

УДК: 639.3.091:616.98

DOI:10.52419/issn2072-2419.2025.2.54

РАЗРАБОТКА ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ МАТЕРИАЛА ВИРУСА ВЕСЕННЕЙ ВИРЕМИИ КАРПА (*CYPRINUS CARPIO*) ПОЛИМЕРАЗНО-ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Сибгатуллова А.К.^{*1} – канд. ветеринар. наук, доц. каф. «Биологии, экологии, паразитологии, водных биоресурсов и аквакультуры» (ORCID 0000-0001-5944-3808); **Падило Л.П.**² – канд. биол. наук, доц. каф. «Болезни животных и ветеринарно-санитарная экспертиза» (ORCID 0000-0002-8402-6798); **Агольцов В.А.**² – д-р ветеринар. наук, проф. каф. «Болезни животных и ветеринарно-санитарная экспертиза» (ORCID 0000-0001-6991-7253); **Черных О.Ю.**^{3,4} – д-р ветеринар. наук, проф. каф. «Микробиология, эпизоотология и вирусология», директор (ORCID 0000-0001-8584-8251)

¹ ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина»

² ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова»

³ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет им. И.Т. Трубилина»

⁴ ГБУ КК «Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория»

* sibgatullova92@mail.ru

Ключевые слова: весенняя виремия карпа, вирус, карп, рыбы, праймеры, полимеразная цепная реакция.

Key words: spring viremia of carp, virus, carp, fish, primers, polymerase chain reaction.

Поступила: 20.04.2025

Принята к публикации: 06.06.2025

Опубликована онлайн: 20.06.2025



РЕФЕРАТ

Весенняя виремия карпа является контагиозным заболеванием, поражающая карповых, в первую очередь обыкновенного карпа (*Cyprinus carpio*). Это заболевание является эндемичным в Европе, Америке и ряде азиатских стран, где оно вызывает значительную заболеваемость и смертность пораженных рыб. Международное эпизоотическое бюро включило весеннюю виремию карпа в список заболеваний, подлежащих уведомлению. Вирус выделяется в основном с калом и мочой клинически инфицированных рыб и самими носителями. Диагноз должен быть подтвержден нейтрализацией вируса или полимеразной цепной реакцией (ПЦР) и анализом нуклеотидной последовательности продуктов ПЦР. Статья посвящена разработке праймеров для полимеразно-цепной реакции в режиме реального времени с целью обнаружения геном вируса весенней виремии карпа. Исследования проводились на базе ГБУ «Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория» в Краснодарском крае, г. Кропот-

кин. У карпов отбор проб осуществлялся путем взятия тканевого материала и экссудата из брюшной полости. Подбор праймеров осуществлялся на кафедре «Биологии, экологии, паразитологии, водных биоресурсов и аквакультуры» ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ. Материалом исследования служили 4 пробы органов от карповых рыб поступившие в ГБУ «Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория». Полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени проводили в объеме реакционной смеси 25 мкл на 1 пробу РНК. Детекция исследуемых образцов осуществлялась на амплификаторе «CFX 96 Bio-Rad». Флуоресценцию измеряли по каналам на 5' конце с красителем FAM/green и на 3'-конце гасителем BHQ1. В результате проведения ПЦР-РВ были выявлены 6 кривых флуоресценции, вместе с двумя положительными контролями пересекающие линию Threshold. Полученные результаты проведенной реакции свидетельствуют об их хорошей воспроизводимости и достоверности. Созданные нами праймеры на весеннюю виремию карпа можно применять в научно-исследовательских и диагностических целях при проведении лабораторных исследований.

ВВЕДЕНИЕ/ INTRODUCTION

Весенняя виремия карпа (ВБК) – это высококонтагиозное вирусное заболевание, поражающее карповых рыб, в основном обыкновенного карпа *Cyprinus carpio*. Это одноцепочечный РНК вирус, относящийся к семейству *Rhabdoviridae* в отряде *Vesiculovirus* [1,2,5].

В настоящее время это заболевание является эндемичным в Европе, Америке и некоторых странах Азии, где оно вызывает значительную заболеваемость и смертность среди пораженных этим вирусом рыб [3,4,9].

