

Обнаружение особо опасных вирусных болезней рыб семейства лососёвых (*Salmo salar*) с применением полимеразной цепной реакции

DOI

Кандидат биологических наук,
А.В. Перчун – старший
научный сотрудник;

Доктор технических наук,
академик РАЕН **В.В. Воробьев**;

Кандидат ветеринарных наук
В.П. Мельников – заведующий
лабораторией –

Референтная лаборатория
по болезням аквакультуры
Лабораторно-диагностического
центра Федеральное
государственное бюджетное
учреждение «Федеральный центр
охраны здоровья животных»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир

@ perchun@arriah.ru;
vorobyev_vv@arriah.ru

Ключевые слова:

вирусные болезни лососей,
мониторинг, риски, методика,
полимеразная цепная реакция,
специфичность, аналитическая
чувствительность

Keywords:

viral diseases of salmon,
monitoring, risks, methodology,
polymerase chain reaction,
specificity, analytical sensitivity

DETECTION OF PARTICULARLY DANGEROUS VIRAL DISEASES OF SALMON FISH (*SALMO SALAR*) USING POLYMERASE CHAIN REACTION

Candidate of Biological Sciences **A.V. Perchun** – Senior Researcher;
Doctor of Technical Sciences, Academician of the Russian Academy
of Sciences **V.V. Vorobyov** – Process Engineer;

Candidate of Veterinary Sciences **V.P. Melnikov** - Head of the laboratory –
Reference Laboratory for Aquaculture Diseases of the Laboratory Diagnostic Center Federal
State Budgetary Institution "Federal Center for Animal Health Protection" (FGBI "VNIIZH")

Significant economic damage to aquaculture facilities and marine aquatic organisms is caused by viral diseases of fish, almost a quarter of the detected viruses cause diseases. Pathogens mainly fall during the transportation of infected fish from disadvantaged farms to "clean" aquatic farms, as well as from "escaped" fish from cages to the sea, where contamination of natural salmon and other aquatic organisms occurs. When delivering fish planting material to Russia from countries with different epizootological situations, constant monitoring and forecasting of possible risks is necessary. To prevent the spread of viral infections of fish, diagnostics and prevention occupy a leading place. Laboratory diagnostics of fish diseases of viral etiology is based on the isolation of the pathogen and its identification by serological methods that require a long time and research in specialized laboratories of large research institutes. More effective and highly sensitive are molecular diagnostic methods, in particular, polymerase chain reaction (PCR) with reverse transcription to detect a number of particularly dangerous viral diseases of fish. Infectious necrosis of hematopoietic tissue, infectious pancreatic necrosis, viral hemorrhagic septicemia and infectious anemia of salmon were identified by highly specific and sensitive diagnostic PCR method. The improved technique of PCR with reverse transcription makes it possible to detect pathogens in salmon and other fish both with obvious clinical signs and with hidden virus carrier.

ВВЕДЕНИЕ

Болезни рыб вирусной этиологии широко распространены во всём мире. Около четверти выявленных вирусов вызывают забо-

левания, наносящие серьезный ущерб объектам аквакультуры и морским гидробионтам [6]. Несмотря на то, что большинство инфекций не представляют пря-

мой угрозы здоровью человека, они отрицательно влияют на темп роста рыб, товарный вид, качество рыбопродукции, а также сопровождаются высокой летальностью [1].

Во всем мире главное направление в борьбе с различными болезнями рыб – профилактика, а именно – предотвращение проникновения патогенов в регионы, где их прежде не было [5]. Из этого следует, что завоз рыбопосадочного материала в Россию из стран с различной эпизоотологической ситуацией требует мониторинга и прогнозирования на основе возможных рисков.

В комплексе мероприятий по предотвращению распространения вирусных инфекций рыб ведущее место отводится диагностике. На сегодняшний день лабораторная диагностика заболеваний основана на выделении вируса и его идентификации серологическими методами, которые требуют больших затрат времени и выполняются только в крупных научно-исследовательских институтах, имеющих профильные лаборатории [5; 6].

В последние годы всё более важными инструментами для диагностики инфекционных болезней становятся методы молекулярно-генетического анализа, в том числе различные варианты полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием.

