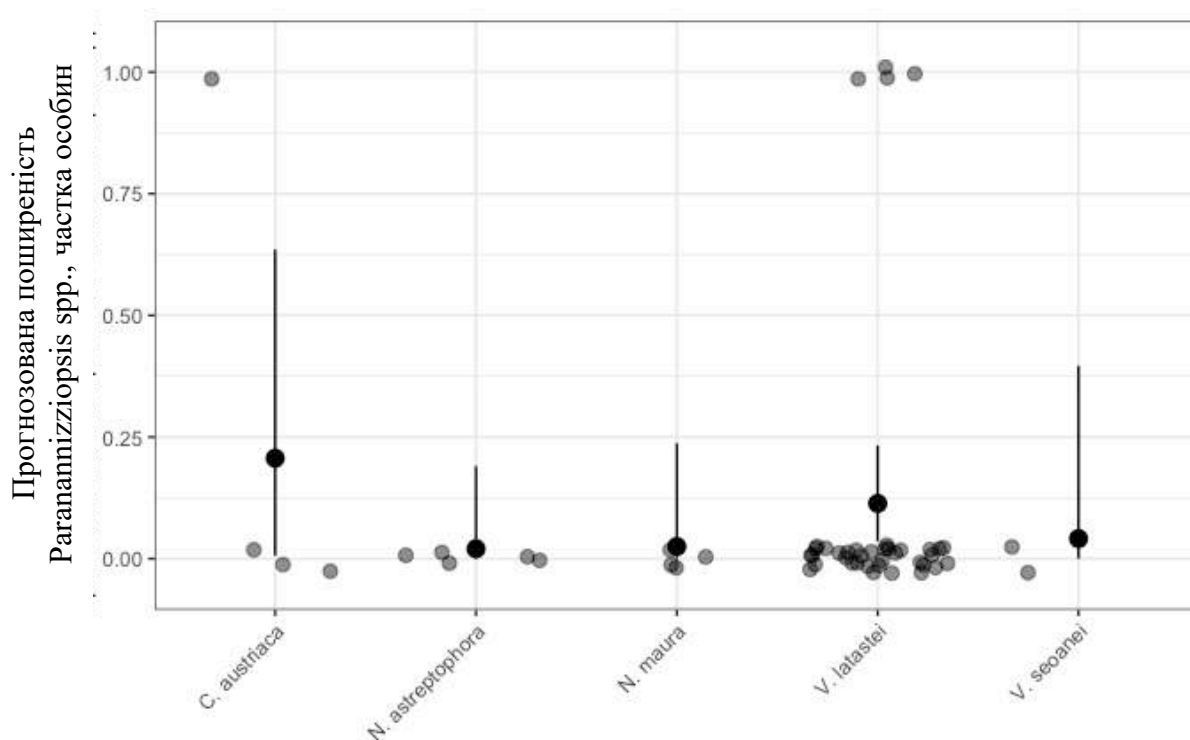


Рис 3.9. Прогнозована поширеність *Paranannizziopsis* spp. серед обстежених видів змій в Португалії. Чорні точки представляють апостеріорне середнє, передбачене моделлю, а лінії — 95% довірчий інтервал. Кожна сіра точка представляє окрему особину та її результат на наявність *Paranannizziopsis* spp. за кПЛР (0|1)

Більшість знахідок *Paranannizziopsis* spp. було зареєстровано нами на особинах *V. latastei*. Цей вид є раритетним видом плазунів, занесеним до Червоного списку МСОП (охоронна категорія: уразливий вид). Якщо

Paranannizziopsis spp. був інтродукований нещодавно, поширення цього патогену серед вразливих популяцій рептилій викликає занепокоєння.

Згідно з екологічними моделями (Santos et al. 2006), поширення *V. latastei* найбільшою мірою визначають велика висота над рівнем моря та крутий кут нахилу поверхні. Дві змінні, пов'язані з присутністю людей (трансформація ландшафту та щільність населення), мають негативний зв'язок з появою *V. latastei*. Зважаючи на те, що місце реєстрації інфікованих особин знаходиться на рівні моря в околицях другого за населенням міста Португалії – Порту, виявлення гриба роду *Paranannizziopsis* в цьому регіоні викликає занепокоєння щодо кумулятивного впливу інших стресорів і хвороб на здоров'я популяцій цього вразливого виду.

Для відповіді на питання, чи є залежність ймовірності поширення інфекції *Paranannizziopsis* spp. від придатності середовища для *V. latastei*, було використано байесівський аналіз за методикою, описаною в Розділі 2.7. За результатами аналізу, прогнозована поширеність хвороби у місцях існування низької придатності становить 9,85% (достовірний інтервал 2,86% – 20,42%). Для локацій середньої придатності цей показник становить 4,18% (0% – 41,88%), а для високої – 0,68% (0% – 4,49%). Однак модель не виявила значущої різниці між поширеністю *Paranannizziopsis* spp. серед трьох класів придатності середовища для *V. latastei*, ймовірно через упередженість відбору зразків, утрудненого у гірських місцевостях вдалині від інфраструктурних об'єктів (Рис. 3.10)

Окрім зразків, позитивних на наявність ДНК *Paranannizziopsis* spp. за кПЛР, ми виявили ще шість сумнівних зразків, для яких значення *St* було вище порогового (37, Lorch et al., 2023). Два з цих зразків походили з Португалії (від *Natrix astreptophora* та *V. latastei*), з тієї самої локації, що і позитивні зразки. Ще два зразки походили з півночі Іспанії, на кордоні з Францією (від *Malpolon*

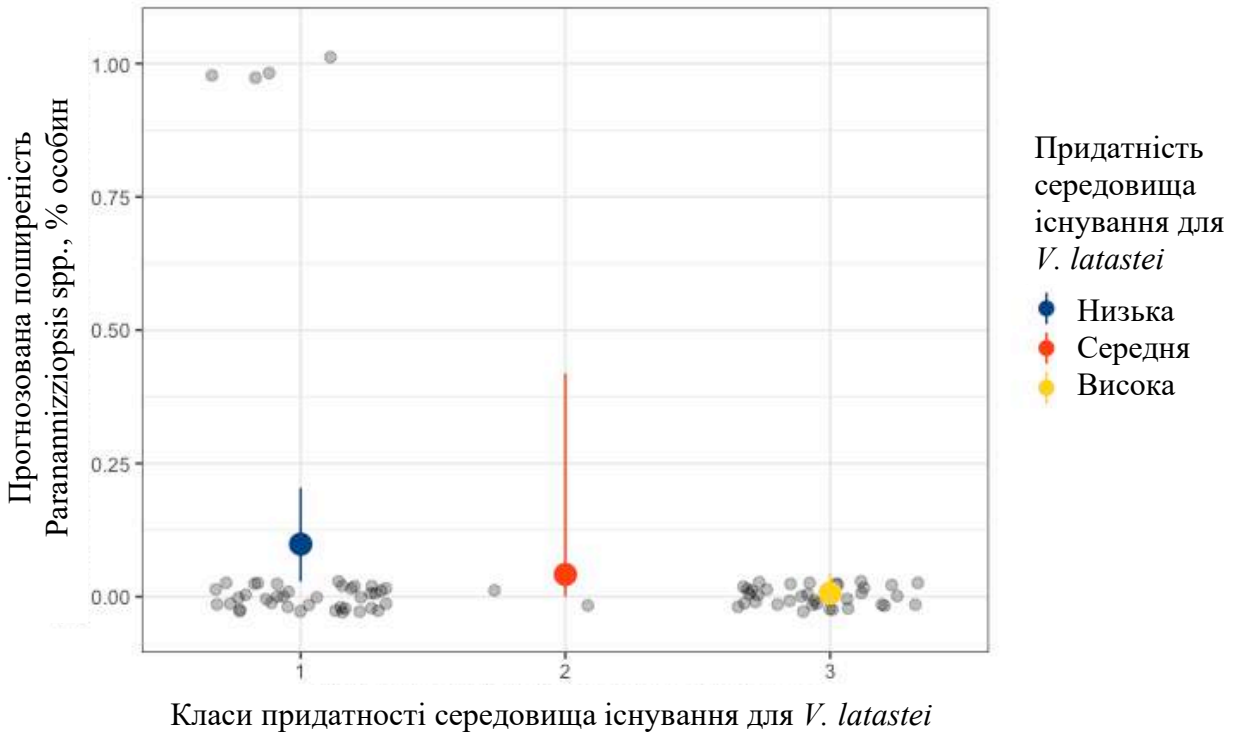


Рис 3.10. Прогнозована поширеність *Paranannizziopsis* spp. серед особин *V. latastei* залежно від придатності середовища існування для цього виду. Кольорові точки представляють апостеріорне середнє, передбачене моделлю, а лінії — 95% довірчий інтервал. Кожна сіра точка представляє окрему особину та її результат на наявність *Paranannizziopsis* spp. за кПЛР (0|1)

monspessulanus та *V. latastei*). Один зразок походив зі сходу Франції (від *Z. longissimus*), і ще один – з Польщі (від *C. austriaca*). Для всіх цих зразків повторні реакції кПЛР повертали або неоднозначний результат ($St > 37$), або негативний. Дублікати мазків шкіри для цих особин частіше за все були негативними за кПЛР, або також містили недостатню кількість ДНК для позитивного результату. Хоча цих особин не можна вважати носіями *Paranannizziopsis* spp., ці результати можуть свідчити про присутність фонового навантаження патогену у середовищі, наприклад в ґрунті, або про ураженість змій інших видів в цих регіонах.

РОЗДІЛ 4. ОСОБЛИВОСТІ РОСТУ ТА ВІРУЛЕНТНІСТЬ *O. OPHIDIICOLA*

4.1 Аналіз швидкості росту *O. ophidiicola* в культурі

Для аналізу відмінностей у швидкості росту різних штамів *O. ophidiicola* на твердому поживному середовищі культивували вісім ізолятів, що відносилися до семи різних генотипів. Три ізоляти були виділені зі змії у Європі (Швейцарія), а п'ять — у різних штатах США (див. Додаток В). Вимірювання діаметру колоній проводили починаючи з п'ятої доби, на вже на сьому добу стали помітні відмінності у швидкості росту колоній різних ізолятів. На останню 16-ту добу культивування різниця у діаметрі колоній була статистично значущою між усіма дослідженими ізолятами, окрім єдиної пари ізолятів 23906-1 (США, генотип II-E) та 47005-110 (Європа, генотип II-D/E; $p < 0.05$) (Рис. 4.1).

Загалом, ізоляти з Європи продемонстрували значно менший розмір діаметру колоній, ніж ізоляти із США, як на 16-ту добу культивування ($p = 2,63 \times 10^{-6}$), так і протягом всього часу проведення дослідження ($p = 1,04 \times 10^{-6}$). Значущою також була відмінність у діаметрі колоній між ізолятами, що відносяться до I та II клад ($p < 0,0001$). Клада I, що розповсюджена лише у Європі, була представлена одним ізолятом I-W, який характеризувався найменшим розміром діаметру колоній протягом всього експерименту. Відомо, що штами кладу I, як правило, викликають легші симптоми офідіомікозу, ніж штами кладу II (Blanvillain et al., 2024), що може частково пояснюватися меншою швидкістю їх росту. Цікавою є різниця у швидкості росту між штамами генотипу II-F, виділеними з США та з Європи. Середній діаметр ізоляту із США на 16-ту добу становив 31,8 мм (31,3 мм – 32,3 мм), а ізоляту з Європи — 26,6 мм (26,1 мм – 27,1 мм). Таким чином,

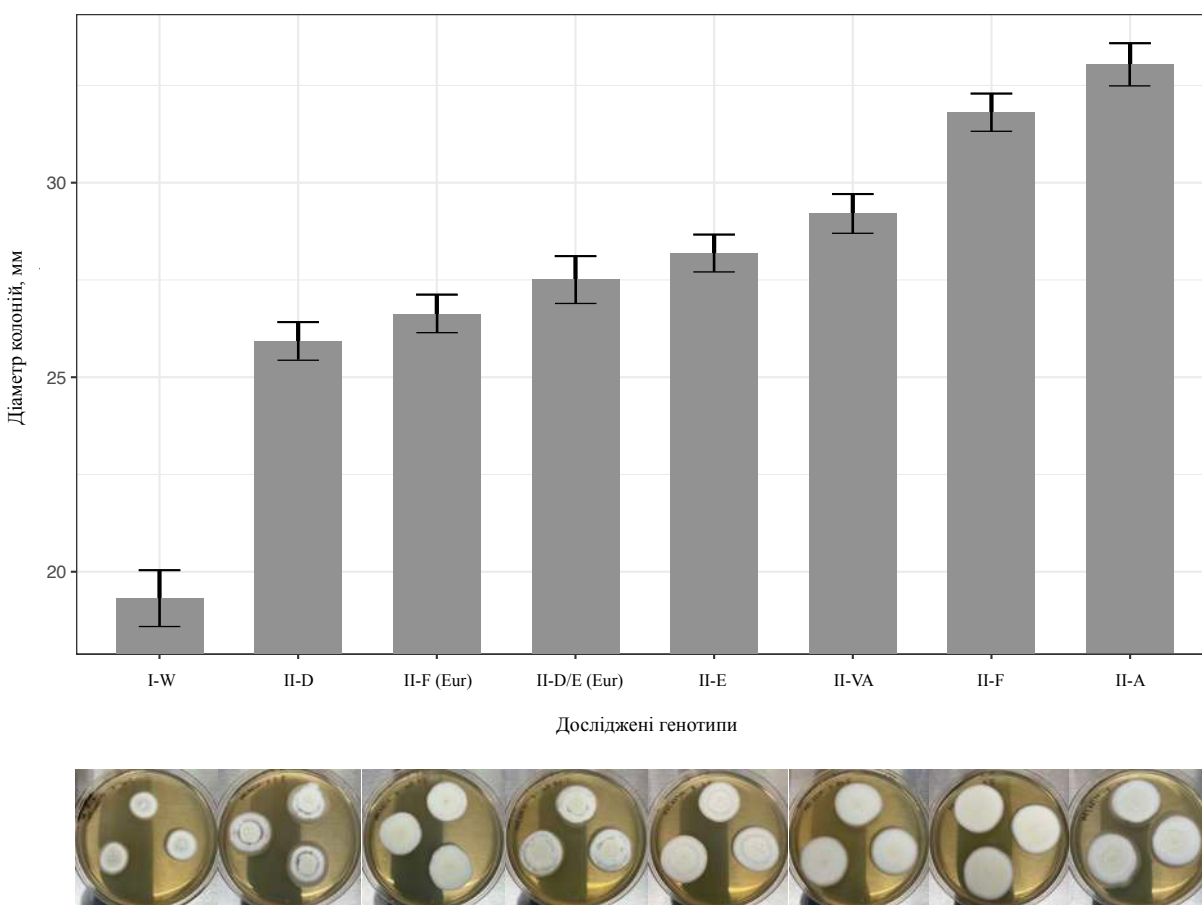


Рис 4.1. Діаметр колонії восьми штамів *O. ophidiicola* на 16-ту добу культивування. Стовпчики представляють середній діаметр, вуса – 95% довірчий інтервал

діаметр ізоляту з США був більшим на 18%. За Ladner et al., 2022, інтродукція представників генотипу II-F у Північну Америку відбулася впродовж останніх ста років, в той час як в Європі представники цієї класи еволюціонували довше. Таким чином, нижча швидкість росту ізоляту II-F з Європи може пояснюватися довшим коеволюційним процесом з місцевими видами рептилій, під час якого швидкість росту та вірулентність, з нею пов'язана, знизилася. Це відповідає класичній теорії еволюції вірулентності яка

передбачає, що більша швидкість росту всередині хазяїна спричиняє більшу вірулентність але поширюваність знижується через підвищену смертність хазяїна. Таким чином, патогени в процесі еволюції набувають меншої вірулентності. Слід зазначити, що ці ізоляти можуть не бути представниками однієї клональної лінії, оскільки рекомбінантні штами можуть мати ідентичні з клональними лініями послідовності ITS2 (Ladner et al., 2022).

Для дослідження швидкості росту ізолятів *O. ophidiicola* в динаміці будували криві росту колоній за допомогою модифікованого рівняння Гомперца, де основними показниками, що визначають форму кривої, є μ (показник швидкості експоненційного росту колонії в логарифмічній фазі) та λ (показник довжини лаг-фази, що описує, як швидко колонія переходить у логарифмічну фазу росту). Таким чином, швидкість росту ізолятів з найбільшим значенням μ та найменшим λ вважалася найвищою.

Найменша швидкість росту у логарифмічній фазі та найдовша лаг-фаза спостерігалася в ізоляту I-W (Табл. 4.1). Крива росту цього ізоляту значно відрізнялася від усіх інших (Рис. 4.2). Подальші порівняння та висновки були зроблені для ізолятів кладу II.

Таблиця 4.1

Показники рівняння Гомперца, вираховані за допомогою моделі змішаних ефектів для ізолятів *O. ophidiicola*. Всі значення μ та λ є статистично значущими ($p < 0,01$).

Штам	Генотип	A	μ	λ
23906-1	II-E	43,08 $\pm$ 2,27	0,1086 $\pm$ 0,0017	106,00 $\pm$ 2,41
24281-1	II-F (US)	42,04 $\pm$ 0,75	0,1247 $\pm$ 0,0013	94,66 $\pm$ 1,30
24746-1	II-D	41,20 $\pm$ 2,46	0,0993 $\pm$ 0,0015	107,13 $\pm$ 2,53
44736-89	II-A	40,58 $\pm$ 0,68	0,1342 $\pm$ 0,0017	95,84 $\pm$ 1,53
47005-102	II-F (Eur)	36,63 $\pm$ 1,11	0,0989 $\pm$ 0,0014	89,12 $\pm$ 1,91

47005-110	II-D/E	39,30 ± 1,42	0,1030 ± 0,0014	95,15 ± 1,98
47007-12	II-VA	40,49 ± 0,95	0,1108 ± 0,0012	94,33 ± 1,44
47005-95	I-W	86,09 ± 51,16	0,0932 ± 0,0291	189,81 ± 73,50

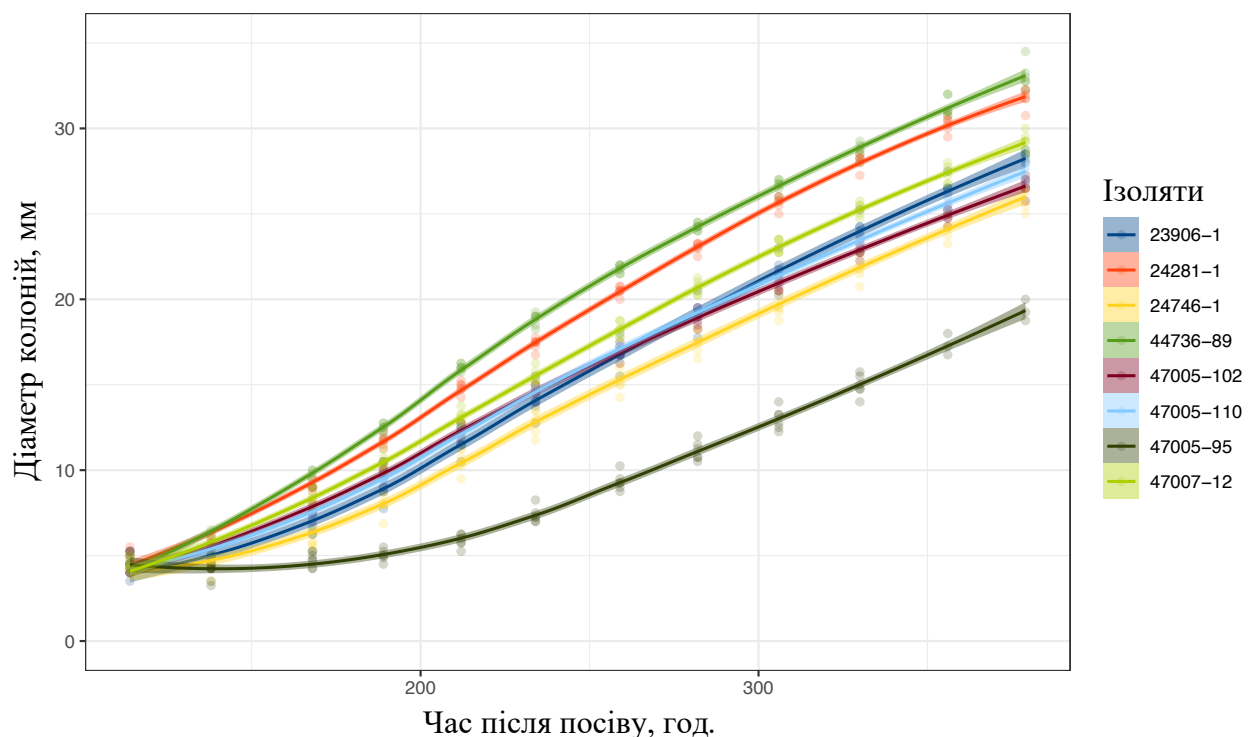


Рис 4.2. Криві росту восьми штамів *O. ophidiicola*. Кольорові точки представляють середній діаметр окремої колонії, лінії — передбачені моделлю середні значення з 95% довірчим інтервалом, позначеним напівпрозорими кольорами

Найбільшою швидкістю росту у логарифмічній фазі характеризувався ізолят 44736-89, що належав до генотипу II-A. Показник μ для цього ізоляту був вищим, ніж для всіх інших ізолятів ($p < 0,0001$). Другим у порядку спадання показником μ характеризувався ізолят генотипу II-F, виділений з США (стат. значущість див. у Додатку Г). Далі — генотипи II-VA та II-E, що між собою не відрізнялися на достатньому рівні значущості, і насамкінець

генотипи II-D/E, II-D та II-F, виділений з Європи. В той час як ізолят генотипу II-F з США був другим за показником μ з усіх досліджених, ізолят цього ж генотипу з Європи характеризувався найнижчою швидкістю росту у логарифмічній фазі з усіх ізолятів клади II.