Имеются сведения о спонтанных случаях заражения ВБК у других карповых рыб, включая золотую рыбку (*Carassius auratus*), кои (*Cyprinus carpio koi*), толстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix*), карася (*Carassius carassius*), толстолобика (*Aristichthys nobilis*), белого амура (*Ctenopharyngodon idella*), линя (*Tincatinca*) и орфа (*Leuciscus idus*) [9].

Заражение ВБК является крайне летальным для молоди рыб с уровнем смертности до 90% и, таким образом, наносит значительный экономический ущерб отрасли аквакультуры [7]. Было доказано, что ВБК поражает широкий спектр видов рыб, включая серебряного карпа, травяного карпа, золотого карпа и толстолобика. Также было доказано, что в экспериментальных условиях он поражает другие виды рыб, включая северную щуку, гуппи, данио-рерио и тыквочковых [5,11].

Международное эпизоотическое бюро

включило весеннюю виремию карпа (ВБК) в список заболеваний, подлежащих уведомлению. У пораженных рыб наблюдается вздутие живота, разрушение тканей почек, некроз селезенки и печени, что приводит к кровоизлияниям, нарушению водно-солевого баланса и ослаблению иммунного ответа [5].

Вспышки весенней виремии у карпа обычно происходят весной, когда температура воды начинает повышаться после холодной зимы. Исследования карпа показали, что при температуре воды выше 17 °C заражается мало взрослых особей, но молодь может заразиться даже при 22–23 °C. К другим факторам риска, связанным с заболеваемостью и смертностью, относятся плотность популяции, географическое положение, виды рыб и иммунный статус восприимчивых к болезням рыб [6,9].

Вирус весенней виремии может передаваться через воду, ил, предметы общего пользования и кровососущих паразитов пиявки и рачки рода *Argulus*, а также рыбоядные птицы, в желудке которых он сохраняется несколько часов и может выбрасываться с отрыгиваемой пищей. Инкубационный период инфекции колеблется от 7 до 30 дней в зависимости от температуры воды. Клинические признаки неспецифичны. У карпа наиболее частыми симптомами являются вздутие живота, экзофтальмия, воспаление или отек вентиляционного отверстия (часто с оставленными слизистыми фекальными цилиндрами), а также петехиальные кро-

воизлияния на коже, жабрах и глазах [7,10].

Диагноз обычно ставится на основании выделения вируса (из селезёнки или хвостовой почки) и определения титров антител в сыворотке крови. Диагноз должен быть подтверждён нейтрализацией вируса или полимеразной цепной реакцией (ПЦР) и анализом нуклеотидной последовательности продуктов ПЦР.

Лечение весенней виремии карпа не разработано.

После заражения сложно уничтожить вирус в заражённых прудах, и для его ликвидации может потребоваться уничтожение всей водной флоры и фауны [5].

Профилактика заболевания связана с обеспечением оптимальных гидрохимических и гидробиологических режимов содержания рыбы, соблюдение норм плотностей посадки, кормление сбалансированными кормами. Необходимо максимально понизить уровень стресса у рыбы при манипуляциях с ней, а также проведение регулярной чистки и дезинфекции рыбоводных сооружений и т.д. [6,8].

Цель работы – проведение молекулярно-генетического исследования возбудителя весенней виремии у карпа с использованием разработанными и оптимизированными нами праймерами для выявления РНК вируса *Rhabdovirus carpio*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Исследования проводились на базе ГБУ «Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория» в Краснодарском крае, г. Кропоткин.

У карпов отбор проб осуществлялся путем взятия тканевого материала и экссудата из брюшной полости.

Подбор праймеров осуществлялся на кафедре «Биологии, экологии, паразитологии, водных биоресурсов и аквакультуры» ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ. Нуклеотидная последовательность праймеров представлена в таблице 1. Материалом исследования служили 4 пробы внутренних органов от карповых рыб поступившие в ГБУ «Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория».

Подбор праймеров осуществлялся при помощи программы Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> 23.03.2025).