Молекулярные методы диагностики более чувствительны и требуют меньше времени, чем культивирование и серологические методы, традиционно используемые для идентификации вирусов рыб. В течение последних 15 лет молекулярная диагностика заболеваний значительно продвинулась, в том числе и при выявлении заболеваний рыб. К числу таких методов относится ПЦР и ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), которые позволяют обнаружить вирус у рыб, как с явными клиническими признаками, так и у рыб со скрытым вирусносительством [2; 4].

В России отсутствуют методы, сочетающие невысокую стоимость анализа, простоту в использовании, а главное, высокую чувствительность. На отечественном рынке предлагаются только импортные наборы и тест-системы для диагностики вирусных болезней рыб. Таким образом, целью настоящего исследования являлась оценка возможности применения полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией для индикации и идентификации таких особо опасных возбудителей вирусных болезней рыб семейства лососёвых, как вирусная геморрагическая септицемия (VHSV, viral haemorrhagic septicaemia virus), инфекционный некроз гемопоэтической ткани (IHNV, infectious haematopoietic necrosis virus), инфекционная анемия (ISAV, infectious salmon anaemia virus) и инфекционный панкреатический некроз (IPNV, infectious pancreatic necrosis virus).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве стандартных референтных образцов были использованы следующие штаммы: «Аркус 32/87» вируса IHNV, «FLD/2004» вируса IPNV, «Аланд» вируса VHSV, находящиеся на хранении во «Всероссийской государственной коллекции экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных (ГКШМ) Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный центр охраны здоро-

Значительный экономический ущерб объектам аквакультуры и морским гидробионтам наносят вирусные болезни рыб, почти четверть из выявленных вирусов вызывают заболевания. Возбудители болезней в основном попадают при перевозках инфицированных рыб из неблагополучных хозяйств в «чистые» аквафермы, а также от «сбежавшей» из садков рыбы в море, где происходит контаминация природного лосося и других гидробионтов. При доставке рыбопосадочного материала в Россию из стран с различной эпизоотологической ситуацией необходим постоянный мониторинг и прогнозирование возможных рисков. Для предотвращения распространения вирусных инфекций рыб ведущее место занимают диагностика и профилактика. Лабораторная диагностика болезней рыб вирусной этиологии основана на выделении возбудителя и его идентификации серологическими методами, требующими продолжительного времени и выполнения исследований в профильных специализированных лабораториях крупных НИИ. Более эффективными и высокочувствительными являются молекулярные методы диагностики, в частности, полимеразная цепная реакция (ПЦР) с обратной транскрипцией по выявлению ряда особо опасных вирусных болезней рыб. Высокоспецифичным и чувствительным диагностическим методом ПЦР были идентифицированы инфекционный некроз гемопоэтической ткани, инфекционный панкреатический некроз, вирусная геморрагическая септицемия и инфекционная анемия лососёвых. Усовершенствованная методика проведения ПЦР с обратной транскрипцией позволяет обнаружить возбудителей болезней у лососёвых и других рыб как с явными клиническими признаками, так и со скрытым вирусносительством.

вья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)), а также штамм «ССВВ» вируса ISAV, полученный в 2019 г. из Американской коллекции типовых культур (ATCC).

Выделение РНК исследуемых вирусов проводили с использованием комплекта реагентов «РИБО-сорб» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия), согласно инструкции производителя. Для получения кДНК на матрице, выделенной РНК, использовали комплект реагентов «ОТ-1» (ООО «НПФ Синтол», Россия), согласно рекомендациям фирмы-производителя. Реакционную смесь для постановки ПЦР готовили в объёме 25 мкл с использованием набора реактивов «Encyclo Plus PCR kit» (ЗАО «Евроген», Россия), согласно инструкции к набору. ПЦР проводили в термоциклере «PTC-200 DNA Engine Cycler» (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Последовательности олигонуклеотидных праймеров, используемых для постановки ПЦР, заимствованы из работ Н.Ю. Кандриной и др., 2014 [8], M. Devold *et al.*, 2000 [9], E.J. Emmenegger *et al.*, 2000 [11] и P. Vennerström *et al.*, 2018 [17]. Олигонуклеотиды были синтезированы в компании ООО «НПФ Синтол».

Полученные в ходе ПЦР ампликоны анализировали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия (10 мг/мл) в течение 1 часа при напряжении 10 В/см в 1х трисборатном буфере. В качестве маркера молекулярных весов

использовали «M100» с шагом в 100 п.н. (ООО «НПФ Синтол», Россия) в количестве 5 мкл. По окончании электрофореза гель анализировали в коротковолновом УФ-свете (длина волны 312 нм с помощью системы гель-документирования «Взгляд») (ООО «НПФ Хеликон», Россия) и результаты реакции интерпретировали по наличию или отсутствию светящихся полос.