Найдовшою затримкою в рості перед логарифмічною фазою з ізолятів клади II був 24746-1 (генотип II-D). Таким чином, швидкість росту цього ізоляту була найнижчою як з усіх ізолятів клади II, так і з усіх ізолятів з США. Другим за показником λ виявився ізолят генотипу II-E, не відрізняючись від II-D на достатньому рівні значущості. Трохи коротшою лаг-фазою характеризувалася група ізолятів генотипів II-A, II-D/E, II-F (США) та II-VA. А найшвидший перехід до експоненційного росту спостерігався в ізоляту II-F з Європи. Таким чином, в цього ізоляту має місце бути компроміс між довжиною лаг-фази та швидкістю експоненційного росту. Дійсно, діаметр колоній цього ізоляту був четвертим за величиною протягом дев'яти перших діб експерименту, після чого поступився ізолятам II-E та II-D/E, що зростали швидше.

Таким чином, усі досліджені ізоляти можна розділити на декілька груп за показниками швидкості росту. Ізоляти генотипів I-W та II-D виявилися повільнозростаючими, з довгою лаг-фазою та низькою швидкістю експоненційного росту. Швидкозростаючими виявилися ізоляти II-A та II-F (США), вони характеризувалися високим показником μ та середньою довжиною лаг-фази. Всі інші досліджені ізоляти лежали посередині, маючи середній показник μ та довгу лаг-фазу (II-E), низький показник μ та середній λ (II-D/E), середні показники обох змінних (II-VA) або компроміс між низькою швидкістю експоненційного росту та дуже короткою лаг-фазою (II-E з Європи).

4.2 Рясність проростання спор *O. ophidiicola* за попереднього впливу холодового та теплового шоку

Метою даного дослідження було з'ясувати рівень проростання спор різних ізолятів *O. ophidiicola*, а також вплив екстремальних температур на цей процес. Для дослідження були обрані 15 ізолятів клади II, виділених зі змії з природи різних штатів США (Додаток Д) Проростання спор різних ізолятів після 27 годин інкубації при оптимальній температурі варіювало в діапазоні від 4,6% до 93,4% (Рис. 4.3). Коефіцієнт Джині в межах ізолятів не перевищував 0,17, що підтверджує відтворюваність результату між повторностями (Додаток Д). Ізолят із найменшим середнім відсотком пророслих спор (ВПС) належав до генотипу II-A. Прогнозована моделлю ВПС для цього ізоляту становила 4,6% з 95% достовірним інтервалом від 3% до 6,8%, що було значно нижче, ніж для наступного ізоляту в порядку зростання ($p = 0,008$). Наступний єдиний ізолят генотипу II-F мав прогнозований ВПС на рівні 9% (6,7%–11,9%), значно відрізняючись від усіх ізолятів, крім одного з генотипу II-VA ($p < 0,01$). Два досліджені ізоляти генотипу II-E мали ВПС на рівні 38% і 47%, значно відрізняючись між собою ($p = 0,0055$) з коефіцієнтом Джині в межах генотипу 0,08. Два штами, що представляють рекомбінантні генотипи II-D/F і II-D/E, не показали істотної різниці у ВПС із середніми показниками 44% і 45% відповідно. Генотип II-D, представлений шістьма ізолятами, продемонстрував більшу варіабельність із середнім ВПС у діапазоні від 20,6% до 93,4% і коефіцієнтом Джині 0,24. Усі ізоляти цього генотипу суттєво відрізнялися один від одного, за винятком ізолятів із Вісконсіна та Канзасу. Нарешті, найвища варіабельність спостерігалася в ізолятів генотипу II-VA (коефіцієнт Джині = 0,42), з ВПС для трьох ізолятів, прогнозованими моделлю на рівні 12% (9,3% – 15,2%), 23,2% (19,5% – 27,3%) і 82,2% (78,4% – 85,5%).

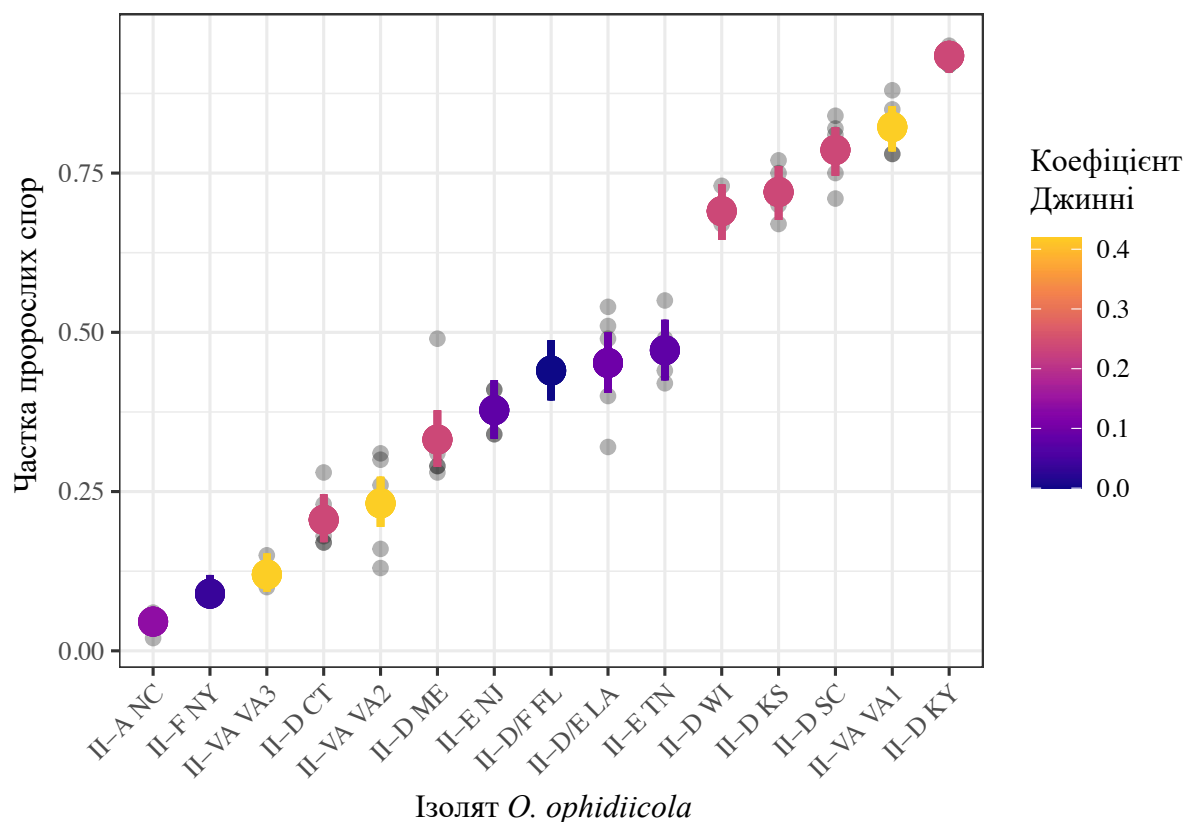


Рис 4.3. Частка пророслих спор п'ятнадцяти ізолятів *O. ophidiicola* після інкубації за 25°C протягом 27 годин. Сірі точки представляють відсоток пророслих спор в окремій пробірці, кольорові точки та лінії — середні значення та 95% довірчий інтервал, передбачені моделлю

Наші результати показали, що відсоток пророслих спор значно збільшився після впливу підвищених температур у більшості досліджених ізолятів (Рис. 4.4). Така закономірність спостерігалася для одинадцяти ізолятів, що належать до всіх семи досліджених генотипів. Для решти чотирьох ізолятів тепловий шок або не змінив проростання спор ($n = 3$), або знизив ВПС ($n = 1$). Це були ті самі чотири ізоляти, які проростали найінтенсивніше при постійній оптимальній температурі (Рис. 4.2.1: II-D KS, II-D SC, II-VA VA1, II-D KY). Позитивний ефект теплового шоку був найбільш помітним в ізолятах із низьким ВПС за оптимальної температури: II-F NY

(нахил = $0,64 \pm 0,09$, $p < 0,0001$), II-A NC (нахил = $0,62 \pm 0,09$, $p < 0,0001$) і II-D CT (нахил = $0,44 \pm 0,07$, $p < 0,0001$). Два ізоляти з генотипу II-E також продемонстрували особливо швидке збільшення ВПС із підвищенням температури: II-E NJ (нахил = $0,43 \pm 0,07$, $p < 0,0001$) і II-E TN (нахил = $0,38 \pm 0,07$, $p < 0,0001$). Позитивний вплив температури на ВПС також був значущим

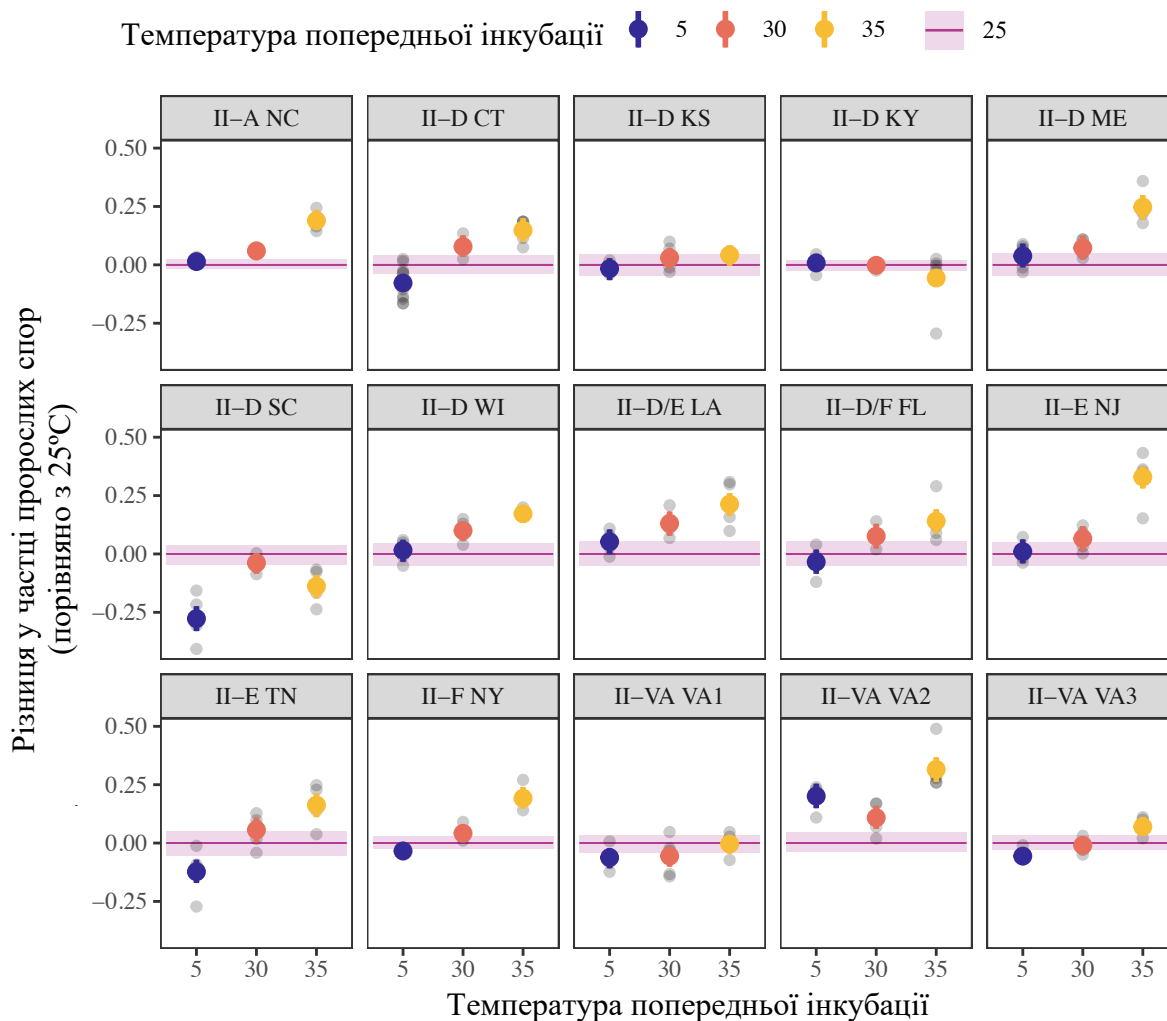


Рис. 4.4. Зміни у проростанні штамів *O. ophidiicola* відносно проростання за 25°C, залежні від температури попередньої інкубації. Кольорові крапки та лінії представляють середню різницю порівняно з проростанням за 25°C $\pm$ 95% достовірні інтервали. Кожна панель представляє ізолят, названий за його генотипом і штатом походження.

для ізолятів II-D ME, II-D WI, II-D/E LA, II-D/F FL, II-VA VA2 та II-VA VA3 з меншими значеннями нахилу. Ми виявили, що холодний шок або не змінює ВПС на достатньому рівні статистичної значущості (9 ізолятів), або знижує цей показник (5 ізолятів). В одному випадку як холодний, так і тепловий шок значно підвищили ВПС порівняно з оптимальною температурою (II-VA VA2).

Відсутність різниці у проростанні спор чотирьох ізолятів за попереднього теплового шоку може пояснюватися низькою швидкістю росту цих ізолятів. Було помічено, що ізолят II-D з Кентуккі не мав рясного спороутворення на шістнадцятий день культивування. Текстура колоній виглядала менш порошкоподібною, ніж в інших ізолятів, особливо швидкозростаючих (наприклад, II-F). Ймовірно, на момент приготування спорової суспензії, конідії тільки почали утворюватися, і стан їх спокою ще не настав. Таким чином, вплив температури для подолання стану спокою не був необхідним, і всі зрілі спори проросли відразу після поміщення у сприятливі для цього умови (наявність води та поживних речовин). Дійсно, ці чотири ізоляти характеризувалися найбільшою часткою пророслих спор з поміж усіх ізолятів та усіх температур попередньої інкубації.

Закономірностей залежності рясності проростання від генотипу чи географічного розподілу нами виявлено не було. Кореляції між швидкістю проростання та температурою по градієнту широти також не спостерігалось.

Для більшості ізолятів тепловий шок збільшував відсоток пророслих конідій. Це може бути адаптацією до змін температури тіла хазяїна, коли температура сигналізує патогену про стадії життєвого циклу змій, що характеризуються найвищою вірогідністю зараження. Будучи пойкилотермними, рептилії можуть досягати високої температури тіла лише гріючись на сонці (Cowles and Bogert, 1944; Huey, 1982), досягаючи 34–38 °C залежно від виду, розміру тіла, статі, типу середовища існування, сезонного

періоду, стратегії пошуку їжі, і фізіологічного стану (Brattstrom, 1965). Таким чином, гріння може бути важливою точкою конвергенції між життєвими циклами змії та гриба.

Хоча гібернакули є епіцентрами передачі патогену через випадки скупчення змії (Klauber, 1956; Parker and Brown, 1973, 1974), потенційно високі кількості грибних пропагул у вологих підземних гібернакулах (McKenzie et al., 2018) і тривалий час контакту, температура під час брумації (0 – 10 °C, Macartney et al., 1989) не є оптимальною для росту *O. ophidiicola*. В той самий час, період безпосередньо після гібернації характеризується виснаженням поживних речовин (Nordberg, 2013) і ослабленням імунної функції (Nelson & Demas, 1996), що робить змії особливо чутливими до інфекції. Прогрівання на сонці після зимової сплячки є добре задокументованим явищем у помірних видів змії (Dyugmedzhiev et al., 2019). Для самців рептилій прогрівання також має вирішальне значення для завершення сперматогенезу до періоду спарювання (Saint Girons & Kramer, 1963; Prestt 1971; Nilson, 1980; Bauwens et al., 1989). Можливо, саме це перше прогрівання після гібернації і є тригером, що сигналізує патогену про вдалий час для ініціації інфікування. Нерідко змії виходять з гібернації тимчасово, реагуючи на підвищення температури середовища у лютому і навіть у січні. Зважаючи на зміни клімату, це явище ставатиме дедалі розповсюдженішим. В такому разі патоген отримує додаткову перевагу, інфікуючи хазяїна протягом періоду відсутньої активності та линьки. Нарешті, невдовзі після сплячки змії вступають до шлюбного сезону. Спаровування має енергетичну вартість, що знижує здатність змії протистояти інфекції (наприклад, шляхом линяння), що разом із соціальною поведінкою створює можливість для передачі патогенів. Це узгоджується із сезонністю хвороби, що має найвищі значення поширеності та тяжкості саме навесні (McKenzie et al., 2019).

4.3. Порівняльна оцінка вірулентності та динаміки захворювання у маїсових полозів, інфікованих різними штамами *O.ophidiicola*

Для проведення порівняльного аналізу захворювання на офідіомікоз, викликаного різними штамами *O.ophidiicola*, 105 змій були інокульовані сімома штамами патогену, по 15 змій на кожен штам. З них один штам відносився до класу I і був виділений із ураження шкіри змії зі Швейцарії, інші шість ізолятів відносилися до різних генотипів класу II. З шести ізолятів класу II чотири були виділені в США і відносилися до трьох клональних ліній (II-D US, II-E US, II-F US) та одного рекомбінантного генотипу (II-VA US). Два ізоляти класу II були виділені з уражень шкіри змій в Європі (II-F Eur та II-D/E Eur; Додаток В). Кожна змія була інокульована у чотирьох місцях, з них три місця — з попередньою скарифікацією, і одне без такої. П'ятнадцять змій контрольної групи були інокульовані стерильним буферним розчином.

Вже на п'ятий день після інокуляції змій патогеном спостерігався початок розвитку уражень шкіри у скарифікованих місцях. Протягом наступних семи тижнів експерименту розвиток уражень на скарифікованих ділянках шкіри спостерігався у всіх групах, окрім контрольної. Ураження на інтактних ділянках виникли не у всіх інокульованих змій та не в усіх групах, і були загалом значно легші, тому аналіз уражень цих ділянок проводився окремо. За допомогою лінійної моделі змішаних ефектів визначали різницю у тяжкості уражень (вірулентності), викликаних різними штамами патогену протягом семи тижнів експерименту. Згідно з отриманими результатами, тяжкість уражень відрізнялася між контрольною групою та всіма дослідженими штамами попарно ($P < 0,0001$). Крім того, спостерігалася різниця у вірулентності між штамами патогену (Рис. 4.5). Штам рекомбінантного генотипу II-VA US характеризувався значно вищим середнім показником

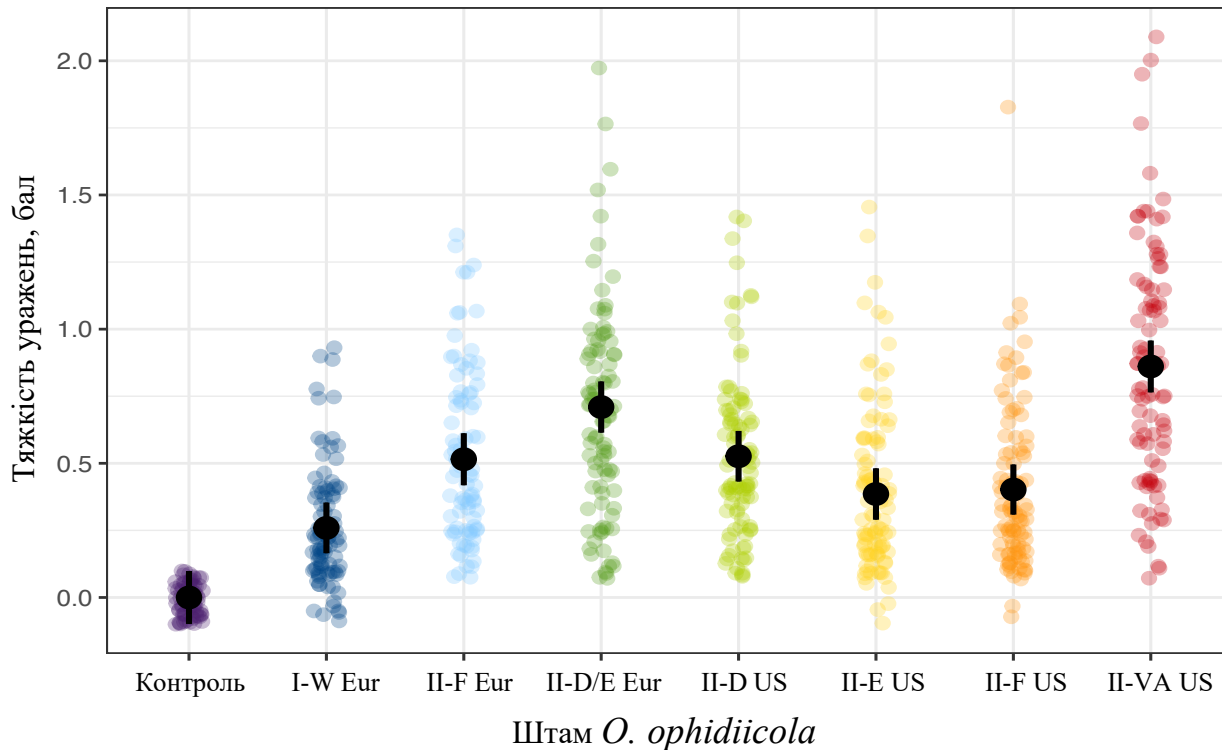


Рис 4.5. Вірулентність семи штамів *O. ophidiicola*. Кольорові точки представляють тяжкість окремого ураження шкіри у місцях з попередньою скарифікацією, чорні точки та лінії — передбачені моделлю середні значення з 95% довірчим інтервалом

тяжкості уражень ($0,86 \pm 0,05$) порівняно з показниками в інших групах ($p < 0,03$). Крім того, три змії з цієї групи загинули через 9 (2 особини) та 20 днів після інокуляції патогеном. Імовірно, вища вірулентність цього штаму пояснюється гіпотезою компромісу передачі, згідно з якою вища вірулентність може бути вигідною, якщо вона корелює з вищою вірогідністю передачі патогену до нового хазяїна. Це явище може спостерігатися в середовищі з високою щільністю хазяїв та/або за умови специфічної поведінки хазяїв (наприклад, часті контакти під час терморегуляції або гібернації у змії), що забезпечує швидкість передачі інфекції, вищу за швидкість елімінації особин з популяції внаслідок смертності, спричиненої захворюванням.

