

ОБЗОР

**СЪВРЕМЕНЕН ПОГЛЕД ВЪРХУ РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО
И МЕТОДИТЕ ЗА ДИАГНОСТИКА
НА ПРОЛЕТНАТА ВИРЕМИЯ ПО ШАРАНА**

ВАНЯ ЧИКОВА, ЕКАТЕРИНА МИЛЕВА

Национален диагностичен научноизследователски
ветеринарномедицински институт „Проф. д-р Г. Павлов“- София
e:mail: vchikova@abv.bg

Spring viremia of carp (SVC) is contagious viral disease with important economical impact into cyprinid aquacultures. This article describes an achievement in molecular biology and some of the most common methods and used for detection of SVCV – such as reverse transcriptase-polymerase chain reaction (PCR, RT-PCR) and other. These molecular methods are more rapid, sensitive and specific than classic as cell cultures and serology and either might be used to complement one another.

Key words: *Spring viremia of carp, virology, cell cultures, molecular methods, PCR.*

Пролетната виремия по шарана (ПВШ) е вирусно инфекциозно заболяване с важно стопанско значение.

До средата на ХХ в. ПВШ е описвана като част от група инфекциозни заболявания, под различни наименования: „остра инфекциозна воднянка“, „заразна воднянка“, „инфекциозен асцит“, „възпаление на плавателния мехур“, „хеморагична септицемия по шарана“, „червена заразна болест“ (Fijan, 1973; Ahne et al., 2002). Едно от най-популярните наименования, което се използва и до днес в нашата страна е „червенка по шарана“.

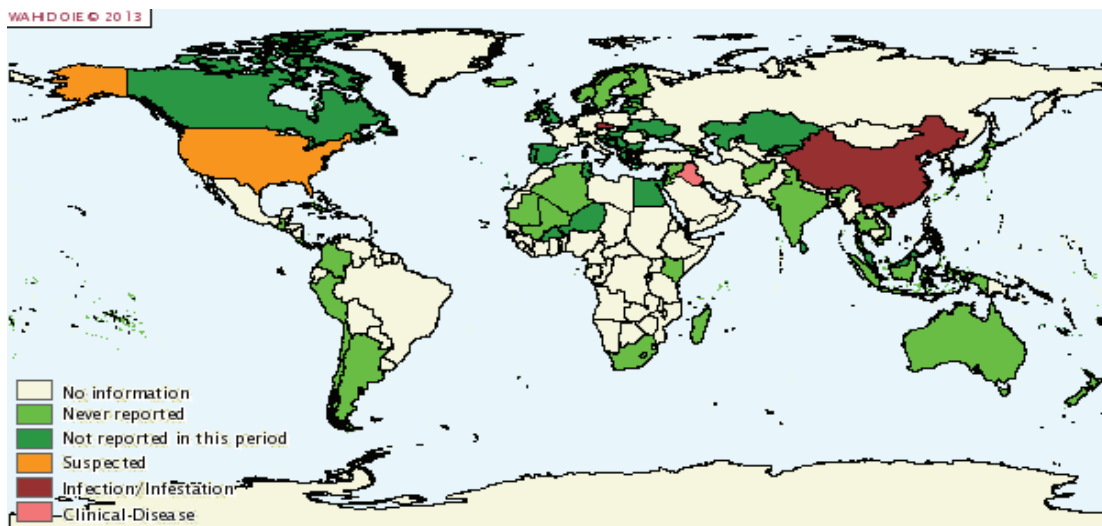
Fijan (1972) предлага инфекциозният асцит по шарана или т.нар. „червенка по шарана“ да се разглежда като комплексно заболяване, включващо две нозологични единици:

- Пролетна виремия по шарана – с вирусна етиология;
- Еритродерматит по шарана – с бактериална етиология.