Аналитическую чувствительность оценивали путём исследования серии последовательных десятикратных разведений суспензий культуральных штаммов «Аркус 32/87» вируса IHNV, «FLD/2004» вируса IPNV, «Аланд» вируса VHSV и «ССВВ» вируса ISAV с исходными титрами инфекционной активности, соответственно, $6,90 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, $5,77 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, $7,20 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и $5,50 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Пределом чувствительности считали наибольшее разведение, при котором регистрировали положительный результат.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основании проведённого анализа последовательностей генома исследуемых вирусов IHNV, IPNV, VHSV и ISAV, представленных в базе данных GenBank Национального центра биотехнологической информации США (National Center for Biotechnological Information, NCBI) и рекомендаций Всемирной организации по охране здоровья животных (World Organisation for Animal Health, OIE) [14], нами были выбраны олигонуклеотиды к консервативным участкам 8-го сегмента вируса ISAV, нуклеокапсида (N) вируса VHSV, гена G вируса IHNV и сегмента B вируса IPNV, позволяющих идентифицировать максимальное количество известных штаммов и изолятов этих вирусов. Последовательности олигонуклеотидов представлены в таблице 1.

В серии экспериментов были подобраны температурные и временные условия постановки ПЦР. При амплификации фрагмента генома вируса IHNV количество циклов было увеличено с 30 до 35, что позволило наработать большее число ампликонов, тем самым увеличилась чувствительность реакции. При амплификации фрагмента генома вируса ISAV время отжига олигонуклеотидов было уменьшено с 45 сек до 30 сек, а синтеза – с 90 сек до 60 сек, что позволило сократить время реакции без потери её эффективности. При амплификации фрагмента генома вируса IPNV был убран второй раунд постановки ПЦР, предложенный Н.Ю. Кандринной с соавт. [8], что также позволило сократить время реакции. При амплификации фрагмента генома вируса VHSV температура отжига олигонуклеотидов была увеличена с 52°C до 55°C , что позволило усилить специфичность реакции.

Оптимизированные параметры амплификации для исследуемых инфекций представлены в таблице 2.

Специфичность выбранных олигонуклеотидов была проверена экспериментально при исследовании культур клеточных линий ASK (культура клеток головной почки атлантического лосося), RTG-2 (культура клеток гонад радужной форели), EPC (культура клеток папулезной эпителиомы карпа) и CHSE-214 (культура клеток эмбриона чавычи) после инокуляции вирусами, соответственно, ISAV, VHSV, IHNV и IPNV в ОТ-ПЦР. Полученные после амплификации фрагменты геномов данных вирусов анализировали с помощью гель-электрофореза.

На рисунке 1 представлены электрофореграммы проведённого анализа.

Из представленных на рисунке 1 данных видно, что в лунках №2 со штаммами вирусов IHNV, ISAV, VHSV

Таблица 1. Структура олигонуклеотидов для выявления возбудителей ISAV, VHSV, IHNV и IPNV / **Table 1.** Structure of oligonucleotides for the detection of pathogens ISAV, VHSV, INV and INV

Возбудитель	Последовательность (5'-3') олигонуклеотидов	Размер ПЦР продукта, п.н.	Источник
ISAV	F - GAAGAGTCAGGATGCCAAGACG R - GAAGTCGATGAAGTGCAGCGA	211	M. Devold <i>et al.</i> , 2000 [9]
VHSV	F - GGGGACCCCAGACTGT R - TCTCTGTACCTTGATCC	811	P. Vennerström <i>et al.</i> , 2018 [17]
IHNV	F - AGAGATCCCTACACCAGAGAC R - GGTGGTGTGTTTCCCGTCAA	693	E.J. Emmenegger <i>et al.</i> , 2000 [11]
IPNV	F - ACGTTGGTGGCACCCGACATAC R - GTGTCTCCTTGGTTTGCCTATG	860	Н.Ю. Кандринна и др., 2014 [8]

Примечание: F – forward (прямой олигонуклеотидный праймер), R – reverse (обратный олигонуклеотидный праймер)