На другому місці за вірулентністю виявився європейській штаб II-D/E Eur (середній показник тяжкості уражень $0,71 \pm 0,05$). Вірулентність штабів II-F Eur, II-D US, II-E US та II-F US не відрізнялася на достатньому рівні статистичної значущості. Тяжкість уражень, викликана штабом з кладу I виявилася суттєво нижчою порівняно з усіма іншими штабами, окрім II-E US.

На підтвердження дослідження Blanvillain et al., 2024, штаб з кладу I не викликав таку важку інфекцію, як ізоляти з кладу II. Жодна змія, інфікована цим ізолятом, не померла протягом експерименту. В той самий час, змії, інфіковані ізолятами з Європи, що відносилися до кладу II, розвинули тяжче захворювання, подібно до змії, інфікованих ізолятами тієї самої кладу з США. У цих двох групах також спостерігалася смертність: дві особини, інфіковані штабом II-F Eur, загинули через 10 та 39 днів після інокуляції, ще одна особина, уражена штабом II-D/E Eur, загинула на 23 день. Дійсно, вірулентність штабів кладу II з Європи та США не відрізнялася на достатньому рівні статистичної значущості ($p = 0,214$). Отже, філогенетичне положення патогену є одним з факторів, що обумовлюють тяжкість захворювання.

Ми проаналізували динаміку тяжкості уражень, викликаних різними штабами *O. ophidiicola*, протягом семи тижнів експерименту (Рис. 4.6). У трьох групах значний пік інфекції прийшовся на третій тиждень після інокуляції патогеном. Середня тяжкість уражень у групі, інфікованій ізолятом II-E US становила $1,01 \pm 0,12$ ($p < 0,02$), для II-D US цей показник становив $1,28 \pm 0,13$ ($p < 0,02$), а для II-VA US — $1,57 \pm 0,13$ ($p < 0,04$). Ще для двох штабів та третій тиждень спостерігалася зростання показників тяжкості уражень шкіри ($1,11 \pm 0,12$ для II-D/E Eur та $0,86 \pm 0,11$ для II-F US), але вони не відрізнялися від показників інших тижнів на достатньому рівні значущості.

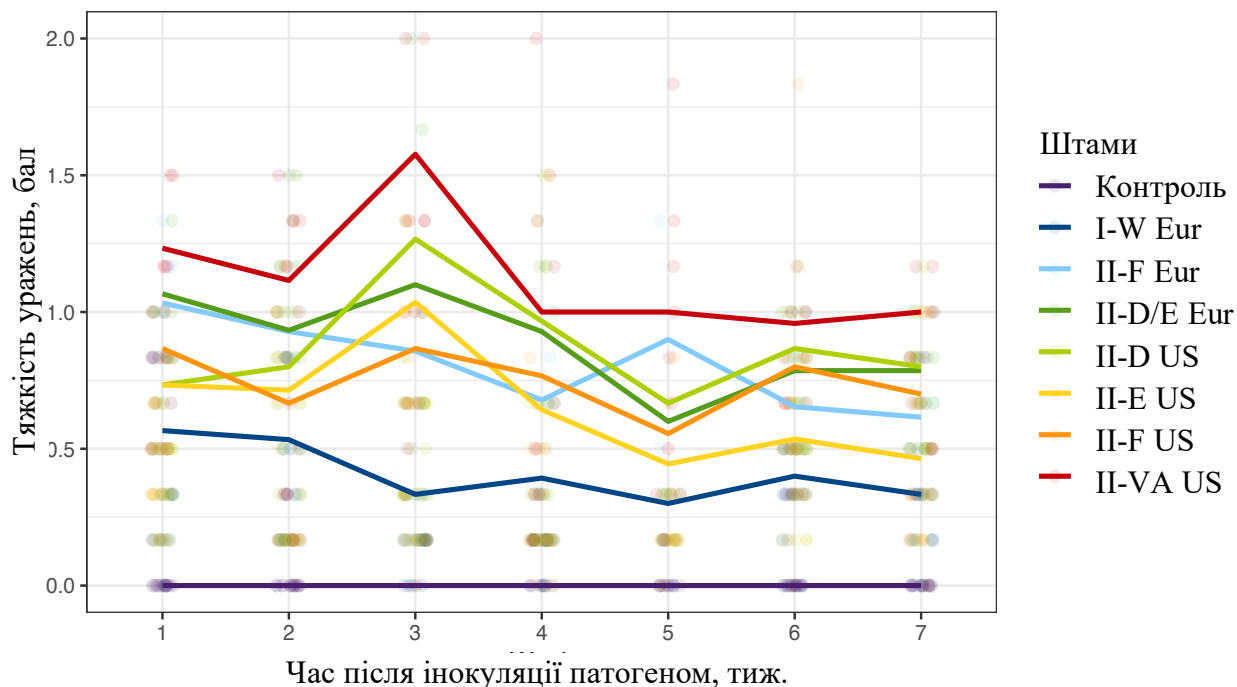


Рис 4.6. Динаміка тяжкості уражень шкіри, викликаних сімома штамми *O. ophidiicola*, протягом 49 днів експерименту. Кольорові точки представляють тяжкість окремого ураження шкіри, лінії — передбачені моделлю середні значення тяжкості уражень

Штами I-W та II-F Eur спричинили найтяжчі ураження вже через тиждень після інокуляції ($0,59 \pm 0,06$ та $1,04 \pm 0,11$ відповідно), після чого спостерігалось зниження інтенсивності симптомів інфекції. При цьому для штаму I-W тяжкість уражень суттєво не відрізнялася протягом перших двох тижнів, після чого знизилася ($p < 0,012$). Погіршення уражень шкіри в групі, інокульованій штамом II-F Eur, на п'ятому тижні експерименту не виявилось статистично значущим ($p = 0,36$ у порівнянні з четвертим тижнем, $p = 0,27$ в порівнянні з шостим тижнем).

Попередня скарифікація була важливим фактором, що обумовлював як появу симптомів захворювання, так і їх тяжкість (Рис. 4.7).

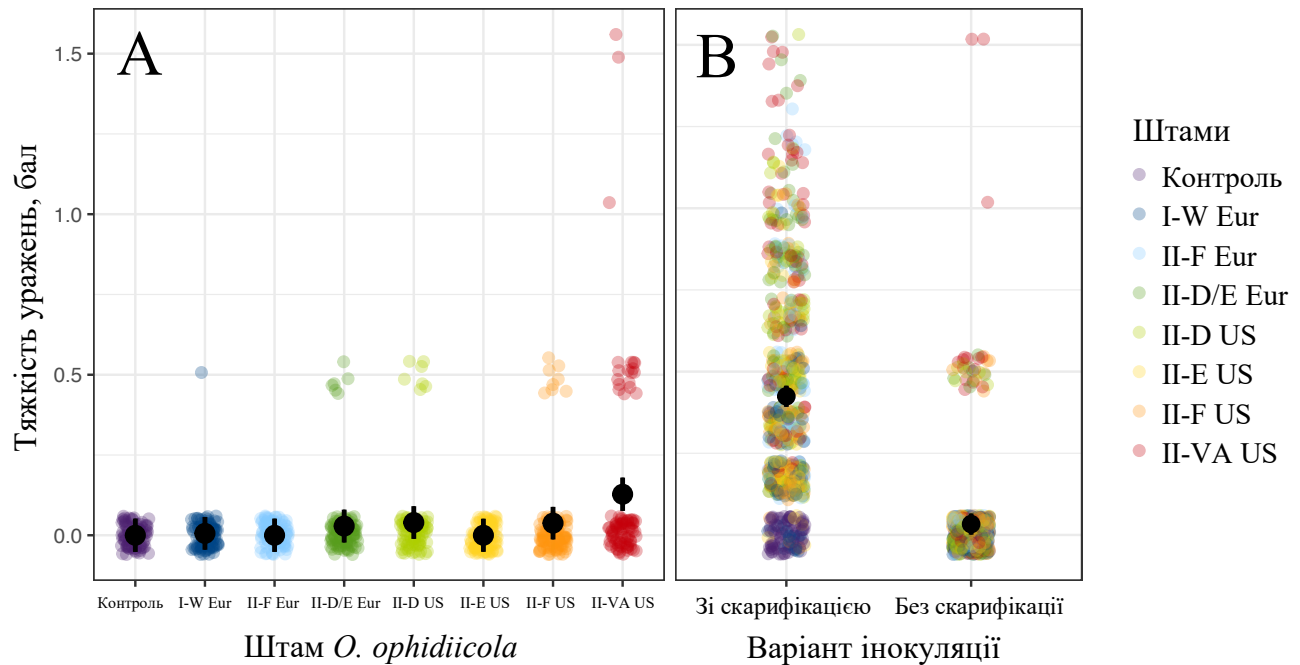


Рис. 4.7. Тяжкість уражень, спричинених сімома штамами *O. ophidiicola* у місцях без попередньої скарифікації (А). Різниця тяжкості уражень при інокуляції зі скарифікацією та без такої (В). Кольорові точки представляють тяжкість окремого ураження шкіри, чорні точки та лінії — передбачені моделлю середні значення та 95% довірчий інтервал

Найлегші ураження (0,5 балів) спостерігалися у декількох змій, заражених штамами II-D/E Eur (n = 3), II-D US (n = 3), II-F US (n = 3) та II-VA US (n = 5). З групи, інокульованої штамом I клади ураження спостерігалось лише на одній особині і лише в перший тиждень. В однієї особини, інокульованої штамом II-VA US, тяжкість ураження на ділянці шкіри без попередньої скарифікації коливалася і досягала балів 1 та 1,5 протягом перших чотирьох тижнів експерименту. Таким чином, штам II-VA не тільки спричиняв тяжчі ураження з попередньою скарифікацією, але й призводив до формування уражень тяжчого ступеню у більшої кількості особин без травматизації шкіри ($p < 0,02$ порівняно з усіма іншими групами). Загалом, інокуляція патогену з

попередньою травматизацією шкіри призвела до появи тяжчих уражень (середній бал $0,42 \pm 0,02$), ніж інокуляція інтактних ділянок (середній бал $0,03 \pm 0,02$), $p < 0,0001$.

Під час аналізу середньої кількості днів між линьками у різних групах експерименту було виявлено, що всі заражені змії линяли значно частіше, ніж змії у контрольній групі ($p < 0,0001$). Крім того, середня частота линьки варіювала по групах (Рис. 4.8. А). Змії, інокульовані штамом I-W линяли значно рідше (в середньому раз у 21 день ± 1 день), ніж змії з усіх інших груп, за винятком контрольної (35 днів ± 1 день). А зараження штамом II-VA US, що показав себе як найбільш вірулентний, призвело до збільшення частоти

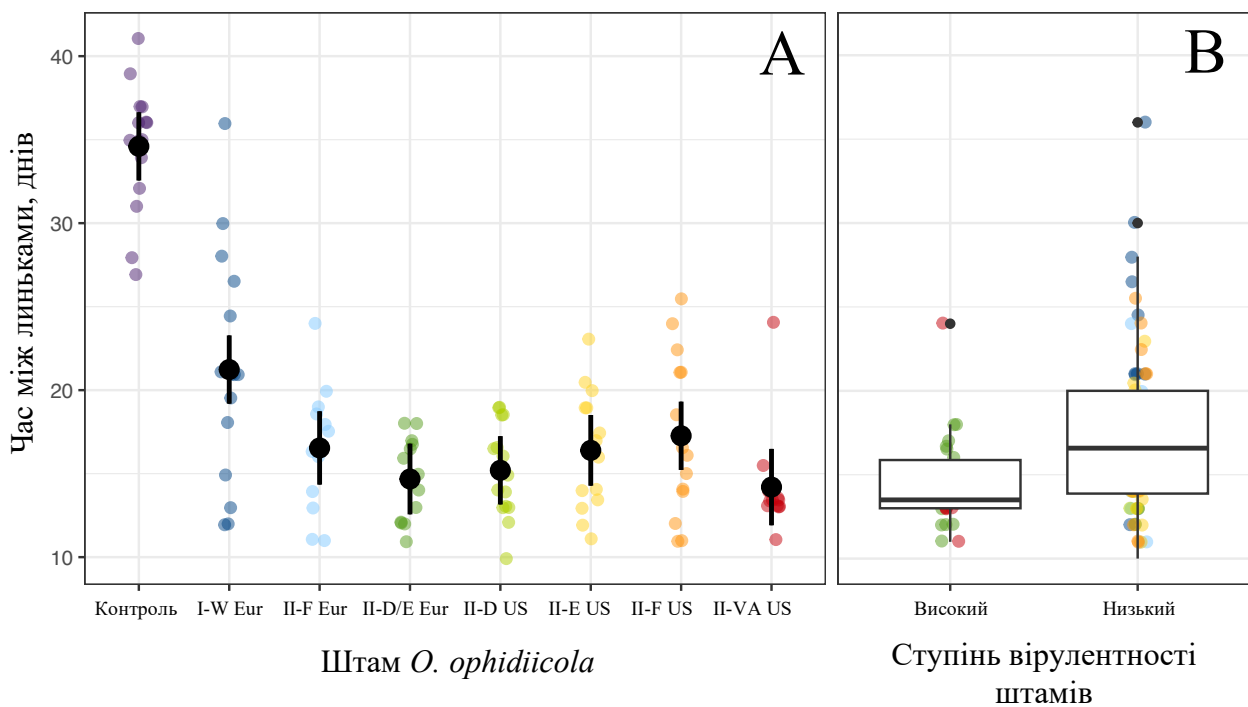


Рис. 4.8. Середня частота линьки змій, уражених сімома штамами *O. ophidiicola* (А). Порівняння частоти линьки між групами штамів з низькою та високою вірулентністю (В). Кольорові точки представляють середній час між линьками для однієї особини, чорні точки та лінії — передбачені моделлю середні значення та 95% довірчий інтервал

скидання шкіри (раз на 14 днів $\pm$ 1 день). Цей показник відрізнявся від середньої частоти лінки у контрольній групі ($p < 0,0001$), а також у групах, заражених штамами I-W ($p < 0,0001$) та II-F US ($p = 0,047$), але не в інших групах. Для перевірки гіпотези про те, що важчі ураження провокують більш часті лінки у хворих змій, штами були розділені на дві групи за тяжкістю уражень: менш вірулентні (штами I-W Eur, II-F Eur, II-D US, II-E US, II-F US) та більш вірулентні (штами II-D/E Eur та II-VA US). Проведення тесту Уїлкоксона (Манна-Уїтні) підтвердило, що ці дві групи відрізняються за середньою частотою лінки на рівні значущості $p = 0,004$ ($W=1289,5$; Рис. 4.8. В). В нашому дослідженні линяння призвело до відсутності патогену на поверхні шкіри інфікованих змій за результатами кПЛР після другого або третього циклу линяння, що свідчить про те, що це може бути ефективним захисним механізмом при боротьбі із захворюванням на офідіомікоз у змій.

РОЗДІЛ 5. ІНШІ ГРИБИ-ПАТОГЕНИ АМФІБІЙ ТА РЕПТИЛІЙ, ПОШИРЕНІ В УКРАЇНІ

5.1. Поширеність патогенного гриба амфібій *Batrachochytrium dendrobatidis* в Україні

В рамках дослідження поширеності *B. dendrobatidis* на території України було зібрано мазки шкіри та/або зразки тканин 11 видів земноводних із 36 локацій у Волинській, Житомирській, Запорізькій, Київській, Миколаївській, Одеській, Полтавській, Чернівецькій, Чернігівській, Харківській та Херсонській областях (Jakóbk et al., 2024). Більшість досліджених особин складала зелені жаби комплексу *Pelophylax esculentus* (303 особини, 67,9 %) і кумки звичайна та жовточерева (*Bombina* spp., 126 особин, 28,2 %).

Для території України були вперше оцінені наявність та поширеність патогену амфібій *B. dendrobatidis*. Патоген було виявлено у 4 таксонів (*Bombina bombina*, *B. variegata*, *Pelophylax esculentus* і *Hyla orientalis*). З 446 зразків амфібій загалом 33 (7,4 %) виявилися позитивними на присутність *B. dendrobatidis* за результатами трьох або чотирьох повторних кПЛР і були визнані інфікованими. Ці особини походили з восьми населених пунктів з 36 досліджених (22,2%). Крім того, 15 протестованих особин (з Чернівецької та Волинської областей) продемонстрували позитивний результат в одній або двох із чотирьох реакцій кПЛР та мали високі порогові значення C_t ($41,5 \pm 1,6$), тому вважалися в цьому дослідженні негативними. Слід зазначити, що всі досліджені особини, включаючи позитивні на присутність *B. dendrobatidis* за результатами кПЛР, не мали симптомів хітридіомікозу.

Аналіз поширеності *B. dendrobatidis* серед таксонів з найбільшими розмірами вибірок виявив найвищі значення для *B. variegata* (19,7%, 11,5–30,4%), *B. bombina* (9,1%, 2,5–21%) та *Pelophylax* sp. (4,3%, 2,3–7,2%).

Дванадцять з тринадцяти інфікованих особин *Pelophylax* походили з одного місця (оз. Світязь, Волинська область), де поширений переважно гібрид *P. esculentus* за оцінкою ділянки геному SAI-1.

Географічне поширення *B. dendrobatidis* в Україні було обмежене дослідженими ділянками на півночі та заході України (Волинська, Чернівецька, Київська області). У Чернівецькій області поширеність патогену була розрахована для трьох локацій: с. Круп'янське — 40% (12,1–73,7%), с. Багна — 18 % (8,9–32 %) та с. Заволока — 25 % (5,4–57,2 %); на цих локаціях всі інфіковані особини відносилися до роду *Bombina* sp. На озері Світязь у Волинській області поширеність *B. dendrobatidis* серед зелених жаб (*Pelophylax* spp.) була надзвичайно високою — 50 % (29,1–70,8 %). Далі на схід лише на одній ділянці вздовж річки Уж у Чорнобильській зоні була виявлена одна особина, позитивна на присутність патогену за кПЛР (поширеність 4,7%, 0,1–23,8%). Ця особина також мала низьке навантаження *B. dendrobatidis*. Патоген не був виявлений у 291 зразках амфібій, що походили із центральної, південної та східної частин країни (Рис. 5.1).

За допомогою критерія Фішера був виявлений статистично значущий зв'язок між придатністю середовища існування, передбаченою моделлю для *B. dendrobatidis* (Tytar et al. 2023) та наявністю патогену, оціненою за допомогою польових зразків ($p < 0,001$). Крім того, місця поширення *B. dendrobatidis* мали значно вищі індекси придатності середовища існування для цього патогену порівняно з локаціями, де *B. dendrobatidis* не був виявлений ($0,666 \pm 0,157$ проти $0,382 \pm 0,241$, Kruskal-Wallis $\chi^2 = 8,04$, $p < 0,01$).

Одним із факторів, який міг вплинути на отриманий розподіл знахідок *B. dendrobatidis* територією України, був час відбору зразків. Вірогідність виявлення патогену, як відомо, нижча в теплі місяці року, особливо наприкінці

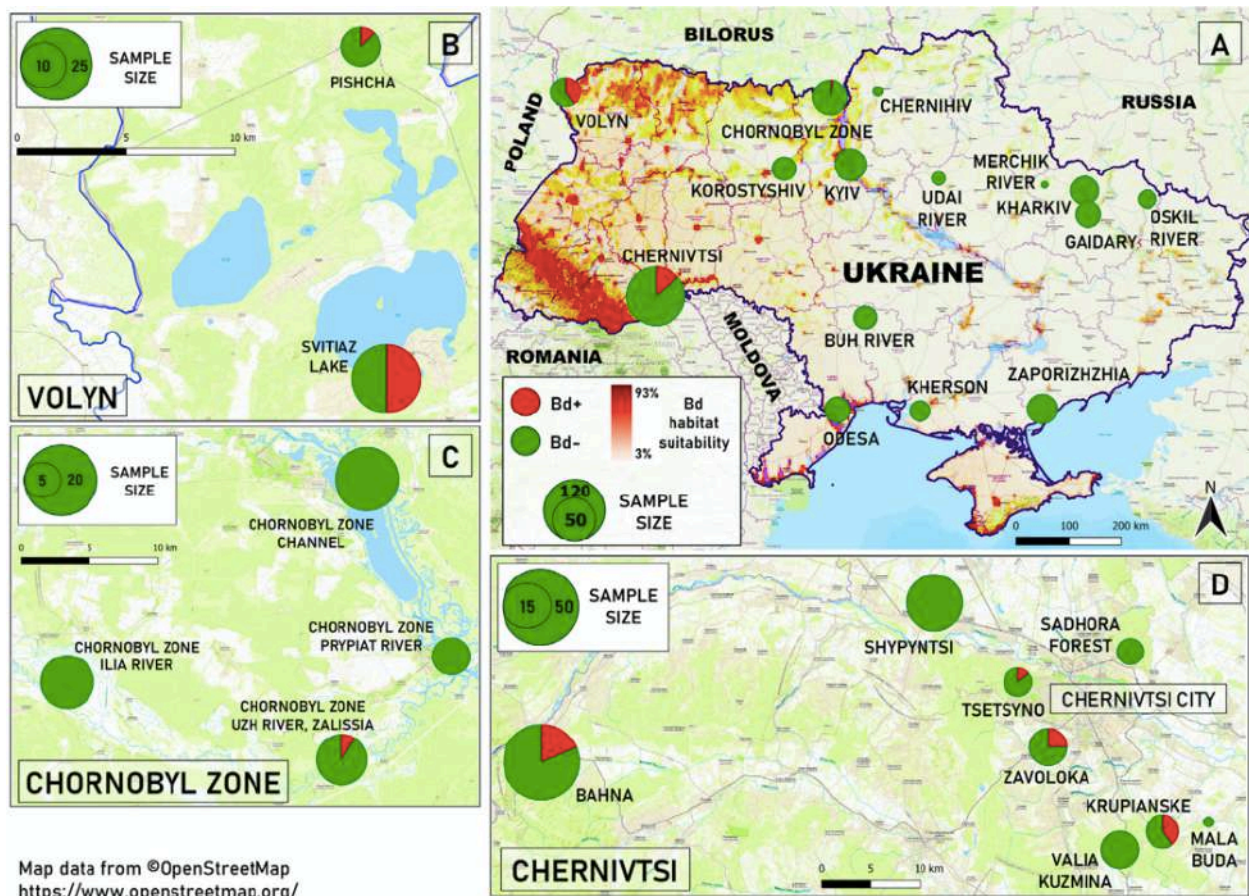


Рис 5.1. Досліджені регіони України (А) та вибрані населені пункти у Волинській (В), Чорнобильській (С) та Чернівецькій (D) областях (Jakóbič et al., 2024). Кругові діаграми представляють частку зразків, позитивних на *B. dendrobatidis*; розмір діаграм пропорційний розмірам вибірки. Значення придатності середовища проживання за Tytar et al. (2023) накладені на карту на панелі А

літа (Ouellet et al., 2005, Kriger & Hero, 2007b). Загалом відбір зразків проводився випадково з квітня по жовтень, при цьому більшість зразків було зібрано в травні та червні, хоча деякі польові роботи в центральній та південній Україні проводилися в серпні (10/25 локацій). Таким чином, при інтерпретації отриманих результатів слід брати до уваги неоптимальний час

відбору проб на деяких ділянках. Хоча відбір зразків у кінці літа міг сприяти відсутності виявлення *B. dendrobatidis* у східній та південній частинах України, цей фактор не може повністю пояснити отримані висновки, оскільки більшість зразків було зібрано в прохолодні періоди року.