Перед проведением ПЦР в режиме реального времени все реактивы были разморожены, а затем центрифугированы несколько секунд на низкой скорости. Все поступившие образцы подвергались гомогенизации с последующей экстракцией РНК. Выделение РНК осуществляли из патматериала с помощью

набора реактивов с сорбентом «Рибосорб 100» («ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Детекция исследуемых образцов осуществлялась на амплификаторе «CFX 96 Touch» («Bio-Rad» США). Для постановки ПЦР реакции использовали тест-систему для выявления вируса весенней виремии карпов (SVCV) методом ПЦР в режиме реального времени.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Для идентификации вируса весенней виремии карпа и в ПЦР в режиме реального времени использовали праймеры, комплиментарные определенным участкам гена нуклеопротеина G: GF (прямой) и GR (обратный).

Гликопротеин (G-белок) ВВК является единственным белком на поверхности вириона, который является наиболее важным вирусным антигенным белком, определяющим инфекционные и серологические свойства вируса [8].

Гликопротеин (белок G) вируса ВВК образует на поверхности вируса тримерные пепломеры или шипы, которые связываются с клеточными рецепторами и усиливают вирусный эндоцитоз и слияние мембран [8].

В процессе конструирования дизайна олигонуклеотидных праймеров основными параметрами были следующие: 1) степень гомологии праймеров и комплементарность выбранной области; 2) отсутствие самокомплементарности участков внутри самих праймеров и комплементарности друг другу. Следует учитывать то, чтобы не создавались вторичные структу-

ры праймеров, «димеры», которые участвуют в блокировке реакции или приводят к возникновению неспецифической амплификации; 3) Близость значений температуры плавления праймеров (разница в 3° - 5° С). Данный показатель является ключевым параметром. Повышение температуры отжига может привести к отсутствию синтеза ампликона и, как следствие, ложноотрицательному результату ПЦР, а снижение - увеличивает возможность возникновения неспецифических продуктов, что усложняет проведения ПЦР анализа и ведет к интерпретации их как ложноположительных.

Для постановки полимеразно-цепной реакции в режиме реального времени был использован зонд для гена G (5'-[FAM] ATGAAGARGAGTAAACKGCCTG-CAACAGA[BHQ1]-3') [12].

Специфичность праймеров определяли с использованием поисковой системы BLAST в режиме онлайн. Нуклеотидные последовательности праймеров проверяли на наличие гомологии со всеми известными нуклеотидными последовательностями в международной базе данных GenBank.

Были подобраны и оптимизированы температурно-временные режимы условия проведения ПЦР-РВ. Перед началом постановки ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) все реактивы были разморожены, а затем были центрифугированы несколько секунд на низкоскоростной центрифуге.

Первый этап работы состоял во внесении комплектов реагентов в пробирку для постановки ПЦР-РВ. Реакционную смесь готовили из расчета: на каждый образец 10 мкл дистиллированной воды, 5×буфер для ПЦР – 5 мкл; смесь специфических олигонуклеотидных праймеров (10 пкМ каждого) – 2 мкл; зонд флуоресцирующий – 0,5 мкл; раствор MgCl₂ (25 mM) – 1 мкл; смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов dNTP (10 mM) – 1 мкл; Taq-полимераза (5 ед/мкл) – 0,5 мкл, РНК исследуемого образца ВВК – 5 мкл.

Полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени проводили в

объеме реакционной смеси 25 мкл на 1 пробу РНК (20 мкл реакционной смеси и 5 мкл РНК пробы). Смесь реагентов готовили с учетом еще двух контрольных образцов (ПКО и ОКО).

В микропробирки с реагентами для исследуемых образцов вносили по 20 мкл реакционной смеси и по 5 мкл РНК, а в микропробирку для ПКО внесли РНК коллекционного штамма. В отрицательный контрольный образец (ОКО) вносили по 20 мкл реакционной смеси.

Положительный контроль выделения (ПКВ) был взят из тест-системы для выявления вируса весенней виремии карпов (SVCV) методом ПЦР в режиме реального времени, а в качестве отрицательного контроля применяли бидистиллированную воду.