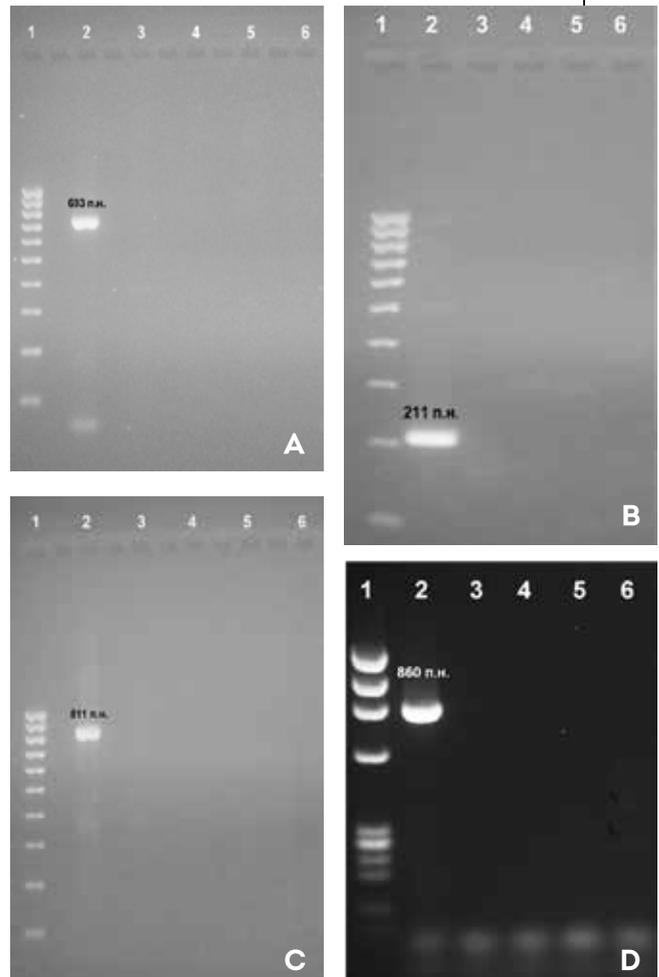
Таблица 2. Параметры амплификации для выявления возбудителей ISAV, VHSV, IHNV и IPNV / **Table 2.** Amplification parameters for the detection of ISAV, VHSV, INV and INV pathogens

Стадия ПЦР	Количество циклов	Температура, °C	Длительность стадии, мин.
Предварительная денатурация	1	95	3
Денатурация		95	1/2
Отжиг праймеров	35	59 (ISAV); 50 (IHNV); 55 (VHSV); 57 (IPNV)	1/2
Синтез		72	1
Заключительный синтез	1	72	7
Хранение	1	4	20

Рисунок 1. Электрофореграммы результатов тестирования специфичности метода ОТ-ПЦР для выявления вирусов IHNV (A.), ISAV (B.), VHSV (C.) и IPNV (D.):

- A. дорожка 1 – маркер молекулярных весов «M100»;
дорожка 2 – штамм «Аркус 32/87» вируса IHNV;
дорожка 3 – штамм «Аланд» вируса VHSV;
дорожка 4 – штамм «FLD/2004» вируса IPNV;
дорожка 5 – штамм «CCBB» вируса ISAV;
дорожка 6 – отрицательный контроль (стерильная вода, свободная от РНКаз и ДНКаз).
- B. дорожка 1 – маркер молекулярных весов «M100»;
дорожка 2 – штамм «CCBB» вируса ISAV;
дорожка 3 – штамм «Аланд» вируса VHSV;
дорожка 4 – штамм «Аркус 32/87» вируса IHNV;
дорожка 5 – штамм «FLD/2004» вируса IPNV;
дорожка 6 – отрицательный контроль (стерильная вода, свободная от РНКаз и ДНКаз).
- C. дорожка 1 – маркер молекулярных весов «M100»;
дорожка 2 – штамм «Аланд» вируса VHSV;
дорожка 3 – штамм «FLD/2004» вируса IPNV;
дорожка 4 – штамм «Аркус 32/87» вируса IHNV;
дорожка 5 – штамм «CCBB» вируса ISAV;
дорожка 6 – отрицательный контроль (стерильная вода, свободная от РНКаз и ДНКаз).
- D. дорожка 1 – маркер молекулярных весов «M100»;
дорожка 2 – штамм «FLD/2004» вируса IPNV;
дорожка 3 – штамм «Аланд» вируса VHSV;
дорожка 4 – штамм «Аркус 32/87» вируса IHNV;
дорожка 5 – штамм «CCBB» вируса ISAV;
дорожка 6 – отрицательный контроль (стерильная вода, свободная от РНКаз и ДНКаз).