Отримані результати поширеності *B. dendrobatidis* та прогнози на основі моделі (Tytar et al. 2023) свідчать про те, що цей патоген відсутній або присутній у малих кількостях у центральних, східних та південних регіонах України. Ландшафт цих територій, як правило, відкритий, безлісний, переважно сільськогосподарський і перехідний до степу на східній і південній периферії. Ці території пов'язані з меншою кількістю опадів у теплі місяці та ширшим діапазоном температур (висока континентальність), тоді як оптимальний температурний діапазон для росту *B. dendrobatidis* є відносно вузьким (17–25°C), а перегрівання, заморожування та висихання є смертельними для гриба (Johnson & Speare, 2003, Piotrowski et al., 2004). У межах цих, як правило, менш сприятливих для патогену територій є досить великі ліси, болота та річкові угруповання з відносно придатними умовами для земноводних, наприклад, на берегах річок Удай і Мерчик, в околицях с. Гайдари Харківської області, в заплавах лісах нижньої течії Дніпра (с. Праві Солонці Херсонської обл.) та дельти Дунаю (с. Вилкове Одеської обл.) (Suriadna & Mykutynech 2023). Ці території можуть виступати потенційними кліматичними рефугіумами для великих популяцій амфібій, присутніх тут (Puschendorf et al., 2009), зменшуючи навантаження *B. dendrobatidis* принаймні в теплі пори року. Особливий інтерес представляють регіони центральної України з низькою придатністю середовища існування для патогену. Завдяки своїй близькості до передбачуваних територій появи *B. dendrobatidis*, ці потенційні рефугіуми можуть відігравати важливу роль у збереженні земноводних, поповнюючи

через міграцію популяції, які зазнають зменшення чисельності через хітридіомікоз. Оскільки землекористування в цих регіонах переважно сільськогосподарське, потенційне занепокоєння викликає вплив підвищеного забруднення пестицидами на стан місцевих популяцій амфібій та їх сприйнятливість до хітридіомікозу. Зважаючи на вищесказане, доцільним є запровадження природоохоронного статусу цих територій.

Згідно з отриманими результатами, хітридіомікоз є потенційною загрозою для популяцій амфібій в Україні, особливо у Карпатських горах та їх передгір'ях, де спостерігається найбільше видове різноманіття земноводних (19 видів; Pysanets, 2012). Тому у майбутні дослідження амфібій на заході України необхідно впроваджувати заходи біозахисту, спрямовані на стримування розповсюдження *B. dendrobatidis* через людину.

5.2 Виділення ентомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* з ураження шкіри гадюки Нікольського (*Vipera berus nikolskii*) з природи

У самця гадюки Нікольського (*Vipera berus nikolskii*), відловленого 29.04.2021 в листяному лісі поблизу с. Руська Лозова Дергачівського району Харківської області, спостерігалася одиночне ураження покривних тканин, а саме деструкція та потемніння краю черевної луски (Рис. 5.2. А). Для ідентифікації патогену, що спричинив ураження шкіри, відібраний зразок культивували на поживному середовищі Сабуро за 25°C. На 7-му добу після посіву зразка шкіри на поживне середовище спостерігали ріст чистої культури ізоляту гриба (Рис. 5.2. В). Форма колонії була круглою, з опуклим профілем, що піднімався над поверхнею середовища на 4 мм, гладеньким краєм і пухнастою поверхнею. Спостерігалися концентричні білі та жовтуватобілі кільця, які чергувалися. Ознак споруляції виявлено не було (Klynova & Zinenko, 2024).



Рис 5.2. Ураження шкіри гадюки Нікольського (А) та чиста культура гриба, що була виділена з ураження на поживне середовище Сабуро

Аналіз отриманої нуклеотидної послідовності ділянки ITS виявив 100% збіг з відповідною послідовністю ентомопатогенних грибів *B. bassiana* (номер доступу у GenBank MN122409.1) та *Beauveria pseudobassiana* (номер доступу у GenBank NR_111598.1), що є криптичним видом *B. bassiana sensu lato*. Порівняння ділянки LSU з еталонними послідовностями показало 100% відповідність регіону LSU *B. bassiana* (номер доступу MH867244.1, ізолят CBS 126.36), культура якого зберігається в колекції CBS-KNAW Інституту біорізноманіття грибів Вестердайк, Нідерланди.

Оскільки визначення послідовностей ділянок ITS та LSU не має достатньої роздільної здатності для розрізнення *B. bassiana* і *B. pseudobassiana*, культура, виділена з ураження шкіри гадюки Нікольського, була ідентифікована як *B. bassiana sensu lato*.

B. bassiana вважається ентомопатогенним грибом. Різноманітність хазяїв *Beauveria* spp. включає 17 рядів членистоногих (Wang et al., 2020). Види *Beauveria* також були виділені з ґрунту за допомогою приманок, а також із поверхні та внутрішньої частини рослин. Згідно з Huber (1958) і Wartenberg та Freund (1961), *B. bassiana* має слабкі сапрофітні властивості, але її ріст у ґрунті пригнічується ґрунтовими мікроорганізмами. Використовуючи селективні середовища, *B. bassiana* була виділена з кори дерев в'яза, ґрунту біля основи дерев в'яза (Doberski & Tribe, 1980), кори *Carpinus caroliniana* (Bills & Polishook, 1991) та з філоплани різних рослин живоплоту (Meyling & Eilenberg, 2006).

З моменту свого першого опису види *Beauveria* були визнані грибами з потенційним застосуванням для боротьби з комахами-шкідниками, у зв'язку з чим у 1967 році Muller-Kogler узагальнив потенційні несприятливі ефекти цих грибів на хребетних і людей. Сьогодні процеси реєстрації комерційних продуктів включають комплексні тести на безпеку хребетних, які проводяться з кількома ізолятами *B. bassiana*. Загалом було встановлено, що *Beauveria* spp. не є токсичними або інфекційними для хребетних, таких як риби (Goettel & Jaronski, 1997), амфібії (Donovan-Peluso et al., 1980), птахи (Althouse et al., 1997, Johnson et al., 2002) і ссавці (Goettel & Jaronski, 1997, Semalulu et al., 1992). Проте повідомлялося про деякі випадки інфікування рептилій грибом *B. bassiana* (Sachs et al., 1985, Ishibashi et al., 1987, Low et al., 1997, Kislá et al., 2000, Sigler, 2002).

Є кілька повідомлень про те, що *B. bassiana* викликає легеневі гранульоми у сухопутних та морських черепах, що було підтверджено гістопатологічними та культуральними дослідженнями (Georg et al., 1963, Cabo et al., 1995, Schumacher et al., 2014). Черепаха, яку утримували при 22 °C і якій ввели в легені 0,5 мл суспензії спор *B. bassiana*, не загинула, тоді як друга інфікована

черепаша померла при утриманні за 16 °C (Muller-Kogler, 1967). *B. bassiana* була виділена з уражень легень у кількох алігаторів, які загинули від легеневої хвороби (Fromtling et al., 1979). Припускають, що алігатори були схильні до інфекції через тривалий період сплячки, спричинений суворою зимою та несправністю системи опалення зоопарку. Оптимальна температура для *B. bassiana* становить близько 25 °C, а термічний максимум розташовується нижче 37 °C, що пояснює сприятливість комах і пойкилотермів до цього патогену і відсутність повідомлень про захворювання гомойотермних видів.

Вважається, що найчастіше інфекція *B. bassiana* уражує легені у хребетних шляхом вдихання спор, з подальшим системним захворюванням або без нього. Враховуючи, що неоптимальні умови утримання сприяють розвитку інфекції у рептилій, можна зробити висновок, що хоча *B. bassiana* не є основним збудником цих видів, але може викликати опортуністичні системні мікози.

Виділення *B. bassiana* з ураженої шкіри гадюки можна пояснити двома гіпотезами. По-перше, при ініціації інфекції комах *B. bassiana* механічно проникає в кутикулу, утворюючи апресорій, розвиваючи в ньому тиск і пробиваючи покривні тканини інфекційними гіфами (Zimmermann, 2007). Таким чином, ферменти, специфічні для шкіри рептилій, не є необхідними для ініціації інфекції. Однак точковий характер проникнення суперечить наявності макроскопічних уражень на лусці. Альтернативно, кератинофільний патогенний гриб, такий як *O. ophioidiicola*, міг спричинити ураження та згодом зникнути через несприятливі умови, відкриваючи ворота інфекції для іншого гриба. У цьому випадку незрозуміло, чи *B. bassiana* колонізувала уражену ділянку, чи були присутні лише її пропагули за відсутності вегетації. *B. bassiana* не має кератолітичних ферментів (Khachatourians, 1996), але якщо ураження було достатньо глибоким, щоб досягти живих тканин, гриб мав

сприятливий субстрат, і його присутність не була випадковою. Виділення чистої культури напряду з ураженої тканини та відсутність контамінації ґрунтовими сапротрофами, такими як *Aspergillus*, *Penicillium* та *Alternaria*, свідчать на користь цієї гіпотези.

ВИСНОВКИ

1. Патогенний гриб *Ophidiomyces ophidiicola* спорадично поширений на території України. Він був знайдений у 13,4% досліджених змій з найвищою поширеністю серед особин *Natrix natrix*. *O. ophidiicola* був також виявлений в колекційних зразках звичайних вужів на території Харківської області щонайменше з 2003 року, з території Грузії з 1978 року, що підтверджує наявність цього патогену на перехресті Європи та Азії щонайменше з другої половини двадцятого сторіччя.

2. Ізоляти *O. ophidiicola* з Європи продемонстрували значно менші темпи росту, ніж ізоляти із США. Значущою була відмінність у діаметрі колоній між ізолятами, що відносяться до I та II клад. Існує також значна мінливість між представниками різних генотипів *O. ophidiicola*.

3. Проростання спор різних ізолятів *O. ophidiicola* після інкубації при оптимальній температурі варіювало в діапазоні від 4,6% до 93,4%. Відсоток пророслих спор більшості ізолятів значно збільшився після впливу підвищених температур і не змінювався після впливу холодового шоку. Це може бути адаптацією до синхронізації фенологічних циклів гриба та хазяїна.

4. Із семи вивчених штамів, штам рекомбінантного генотипу II-VA US характеризувався значно вищим середнім показником тяжкості уражень при експериментальному інфікуванні. Ізоляти класу II викликали значно тяжчі ураження, ніж ізоляти класу I. Частота появи уражень та їх тяжкість були значно вищими при скарифікації шкіри перед інокуляцією патогеном. Всі заражені змії линяли значно частіше, ніж здорові змії у контрольній групі. Ступінь ураження корелює з частотою линяння.

5. Станом на цей час географічне розповсюдження *Paranannizziopsis* spp. у Європі відомо лише на Піренейському півострові. Було виявлено два нові

види-хазяїни для цього патогену у Європі: *Vipera latastei* та *Coronella austriaca*. Крім того, був задокументований випадок ураження шкіри *Vipera berus nikolskii* з природи ентомопатогенним грибом *Beauveria bassiana sensu lato*. Велика кількість уражень шкіри змій з природи не має визначеного збудника.

6. Для протидії поширенню *O. ophidiicola* у природніх популяціях змій, при проведенні польових досліджень необхідно дотримуватися асептичних технік, стерилізувати матеріали та обладнання після обробки кожної особини. При утриманні змій в неволі з метою подальшого випуску необхідно проводити регулярний моніторинг стану здоров'я рептилій, в тому числі за допомогою кПЛР, ізолювати симптоматичних особин, розміщувати теплові лампи у тератіумах для збільшення швидкості линяння, регулярно очищувати тераріуми для зменшення ймовірності повторного зараження. Утримання *Natrix tessellata* в неволі рекомендується уникати.

7. Для території України були вперше оцінені наявність та поширеність патогену амфібій *B. dendrobatidis*. Аналіз поширеності *B. dendrobatidis* виявив найвищі значення для *B. variegata* (19,7%), *B. bombina* (9,1%) та *Pelophylax* sp. (4,3%). Географічне поширення *B. dendrobatidis* в Україні обмежене регіонами на півночі та заході України, що корелює з кліматичною моделлю поширення (Tytyar et al. 2023).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ali, S.R.A., Safari, S., Thakib, M.S., Bakeri, S.A., Ghani, N.A.A. Soil fungal community associated with peat in Sarawak identified using 18S rDNA marker. (2016). Journal of Oil Palm Research, 28(2), 161-171.
<https://doi.org/10.21894/jopr.2016.2802.03>
2. Allain, S. J., Leech, D. I., Hopkins, K., Seilern-Moy, K., Rodriguez-Ramos Fernandez, J., Griffiths, R. A., & Lawson, B. (2024). Characterisation, prevalence and severity of skin lesions caused by ophidiomycosis in a population of wild snakes. Scientific Reports, 14(1), 5162. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03352-1>
3. Allender, M. C., Baker, S., Britton, M., & Kent, A. D. (2018). Snake fungal disease alters skin bacterial and fungal diversity in an endangered rattlesnake. Scientific Reports, 8(1), 12147. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30709-x>
4. Allender, M. C., Dreslik, M. J., Wylie, D. B., Wylie, S. J., Scott, J. W., & Phillips, C. A. (2013). Ongoing health assessment and prevalence of *Chrysosporium* in the eastern massasauga (*Sistrurus catenatus catenatus*). Copeia, 2013(1), 97-102. <https://doi.org/10.1643/OT-12-004>
5. Allender, M. C., Dreslik, M., Wylie, S., Phillips, C., Wylie, D. B., Maddox, C., ... & Kinsel, M. J. (2011). *Chrysosporium* sp. infection in eastern massasauga rattlesnakes. Emerging infectious diseases, 17(12), 2383.
<http://dx.doi.org/10.3201/eid1712.110240>
6. Allender, M. C., Raudabaugh, D. B., Gleason, F. H., & Miller, A. N. (2015). The natural history, ecology, and epidemiology of *Ophidiomyces ophiodiicola* and its potential impact on free-ranging snake populations. Fungal Ecology, 17, 187-196.<https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.05.003>

7. Allender, M. C., Ravesi, M. J., Haynes, E., Ospina, E., Petersen, C., Phillips, C. A., & Lovich, R. (2020). Ophidiomycosis, an emerging fungal disease of snakes: Targeted surveillance on military lands and detection in the western US and Puerto Rico. *PloS one*, 15(10), e0240415.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240415>
8. Althouse, C. M., Petersen, B. E., & McEwen, L. C. (1997). Effects on young american kestrels (*Falco sparverius*) exposed to *Beauveria bassiana* bioinsecticide. *Bull Environ Contam Toxicol* 1997; 59, 507–512.
<https://doi.org/10.1007/s001289900507>
9. Anderson, K.B., Steeil, J.C., Neiffer, D.L., Evans, M., Peters, A., Allender, M.C., Cartoceti A.N. (2021). Retrospective Review of Ophidiomycosis (*Ophidiomyces ophiodiicola*) at the Smithsonian's National Zoological Park (1983-2017). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 52(3). 997-1002.
<https://doi.org/10.1638/2020-0213>
10. Anderson, R. M., & May, R. M. (1982). Coevolution of hosts and parasites. *Parasitology*, 85(2), 411-426.
<https://doi.org/10.1017/S0031182000055360>
11. Baker, S.J., Haynes, E., Gramhofer, M., Stanford, K., Bailey, S., Christman, M., Allender, M.C. (2019). Case definition and diagnostic testing for snake fungal disease. *Herpetological Review*, 50(2), 279–285.
12. Băncilă, R. I., Lattuada, M., & Sillero, N. (2023). Distribution of amphibians and reptiles in agricultural landscape across Europe. *Landscape Ecology*, 38(3), 861-874. <https://doi.org/10.1007/s10980-022-01583-w>
13. Bauwens, D., Van Damme, R., & Verheyen, R. F. (1989). Synchronization of spring molting with the onset of mating behavior in male lizards, *Lacerta vivipara*. *Journal of herpetology*, 23(1), 89-91.
<https://doi.org/10.2307/1564326>

14. Berry, K. H., Brown, M. B., Vaughn, M., Gowan, T. A., Hasskamp, M. A., & Torres, M. C. M. (2015). *Mycoplasma agassizii* in Morafka's desert tortoise (*Gopherus morafkai*) in Mexico. *Journal of Wildlife Diseases*, 51(1), 89-100. <https://doi.org/10.7589/2014-04-083>
15. Bertelsen, M. F., Crawshaw, G. J., Sigler, L., & Smith, D. A. (2005). Fatal cutaneous mycosis in tentacled snakes (*Erpeton tentaculatum*) caused by the *Chrysosporium* anamorph of *Nannizziopsis vriesii*. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 36(1), 82-87. <https://doi.org/10.1638/04-020>
16. Biber, M. F., Voskamp, A., & Hof, C. (2023). Potential effects of future climate change on global reptile distributions and diversity. *Global Ecology and Biogeography*, 32(4), 519-534. <https://doi.org/10.1111/geb.13646>
17. Bicknese E (2009) Itraconazole treated CANV (*Chrysosporium* anamorph of *Nannizziopsis vriesii*) in green anacondas (*Eunectes murinus murinus*). *Proc ARAV*:157–158
18. Bills, G. F., & Polishook, J. D. (1991). Microfungi from *Carpinus caroliniana*. *Canadian Journal of Botany*, 69(7), 1477-1482. <https://doi.org/10.1139/b91-191>
19. Blanvillain, G., Lorch, J. M., Joudrier, N., Bury, S., Cuenot, T., Franzen, M., ... & Hoyt, J. R. (2024). Contribution of host species and pathogen clade to snake fungal disease hotspots in Europe. *Communications biology*, 7(1), 440. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-06424-x>
20. Blehert, D. S., Hicks, A. C., Behr, M., Meteyer, C. U., Berlowski-Zier, B. M., Buckles, E. L., ... & Stone, W. B. (2009). Bat white-nose syndrome: an emerging fungal pathogen? *Science*, 323(5911), 227-227. <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1163874>
21. Böhm, M., Collen, B., Baillie, J. E., Bowles, P., Chanson, J., Cox, N., ... & Mateo, J. A. (2013). The conservation status of the world's reptiles.

Biological conservation, 157, 372-385.

<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2012.07.015>

22. Bohuski, E., Lorch, J. M., Griffin, K. M., & Blehert, D. S. (2015). TaqMan real-time polymerase chain reaction for detection of *Ophidiomyces ophiodiicola*, the fungus associated with snake fungal disease. BMC Veterinary Research, 11, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0407-8>

23. Bradley, H. S., Craig, M. D., Tomlinson, S., Cross, A. T., Bamford, M. J., & Bateman, P. W. (2022). Predators in a mining landscape: Threats to a behaviourally unique, endangered lizard. Austral Ecology, 47(5), 1077-1090. <https://doi.org/10.1111/aec.13195>

24. Brattstrom, B. H. (1965). Body temperatures of reptiles. American Midland Naturalist, 376-422. <https://doi.org/10.2307/2423461>

25. Brooks, M. E., Kristensen, K., Van Benthem, K. J., Magnusson, A., Berg, C. W., Nielsen, A., ... & Bolker, B. M. (2017). glmmTMB balances speed and flexibility among packages for zero-inflated generalized linear mixed modeling.

26. Bürkner, P. C. (2017). brms: An R package for Bayesian multilevel models using Stan. Journal of statistical software, 80, 1-28.

27. Burns G, Ramos A, Muchlinski A (1996) Fever response in North American snakes. J Herpetol. <https://doi.org/10.2307/1565503>

28. Cabo, J. G., Serrano, J. E., & Asensio, M. B. (1995). Mycotic pulmonary disease by *Beauveria bassiana* in a captive tortoise: Mykotische Lungenerkrankung durch *Beauveria bassiana* bei einer in Gefangenschaft gehaltenen Schildkröte. Mycoses, 38(3-4), 167-169. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1995.tb00043.x>

29. Campbell, L. J., Burger, J., Zappalorti, R. T., Bunnell, J. F., Winzeler, M. E., Taylor, D. R., & Lorch, J. M. (2021). Soil reservoir dynamics of

Ophidiomyces ophidiicola, the causative agent of snake fungal disease. Journal of Fungi, 7(6), 461. <https://doi.org/10.3390/jof7060461>

30. Campbell, G. L., Marfin, A. A., Lanciotti, R. S., & Gubler, D. J. (2002). West Nile virus. The Lancet infectious diseases, 2(9), 519-529. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(02\)00368-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00368-7)

31. Cheatwood, J. L., Jacobson, E. R., May, P. G., Farrell, T. M., Homer, B. L., Samuelson, D. A., & Kimbrough, J. W. (2003). An outbreak of fungal dermatitis and stomatitis in a free-ranging population of pigmy rattlesnakes (*Sistrurus miliarius barbouri*) in Florida. Journal of wildlife diseases, 39(2), 329-337. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-39.2.329>

32. Clark, R. W., Marchand, M. N., Clifford, B. J., Stechert, R., & Stephens, S. (2011). Decline of an isolated timber rattlesnake (*Crotalus horridus*) population: interactions between climate change, disease, and loss of genetic diversity. Biological Conservation, 144(2), 886-891. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2010.12.001>

33. Claunch, N. M., Goodman, C. M., Harman, M., Vilchez, M., Smit, S. D., Kluever, B. M., ... & Romagosa, C. M. (2023). Dermatomycosis caused by *Paranannizziopsis australasiensis* in nonnative panther chameleons (*Furcifer pardalis*) captured in central Florida, USA. The Journal of Wildlife Diseases, 59(2), 322-331. <https://doi.org/10.7589/JWD-D-22-00018>

34. Cochrane, V. W. (1974). Dormancy in spores of fungi. Transactions of the American Microscopical Society, 599-609. <https://doi.org/10.2307/3225161>

35. Cowles, R. B., & Bogert, C. M. (1944). A preliminary study of the thermal requirements of desert reptiles. Bulletin of the AMNH; v. 83, article 5.