Измерение флуоресценции проводили по каналу FAM/Green, позволяющий обнаружить фрагмент ДНК карпа (*Cyprinus carpio*). Полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени проводили в амплификаторе «CFX 96 Touch» («Bio-Rad» США).

Пробирки с реакционной смесью устанавливали в амплификатор для постановки ПЦР в режиме реального времени. В программе указывали расположение и характеристику проб, выбирали рабочий краситель (FAM) и (BHQ1). Далее устанавливали в программе температурно-временной профиль реакции. Программирование амплификатора осуществлялось согласно инструкции производителя.

Следующим этапом работы являлась постановка полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Для постановки ПЦР в режиме реального времени был использован температурно-временной профиль (таблица 2).

Детекция исследуемых образцов осуществлялась на амплификаторе «CFX 96 Bio-Rad (США)». Флуоресценцию измеряли по каналам на 5' конце с красителем FAM/green и на 3' - конце гасителем BHQ1.

Таблица 1 – Нуклеотидные последовательности праймеров

Название гена	Нуклеотидная последовательность	Длина фрагмента п.о.	Позиция в геноме
G (F)	5`TAGCCCACCCCAACCATTTC3`	20	2899-2918
G (R)	5`CGGAGACCAACGTTCCATCA -3`	20	3909-3928

Таблица 2 – Температурно-временной режим проведения ПЦР-РВ

Процесс	Параметр		
	Температура, °C	Время	Цикл
Начальная денатурация	95° C	2 мин	1
Денатурация	95° C	20 сек.	30
Отжиг	58° C	20 сек.	
Элонгация	72° C	25 сек.	

Пересечение кривой флуоресценции линии порогового цикла (Ct), свидетельствует о наличии генома в образцах весенней виiremии карпа, чем ниже показатель (Ct), тем больше концентрация генома вируса ВВК в исследуемых образцах. Отсутствие пересечения кривой флуоресценции линии (Ct) свидетельствует об отсутствии генома вируса ВВК в тестируемых материалах.

Интерпретацию результатов ПЦР-РВ осуществляли на основании наличия или отсутствия пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией Threshold, что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла (Ct), рассчитываемого программным обеспечением амплификатора. Результат считали

положительным, если кривая флуоресценции каждого образца имела «сигмовидную» форму и пересекала пороговую линию Threshold.

В результате проведения ПЦР-РВ были выявлены 6 кривых флуоресценции, вместе с двумя положительными контролями пересекающие линию Threshold. Полученные результаты проведенной реакции свидетельствуют об их хорошей воспроизводимости и достоверности.

Разработанные нами праймеры могут быть использованы для обнаружения РНК вируса весенней виiremии карпа в образцах биологического материала, с целью проведения клинической и лабораторной диагностики, а также научно-исследовательских работ в области ветеринарии.

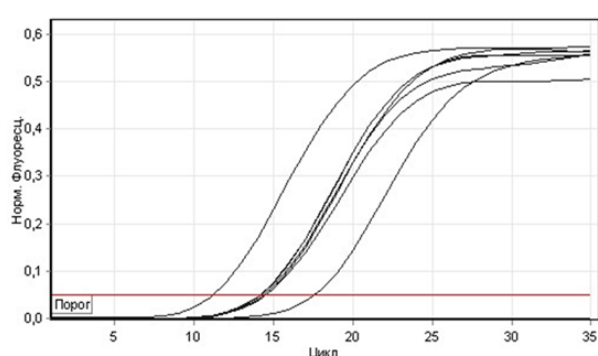


Рисунок 1 – Представлены кривые накопления флуоресцентного сигнала по каждому из заданных образцов по каналам FAM и BHQ1.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Таким образом в результате проведенного исследования с использованием разработанных нами олигонуклеотидных праймеров с помощью ПЦР в режиме реального времени удалось выявить РНК вируса весенней виремии карпа.

Разработанные праймеры для выявления РНК вируса весенней виремии карпа свидетельствуют о высокой аналитической характеристике. Олигонуклеотидные праймеры обладают высокой специфичностью и чувствительностью. Созданные нами праймеры на весеннюю виремию карпа можно применять в научно-исследовательских и диагностических целях при проведении лабораторных исследований.