Figure 1. Electrophoregram of the results of testing the specificity of the RT-PCR method for detecting viruses IHNV (A.), ISAV (B.), VHSV (C.) and IPNV (D.)



и IPNV наблюдаются чёткие фрагменты на уровне 693 п.н. (A.), 211 п.н. (B.), 811 п.н. (C.) и 860 п.н. (D.), соответственно. В остальных лунках, включая отрицательный контроль реакции, данные фрагменты не наблюдаются, что свидетельствовало о высокой специфичности подобранных олигонуклеотидов для выявления возбудителей рассматриваемых инфекций и отсутствии контаминации используемых реагентов, исследуемой или посторонней РНК.

Аналитическую чувствительность оценивали путём исследования серии последовательных десятикратных разведений культуральных штаммов «CCBB» вируса ISAV, «Аланд» вируса VHSV, «Аркус 32/87» вируса IHNV и «FLD/2004» вируса IPNV, с исходным титром их инфекционной активности – 5,50 lg ТЦД₅₀/см³, 7,20 lg ТЦД₅₀/см³, 6,90 lg ТЦД₅₀/см³ и 5,77 lg ТЦД₅₀/см³, соответственно. Пределом чувствительности считали наибольшее разведение, при котором регистрировали положительный результат. Рассчитанные значения аналитической чувствительности оптимизированной ПЦР составили 2,50 lg ТЦД₅₀/см³ для вируса ISAV, 2,90 lg ТЦД₅₀/см³ для вируса IHNV, 4,20 lg ТЦД₅₀/см³ для вируса VHSV и 2,77 lg ТЦД₅₀/см³ для вируса IPNV.

Результаты тестирования аналитической чувствительности представлены на рисунке 2 и в таблице 3.

Таким образом, предложенный метод ОТ-ПЦР позволяет выявлять вирусы ISAV, IHNV, VHSV и IPNV со следующими титрами инфекционной активности – 2,50 lg ТЦД₅₀/см³, 2,90 lg ТЦД₅₀/см³, 4,20 lg ТЦД₅₀/см³ и 2,77 lg ТЦД₅₀/см³, соответственно. Специфичность подобранных олигонуклеотидов была проверена с по-

мощью онлайн программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), а также экспериментально. Результаты ОТ-ПЦР, представленные на рисунке 1, показали, что выбранные олигонуклеотиды гибридизируются только с фрагментами генома комплементарными искомым вирусам и не взаимодействуют с РНК других вирусов.

С помощью описанного метода была проведена идентификация штаммов, референтных и полевых, имеющих в референтной лаборатории по болезням аквакультуры ФГБУ «ВНИИЗЖ». Данные, полученные в ходе исследований с применением ОТ-ПЦР, корректировали с результатами, полученными методом вирусыведения в чувствительных культурах клеток и методом иммуноферментного анализа, с использованием коммерческих наборов фирм-производителей «TestLine Clinical Diagnostics Ltd» (Чехия) и «Bio-X Diagnostics S.A.» (Бельгия).

Следующим этапом работ в данном направлении будет разработка методик и подходов по обнаружению ISAV, VHSV, IHNV и IPNV с использованием современного и более чувствительного метода – ПЦР в режиме реального времени с последующим секвенированием и филогенетическим анализом переменных элементов генома выделенных изолятов перечисленных вирусов. Определение нуклеотидной последовательности переменных сегментов генома, обсуждаемых в статье возбудителей, позволит не только установить серотип вируса, но и определить другие его свойства, например, его топотип или географическое проис-