36. CWHC (2017). Snake fungal disease in Canada rapid threat assessment. Canadian Wildlife Health Cooperative. <http://www.cwhc-rcsf.ca/>

docs/technical_reports/CWHC_Snake_Fungal_Disease_Threat_Assessment.pdf.
Accessed 16 November 2021

37. Davy, C. M., Shirose, L., Campbell, D., Dillon, R., McKenzie, C., Nemeth, N., ... & Jardine, C. (2021). Revisiting ophidiomycosis (snake fungal disease) after a decade of targeted research. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 665805. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.665805>

38. de Miranda, E. B. (2017). The plight of reptiles as ecological actors in the tropics. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 5, 159. <https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00159>

39. Di Nicola, M. R., Coppari, L., Notomista, T., & Marini, D. (2022). *Ophidiomyces ophidiicola* detection and infection: a global review on a potential threat to the world's snake populations. *European Journal of Wildlife Research*, 68(5), 64. <https://doi.org/10.1007/s10344-022-01612-8>

40. Di Nicola, M. R., Mulder, K. P., Verbrugghe, E., Storniolo, F., Terriere, N., Colla, L., ... & Martel, A. (2025). Nationwide Screening Unveils Endemic *Ophidiomyces ophidiicola* Presence in Northern Italy, Mainly Affecting Dice Snakes: Evidence from Contemporary and Historical Snake Samples. *Journal of Fungi*, 11(2), 118. <https://doi.org/10.3390/jof11020118>

41. Díaz-Delgado, J., Marrow, J. C., Flanagan, J. P., Bauer, K. L., Zhang, M., Rodrigues-Hoffmann, A., ... & Balamayooran, G. (2020). Outbreak of *Paranannizziopsis australasiensis* infection in captive African bush vipers (*Atheris squamigera*). *Journal of Comparative Pathology*, 181, 97-102. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2020.10.004>

42. Dillon, R. M., Paterson, J. E., Manorome, P., Ritchie, K., Shirose, L., Slavik, E., & Davy, C. M. (2024). Effects of ophidiomycosis on movement, survival, and reproduction of eastern foxsnakes (*Pantherophis vulpinus*). *Scientific Reports*, 14(1), 4948. <https://doi.org/10.7559/JWD-D-21-00134>

43. Doberski, J. W., & Tribe, H. T. (1980). Isolation of entomogenous fungi from elm bark and soil with reference to ecology of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Transactions of the British Mycological Society, 74(1), 95-100. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(80\)80013-1](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(80)80013-1)
44. Dodge, B. O. (1912). Artificial cultures of *Ascobolus* and *Aleuria*. Mycologia, 4(4), 218-222. <https://doi.org/10.1080/00275514.1912.12017910>
45. Doherty, T. S., Balouch, S., Bell, K., Burns, T. J., Feldman, A., Fist, C., ... & Driscoll, D. A. (2020). Reptile responses to anthropogenic habitat modification: A global meta-analysis. Global Ecology and Biogeography, 29(7), 1265-1279. <https://doi.org/10.1111/geb.13091>
46. Dolinski, A. C., Allender, M. C., Hsiao, V., & Maddox, C. W. (2014). Systemic *Ophidiomyces ophiodiicola* infection in a free-ranging plains garter snake (*Thamnophis radix*). Journal of Herpetological Medicine and Surgery, 24(1-2), 7-10. <https://doi.org/10.5818/1529-9651-24.1.7>
47. Donovan-Peluso, M., Wasti, S. S., & Hartmann, G. C. (1980). Safety of entomogenous fungi to vertebrate hosts. Applied Entomology and Zoology, 15(4), 498-499. <https://doi.org/10.1303/aez.15.498>
48. Doran, W. L. (1922). Effect of external and internal factors on the germination of fungous spores. Bulletin of the Torrey Botanical Club, 313-340. <https://doi.org/10.2307/2480384>
49. Doweld, A. B. (2013). Nomenclatural novelties. Index Fungorum. 44, 1-1.
50. Dyugmedzhiev, A., Andonov, K., Naumov, B., Lukanov, S., Slavchev, M., Vacheva, E., ... & Nedeltcheva-Antonova, D. (2019). Comparison of methodologies for the extraction of snakes' (*Reptilia: Serpentes*) skin secretions and preliminary results on the presence of pheromones. In ARPHA Conference

Abstracts (Vol. 2, p. e46456). Pensoft Publishers.

<https://doi.org/10.3897/aca.2.e46456>

51. Edgar, G. J., Banks, S. A., Brandt, M., Bustamante, R. H., Chiriboga, A., Earle, S. A., ... & Wellington, G. M. (2010). El Niño, grazers and fisheries interact to greatly elevate extinction risk for Galapagos marine species. *Global Change Biology*, 16(10), 2876-2890. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.02117.x>

52. Eisenhauer, N., Ochoa-Hueso, R., Huang, Y., Barry, K. E., Gebler, A., Guerra, C. A., ... & Türke, M. (2023). Ecosystem consequences of invertebrate decline. *Current Biology*, 33(20), 4538-4547. <https://doi.org/10.25829/idev.3557-dcq3v4>

53. Ferreira, J., Lennox, G. D., Gardner, T. A., Thomson, J. R., Berenguer, E., Lees, A. C., ... & Barlow, J. (2018). Carbon-focused conservation may fail to protect the most biodiverse tropical forests. *Nature Climate Change*, 8(8), 744-749. <https://doi.org/10.1038/s41558-018-0225-7>

54. Fisher, M. C., & Garner, T. W. (2007). The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. *Fungal biology reviews*, 21(1), 2-9. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.02.002>

55. Fisher, M. C., Garner, T. W., & Walker, S. F. (2009). Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time, and host. *Annual review of microbiology*, 63(1), 291-310. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073435>

56. Fisher, M. C., & Garner, T. W. (2020). Chytrid fungi and global amphibian declines. *Nature Reviews Microbiology*, 18(6), 332-343. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0335-x>

57. Foley, J. A., DeFries, R., Asner, G. P., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, S. R., ... & Snyder, P. K. (2005). Global consequences of land use. *Science*, 309(5734), 570-574.
58. Forsythe, A., Vogan, A., & Xu, J. (2016). Genetic and environmental influences on the germination of basidiospores in the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Scientific reports*, 6(1), 33828. <https://doi.org/10.1038/srep33828>
59. Frank, S. A. (1996). Models of parasite virulence. *The Quarterly review of biology*, 71(1), 37-78.
60. Franklinos, L. H., Lorch, J. M., Bohuski, E., Rodriguez-Ramos Fernandez, J., Wright, O. N., Fitzpatrick, L., ... & Lawson, B. (2017). Emerging fungal pathogen *Ophidiomyces ophiodiicola* in wild European snakes. *Scientific reports*, 7(1), 3844. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03352-1>
61. Fromtling, R. A., Kosanke, S. D., Jensen, J. M., & Bulmer, G. S. (1979). Fatal *Beauveria bassiana* infection in a captive American alligator. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 175(9), 934-936.
62. Fuchs, L.D., Tupper, T.A., Aguilar, R., Lorentz, E.J., Bozarth, C.A., Fernandez, D.J., Lawlor, D.M. (2020). Detection of *Ophidiomyces ophiodiicola* at two mid-Atlantic natural areas in Anne Arundel County, Maryland and Fairfax County, Virginia, USA. *Amphibian and Reptile Conservation*, 14(1), 22–28.
63. Gagliardo, R., Crump, P., Griffith, E., Mendelson, J., Ross, H., & Zippel, K. (2008). The principles of rapid response for amphibian conservation, using the programmes in Panama as an example. *International Zoo Yearbook*, 42(1), 125-135. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1090.2008.00043.x>
64. Georg, L. K., Williamson, W. M., Tilden, E. B., & Getty, R. E. (1963). Mycotic pulmonary disease of captive giant tortoises due to *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumoso-roseus*. *Sabouraudia*, 2(2), 80-86. <https://doi.org/10.1080/00362176385190161>

65. Germano, J. M., K. J. Field, R. A. Griffiths, S. Clulow, J. Foster, G. Harding, & R. R. Swaisgood. (2015). Mitigation-driven translocations: are we moving wildlife in the right direction? *Frontiers in Ecology and the Environment*, 13, 100-105.
66. Gervasi, S. S., Stephens, P. R., Hua, J., Searle, C. L., Xie, G. Y., Urbina, J., ... & Blaustein, A. R. (2017). Linking ecology and epidemiology to understand predictors of multi-host responses to an emerging pathogen, the amphibian chytrid fungus. *PloS one*, 12(1), e0167882.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167882>
67. Gibbons, J. W., Scott, D. E., Ryan, T. J., Buhlmann, K. A., Tuberville, T. D., Metts, B. S., ... & Winne, C. T. (2000). The Global Decline of Reptiles, Déjà Vu Amphibians: Reptile species are declining on a global scale. Six significant threats to reptile populations are habitat loss and degradation, introduced invasive species, environmental pollution, disease, unsustainable use, and global climate change. *BioScience*, 50(8), 653-666. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2000\)050\[0653:TGDORD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2000)050[0653:TGDORD]2.0.CO;2)
68. Giery, S. T., & Ostfeld, R. S. (2007). The role of lizards in the ecology of Lyme disease in two endemic zones of the northeastern United States. *Journal of Parasitology*, 93(3), 511-517. <https://doi.org/10.1645/GE-1053R1.1>
69. Goettel, M. S., & Jaronski, S. T. (1997). Safety and registration of microbial agents for control of grasshoppers and locusts. *The Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 129(S171), 83-99.
<https://doi.org/10.4039/entm129171083-1>
70. Gormally, B. M., & Romero, L. M. (2020). What are you actually measuring? A review of techniques that integrate the stress response on distinct time-scales. *Functional Ecology*, 34(10), 2030-2044. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13648>

71. Griffith, B., Scott, J. M., Carpenter, J. W., & Reed, C. (1989). Translocation as a species conservation tool: status and strategy. *Science*, 245(4917), 477-480.
72. Grioni, A., To, K. W., Crow, P., Rose-Jeffreys, L., Ching, K. K., Chu, L. O., ... & Cheung, K. S. (2021). Detection of *Ophidiomyces ophidiicola* in a wild Burmese python (*Python bivittatus*) in Hong Kong SAR, China. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 31(4), 283-291.
73. Grisnik, M., Leys, J. E., Bryan, D., Hardman, R. H., Miller, D. L., Cobb, V. A., ... & Walker, D. M. (2018). Host and geographic range of snake fungal disease in Tennessee, USA. *Herpetological Review*, 49(4).
74. Grogan, L. F., Robert, J., Berger, L., Skerratt, L. F., Scheele, B. C., Castley, J. G., ... & McCallum, H. I. (2018). Review of the amphibian immune response to chytridiomycosis, and future directions. *Frontiers in immunology*, 9, 2536. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02536>
75. Guiller, G., Legentilhomme, J., Boissinot, A., Blouin-Demers, G., Barbraud, C., & Lourdaux, O. (2022). Response of farmland reptiles to agricultural intensification: Collapse of the common adder *Vipera berus* and the western green lizard *Lacerta bilineata* in a hedgerow landscape. *Animal Conservation*, 25(6), 849-864. <https://doi.org/10.1111/acv.12790>
76. Hailey, A. (2000). The effects of fire and mechanical habitat destruction on survival of the tortoise *Testudo hermanni* in northern Greece. *Biological conservation*, 92(3), 321-333. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(99\)00099-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(99)00099-3)
77. Harding, S. F., Becker, C. G., Yates, J. R., Crump, P., Forstner, M. R., Mullin, S. J., & Rodriguez, D. (2022). Comparative host–pathogen associations of Snake Fungal Disease in sympatric species of water snakes (*Nerodia*). *Scientific reports*, 12(1), 12303. <https://doi.org/10.5061/dryad.t76hdr83p>

78. Hashimoto, T., & Blumenthal, H. J. (1977). Factors affecting germination of *Trichophyton mentagrophytes* arthrospores. *Infection and Immunity*, 18(2), 479-486. <https://doi.org/10.1128/iai.18.2.479-486.1977>
79. Hauswaldt, J. S., Hoeer, M., Ogielska, M., Christiansen, D. G., Dziwulska-Szwajkowska, D., Czernicka, E., & Vences, M. (2012). A simplified molecular method for distinguishing among species and ploidy levels in European water frogs (*Pelophylax*). *Molecular Ecology Resources*, 12(5), 797-805. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2012.03160.x>
80. Haynes, E., Stanford, K., Gramhofer, M., Vivirito, K., Durante, K., Wright, A., ... & Allender, M. C. (2022). Epidemiology of ophidiomycosis in Lake Erie watersnakes (*Nerodia sipedon insularum*). *The Journal of Wildlife Diseases*, 58(1), 100-113. <https://doi.org/10.7589/JWD-D-21-00111>
81. Hierink, F., Bolon, I., Durso, A. M., de Castañeda, R. R., Zambrana-Torrel, C., Eskew, E. A., & Ray, N. (2020). Forty-four years of global trade in CITES-listed snakes: Trends and implications for conservation and public health. *Biological Conservation*, 248, 108601. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108601>
82. Hileman, E. T., Allender, M. C., Bradke, D. R., Faust, L. J., Moore, J. A., Ravesi, M. J., & Tetzlaff, S. J. (2018). Estimation of *Ophidiomyces* prevalence to evaluate snake fungal disease risk. *The Journal of Wildlife Management*, 82(1), 173-181. <https://doi.org/10.1002/jwmg.21345>
83. Hill, A. J., Leys, J. E., Bryan, D., Erdman, F. M., Malone, K. S., Russell, G. N., ... & Walker, D. M. (2018). Common cutaneous bacteria isolated from snakes inhibit growth of *Ophidiomyces ophiodiicola*. *EcoHealth*, 15, 109-120. <https://doi.org/10.1007/s10393-017-1289-y>
84. Huber, J. (1958). Untersuchungen zur Physiologie insektentötender Pilze. *Archiv für Mikrobiologie*, 29, 257-276. <https://doi.org/10.1007/BF00412319>

85. Huey, R. B. (1982). Phylogenetic and ontogenetic determinants of sprint performance in some diurnal Kalahari lizards. *Koedoe*, 25(1), 43-48.
<https://doi.org/10.4102/koedoe.v25i1.602>
86. Ishibashi, Y., Kaufman, H. E., Ichinoe, M., & Kagawa, S. (1987). The Pathogenicity of *Beauveria bassiana* in the Rabbit Cornea/Pathogenität von *Beauveria bassiana* für die Cornea des Kaninchens. *Mycoses*, 30(3), 115-126.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1987.tb03839.x>
87. Jacobson, E. R. (1993). Implications of infectious diseases for captive propagation and introduction programs of threatened/endangered reptiles. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 245-255. <https://www.jstor.org/stable/20095276>
88. Jakóbk, J., Drohvalenko, M., Melendez, E. F., Kępa, E., Klynova, O., Fedorova, A., ... & Pabijan, M. (2024). Countrywide screening supports model-based predictions of the distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Ukraine. *Diseases of Aquatic Organisms*, 159, 15-27.
<https://doi.org/10.3354/dao03802>
89. Jofré, G. M., Warn, M. R., & Reading, C. J. (2016). The role of managed coniferous forest in the conservation of reptiles. *Forest Ecology and Management*, 362, 69-78. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2015.11.044>
90. Johnson, B. (2003). OSHA infectious dose white paper. *Applied Biosafety*, 8(4), 160-165.
91. Johnson, D. L., Smits, J. E., Jaronski, S. T., & Weaver, D. K. (2002). Assessment of health and growth of ring-necked pheasants following consumption of infected insects or conidia of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* and *Beauveria bassiana*, from Madagascar and North America. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 65(24), 2145-2162.
<https://doi.org/10.1080/00984100290071847>

92. Johnson M. L., Speare R. (2003). Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: quarantine and disease control implications. *Emerging Infectious Diseases*, 9(8), 922–925. <https://doi.org/10.3201/eid0908.030145>
93. Joudrier, N., Blanvillain, G., Meier, G., Hoyt, J., Chèvre, M., Dubey, S., ... & Ursenbacher, S. (2024). Unravelling the disease ecology of snake fungal disease: high genetic variability and ecological features of *Ophidiomyces ophidiicola* in Switzerland. *Amphibia-Reptilia*, 45(1), 85-98. <https://doi.org/10.1163/15685381-bja10170>
94. Juge, C., Samson, J., Bastien, C., Vierheilig, H., Coughlan, A., & Piché, Y. (2002). Breaking dormancy in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*: a critical cold-storage period. *Mycorrhiza*, 12, 37-42. <https://doi.org/10.1007/s00572-001-0151-8>
95. Kendall, M. W., Wright, A. D., Adamovicz, L. A., Durante, K., Andersson, K. E., Frederickson, K., ... & Allender, M. C. (2023). Environmental temperature influences ophidiomycosis progression and survival in experimentally challenged prairie rattlesnakes (*Crotalus viridis*). *PloS one*, 18(8), e0289641. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0289641>
96. Khachatourians, G. G. (1996). Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. In *Human and animal relationships* (pp. 331-363). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
97. Kikoku, Y. (2003). Heat activation characteristics of *Talaromyces ascospores*. *Journal of food science*, 68(7), 2331-2335. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05768.x>
98. Kislá, T. A., Cu-Unjieng, A., Sigler, L., & Sugar, J. (2000). Medical management of *Beauveria bassiana* keratitis. *Cornea*, 19(3), 405-406.

99. Klauber, L. M. (1956). Rattlesnakes; Their Habits, Life Histories, and Influence on Mankind: Poison apparatus (Vol. 2). Zoölogical Society of San Diego.
100. Klynova O., Zinenko O. (2024). Isolation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* from a skin lesion in a wild Nikolsky's viper (*Vipera berus nikolskii*). Journal of Comparative Pathology, 210, 5-7.
<https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2024.02.004>.
101. Köhler, C. F., Sprong, H., Fonville, M., Esser, H., de Boer, W. F., van Der Spek, V., & Spitzen-van der Sluijs, A. (2023). Sand lizards (*Lacerta agilis*) decrease nymphal infection prevalence for tick-borne pathogens *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in a coastal dune ecosystem. Journal of Applied Ecology, 60(6), 1115-1126.
<https://doi.org/10.1111/1365-2664.14379>
102. Kriger, K. M., & Hero, J. M. (2007a). The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* is non-randomly distributed across amphibian breeding habitats. Diversity and Distributions, 13(6), 781-788.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2007.00394.x>
103. Kriger, K. M., & Hero, J. M. (2007b). Large-scale seasonal variation in the prevalence and severity of chytridiomycosis. Journal of Zoology, 271(3), 352-359. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2006.00220.x>
104. Ladner, J. T., Palmer, J. M., Ettinger, C. L., Stajich, J. E., Farrell, T. M., Glorioso, B. M., ... & Lorch, J. M. (2022). The population genetics of the causative agent of snake fungal disease indicate recent introductions to the USA. PLoS Biology, 20(6), e3001676. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001676>
105. Lai, W. Y., Yang, C. K., Sun, P. L., Li, W. T., Liu, X. R., Chen, C. W., & Yu, P. H. (2024). Detection of *Ophidiomyces* and *Nannizziopsis* spp. in

the dermal lesions of free-roaming native snakes in Taiwan. *Medical Mycology*, 62(10), myae103. <https://doi.org/10.1093/mmy/myae103>

106. Lamarre, C., Sokol, S., Debeaupuis, J. P., Henry, C., Lacroix, C., Glaser, P., ... & Latgé, J. P. (2008). Transcriptomic analysis of the exit from dormancy of *Aspergillus fumigatus* conidia. *BMC genomics*, 9, 1-15. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-417>

107. Le Galliard, J. F., Massot, M., Baron, J. P., & Clobert, J. (2012). Ecological effects of climate change on European reptiles. *Wildlife conservation in a changing climate*, 179, e203. <https://doi.org/10.7208/9780226074641-009>

108. Leggett, H. C., Cornwallis, C. K., Buckling, A., & West, S. A. (2017). Growth rate, transmission mode and virulence in human pathogens. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1719), 20160094. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2016.0094>

109. Leyden, J. J., & Marples, R. R. (1973). Ecologic principles and antibiotic therapy in chronic dermatoses. *Archives of dermatology*, 107(2), 208-211.