DEVELOPMENT OF OLIGONUCLEOTIDE PRIMERS FOR IDENTIFICATION OF THE SPRING CARP VIREMIA VIRUS (*CYPRINUS CARPIO*) BY POLYMERASE CHAIN REACTION

Sibgatullova A.K.^{1*} – Ph.D. of Veterinary Sciences, Associate Professor of the Department of Biology, Ecology, Parasitology, Aquatic Bioresources and Aquaculture (ORCID 0000-0001-5944-3808); **Padilo L.P.**² – Ph.D. of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Animal Diseases and Veterinary and Sanitary Expertise, (ORCID /0000-0002-8402-6798); **Agoltsov V.A.**² – Doctor of Biological Sciences, Professor, Professor of the Department of Animal Diseases and Veterinary and Sanitary Expertise (ORCID 0000-0001-6991-7253); **Chernykh O.Yu.**^{3,4} – Doctor of Biological Sciences, Professor, Director Laboratory (ORCID 0000-0001-8584-8251)

¹ Ulyanovsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin

² Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering named after N.I. Vavilov

³ Kuban State Agrarian University named after I.T. Trublin

⁴ GBU CC "Kropotkin regional Veterinary Laboratory"

*sibgatullova92@mail.ru

ABSTRACT

Spring carp viremia is a contagious disease affecting cyprinids, primarily the common carp (*Cyprinus carpio*). The disease is endemic in Europe, America and several Asian countries, where it causes significant morbidity and mortality in affected fish. The Office International des Epizooties (OIE) has included spring carp viremia (SCV) in the list of notifiable diseases. The virus is excreted mainly in the faeces and urine of clinically infected fish and by the carriers themselves. Diagnosis should be confirmed by virus neutralization or polymerase chain reaction (PCR) and nucleotide sequence analysis of the PCR products. There is no treatment for spring carp viremia. This article is devoted to the development of primers for real-time polymerase chain reaction to detect the genome of the spring carp viremia virus. The studies were conducted at the Kropotkin Regional Veterinary Laboratory in Kropotkin, Krasnodar krai. Carp samples were collected by taking tissue material and exudate from the abdominal cavity. Primers were selected at the Department of Biology, Ecology, Parasitology, Aquatic Bioresources and Aquaculture of the Ulyanovsk State Agrarian University. The study material included 4 organ samples from carp fish received by the Kropotkin Regional Veterinary Laboratory. Real-time polymerase chain reaction was performed in a reaction mixture volume of 25 µl per 1 RNA sample. The samples under study were detected using a CFX 96 Bio-Rad (USA) amplifier. Fluorescence was measured by channels at the 5' ends with FAM/green dye and at the 3' ends with BHQ1 quencher. As a result of the RT-PCR, 6 fluorescence curves were identified, together with two positive controls, crossing the Threshold line. The values of the "Ct" indicator ranged from 13 to 35. The obtained results of the reaction indicate their good reproducibility and reliability.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Барышникова, Е. И. Диагностика весенней виремии карпа методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени / Е. И. Барышникова, М. Е. Сенина, Ю. П. Щелкунова //

Ветеринария. – 2022. – № 11. – С. 66-72.

2. Завьялова Е.А., Дрошнев А.Е., Булина К.Ю., Карпова М.А. Мониторинг эпизоотической ситуации по болезням рыб: факты и перспективы. Труды ВИЭВ. 2018; 80 (1):182 – 189.

3. Грищенко, Л. И. Патолого-морфологические изменения и патогенез при весенней виремии карпов / Л. И. Грищенко // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. – 2015. – № 1. – С. 23-25.

4. Пичуева, А. А. Вспышка весенней виремии карповых рыб в Приволжском федеральном округе РФ в 2014 году / А. А. Пичуева, М. И. Доронин // Ветеринария сегодня. – 2015. – № 4(15). – С. 66-70.

5. Ahne W., Spring viremia of carp (SVC) / W. Ahne, H.V. Björklund, S. Essbauer [et al.] // Dis.Aquat. Organ. – 2002. - № 52. – P. 261–272.

6. Грищенко Л.И., Акбаев М. Ш. Болезни рыб и основы рыбоводства. М.: Колос, 2013. – С. 456.