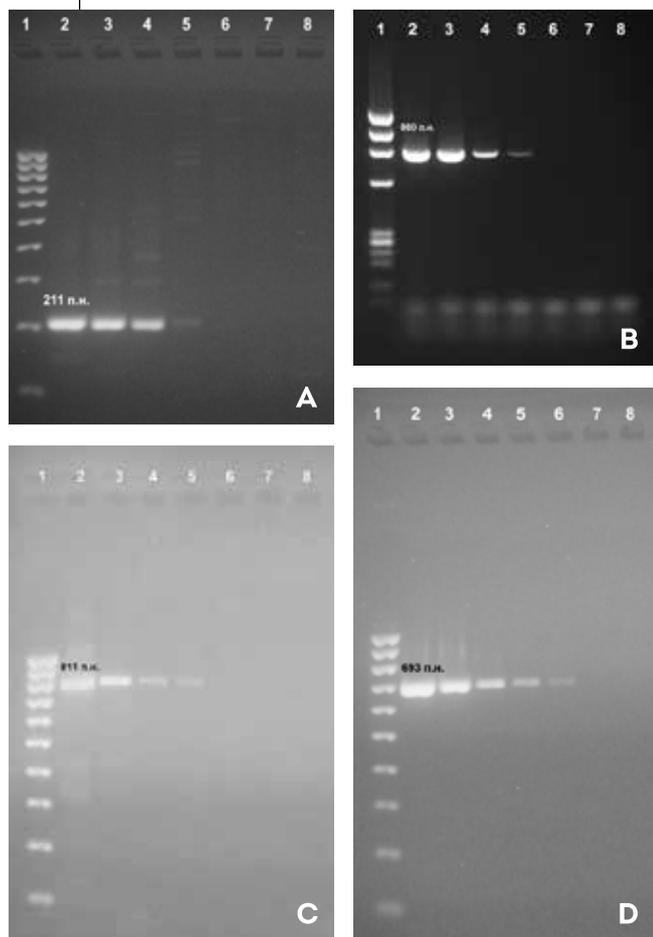


Рисунок 2. Электрофореграммы результатов определения аналитической чувствительности ПЦР для выявления геномов вирусов ISAV (А.), IPNV (В.), VHSV (С.) и IHNV (D.):

дорожка 1 – маркер молекулярных весов «М100»; дорожка 2 – исходный образец штамма «ССВВ» вируса ISAV (А.), штамма «FLD/2004» вируса IPNV (В.), штамма «Аланд» вируса VHSV (С.) и штамма «Аркус 32/87» вируса IHNV (D.); дорожки с 3-ю по 7-ю – серия десятикратных разведений (10^{-1} – 10^{-5}) культуральных штаммов «ССВВ», «FLD/2004», «Аланд» и «Аркус 32/87»; дорожка 8 – отрицательный контроль (стерильная вода, свободная от РНКаз и ДНКаз).

Figure 2. Electrophoregram of the results of determining the analytical sensitivity of PCR for detecting the genomes of ISAV (A.), IPNV (B.), VHSV (C.) and IHNV (D.) viruses

хождение. Актуальность такого анализа связана со значительным уровнем генетической гетерогенности последовательностей изолятов различного гео-

графического происхождения, но принадлежащих к одному серотипу.

Применение ПЦР в диагностике вирусных болезней рыб стимулирует развитие аква- и марикультуры за счёт увеличения разнообразия методических подходов для практической ветеринарии и представляет большой интерес для изучения молекулярно-генетических исследований свойств вирусов, циркулирующих в пресных водоёмах и прибрежных морских акваториях Российской Федерации.

Отметим, что в нашей стране данные по использованию метода ПЦР в диагностике вирусных болезней рыб малочисленны. Имеется лишь ограниченное число публикаций [2; 3; 4; 7; 15] по разработке и использованию этого молекулярно-генетического метода, в то время, как за рубежом он получил широкое

Таблица 3. Результаты определения аналитической чувствительности, оптимизированной ПЦР / **Table 3.** Results of determination of analytical sensitivity optimized by PCR

Возбудитель	Разведение	Титр инфекционной активности вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³	Результат ПЦР
ISAV	исходный образец	5,50	+
	10^{-1}	4,50	+
	10^{-2}	3,50	+
	10^{-3}	2,50	+
	10^{-4}	1,50	-
	10^{-5}	0,50	-
IHNV	исходный образец	6,90	+
	10^{-1}	5,90	+
	10^{-2}	4,90	+
	10^{-3}	3,90	+
	10^{-4}	2,90	+
	10^{-5}	1,90	-
VHSV	исходный образец	7,20	+
	10^{-1}	6,20	+
	10^{-2}	5,20	+
	10^{-3}	4,20	+
	10^{-4}	3,20	-
	10^{-5}	2,20	-
IPNV	исходный образец	5,77	+
	10^{-1}	4,77	+
	10^{-2}	3,77	+
	10^{-3}	2,77	+
	10^{-4}	1,77	-
	10^{-5}	0,77	-

Примечание: «+» – положительный результат реакции; «-» – отрицательный результат реакции

распространение. Во многих странах избирательная амплификация отдельных участков вирусного генома с помощью ПЦР с последующим секвенированием используется не только в диагностики вирусов ISAV, VHSV, IHNV и IPNV, но и для разработки методов по их типированию [10; 12; 13; 16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведённых исследований подобранные олигонуклеотиды и оптимизированы температурно-временные условия проведения ПЦР для выявления следующих особо опасных вирусных болезней рыб семейства лососёвых: ISAV, VHSV, IHNV и IPNV.