Исторически и географски погледнато, пролетната виремия по шарана е широко разпространена в световен мащаб и нанася ежегодно сериозни икономически щети на фермите за аквакултури. Най-възприемчив и засегнат вид е шаранът (*Cyprinus carpio*), но боледуват и други видове – главно от сем. Шаранови (*Cyprinidae*), включително декоративен шаран *Koi* (*Cyprinus carpio koi*), каракуда (*Carassius* spp.), лин (*Tinca tinca*) и растителноядни видове риби – бял толстолоб (*Hypophthalmichthys molitrix*), пъстър толстолоб (*Aristichthys nobilis*) и бял амур (*Stenopharingodon idella*). Съществуват съобщения за инфектирани и други топлолюбиви видове риби като европейски сом (*Silurus glanis*), щука (*Esox lucius*), слънчевки (*Lepomis gibbosus*), тилапия (*Oreochromis* spp.), есетра (*Acipenser* spp.), канален сом (*Ictalurus punctatus*) и бяла риба (*Stizostedion lucioperca* syn. *Sander lucioperca*), обитаващи хабитати със сходни характеристики и имащи достъп до едни и същи вектори на пренос (OIE Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2012, Soliman et

al., 2008; Vicensova et al., 2011). При експериментални условия заболяването е възпроизведено при бабушка (*Rutilus rutilus*) (Haenen et al., 1993), данио (*Danio rerio*), гупи (*Poecilia reticulata*) и тилапия (*Oreochromis niloticus*) (Abo Eisa 2007). За първи път етиологичният агент е изолиран от пъстърви (*Oncorhynchus mykiss*) с клинични признаци при естествено избухване на заболяването в Сърбия (Jeremić S. et al., 2006) и в Иран (Haghighi Khiabani Asl A. et al., 2008). Вирус с филогенетично сходство с вируса на ПВШ (SVCV) е бил доказан в култивирани стриди в Хавай. (Lu Y. et al., 1994; Johnson M.C. et al., 1999; www.cfsph.iastate.edu).

Публикуваните епидемиологични данни показват, че болестта е установена при шарановите култури, отглеждани в европейските рибовъдни стопанства. През последните десет години ПВШ е била обявявана в редица страни от Европейския съюз – Англия (Way et al. 2003), Ирландия (Rowley et al., 2001), Италия, Франция, Чехия (Miller et al., 2007). Заболяването е регистрирано също в Русия, Беларус, Грузия, Литва, Молдова и Украйна (Björklund et al., 1996; Siwicki et al., 2003; Oreshkova et al., 1995). Интерес представляват съобщенията за поява на заболяването през последните години в Близкия Изток – Египет (Saad T. T., 2005; Soliman et al., 2008) и Иран (Haghighi Khiabani Asl A. et al., 2008). През 2003 година в Китай е установена латентна форма на болестта във ферма за декоративни шарани *Koi* (Liu C.T.Y. et al., 2004; Teng Y et al., 2007). Последните данни – за 2012 г. са представени във фиг 1.



Фиг. 1. Географско разпространение на ПВШ през 2012 г. (по данни на ОИЕ);

Fig. 1. Geographic distribution of SVCV during 2012 /OIE/

През 2002 г. в два щата независимо един от друг са регистрирани първите случаи в САЩ. През следващите години последват нови съобщения за доказване на SVCV (Dikkeboom A.L. et al., 2004; Goodwin A. E., 2004; Phelps N. B et al., 2012). SVCV е изолиран също от дива популация шарани в езерото Онтарио, Канада. (Garver K. A et al., 2007). В края на 90-те години на миналия век в Ю. Америка – в Бразилия, вирусът е изолиран от златиста каракуда (Alexandro A. C. et al., 1998). Разпределението в световен мащаб на SVSV през последните 10 години е представено в табл. 1.

Заболяването не е включено в част II на приложение IV, съгласно измененията с Директива 2008/53/ЕС на действащата Директива 2006/88/ЕС относно здравните изисквания за аквакултурни животни и продукти от тях и за предотвратяване и контрол на някои болести по водните животни. Съгласно чл. 43 на Директива 2006/88/ЕС се дава възможност на всяка страна-член на ЕС

Таблица 1. Географско разпространение на ПВШ през последните десет години (по данни на ОИЕ, 2012)

Table 1. Geographic distribution of SVCV during last ten years (OIE)

Година, Year	Държава, Country
2002	Югославия
2004	Китай, Латвия, Италия
2005	Великобритания, Франция, Германия, Полша, Китай, Унгария, БЮРМ
2006	Русия, Хърватия, Грузия, Молдавия
2007	Беларус, Канада, САЩ, Дания, Словакия, Словения, Швейцария
2008	Холандия, Египет, Иран
2009	Словакия
2010	САЩ, Бутан, Чехия, Сърбия
2011	Великобритания, Шри Ланка
2012	Словакия, Китай, Иран

допълнително да утвърди национални мерки за ограничаване на заболявания, които представляват стопански интерес. В тази връзка съгласно Решение 2010/221/ЕС са утвърдени рестриктивни мерки, прилагани от Обединеното кралство и Унгария с оглед запазването им на статут на зони, свободни от ПВШ и превенция от внос на това заболяване.