7. Miller O. Phylogenetic analysis of spring viremia of carp virus reveals distinct subgroups with common origins for recent isolates in North America and the UK [et al.] O. Miller, F.G. Fuller, Gebreyes W.A.// Diseases of Aquatic Organisms. – 2007. – Vol. 76. P. 193-204.

8. Garcia-Valtanen P. Autophagy-inducing peptides from mammalian VSV and fish VHSV rhabdoviral G glycoproteins (G) as models for the development of new therapeutic molecules. / P. García-Valtanen, M. M. Ortega-Villaizán, A. Martínez-López. [et al.]// Autophagy. -2014. – Vol.10. P.1666–1680.

9. Usama Ashraf, Spring viraemia of carp virus: recent advances/ Usama Ashraf, Lu Yuanan , Lin Li [et al.]// Journal of General Virology. – 2016. – Vol. 97. P. 1037–1051.

10. Zhang Q., Gui J. F. Virus genomes and virus–host interactions in aquaculture animals // Sci China Life Sci – 2015. – 58. P. 156–169.

11. Walker P., Winton J. «Emerging viral diseases of fish and shrimp»/ Walker P., Winton J. // Veterinary Research. – 2010. – 41 - 51.

12. Yue, Z. Development of a sensitive and quantitative assay for spring viremia of carp virus based on real-time RT-PCR./ Yue Z., Teng, Y., Liang, C., Xie, X. [et al.]// J. Virol. Methods. – 2008. – P. 43-48.

REFERENCES

1. Baryshnikova, E. I. Diagnostics of spring viremia of carp by the RT-PCR method in real time / E. I. Baryshnikova, M. E. Senina, Yu. P. Shchelkunova // Veterinary Science. - 2022. - No. 11. - P. 66-72.

2. Завьялова Е.А., Дрошнев А.Е., Булина К.Ю., Карпова М.А. Мониторинг эпизоотической ситуации по болезням рыб: факты и перспективы. Труды ВИЭВ. 2018; 80 (1):182 – 189.

3. Grishchenko, L. I. Pathological and morphological changes and pathogenesis in spring viremia of carps / L. I. Grishchenko // Russian Veterinary Journal. Farm animals. – 2015. – No. 1. – P. 23-25.

4. Pichueva, A. A. Outbreak of spring viremia of carp fish in the Volga Federal District of the Russian Federation in 2014 / A. A. Pichueva, M. I. Doronin // Veterinary Science Today. – 2015. – No. 4(15). – P. 66-70.

5. Ahne W., Spring viremia of carp (SVC) / W. Ahne, H.V. Björklund, S. Essbauer [et al.] // Dis.Aquat. Organ. – 2002. - № 52. – P. 261–272.

6. Грищенко Л.И., Акбаев М.Ш. Болезни рыб и основы рыбоводства. М.: Колос, 2013. – С. 456.

7. Miller O. Phylogenetic analysis of spring viremia of carp virus reveals distinct subgroups with common origins for recent isolates in North America and the UK [et al.] O. Miller, F.G. Fuller, Gebreyes W.A.// Diseases of Aquatic Organisms. – 2007. – Vol. 76. P. 193-204.

8. Garcia-Valtanen P. Autophagy-inducing peptides from mammalian VSV and fish VHSV rhabdoviral G glycoproteins (G) as models for the development of new therapeutic molecules / P. García-Valtanen, M. M. Ortega-Villaizán, A. Martínez-López. [et al.]// Autophagy. -2014. – Vol.10. P.1666–1680.

9. Usama Ashraf, Spring viraemia of carp virus: recent advances/ Usama Ashraf, Lu

- Yuanan , Lin Li [et al.]// Journal of General Virology. – 2016. – Vol. 97. P. 1037–1051.
- 10.Zhang Q., Gui J. F. Virus genomes and virus–host interactions in aquaculture animals // Sci China Life Sci – 2015. – 58. P. 156–169.
- 11.Walker P., Winton J. «Emerging viral diseases of fish and shrimp»/ Walker P., Winton J. // Veterinary Research. – 2010. – 41 - 51.