Показано, что данный диагностический метод является высокоспецифичным и имеет аналитическую чувствительность 2,50 lg ТЦД₅₀/см³ при выявлении вируса ISAV, 2,90 lg ТЦД₅₀/см³ – IHNV, 4,20 lg ТЦД₅₀/см³ – VHSV и 2,77 lg ТЦД₅₀/см³ – IPNV. Постановка ОТ-ПЦР занимает в среднем 6 часов, в то время как «золотой стандарт» – вирусыведения в чувствительных клеточных культурах занимает несколько недель – от 14 до 21 суток, что позволяет сократить время проведения анализа в 56-84 раза и существенно снизить финансовые затраты на проведение исследований.

Предложенная ОТ-ПЦР может быть использована для выявления вирусов ISAV, VHSV, IHNV и IPNV в мониторинговых исследованиях проб патологического материала от рыб семейства лососёвых. Особенностью данной реакции является то, что она позволяет выявлять инфицированных рыб до появления клинических признаков, в случае скрытого вирусносительства, что особенно важно при трансграничных перевозках гидробионтов.

По результатам проведённых исследований были подготовлены и утверждены на учёном совете ФГБУ «ВНИИЗЖ» методические рекомендации по выявлению возбудителей VHSV (дата утверждения: 10.01.2019 т.), IHNV (дата утверждения: 10.01.2019 т.) ISAV (дата утверждения: 02.12.2019 г.) и IPNV (дата утверждения: 23.12.2020 т.) методом ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией.

ЛИТЕРАТУРА И ИСТОЧНИКИ / REFERENCES AND SOURCES

- Болезни рыб в аквакультуре России. Практическое руководство / Воронин В.Н., Кузнецова Е.В., Стрелков Ю.А., Чернышёва Н.Б. – С.-Пб.: ФГНУ «ГосНИОРХ», 2011. – 264 с.
1. Diseases of fish in aquaculture in Russia. Practical guide / Voronin V.N., Kuznetsova E.V., Strelkov Yu.A., Chernysheva N.B. – S.-Pb.: FGNU "GosNIORH", 2011. – 264 p.
2. Доронин М.И., Котова Е.В., Никитин М.М. Мудрак Н.С. Одновременная идентификация вирусов лососевых рыб с помощью метода обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) в формате микрочипов // Сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием: Молекулярная диагностика. – Москва, 2017. Том 2. – С. 367-368.
2. Doronin M.I., Kotova E.V., Nikitin M.M. Mudrak N.S. Simultaneous identification of salmon fish viruses using the method of reverse transcription and polymerase chain reaction in real time (RT-PCR-RV) in the format of microchips // Proceedings of the IX All-Russian Scientific and Practical Conference with international participation: Molecular diagnostics. – Moscow, 2017. Volume 2. – Pp. 367-368.