110. Lind, C. M., Agugliaro, J., Lorch, J. M. & Farrell, T. M. (2022). Ophidiomycosis is related to seasonal patterns of reproduction, ecdysis, and thermoregulatory behavior in a free-living snake species. *Journal of Zoology*, 319(1), 54–62. <https://doi.org/10.1111/jzo.13024>

111. Lindemann, D. M., Allender, M. C., Rzadkowska, M., Archer, G., Kane, L., Baitchman, E., ... & Cox, S. (2017). Pharmacokinetics, efficacy, and safety of voriconazole and itraconazole in healthy cottonmouths (*Agkistrodon piscivorus*) and massasauga rattlesnakes (*Sistrurus catenatus*) with snake fungal disease. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 48(3), 757-766. <https://doi.org/10.1638/2016-0179.1>

112. Lips, K. R. (2016). Overview of chytrid emergence and impacts on amphibians. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1709), 20150465. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0465>
113. Liu, X., Rohr, J. R., & Li, Y. (2013). Climate, vegetation, introduced hosts and trade shape a global wildlife pandemic. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1753), 20122506. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2506>
114. Lorch, J. M., Knowles, S., Lankton, J. S., Michell, K., Edwards, J. L., Kapfer, J. M., ... & Blehert, D. S. (2016). Snake fungal disease: an emerging threat to wild snakes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1709), 20150457. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0457>
115. Lorch, J. M., Lankton, J., Werner, K., Falendysz, E. A., McCurley, K., & Blehert, D. S. (2015). Experimental infection of snakes with *Ophidiomyces ophiodiicola* causes pathological changes that typify snake fungal disease. *MBio*, 6(6), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/mbio.01534-15>
116. Lorch, J. M., Price, S. J., Lankton, J. S., & Drayer, A. N. (2021). Confirmed cases of ophidiomycosis in museum specimens from as early as 1945, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 27(7), 1986. <https://doi.org/10.3201/eid2707.204864>
117. Lorch, J. M., Winzeler, M. E., Lankton, J. S., Raverty, S., Snyman, H. N., Schwantje, H., ... & Grear, D. A. (2023). *Paranannizziopsis* spp. associated with skin lesions in wild snakes in North America and development of a real-time PCR assay for rapid detection of the fungus in clinical samples. *bioRxiv*, 2023-07. <https://doi.org/10.1101/2023.07.13.548879>
118. Low, C. D., Badenoch, P. R., & Coster, D. J. (1997). *Beauveria bassiana* keratitis cured by deep lamellar dissection. *Cornea*, 16(6), 698-699.

119. Macartney, J. M., Larsen, K. W., & Gregory, P. T. (1989). Body temperatures and movements of hibernating snakes (*Crotalus* and *Thamnophis*) and thermal gradients of natural hibernacula. *Canadian Journal of Zoology*, 67(1), 108-114. <https://doi.org/10.1139/z89-017>
120. Mack, Z. E., Boyer, D. M., Cardillo, S., & Conley, K. J. (2021). A review of mortality in tentacled snakes (*Erpeton tentaculatum*) in a multi-institution zoological collection between 1966 and 2017. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 52(3), 909-917. <https://doi.org/10.1638/2020-0099>
121. Mancini, F., Cooke, R., Woodcock, B. A., Greenop, A., Johnson, A. C., & Isaac, N. J. (2023). Invertebrate biodiversity continues to decline in cropland. *Proceedings of the Royal Society B*, 290(2000), 20230897. <https://doi.org/10.1098/rspb.2023.0897>
122. Masters, N. J., Alexander, S., Jackson, B., Sigler, L., Chatterton, J., Harvey, C., ... & Jakob-Hoff, R. (2016). Dermatomycosis caused by *Paranannizziopsis australasiensis* in five tuatara (*Sphenodon punctatus*) and a coastal bearded dragon (*Pogona barbata*) in a zoological collection in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 64(5), 301-307. <https://doi.org/10.1080/00480169.2016.1177473>
123. McBride, M. P., Wojick, K. B., Georoff, T. A., Kimbro, J., Garner, M. M., Wang, X., ... & Wellehan, J. F. (2015). *Ophidiomyces ophiodiicola* dermatitis in eight free-ranging timber rattlesnakes (*Crotalus horridus*) from Massachusetts. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 46(1), 86-94. <https://doi.org/10.1638/2012-0248R2.1>
124. McCoy, C.M., Lind, C.M., Farrell, T.M. (2017). Environmental and physiological correlates of the severity of clinical signs of snake fungal disease in a population of pigmy rattlesnakes *Sistrurus miliarius*. *Conservation Physiology*, 5(1). <https://doi.org/10.1093/conphys/cow077>

125. McKenzie, C. M., Oesterle, P. T., Stevens, B., Shirose, L., Mastromonaco, G. F., Lillie, B. N., ... & Nemeth, N. M. (2020). Ophidiomycosis in red cornsnakes (*Pantherophis guttatus*): potential roles of brumation and temperature on pathogenesis and transmission. *Veterinary Pathology*, 57(6), 825-837. <https://doi.org/10.1177/0300985820953423>
126. Mckenzie, J. (2018). Initial assessment and effects of snake fungal disease on populations of snakes in Kentucky. Theses and Dissertations — Forestry and Natural Resources. 42. <https://doi.org/10.13023/ETD.2018.213>
127. McKenzie, J. M., Price, S. J., Connette, G. M., Bonner, S. J., & Lorch, J. M. (2021). Effects of snake fungal disease on short-term survival, behavior, and movement in free-ranging snakes. *Ecological applications*, 31(2), e02251. <https://doi.org/10.1002/eap.2251>
128. McKenzie, J. M., Price, S. J., Fleckenstein, J. L., Drayer, A. N., Connette, G. M., Bohuski, E., & Lorch, J. M. (2019). Field diagnostics and seasonality of *Ophidiomyces ophidiicola* in wild snake populations. *EcoHealth*, 16, 141-150. <https://doi.org/10.1007/s10393-018-1384-8>
129. Meier, G., Notomista, T., Marini, D., & Ferri, V. (2018). First case of snake fungal disease affecting a free-ranging *Natrix natrix* (Linnaeus, 1758) in Ticino Canton, Switzerland. *Herpetology Notes*, 11, 885-891. <http://orcid.org/0000-0002-7197-6196>
130. Meletiadis, J., Meis, J. F., Mouton, J. W., & Verweij, P. E. (2001). Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media. *Journal of Clinical microbiology*, 39(2), 478-484. <https://doi.org/10.1128/jcm.39.2.478-484.2001>
131. Mendelson III, J. R., Lips, K. R., Gagliardo, R. W., Rabb, G. B., Collins, J. P., Diffendorfer, J. E., ... & Brodie Jr, E. D. (2006). Confronting

amphibian declines and extinctions. *Science*, 313(5783), 48-48.

<https://doi.org/10.1126/science.1128396>

132. Meyling, N. V., & Eilenberg, J. (2006). Isolation and characterisation of *Beauveria bassiana* isolates from phylloplanes of hedgerow vegetation. *Mycological research*, 110(2), 188-195.

<https://doi.org/10.1016/j.mycres.2005.09.008>

133. Michon, A., Cheveau., P. (2021). Identification and consideration of herpetofauna and avifauna issues - restoration of the dikes of the Rhine-Rhône – Osselle-Routelle canal. Review of the year 2021. LPO Bourgogne-Franche-Comté, Museum of the Citadel of Besançon, Voies Navigables de France, Fondation Nature & Découvertes, Bourgogne Franche-Comté Regional Council.

134. Müller-Kögler, E. (1967). Nebenwirkungen insektenpathogener Pilze auf Mensch und Wirbeltiere: Aktuelle Fragen. *Entomophaga*, 12(4), 429-441.

<https://doi.org/10.1007/BF02376929>

135. Nelson, R. J., & Demas, G. E. (1996). Seasonal changes in immune function. *The Quarterly review of biology*, 71(4), 511-548.

136. Nichols, D.K. (2009). Case 4, skin-snake. AFIP WSC Conference, 23. http://www.askjpc.org/wsco/wsc_showcase2.php?id=204.

137. Nilson, G. (1980). Male reproductive cycle of the European adder, *Vipera berus*, and its relation to annual activity periods. *Copeia*, 729-737.

<https://doi.org/10.2307/1444451>

138. Nordberg, E. J. (2013). Thermal ecology and behavioral activity in hibernating timber rattlesnakes (*Crotalus horridus*) (Master's thesis, Middle Tennessee State University).

139. O’hanlon, S. J., Rieux, A., Farrer, R. A., Rosa, G. M., Waldman, B., Bataille, A., ... & Fisher, M. C. (2018). Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. *Science*, 360(6389), 621-627.

140. Ohkura, M., Worley, J. J., Hughes-Hallett, J. E., Fisher, J. S., Love, B. C., Arnold, A. E., & Orbach, M. J. (2016). *Ophidiomyces ophiodiicola* on a captive black racer (*Coluber constrictor*) and a garter snake (*Thamnophis sirtalis*) in Pennsylvania. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 47(1), 341-346.
<https://doi.org/10.1638/2015-0123.1>
141. Olson, D. H., Aanensen, D. M., Ronnenberg, K. L., Powell, C. I., Walker, S. F., Bielby, J., ... & Fisher, M. C. (2013). Mapping the global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the amphibian chytrid fungus. *PloS one*, 8(2), e56802. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056802>
142. Origgi, F. C., Pisano, S. R., Glaizot, O., Hertwig, S. T., Schmitz, A., & Ursenbacher, S. (2022). *Ophidiomyces ophiodiicola*, Etiologic Agent of Snake Fungal Disease, in Europe since Late 1950s. *Emerging infectious diseases*, 28(10), 2064. <https://doi.org/10.3201/eid2810.220564>
143. Osherov, N., & May, G. S. (2001). The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS microbiology letters*, 199(2), 153-160.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10667.x>
144. Ouellet, M., Mikaelian, I., Pauli, B. D., Rodrigue, J., & Green, D. M. (2005). Historical evidence of widespread chytrid infection in North American amphibian populations. *Conservation Biology*, 19(5), 1431-1440.
<https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2005.00108.x>
145. Pabijan, M., Palomar, G., Antunes, B., Antoń, W., Zieliński, P., & Babik, W. (2020). Evolutionary principles guiding amphibian conservation. *Evolutionary Applications*, 13(5), 857-878. <https://doi.org/10.1111/eva.12940>
146. Palomar, G., Jakóbbik, J., Bosch, J., Kolenda, K., Kaczmarek, M., Jońko, P., ... & Pabijan, M. (2021). Emerging infectious diseases of amphibians in Poland: distribution and environmental drivers. *Diseases of Aquatic Organisms*, 147, 1-12. <https://doi.org/10.3354/dao03631>

147. Pare´ J.A., Andes D.R., Sigler L. (2005). In-vitro susceptibility of fungal isolates from reptiles to antifungal drugs. *Proc AAZV*:214.
148. Paré, J. A., Jacobson, E. R., & Jacobson, E. R. (2007). Infectious diseases and pathology of reptiles: color atlas and text.
149. Paré, J. A., & Sigler, L. (2016). An overview of reptile fungal pathogens in the genera *Nannizziopsis*, *Paranannizziopsis*, and *Ophidiomyces*. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 26(1-2), 46-53. <https://doi.org/10.5818/1529-9651-26.1-2.46>
150. Paré, J. A., Wellehan, J., Perry, S. M., Scheelings, T. F., Keller, K., Boyer, T. (2020). Onygenalean Dermatophytes (Formerly Yellow Fungus Disease, Snake Fungal Disease) in Reptiles. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 30(4), 198-209. <https://doi.org/10.5818/19-12-221.1>
151. Parker, W. S., & Brown, W. S. (1974). Mortality and weight changes of Great Basin rattlesnakes (*Crotalus viridis*) at a hibernaculum in northern Utah. *Herpetologica*, 234-239.
152. Parker, W. S., & Brown, W. S. (1973). Species composition and population changes in two complexes of snake hibernacula in northern Utah. *Herpetologica*, 319-326.
153. Patterson, J.R., Bender, M.J., Duckworth, C.E., Noble, E., Patterson, D.B., Pilgrim, Z. (2021). The occurrence of *Ophidiomyces ophiodiicola* in Northern Georgia wild and captive snake populations. *Journal of Wildlife Diseases* 57, 643–647. <https://doi.org/10.7589/JWD-D-20-00129>
154. Peterson, C. C., Walton, B. M., & Bennett, A. F. (1999). Metabolic costs of growth in free-living garter snakes and the energy budgets of ectotherms. *Functional Ecology*, 13(4), 500-507. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.1999.00339.x>

155. Peterson, N. R., Rose, K., Shaw, S., Hyndman, T. H., Sigler, L., Kurtböke, D. İ., ... & Frère, C. (2020). Cross-continental emergence of *Nannizziopsis barbatae* disease may threaten wild Australian lizards. *Scientific Reports*, 10(1), 20976. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86463-0>
156. Picquet, P., Heckers, K. O., Kolesnik, E., Heusinger, A., & Marschang, R. E. (2018). Detection of *Ophidiomyces ophidiicola* in two captive bocourt water snakes (*Subessor bocourti*) and one captive pueblan milk snake (*Lampropeltis triangulum campbelli*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 49(1), 219-222.
157. Piotrowski, J. S., Annis, S. L., & Longcore, J. E. (2004). Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*, 96(1), 9-15. <https://doi.org/10.1080/15572536.2005.11832990>
158. Pohly, A. E. (2020). Pathological characterization of natural *Ophidiomyces ophidiicola* infection in wild-caught Lake Erie watersnakes: a standardized approach to documentation of disease (Doctoral dissertation, University of Illinois at Urbana-Champaign). <https://hdl.handle.net/2142/108509>
159. Prestt, I. (1971). An ecological study of the viper *Vipera berus* in southern Britain. *Journal of Zoology*, 164(3), 373-418. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1971.tb01324.x>
160. Příbyl, M., Kabelka, R., Hanzlík, P. M., Mikulíček, P., Folk, N., Piaček, V., ... & Baláž, V. (2023). *Ophidiomyces ophidiicola* in free-ranging and captive snakes in the Czech and Slovak Republics. *Journal of Vertebrate Biology*, 72(23050), 23050-1. <https://doi.org/10.25225/jvb.23050>
161. Puschendorf, R., Carnaval, A. C., VanDerWal, J., Zumbado-Ulate, H., Chaves, G., Bolaños, F., & Alford, R. A. (2009). Distribution models for the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in Costa Rica: proposing

climatic refuges as a conservation tool. *Diversity and Distributions*, 15(3), 401-408. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2008.00548.x>

162. Pysanets Ye. (2012). Amphibians of the [sic] Eastern Europe. Part I. Order Caudata. Zoological museum NNPM NAS Ukraine, Kyiv.

163. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. (2022). R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>

164. Rainwater, K. L., Wiederhold, N. P., Sutton, D. A., Garner, M. M., Maguire, C., Sanders, C., ... & Stchigel, A. M. (2019). Novel *Paranannizziopsis* species in a Wagler's viper (*Tropidolaemus wagleri*), tentacled snakes (*Erpeton tentaculatum*), and a rhinoceros snake (*Rhynchophis boulengeri*) in a zoological collection. *Medical mycology*, 57(7), 825-832. <https://doi.org/10.1093/mmy/myy134>

165. Rajeev., S, Sutton., D., Wickes, B., Miller, D., Giri, D., Van Meter, M., ... & Guarro, J. (2009). Isolation and Characterization of a New Fungal Species, *Chrysosporium ophioidicola*, from a Mycotic Granuloma of a Black Rat Snake (*Elaphe obsoleta obsoleta*). *Journal of Clinical Microbiology*, 47. <https://doi.org/10.1128/jcm.01751-08>

166. Rehner, S. A., & Samuels, G. J. (1994). Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycological Research*, 98(6), 625-634. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80409-7](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80409-7)

167. Rivera, S. (2019). Quarantine. In *Mader's reptile and amphibian medicine and surgery* (pp. 142-144).

168. Robert, V. A., & Casadevall, A. (2009). Vertebrate endothermy restricts most fungi as potential pathogens. *The Journal of infectious diseases*, 200(10), 1623-1626. <https://doi.org/10.1086/644642>

169. Robertson, J., Chinnadurai, S. K., Woodburn, D. B., Adkesson, M. J., & Landolfi, J. A. (2016). Disseminated *Ophidiomyces ophiodiicola* infection in a captive eastern massasauga (*Sistrurus catenatus catenatus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 47(1), 337-340. <https://doi.org/10.1638/2014-0222.1>
170. Rödder, D., Kielgast, J., Bielby, J., Schmidtlein, S., Bosch, J., Garner, T. W., ... & Lötters, S. (2009). Global amphibian extinction risk assessment for the panzootic chytrid fungus. *Diversity*, 1(1), 52-66. <https://doi.org/10.3390/d1010052>
171. Rossi, J.V. (2019). General husbandry and management. In Mader's reptile and amphibian medicine and surgery (pp. 109–130). <https://doi.org/10.1016/B0-72-169327-X/50008-0>
172. Rzadkowska, M., Allender, M. C., O'Dell, M., & Maddox, C. (2016). Evaluation of common disinfectants effective against *Ophidiomyces ophiodiicola*, the causative agent of snake fungal disease. *Journal of Wildlife Diseases*, 52(3), 759-762. <https://doi.org/10.7589/2016-01-012>
173. Sachs, M., Schluckebier, R., Poll, K., Schulz, V., Sabino-Pinto, J., Schmidt, E., ... & Vences, M. (2020). Evidence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and other amphibian parasites in the Green toad (*Bufo viridis*), syntopic amphibians and environment in the Cologne Bay, Germany. *Salamandra*, 56(3).
174. Sachs, S. W., Baum, J., & Mies, C. (1985). *Beauveria bassiana* keratitis. *British journal of ophthalmology*, 69(7), 548-550. <https://doi.org/10.1136/bjo.69.7.548>
175. Saint Girons, H., & Kramer, E. (1963). Le cycle sexuel chez *Vipera berus* (L.) en montagne. *Revue suisse de zoologie*, 70, 191-221.
176. Santos, X., Brito, J. C., Sillero, N., Pleguezuelos, J. M., Llorente, G. A., Fahd, S., & Parellada, X. (2006). Inferring habitat-suitability areas with ecological modelling techniques and GIS: a contribution to assess the conservation

status of *Vipera latastei*. Biological conservation, 130(3), 416-425.

<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2006.01.003>

177. Scheele, B. C., Pasmans, F., Skerratt, L. F., Berger, L., Martel, A. N., Beukema, W., ... & Canessa, S. (2019). Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. Science, 363(6434), 1459-1463.

<https://doi.org/10.1126/science.aav0379>

178. Scherer, R., & Scherer, M. R. (2018, February). Package ‘PropCIs’.

179. Schilliger, L., Paillusseau, C., François, C., & Bonwitt, J. (2023). Major Emerging Fungal Diseases of Reptiles and Amphibians. Pathogens, 12, 429.

<https://doi.org/10.3390/pathogens12030429>

180. Schmidt, V. (2015). Fungal Infections in Reptiles — An Emerging Problem. Journal of Exotic Pet Medicine, 24(3), 267-275.

<https://doi.org/10.1053/j.jepm.2015.06.014>

181. Schumacher, V. L., Mangold, B., Lenzycki, J., Hinckley, L., Sutton, D. A., & Frasca Jr, S. (2014). Occurrence of fruiting structures allows determination of *Purpureocillium lilacinum* as an inciting agent of pleuritis and pneumonia in a loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) by histopathologic correlation to culture. Medical mycology case reports, 6, 42-45.

<https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2014.07.007>

182. Seddon, P. J., Armstrong, D. P., & Maloney, R. F. (2007). Developing the science of reintroduction biology. Conservation biology, 21(2), 303-312.

<https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2006.00627.x>

183. Semalulu, S. S., MacPherson, J. M., Schiefer, H. B., & Khachatourians, G. G. (1992). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* in mice. Journal of Veterinary Medicine, Series B, 39(1-10), 81-90.

<https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1992.tb01141.x>

184. Sephton-Clark, P. C., & Voelz, K. (2018). Spore germination of pathogenic filamentous fungi. In *Advances in applied microbiology* (Vol. 102, pp. 117-157). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2017.10.002>
185. Sewell, T. R., Longcore, J., & Fisher, M. C. (2021). *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Trends in Parasitology*, 37(10), 933-934. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.04.014>
186. Shear, C. L., & Dodge, B. O. (1927). Life histories and heterothallism of the red bread-mold fungi of the *Monilia sitophila* group (pp. 1019-1042). Washington, DC: US Government Printing Office.
187. Sigler, L. (2002). Miscellaneous opportunistic fungi: *Microascaceae* and other *Ascomycetes*, *Hyphomycetes*, *Coelomycetes*, and *Basidiomycetes*. In: Howard DH, editor. *Pathogenic fungi in humans and animals*. New York: Marcel Dekker, Inc; 2002. p 637-676.
188. Sigler, L., Hambleton, S., & Paré, J. A. (2013). Molecular characterization of reptile pathogens currently known as members of the *Chrysosporium* anamorph of *Nannizziopsis vriesii* complex and relationship with some human-associated isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(10), 3338-3357. <https://doi.org/10.1128/jcm.01465-13>
189. Silvestre, A. M. (2014). How to assess stress in reptiles. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 23(3), 240-243. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2014.06.004>
190. Snyder, S. D., Sutton, W. B., & Walker, D. M. (2020). Prevalence of *Ophidiomyces ophiodiicola*, the causative agent of snake fungal disease, in the interior plateau ecoregion of Tennessee, USA. *Journal of Wildlife Diseases*, 56, 907–911. <https://doi.org/10.7589/2019-04-109>
191. Sperry, J. H., Wolff, P. J., Melder, C. A., Nevarez, J. G., Huskins, S. D., & Pearce, S. E. (2021). Habitat use, activity patterns, and survival of Louisiana

pinenakes (*Pituophis ruthveni*) in West-central Louisiana. Southeastern Naturalist, 20(2), 273-292. <https://doi.org/10.1656/058.020.0206>

192. Stark, T., Beukema, W., Gilbert, M. J., Goverse, E., Spitzen-van der Sluijs, A., Struijk, R. P. J. H., ... & Martel, A. (2024). Detection of *Ophidiomyces ophidiicola* in wild barred grass snakes (*Natrix helvetica*) in the Netherlands. Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift, 93(2). <https://doi.org/10.21825/vdt.90405>

193. Stchigel, A. M., Sutton, D. A., Cano-Lira, J. F., Cabañes, F. J., Abarca, L., Tintelnot, K., ... & Guarro, J. (2013). Phylogeny of chrysosporia infecting reptiles: proposal of the new family *Nannizziopsiaceae* and five new species. Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi, 31(1), 86-100. <https://doi.org/10.3767/003158513X669698>

194. Steeil, J. C., Hope, K. L., Evans, M., Peters, A., & Cartoceti, A. (2018). Multifocal *Ophidiomyces ophiodiicola* infection in an eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*) without the presence of skin lesions. Journal of Herpetological Medicine and Surgery, 28(3-4), 76-80. <https://doi.org/10.5818/18-02-146.1>

195. Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S., Fischman, D. L., & Waller, R. W. (2004). Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. Science, 306(5702), 1783-1786.