3. Жигалева О.Н. Выявление РНК возбудителя вирусной геморрагической септицемии рыб методом ПЦР / О.Н. Жигалева, О.Л. Колбасова, С.Ж. Цыбанов, Н.В. Колбасов // Ветеринария. – 2006. – №9. – С. 24-26
3. Zhigaleva O.N. Detection of the RNA of the causative agent of viral hemorrhagic septicemia of fish by PCR / O.N. Zhigaleva, O.L. Kolbasova, S.Zh. Tsybanov, N.V. Kolbasov // Veterinary medicine. – 2006. – No. 9. – Pp. 24-26
4. Завьялова Е.А. Индикация и идентификация некоторых особо опасных вирусов рыб методом ПЦР / Е.А. Завьялова, Н.Ю. Кандрина, Н.Ф. Ломакина, М.И. Гулюкин // Рыбоводство и рыбное хозяйство. – 2015. – №3 – С. 21-25.
4. Zavyalova E.A. Indication and identification of some particularly dangerous fish viruses by PCR / E.A. Zavyalova, N.Y. Kandrina, N.F. Lomakina, M.I. Gulyukin // Fish farming and fisheries. – 2015. – No. 3 – Pp. 21-25.
5. Здоровая рыба. Профилактика, диагностика и лечение болезни / Риитта Рахконен, Пиа Веннерстрем, Пяйви Ринтамяки, Ристо Каннел. – 2-е изд., перераб. и доп. – Хельсинки.: НИИ охотничьего и рыбного хозяйства Финляндии, 2013. – 177 с.
5. Healthy fish. Prevention, diagnosis and treatment of the disease / Riitta Rahkonen, Pia Wennerstrom, Pyavi Rintamaki, Risto Kannel. – 2nd ed., reprint. and additional – Helsinki.: Research Institute of Hunting and Fisheries of Finland, 2013. – 177 p.
6. Павлов Д.К. Анализ эпизоотической ситуации в мире по вирусным болезням рыб / Д.К. Павлов, А.А. Пичуева // Ветеринария сегодня. – 2015. – №2 (13). – С. 54-58.
6. Pavlov D.K. Analysis of the epizootic situation in the world on viral diseases of fish / D.K. Pavlov, A.A. Pichueva // Veterinary medicine today. – 2015. – №2 (13). – Pp. 54-58.
7. Попова А.Г. Методы идентификации и типирования вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых рыб на основе ОТ-ПЦР / А.Г. Попова, С.Ф. Орешкова, И.С. Шелкунов и др. // Вопросы вирусологии. – 2008. – №3. – С. 39-43.
7. Popova A.G. Methods of identification and typing of infectious necrosis virus of hematopoietic tissue of salmon fish based on RT-PCR / A.G. Popova, S.F. Oreshkova, I.S. Shchelkunov et al. // Questions of virology. – 2008. – No. 3. – Pp. 39-43.
8. Способ диагностики вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых методом полимеразной цепной реакции. Патент РФ № RU 2508547 С2. Бюл. 2014. № 6. Н.Ю. Кандрина, Н.Ф. Ломакина, Е.А. Завьялова, М.И. Гулякин.
8. A method for diagnosing the virus of infectious necrosis of the pancreas of salmon by polymerase chain reaction. RF Patent No. RU 2508547 C2. Byul. 2014. No. 6. N.Y. Kandrina, N.F. Lomakina, E.A. Zavyalova, M.I. Gulyakin.
9. Devold M., Krossoy B., Aspehaug V. et al. Use of RT-PCR for diagnosis of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in carrier sea trout *Salmo trutta* after experimental infection // Dis. Aquat. Org. 2000. Vol. 40. Pp. 9-18
10. Einer-Jensen K., Ahrens P., Lorenzen N. Parallel phylogenetic analyses using the N, G or Nv gene from a fixed group of VHSV isolates reveal the same overall genetic typing // Dis. Aquat. Org. 2005. Vol. 67. – Pp. 39-45.
11. Emmenegger E.J., Meyers T.R., Burton T.O. and Kurath G. Genetic diversity and epidemiology of infectious hematopoietic necrosis virus in Alaska. // Dis. Aquat. Org. 2000. Vol. 40. – Pp. 163-176.
12. Johansson T., Einer-Jensen K., Batts W. et al. Genetic and serological typing of European infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) isolates // Dis. Aquat. Org. 2009. Vol. 86. – Pp. 213-221.
13. Kibenge M., Iwamoto T., Wang Y. et al. Discovery of variant infectious salmon anaemia virus (ISAV) of European genotype in British Columbia, Canada // Virol. J. 2016. 13:3. doi: 10.1186/s12985-015-0459-1.
14. OIE. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. 7th ed. Paris, 2016. – 589 Pp.
15. Rudakova S.L., Kurath G., Bochkova E.V. Occurrence and genetic typing of infectious hematopoietic necrosis virus in Kamchatka, Russia // Dis. Aquat. Org. 2007. Vol. 75. – Pp. 1-11.
16. Tapia D., Eissler Y., Torres P. et al. Detection and phylogenetic analysis of infectious pancreatic necrosis virus in Chile // Dis. Aquat. Org. 2015. Vol.116. Pp. 173-184.
17. Vennerström P., Välimäki E., Hautaniemi M. et al. Wild fish are negligible transmitters of viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) genotype Id in the VHS restriction zone in Finland // Dis. Aquat. Org. 2018. Vol. 131. – Pp. 187-197.