196. Sun, P.-L., Yang, C.-K., Li, W.-T., Lai, W.-Y., Fan, Y.-C., Huang, H.-C., & Yu, P.-H. (2022). Infection with *Nannizziopsis guarroi* and *Ophidiomyces ophiodiicola* in Reptiles in Taiwan. Transboundary and Emerging Diseases, 69, 764-775. <https://doi.org/10.1111/tbed.14049>

197. Suriadna, N., & Mykytynets, H. (2023). Amphibians of the genus *Rana* in the steppe zone of Ukraine: population status, distribution, and ecological features. GEO & BIO, 25, 187-201. <https://doi.org/10.53452/gb2515>

198. Sykes, K. L., & Klukowski, M. (2009). Effects of acute temperature change, confinement and housing on plasma corticosterone in water snakes, *Nerodia sipedon* (Colubridae: Natricinae). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 311(3), 172-181.
<https://doi.org/10.1002/jez.515>
199. Takami, Y., Nam, K. O., Takaki, Y., Kadekaru, S., Hemmi, C., Hosoya, T., & Une, Y. (2021). First report of ophidiomycosis in Asia caused by *Ophidiomyces ophiodiicola* in captive snakes in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 83(8), 1234-1239. <https://doi.org/10.1292/jvms.21-0177>
200. Tan, W. C., Herrel, A., & Rödder, D. (2023). A global analysis of habitat fragmentation research in reptiles and amphibians: what have we done so far?. *Biodiversity and Conservation*, 32(2), 439-468.
<https://doi.org/10.1007/s10531-022-02530-6>
201. Tetzlaff, S. J., Allender, M., Ravesi, M., Smith, J., & Kingsbury, B. (2015). First report of snake fungal disease from Michigan, USA involving Massasaugas, *Sistrurus catenatus* (Rafinesque 1818). *Herpetology Notes*, 8, 31-33.
202. Tetzlaff, S. J., Ravesi, M. J., Allender, M. C., Carter, E. T., DeGregorio, B. A., Josimovich, J. M., & Kingsbury, B. A. (2017). Snake fungal disease affects behavior of free-ranging massasauga rattlesnakes (*Sistrurus catenatus*). *Herpetological Conservation and Biology*, 12(3), 624-634.
203. Tommerup, I. C. (1985). Inhibition of spore germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Transactions of the British Mycological Society*, 85(2), 267-278. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(85\)80188-1](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(85)80188-1)
204. Tytar, V., Nekrasova, O., Pupins, M., Skute, A., Kirjušina, M., Gravele, E., ... & Kulikova, A. A. (2023). Modeling the distribution of the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* with special reference to Ukraine. *Journal of Fungi*, 9(6), 607. <https://doi.org/10.3390/jof9060607>

205. Ungpakorn, R., Ayutyanont, T., Reangchainam, S., & Supanya, S. (2004). Treatment of *Microsporum* spp. tinea capitis with pulsed oral terbinafine. *Clinical and experimental dermatology*, 29(3), 300-303.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2004.01493.x>
206. Uppala, S. S., Wu, B. M., & Alderman, S. C. (2016). Effects of temperature and duration of preconditioning cold treatment on sclerotial germination of *Claviceps purpurea*. *Plant Disease*, 100(10), 2080-2086.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-02-16-0215-RE>
207. Valencia-Aguilar, A., Cortés-Gómez, A. M., & Ruiz-Agudelo, C. A. (2013). Ecosystem services provided by amphibians and reptiles in Neotropical ecosystems. *International Journal of Biodiversity Science, Ecosystem Services & Management*, 9(3), 257-272. <https://doi.org/10.1080/21513732.2013.821168>
208. Van Waeyenberghe, L., Baert, K., Pasmans, F., Van Rooij, P., Hellebuyck, T., Beernaert, L., ... & Martel, A. (2010). Voriconazole, a safe alternative for treating infections caused by the *Chrysosporium* anamorph of *Nannizziopsis vriesii* in bearded dragons (*Pogona vitticeps*). *Sabouraudia*, 48(6), 880-885. <https://doi.org/10.3109/13693781003743122>
209. Van Waeyenberge, J., Aerts, J., Hellebuyck, T., Pasmans, F., & Martel, A. (2018). Stress in wild and captive snakes: quantification, effects and the importance of management. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 87(2).
<https://doi.org/10.21825/vdt.v87i2.16082>
210. Vitousek, M. N., Mitchell, M. A., Romero, L. M., Awerman, J., & Wikelski, M. (2010). To breed or not to breed: physiological correlates of reproductive status in a facultatively biennial iguanid. *Hormones and Behavior*, 57(2), 140-146. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.09.020>
211. Vivirito, K., Haynes, E., Adamovicz, L., Wright, A., Durante, K., Stanford, K., ... & Allender, M. (2021). Ultraviolet fluorescence as a field-

applicable screening tool for lesions consistent with Ophidiomycosis in Lake Erie Watersnakes (*Nerodia sipedon insularum*). The Journal of Wildlife Diseases, 57(2), 380-385. <https://doi.org/10.7589/JWD-D-20-00013>

212. Wagner, N., Mingo, V., Schulte, U., & Lötters, S. (2015). Risk evaluation of pesticide use to protected European reptile species. Biological Conservation, 191, 667-673. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2015.08.002>

213. Wang, Y., Tang, D. X., Duan, D. E., Wang, Y. B., & Yu, H. (2020). Morphology, molecular characterization, and virulence of *Beauveria pseudobassiana* isolated from different hosts. Journal of invertebrate pathology, 172, 107333. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107333>

214. Wartenberg, H., & Freund, K. (1961). Der Konservierungseffekt antibiotischer Mikroorganismen an Konidien von *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Zentr. Bakteriol. Parasitenk.(Abt II), 114, 718-724.

215. Warwick, C., Arena, P., Lindley, S., Jessop, M., & Steedman, C. (2013). Assessing reptile welfare using behavioural criteria. In Practice, 35(3), 123-131. <https://doi.org/10.1136/inp.fl197>

216. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications, 18(1), 315-322.

217. Woodburn, D. B., Miller, A. N., Allender, M. C., Maddox, C. W., Terio, K. A. (2018). *Emydomyces testavorans*, a new genus and species of onygenalean fungus isolated from shell lesions of freshwater aquatic turtles. Journal of Clinical Microbiology, 57(2), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/jcm.00628-18>

218. Zeileis, A., & Zeileis, M. A. (2007). The ineq Package.

219. Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(6), 553-596. <https://doi.org/10.1080/09583150701309006>
220. Zimmerman, L. M., Vogel, L. A., & Bowden, R. M. (2010). Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective. *Journal of Experimental Biology*, 213(5), 661-671. <https://doi.org/10.1242/jeb.038315>
221. Zippel, K., Johnson, K., Gagliardo, R., Gibson, R., McFadden, M., Browne, R., ... & Townsend, E. (2011). The Amphibian Ark: a global community for ex situ conservation of amphibians. *Herpetological Conservation and Biology*, 6(3), 340-352.
222. Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & Van't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and environmental microbiology*, 56(6), 1875-1881. <https://doi.org/10.1128/aem.56.6.1875-1881.1990>
223. Дудка, І. А., Вассер, С. П., Елланська І. А., Коваль Е. З., Горбик Л. Т., Нікольська Е. А., Білай В. Й., ... Редчиц Т. І. (1982). Методи експериментальної мікології: довідник. Київ: Наукова думка.

Додаток А Список публікацій здобувача за темою дисертації

1. **Klynova O.**, Zinenko O. (2024). Isolation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* from a skin lesion in a wild Nikolsky's viper (*Vipera berus nikolskii*). Journal of Comparative Pathology, Vol. 210, P. 5–7. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2024.02.004>

2. Jakóbi J., Drohvalenko M., Fernandez Melendez E., Kępa E., **Klynova O.**, Fedorova A. et al. (2024). Countrywide screening supports model-based predictions of the distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Ukraine. Diseases of Aquatic Organisms, 159, 15–27. <https://doi.org/10.3354/dao03802>

Публікації, які засвідчують апробацію результатів дисертації

1. Зіненко О.І., **Клинова О.В.**, Солодянкін О. Роль рептилій та амфібій у циркуляції патогенів збудників грибкових, бактеріальних і вірусних захворювань. XI Міжнародна герпетологічна конференція, м. Чернігів, 14–17 вересня 2021 р.

2. **Klynova O.**, Blanvillain G., Zinenko O., Hoyt J. The first report of snake fungal disease (SFD) in Ukraine. 22 Європейський герпетологічний конгрес, університет Вулвергемптона, Великобританія, 4–8 вересня 2023 р., доповідь.

3. **Клинова О.В.**, Бланвілон Г., Зіненко О.І., Хойт Дж. Р. Перші відомості про поширення патогену змій *Ophidiomyces ophidiicola* Sigler, Hambleton & Paré (2013) в Україні. Конференція молодих дослідників-зоологів, Інститут зоології імені І.І. Шмальгаузена НАН України, Київ, 25–26 жовтня 2023 р., доповідь.

4. **Klynova O.**, Lorch J. M., Hoyt J. R. Effect of temperature shock on pathogen germination: implications for infectious dose. Ecology and Evolution of Infectious

Diseases Conference, Стенфордський університет, США, 24–27 червня 2024 р.,
постерна презентація.

Додаток Б

Приклади уражень шкіри, викликаних інфекцією *O. ophidiicola*



Додаток В

Ізоляти *O. ophidiicola*, що використовувалися у дослідженні

№	Номер ізоляту, NWHC	Генотип ізоляту	Місце походження	Вимірювання лінійного росту	Експер. з пророст. конідій	Експер. інфікування
1	24746-1	II-D	Коннектикут, США	+	+	+
2	23906-1	II-E	Нью Джерсі, США	+	+	+
3	24281-1	II-F	Нью-Йорк, США	+	+	+
4	47007-12	II-D/F	Вірджинія (1), США	+	+	+
5	47005-95	I-W	Швейцарія	+		+
6	47005-102	II-F	Швейцарія	+		+
7	47005-110	II-D/E	Швейцарія	+		+
8	44736-89	II-A	Північна Кароліна, США	+	+	
9	24415-1	II-D	Південна Кароліна, США		+	
10	24828-1	II-D	Вісконсин, США		+	
11	24900-1	II-D	Кентуккі, США		+	
12	27239-1	II-D	Мен, США		+	
13	27242-2	II-D	Канзас, США		+	
14	44781-25	II-E	Теннессі, США		+	
15	26341-1	II-D/E	Луїзіана, США		+	
16	24266-1	II-D/F	Флорида, США		+	
17	47008-1	II-D/F	Вірджинія (2), США		+	
18	24878-5	II-D/F	Вірджинія (3), США		+	

Додаток Г

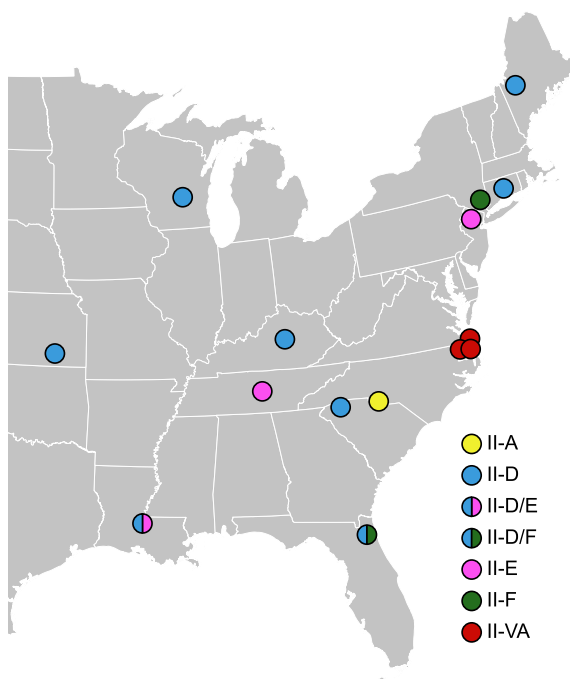
Різниця між параметрами μ для штамів класу II

	II-E	II-F(US)	II-D	II-A	II-F(Eur)	II-D/E	II-VA
II-E		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,012	0,29
II-F (US)	<0,0001		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
II-D	<0,0001	<0,0001		<0,0001	0,85	0,07	<0,0001
II-A	<0,0001	<0,0001	<0,0001		<0,0001	<0,0001	<0,0001
II-F(Eur)	<0,0001	<0,0001	0,85	<0,0001		0,04	<0,0001
II-D/E	0,012	<0,0001	0,07	<0,0001	0,04		<0,0001
II-VA	0,29	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	

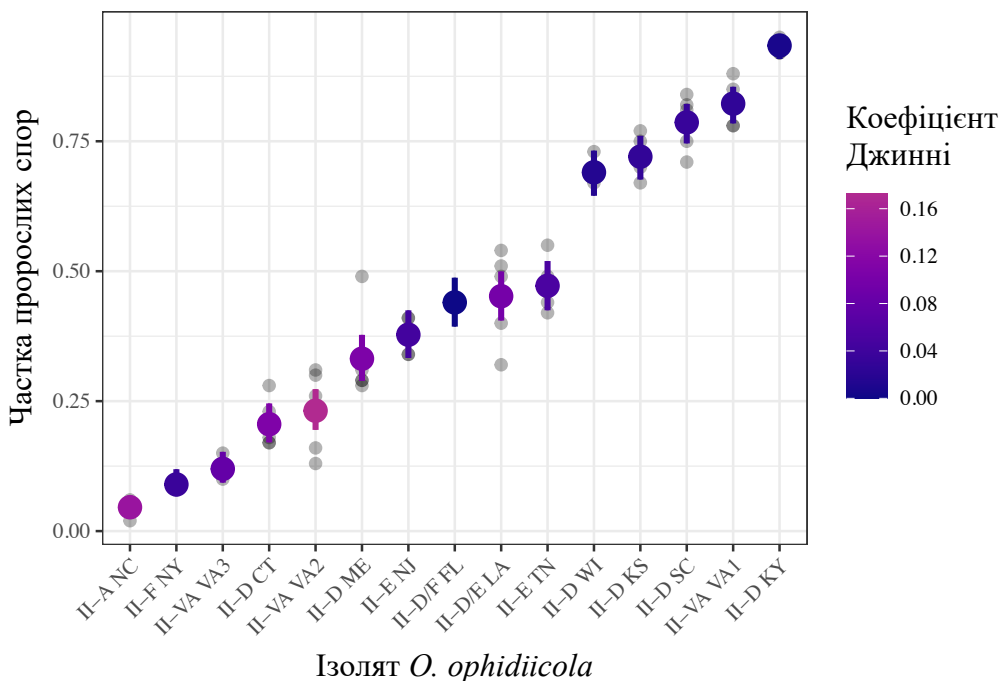
Різниця між параметрами λ для штамів класу II

	II-E	II-F(US)	II-D	II-A	II-F(Eur)	II-D/E	II-VA
II-E		<0,0001	0,75	0,0005	<0,0001	0,0007	<0,0001
II-F (US)	<0,0001		<0,0001	0,56	0,02	0,84	0,87
II-D	0,75	<0,0001		0,0002	<0,0001	<0,0001	<0,0001
II-A	0,0005	0,56	0,0002		0,0068	0,78	0,47
II-F(Eur)	<0,0001	0,02	<0,0001	0,0068		0,030	0,031
II-D/E	0,0007	0,84	<0,0001	0,78	0,030		0,74
II-VA	<0,0001	0,87	<0,0001	0,47	0,031	0,74	

Додаток Д



Географічне поширення вивчених штамів *Ophidiomyces ophidiicola*, виділених від змій з природи у східній частині США. Суцільні кола представляють нерекомбінантні клональні лінії. Розділені кола зображують рекомбінантні штами (комбінації кольорів вказують на генетичні ознаки двох ліній, присутні в цих рекомбінантах).



Частка пророслих спор п'ятнадцяти ізолятів *O. ophidiicola* після інкубації за 25°C протягом 27 годин. Колірна шкала визначає варіабельність схожості серед повторностей в межах ізоляту за допомогою коефіцієнта Джинні.



Last updated 12/1/2013

Section 1: General Information

Protocol Information

IACUC Protocol Number: 20-055
Protocol Title: Snake Fungal Disease
Previous IACUC Protocol Number: _____
(For studies that are continuations.)

Office Use:

Approval Date: 4-21-2020
Expiration Date: 4-20-2023

Principal Investigators

Name
Lead Principal Investigator (PI): Joseph Hoyt
[Note: Only a faculty member may be listed as lead PI.]

Primary Contact Information

Contact Person: Joseph Hoyt
Department: Biological Sciences
Interoffice Mail Code: _____
Phone Number: 518-965-7120

Directions:

- **Important:** Save this form to your computer's hard drive before completing it, or your responses may not be captured!
- It is recommended that you read the entire form before completing.
- This form must be completed and submitted (as a Word document) electronically. Submit to the online system. Retain a copy of your completed form for your records.
- Please respond to all questions in this form. If a particular question does not apply to your study, please indicate this. Type responses in the designated shaded boxes or check the designated check boxes.
- Download and complete all relevant appendices.
- For questions, contact the IACUC Administrative Office at IACUC@vt.edu or 540/231-0931.

Section 2: Assessment of Unnecessary Duplication

1. If this study is an extension of previous work, briefly explain why more work needs to be done.

2. Provide a narrative description of how you came to the conclusion that this study does not unnecessarily duplicate previous work (e.g., current/ongoing scientific literature assessments, recent scientific meetings, consultation with peers).

Snake Fungal Disease is an emerging infectious disease that has only been recently studied, often anecdotically, and is lacking sound scientific studies.

We have consulted state agencies, the USGS, and various international researchers who all have confirmed the need for future research at the local and global scale.

Section 3: Justification of Species Selection

1. List the type of animals to be used on this protocol.

Species or Strain
Snakes

2. Justify the selection of species (check all applicable boxes).

- ☐ This is a new model.
- ☐ A large database exists for this species, which will allow comparisons with previous data.
- ☐ The anatomy, genetics, physiology, or behavior of the species is uniquely suited to the study.
- ☐ This is the phylogenetically lowest species with adequate size, tissue, or anatomy for the study.
- ☒ The results will be directly applicable to the health or care of this species.
- ☐ Other (please describe): _____

3. Explain why a “lower order species” or non-animal alternatives cannot be used to achieve the desired results.

The fungus *Ophidiomyces ophiodiicola*, causative agent of snake fungal disease, only infects snakes. In addition it is necessary to work with snakes in the field since we are studying transmission and in the wild.

Section 4: Justification of Number of Animals

A key principle in the ethical use of animals in research, testing, and teaching is that the number of animals used in each project is the minimum necessary to obtain valid and meaningful results. In determining the numbers of animals required, which of the following are applicable:

- ☒ A statistical assessment (power analysis) was performed. Describe the statistical method/test used to determine appropriate group sizes/animal numbers, and state if a statistician was consulted to assist in the determination:

To quantify disease prevalence and severity we will need to sample 10-40 snakes per species at each site. A range (10-40) is given because the uncertainty of the estimate decreases with increasing prevalence. Thus, we can sample fewer individuals of species that show higher prevalences. This number (10-40) of individuals is the minimum number necessary to provide an estimate of the prevalence of infection (P) with a standard error ($P^*(1-P)/N0.5$) small enough to permit comparisons between species, sites, and over time.

These estimates were completed through power analyses. Several individuals with advanced training in statistics were consulted.

- ☐ The numbers of animals or group sizes have been established by federal guidelines/requirements.
- ☐ This is a pilot study that uses the minimum number of animals required to provide meaningful, but not statistically significant, data.
- ☐ Other (please describe):

Section 5: Pain Category

Please indicate which pain category your study will be in, based on the descriptions below. If animals will undergo procedures in more than one pain category, list only the highest category.

Pain Category: C

Pain Category Descriptions

- B: Breeding or holding animals only; no research conducted.
- C: Use of procedures that cause no or slight/momentary pain or distress (e.g., observational studies; injection of non-irritating agents; blood collection from peripheral vessels; collection of cells or tissues following euthanasia).
- D: Use of procedures that would cause more than slight/momentary pain or distress, but are performed using appropriate anesthetics, analgesics, or tranquilizers to relieve pain (e.g., minor or major surgical procedures [survival or non-survival] performed under anesthesia; collection of cells or tissues prior to euthanasia; painful procedures performed under anesthesia [retro-orbital blood collection in rodents]).
- E: Use of procedures that cause more than slight/momentary pain or distress, but that cannot be performed using anesthetics, analgesics, or tranquilizers without adversely affecting the study (e.g., toxicity and lethal disease studies in which the animals are allowed to die without intervention and mortality is the endpoint). Mechanical restraint may, depending upon duration and type of restraint, be considered a category "E" procedure. **Approval to conduct a Category E study requires detailed justification.**

Section 6: Animal Well-Being & Harm/Benefit Analysis

1. Explain how you will minimize expected animal pain and distress and enhance animal well-being (e.g., use of sedatives, tranquilizers, or anesthetics; familiarization/conditioning of the animal; enrichment opportunities).

Snakes will be captured by hand (for non venomous species) or using hooks and tongs (for venomous species) and placed in cotton bags for temporary storage while processing and sampling. Bagged snakes will be kept in the shade and protected from heat stress and processed as soon as possible. Handling will only be conducted by researchers with advanced training in animal handling to minimize time of containment and therefore animal stress. We expect the time from capture to release to be around 15-20 minutes.

2. Please assess whether the "harm" caused to the research animals is justified, please explain the benefits to humans or animals or both from the proposed research activity that would outweigh the "harm".
This research will provide invaluable insights into the extent of pathogen infection, and the threat, to snakes on a global scale, as well as important information on pathogen transmission and pathogen fluctuation in the environment. This research could be utilized by future disease management as snake fungal disease continues to spread in the US, and could help understand the impact of global change on

this disease. Furthermore, snakes provide substantial economic benefits and play critical roles in ecosystems, preying on animals that destroy agricultural crops and carry zoonotic diseases as well as serving as an important food base for many other species of vertebrates.

Section 7: Experimental Design

Describe the experimental design of this study. Please include the following for each experiment if you have more than one on this protocol:

1. Experiment number (ie 1, 2, 3) and brief description (two sentences),
2. Treatment groups and number of animals in each group,
3. Total number of animals to be used given as an equation to include replicates and extra/replacement animals. ex. 4 treatment groups x 10 animals per group x 2 doses x 2 replicates = 160 animals + 2 extra animals as back up (only if needed),
4. A time line of the experiment to start on day of acquisition of the animal to end of experiment giving only the name of the procedure to be done and the description will be in Section 10. (You may attach your timeline to the submission and state “see attached time line”.) ex on approximate day -14 animals arrive, day 0 Dependent on treatment group treatment given Day 0-28 monitored Day 1, 5, 8, 10, 14, 20 and 28 blood drawn, fecal sample, physical, Day 28 euthanized.

All experiments:

Numbers of animals are given on an annual basis.

Locations:

Work will be conducted in Europe (France, UK, Spain, Germany, Portugal, Switzerland, Austria, Czech Republic, Hungary, Poland, Serbia and Ukraine) in collaboration with established researchers at local universities, museums and rehabilitation centers who hold the necessary permits where applicable. In the USA, work will take place in Virginia, Pennsylvania and New York, where all samples will be collected in coordination and in the presence of Biologists and/or state agency personnel (John Kleopfer, David Garst, Dane Conley, Erik Molleen, William Henry Martin and Bill Brown), for which permits have been obtained or are in the process of being approved (pending IACUC approval, MacKay island NWR).

Personnel safety:

Latex gloves will be worn when sampling all snakes. For venomous species, tongs, hooks, special bagging system and restraining tubes will be used to limit risk of exposure to bites. Personnel will wear snakeproof gaiters, and will carry antivenom and snake first aid kits in the event of a bite.

Experiment 1: Determine the global extent of snake fungal disease (sampling across Europe), and pathogen transmission in the wild. For this study, we are collaborating with researchers in 10-12 European countries with ongoing snake fieldwork and will collect samples over a 2-year period. In the US, we will compare disease prevalence and severity of infection across multiple snake species in Virginia, Pennsylvania and NY.

Number of snakes sampled per species (see supplemental table): 30-40, 10-20 sites, sampled 3 times per year

Total maximum number of snakes sampled per year = 82950

Total maximum number of snakes over 3 years = 82950 x 3 = 248,850

Timeline: field sites will be visited in the spring (exact month varies per country/state, based on climatic conditions), summer and fall. Snakes will be sampled as follow:

1. Snake capture and bagging
2. Cloacal temperature
3. Swab sampling
4. Scale collection
5. Pathogen collection on culture plate
6. Measurements
7. Photos
8. Release

Section 8: Experimental Procedures

1. Please list and describe all procedures identified in Section 9 and give any possible adverse effects they may have on animal health or well-being. *For surgical procedures please only give possible adverse effects and say “see appendix B for description.” *Attach any monitoring sheets that will be used on this protocol at submission to IACUC.

Snake capture and handling: non venomous species will be captured by hand after visual encounter and placed in individual snake bags made of cotton (the cloth bags will be reused after a thorough wash with hot water and bleach (bleach is the recommended disinfectant of field equipment for this pathogen)), which are opaque to reduce the snake's stress level, as it prevents it from seeing the activity around it. Venomous snakes will be captured using snake's tongs and carefully placed in a bag using a special snake bag system (cotton bag attached at the end of a pole). Bagged snakes will be placed in the shade (protected from heat stress) and processed as soon as possible. We expect the time from capture to release to be around 15-20 minutes (5 minutes extra time for PIT tagging). Potential adverse effects: Injuries due to capture are very rare and not documented in the literature. Increased energy usage due to increase in temporary stress of handling is possible, but the effects of this on snake survival have not been documented.

Cloacal temperature: internal temperature will be collected first as to avoid the impact of stress on body temperature. We will gently insert the tip of a digital thermometer (DeltaTrak needle probe thermometer, probe diameter = 1.7mm) in the cloaca (depth 0.5 to 1cm depending on body length) until a stable reading is obtained. Readings should be displayed in 2 to 3 seconds. The thermometer will be disinfected using 70% alcohol after each snake. Potential adverse effect: if the snake cannot be held still enough to take this measurement, we will use an infrared thermometer instead, aiming at the skin of the cloaca (Rowley and Alford, 2007; Carretero, 2011).

Swab sampling: Swabs will be obtained by gently rubbing the ventral scales from the neck down to the vent, 5 times (each time includes up and down motion), rotating the swab slightly each time so that all sides of the swab have come into contact with the skin. These steps will be repeated on the dorsal side, as well as on the face of the snake (on both sides and around the eyes, 2 times). For venomous species, we will use a restraining tube, which are considered by herpetologists to be the safest method of working closely with venomous snakes during minor veterinary work. Tubes are utilized by slipping one end over the head and body of the snake until about half of the snake is inside the tube. The body is then grasped at the point where it exits the tube. One hand should hold the body of the snake and the tube simultaneously to assure that the snake cannot back out of the tube. While in the tube, we will swab the posterior end of the body. Swabs will be collected in duplicate. If skin lesions are observed, we will collect a separate swab by rubbing the swab over the affected skin. If the lesion encompasses a scale crypt, we will work the swab between the scales (often the spaces between overlapping scales is where the majority of fungal spores reside). We will

also swab the environment (soil, rocks) if the snake is found resting or basking. Potential adverse effects: there are no adverse effects to swab sampling.

Pathogen culturing: we will culture the pathogen (*Ophidiomyces ophiodiicola*) on plates directly in the field to maximise our chances of isolating this fungal pathogen. For this, we will swab individuals that exhibit obvious skin lesions, and immediately inoculate a culture plate using the collected swab.

Scale collection: in Europe, we will collect a ~3mm x 3mm piece of flaking scale directly adjacent to a skin lesion, when observed. This will allow us to attempt culturing of the fungal pathogen back in our lab. Potential adverse effects: flaking scale is a dead keratinized tissue and can be removed with no harm to the animal, so we do not anticipate any adverse effect from this sampling.

Snake measurements: snout vent length and tail length will be measured using a measuring tape (while the snake is in its restraining tube for venomous species, and by holding the snake by hands for non venomous species). Weight will be measured using a digital scale or spring scale. Snakes will be sexed visually or by gently squeezing on the tail and massaging towards the cloaca to evert the hemipenes. Potential adverse effects: there are no adverse effects associated with measurements.

PIT tagging: we will follow the procedure described by Jemison et al. (1995). Tags (size: 10mm x 1.4mm, weight: 0.035g), will be injected intraabdominally in the posterior 1/3 of the body using a sterile needle. The snakes we will be working with range in weight from 20 -1500 g. and the tags will not exceed 10% of the snakes body weight. Snakes will be held with their ventral side up, and the sterile needle tip will be inserted between scutes to a depth of about 1.5cm before injecting the tag. The injection site will be cleaned with a solution of povidone-iodine prior to injection. The needle will be oriented with its beveled surface away from the cloaca and directed towards the head. We will apply a small amount (~10 uL) of surgical glue (e.g. VetBond) to help seal the site of incision and ensure the tag is not ejected from the incision. Potential adverse effect: PIT tagging in adult and yearling rattlesnakes has shown no significant impacts on their survival, growth and movement (Jemison et al., 1995). PIT tagging is the most commonly used tagging technique for field studies.

Photos: a series of photos will be taken to document all skin lesions and to score severity of infection.

2. Indicate if death will be used as an endpoint in this study. Use of death as an endpoint refers to situations in which an animal is allowed to progress to death as a required experimental outcome. It does not refer to situations in which an animal is euthanized at an established humane endpoint.

- ☐ Death will be used as an endpoint in this study. *Respond to question 6, and then go to Section 11.*
- ☒ Death will not be used as an endpoint in this study. *Go to Section 11.*

Section 11: Humane Endpoints

1. Even if pain or distress are not anticipated in your study, you must establish humane endpoints at which animals will be removed from the study, treated, or euthanized should unexpected complications arise. Examples of appropriate criteria might include a weight loss limit as a percentage of initial or expected body weight, allowable durations of anorexia, allowable tumor size or total tumor burden expressed as a percentage of body weight, the presence of health problems

refractory to medical intervention, and severe psychological disturbances. Describe the humane endpoint criteria that will be used for determining when sick animals, **both on and off study**, will be euthanized or otherwise removed from the study. *Attach any monitoring sheets that will be used on this protocol at submission to IACUC.

All efforts will be made to reduce stress and anxiety in snakes taken during capture and handling, and handling time will be minimal. In the event that an individual snake appears overly stressed from handling, the snake will be immediately released. If snakes sustain minor injury during capture (small cuts or scratches), these sites will be treated with a topical antibiotic. Severe injuries to snakes requiring euthanization are very unlikely. In the very unlikely event that a snake has a severe injury (due to an unforeseen event during capture or pre-existing) we will contact the local wildlife department for instructions and hold the animal in a cloth bag until instructions are provided.

Section 12: Study Personnel

1. If any personnel do not have experience with the exact species and procedures indicated, please describe how they will be trained. Include information about the qualifications of the person providing the training.

☒ Minimally the trainees will observe the procedures three times or until comfortable to perform, then they will minimally perform the procedure three times supervised or until the trainer feels that they are competent to perform the procedure unsupervised. At that point they can perform the procedure unsupervised.

☐ Other: _____

2. Who will order the animals for this protocol? (Only check a or b if applicable.)
 - a. ☐ CVM
 - b. ☐ LAR (includes purchases for VTCRI, LS1, ILSB, etc)

Section 13: Animal Housing and Husbandry

1. Indicate if the animals involved in this study have been or will be used in other experiments or instructional labs.

☒ The animals involved in this study have not been and will not be used in other experiments or instruction. *Go to question 3.*

☐ The animals involved in this study have been used in prior experiments or instruction. *Respond to question 2, and then go to question 3.*

☐ The animals involved in this study will be used in concurrent experiments or instruction. *Respond to question 2, and then go to question 3.*

☐ The animals involved in this study may be transferred to another experiment or instructional protocol. *Respond to question 2, and then go to question 3.*

2. Please describe prior, concurrent or future use of these animals, and what measures will be taken to prevent over-use.

3. Are special or unusual housing or husbandry conditions required for the animals involved in this study?

- ☐ Special or unusual housing or husbandry conditions are required. *Respond to questions 4 and 5, and then go section 14.*
- ☒ There are no special or unusual housing or husbandry requirements. *Go to section 14.*

Section 14: Animal Disposal

1. Will animals be euthanized during or at the conclusion of this study? (check all that apply)

- ☐ Animals will not be euthanized.
- ☒ Animals will be euthanized. *Go to Appendix F*



Institutional Animal Care and Use Committee Appendix A: Antemortem Specimen Collection

Last updated 12/1/2013 (rev 12/1/2014)

Section 1: General Information

Protocol Information

Protocol Title: Snake Fungal Disease

IACUC Protocol Number: 20-055

Directions:

- **Important:** Save this form to your computer's hard drive before completing it, or your responses may not be captured!
- This form must be completed and submitted (as a Word document) electronically. Submit the form on the online system. Retain a copy of your completed form for your records.
- Please respond to all applicable questions. Type responses in the designated shaded boxes or check the designated check boxes.
- For questions, contact the IACUC Administrative Office at IACUCadmin@vt.edu or 540/231-0931.

Section 2: Tissue Collection

Note: Complete this section if you will be collecting any animal tissues or fluids other than blood. Examples include tail snips, cerebrospinal fluid, and urine.

1. Please complete the following table.

Tissue or Fluid Collected	Site and Method of Collection	Amount (g) or Volume (ml) Collected	Total Number of Collections	Time Interval Between Collections
Skin swabs to collect fungal pathogen	Ventral & dorsal side of body	Not measurable	10	1 week

2. Please indicate if anesthetics, tranquilizers, or analgesics will be used to prevent pain or stress during tissue or fluid collection.

- ☒ Anesthetics, tranquilizers, or analgesics will not be used. *Respond to question 3.*
☐ Anesthetics, tranquilizers, or analgesics will be used. *Complete Section 10 question 2 (in the protocol if this is a protocol) or Appendix F (if this is an amendment).*

3. Provide a justification for the omission of pain-relieving agents. If the procedure will involve only slight or momentary pain, please indicate this.

This type of sample collection does not inflict pain

Institutional Animal Care and Use Committee



Appendix F: Sedation/Anesthesia/Euthanasia/Analgesia

Last updated 12/1/2013 (rev 12/1/2014)

Section 1: General Information

Protocol Information

IACUC Protocol Title: Snake Fungal Disease
IACUC Protocol Number: 20-055

Directions:

- **Important:** Save this form to your computer's hard drive before completing it, or your responses may not be captured!
- This form must be completed and submitted (as a Word document) electronically. Retain a copy of your completed form for your records.
- Please respond to all applicable questions. Type responses in the designated shaded boxes or check the designated check boxes.
- For questions, contact the IACUC Administrative Office at IACUCadmin@vt.edu or 540/231-0931.

Section 2: Sedation/Anesthesia/Euthanasia/Analgesia Agents

1. Please complete the following table in order of when the agents will be used during the protocol. Under purpose please state if the agent will be used for pre-anesthetic, sedation, etc.

Agent	Dose (mg/kg)	Route of Administration	Frequency of Administration	Purpose
Isoflurane (liquid)	0.26 mL per 1L container	inhalation	once at the end of the experiment/ as needed for humane euthanasia	Euthanasia

Appendix G: Substance Administration

Section 1: General Information

Protocol Information

PI name: Dr Joseph Hoyt
 IACUC Protocol Number: 20-055
 IACUC Protocol Title: Snake Fungal Disease
 Facility name(s): Steger Hall

Directions:

- **Important:**
- Please review [EHS Educational Information for IACUC Appendix G](#), [Chemicals in Animals](#) and current Safety Data Sheet (SDS) before completing Appendix G.
- EHS reviews this document with the primary concerns being the potential human exposure to hazardous material and appropriate disposal to protect the environment.
- Save this form to your computer's hard drive before completing it, or your responses may not be captured!
- This form must be completed and submitted (as a Word document) electronically. Retain a copy of your completed form for your records.
- Please respond to all applicable questions. Type responses in the designated shaded boxes or check the designated check boxes.
- **Proprietary Material: Provide as much detailed information as possible including whether it is chemical or biological and the base material. Include any hazards associated with the material.**

For questions, contact Environmental Health and Safety: Chemical Safety: 540-231-3427, Biological Safety: 540-231-3361, Radiation Safety: 540-231-5364.

Section 2: Non-Hazardous Substances

Complete this section if non-hazardous substances such as parenteral fluids (normal saline, lactated Ringers), etc. will be administered to animals. Do not include anesthetics, analgesics, or sedatives. If this section is not applicable to your protocol, go to the next section.

1. Please complete the following table.

Agent (*no acronyms)	Diluent	Dose (mg/kg)	Volume (ml)	Route of Administration	Frequency and Duration of Administration
sterile saline	none	N/A	0.1ml/injection	subcutaneous	once

Section 3: Identification of Hazardous Agents

1. **Hazard summary:** Please check the appropriate box(s) below for potential hazardous agent(s)

that will be administered to animals as part of this animal protocol and answer questions.

- ☐ Chemical substances – chemicals, research pharmaceuticals, nanomaterials etc.
- ☒ Biological agents – infectious agents, human cell lines, microbial toxins etc.
- ☐ Radioactive agents

2. Please indicate if any of the agents listed in this Appendix are on the [CDC/USDA list of select agents/toxins](#) that might be used in bioterrorism.

- ☒ No select agents will be used.
- ☐ Select agents will be used in quantities that fall below the minimum amounts regulated by select agent legislation.
- ☐ Select agents will be used in quantities that are regulated by select agent legislation. **Contact the university's biosafety officer for further instructions and approval requirements.**

3. Do any of the agents described in this Appendix contain recombinant/synthetic nucleic acids?

- ☐ Yes
- ☒ No

If any of the agents described in this appendix contain recombinant constructs **or involve Gene Transfer**, you must conduct the animal experiments according to the *NIH Guidelines for Research Involving Recombinant or Synthetic Nucleic Acid Molecules*. Consult with the Institutional Biosafety Committee to make sure that you comply with these guidelines.

Section 4: Biological Agents (infectious or non-infectious) or Materials

Complete this section if bacteria (including rickettsia), viruses, fungi, protozoa, prions, viral vectors, or other biologic agents will be used; include serum, cell lines, tissue, nucleic acid, microbial toxins. If this section is not applicable to your protocol, go to the next section.

1. Please complete the following table.

Biological Agent (*no acronyms, add R if recombinant)	Diluent	Source (e.g., vendor)	Biosafety Level of Agent (BSL 1, 2, 3, or 4)	Dose (e.g., CFU, PFU)	Volume (ml)	Route of Administration	Frequency of Administration
Ophidiomyces ophidiicola	1 X Phosphate buffered saline and 0.5% Tween 20	Culture	BSL1	1.5 x 10 ⁵	0.05	epidermal	1 or 2 (if we decide to reinfect after shedding)
Ophidiomyces ophidiicola	1 X Phosphate buffered saline and 0.5% Tween 20	Culture	BSL1	1.5 x 10 ⁵	0.1	subcutaneous	2

2. Describe all potential health risks for humans who may be exposed to the agents.

None

3. Is the biologic agent being shed in urine, feces, or other bodily fluid?

- ☐ Yes – If yes, for how long after administration? _____
☐ No
☒ Unknown – the animals must remain housed in the same ABSL level throughout the experiment.

4. Animal room doors, stalls, and/or pens (if applicable) will have University Biohazard signage posted. Cage cards (if applicable) will be labeled with a “Biohazard” sticker and the name of the infectious agent:

☒ Acknowledgement

5. Describe the PPE required for animal care technicians and research staff performing standard animal care and husbandry procedures. Check all that apply. Research staff administering hazardous material must wear PPE as per lab hazard assessment.

- | | |
|---|--|
| ☐ Standard animal facility PPE | ☐ Safety glasses or goggles |
| ☐ Gloves | ☐ Face shield |
| ☒ Double gloves | ☐ Respiratory Protection |
| ☐ Gown | ☐ Surgical Mask for Splash Protection |
| ☐ Double gown | ☒ Boots |
| ☒ Coveralls | ☐ Apron |
| ☒ Other – <u>boot covers and disposable lab coats</u> | |

6. Describe safety equipment required for cage changing or other manipulation of cages or animals:

- ☐ Standard animal transfer station
☒ Class II, Biosafety Cabinet
☐ Chemical Fume Hood
☒ Other – Tubs will be sprayed with 70% ethanol for 2-3 hours prior to being cleaned in industrial cage wash at 180F. Tubs will be replaced with cleaned ones every week.

7. Where will the agent be administered?

- ☒ Animal housing room
☐ Lab/procedure room – Enter room number: _____
☐ Other - _____

8. Please indicate if animals will be anesthetized or sedated when the agents are administered.

- ☒ Animals will not be anesthetized or sedated.
☐ Animals will be anesthetized or sedated when the agents are administered. *Complete Section 10 question 2 (in the protocol if this is a protocol) or Appendix F (if this is an amendment).*

9. Provide any special requirements (e.g., specific disinfectant if standard animal facility disinfectant is not effective against the agent you are using) or emergency procedures (e.g., antidote) for an overt exposure to the agent.

Exposure to agent will not harm humans.

Disposal of Waste and Cleaning of Cages and Equipment

10. For agents handled as BSL2 or BSL3 all bedding, caging, water, or any other equipment or materials in contact with the animals must be autoclaved prior to sanitization. Describe any other special waste handling requirements.

Room 115 and Environmental chambers will be disinfected with chlorine dioxide at the conclusion of the experiment. Snake tubs will be sprayed with 70% alcohol as an additional measure.

11. All animal bedding and carcasses will be disposed of as “Regulated Medical Waste for Incineration”. Describe any additional special waste handling requirements.

Animal carcasses will be disposed of through incineration. Bedding (tub liners) will be discarded every week in solid biohazardous trash bins.

Section 5: PI Assurance

1. The principal investigator is responsible for ensuring that all personnel who may come in contact with the hazardous agents listed in the appendix are trained to work safely. By checking the boxes below, you confirm that you will fulfill the following responsibilities prior to initiation of this project by checking the box next to each statement.
 - ☒ Before any animal procedures involving the agents listed in this appendix are performed, appropriate safety precautions and any applicable Standard Operating Procedures to protect all animal facility staff and non-study animals will be approved by the appropriate university safety committee and uploaded in supporting documents of the protocol.
 - ☒ Prior to beginning the project, all animal care staff and scientific staff that may be exposed to the hazardous agents listed in this appendix will be informed of possible risks and will be properly trained to follow the appropriate safety precautions and any applicable Standard Operating Procedures to minimize the risk of exposure and work safely with the agent(s).

ПРОТОКОЛ
створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 00:01:36 11.04.2025

Назва файлу з підписом: Klynova_diss.pdf.p7s
Розмір файлу з підписом: 18.8 КБ

Перевірені файли:
Назва файлу без підпису: Klynova_diss.pdf
Розмір файлу без підпису: 28.1 МБ

Результат перевірки підпису: Підпис створено та перевірено успішно. Цілісність даних підтверджено

Підписувач: Клинова Олександра Володимирівна
П.І.Б.: Клинова Олександра Володимирівна
Країна: Україна
РНОКПП: 3536004321
Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 07:01:21 11.04.2025
Сертифікат виданий: "Дія". Кваліфікований надавач електронних довірчих послуг
Серійний номер: 382367105294AF9704000000B5B12500BE756F02
Тип носія особистого ключа: ЗНКІ криптомодуль ІІТ Гряда-301
Алгоритм підпису: ДСТУ 4145
Тип підпису: Кваліфікований
Тип контейнера: Підпис та дані в окремих файлах (CAAdES detached)
Формат підпису: З повними даними ЦСК для перевірки (CAAdES-X Long)
Сертифікат: Кваліфікований

Версія від: 2025.02.05 13:00