Пролетната вирусемия по шарана е включена и в списъка на заболяванията, подлежащи на обявяване от Световната организация за здравеопазване на животните (ОИЕ).

Имайки предвид значителния дял на шарановъдството в нашата страна, ПВШ също е обект на мониторинг. В страната ни се изпълнява Програма за надзор на заболяването от 2008 г. Пробите се вземат от официалните ветеринарни лекари при температури на водата над 15-20°C, като са обхванати около 50% от регистрираните рибовъдни ферми – тези с интензивно производство.

В България през 2011 г. за първи път в Националната референтна лаборатория по болести на рибите е изолиран SVCV. През 2008 г. при изследване на шаран и растителноядни риби с проявена смъртност и характерна клинична картина, е изолиран *tench rhabdovirus*, който е потвърден от Европейската референтна лаборатория по болести на рибите в Архус, Дания (непубликувани данни).

Вирусната етиология на болестта е доказана за първи път през 1971 г. (Fijan et al., 1971) и за да бъде отделена от останалите заболявания, засягащи шарановите риби и имащи сходни клинични признаци, е наречена “Пролетна вирусемия по шарана”, а изолираният вирус – Spring viremia of carp virus (SVCV) (Fijan et al. 1971) или *Rhabdovirus carpio* (Bootsma et al., 1983; Wolf, 1988; Ahne et al., 2002; Saad, 2005).

Понастоящем вирусът е класифициран в сем. *Rhabdoviridae*, род *Vesiculovirus* (Walker et al., 2000). Вирусът има характерна за семейството куршумоподобна форма с ширина до 90 и дължина до 180 nm (Ahne et al., 2002). Геномът на SVCV е изграден от линейна едноверижна, не-сегментирана РНК, състояща се от 11019 нуклеотиди, с негативен поляритет и кодираща пет структурни протеина. Те са обозначени като N, P, M, G и L. Проведеният секвентен корелационен анализ на гликопротеиновия ген (G- регион от 550 bp) от вирусни изолати от филогенетично

свързаните SVCV и вируса по младите щуки (*Pike-fry rhabdovirus*, PFV) позволява на **Stone et al.** (2003) да диференцират четири различни геногрупи. В геногрупа I – на SVCV – са обособени вирусните щамове, причиняващи ПВШ, като вирусите от тази група имат нуклеотидна идентичност с останалите три групи по-малко от 61%. Останалите три геногрупи са формирани на базата на идентифицирани до този момент щамове на PFV. В геногрупа II е отделен вирус - подобен на PFV, изолиран от бял амур (*grass carp rhabdovirus*). В геногрупа III е поставен референтният шам на PFV, а в IV – всички останали изолати на вируси от досегашната група на PFV, които споделят помежду си повече от 93% идентичност и групата е наречена *Tench rhabdovirus* (TenRV). Анализът е направен върху вируси, изолирани от различни видове възприемчиви топловодни риби, произхождащи от различни точки на Европейския континент. (**Stone et al.**, 2003). Според **Betts** (2004) *perch rhabdovirus*, причиняващ заболяване при речен костур (*Perca fluviatilis*) може да бъде отнесен в друга геногрупа на базата на проведен филогенетичен анализ.

В Международното бюро по епизоотии (OIE) задължително се обявяват само случаите с изолиран и доказан SVC вирус (OIE Aquatic Code, 2012). Вирусите от геногрупа I могат да бъдат разделени на 4 субгрупи в зависимост от географския произход на изолатите – азиатски (субгрупа a), източно-европейски (субгрупа b и c) и западно-европейски (субгрупа d). Редица автори посочват, че разграничаването на отделните серогрупи на базата на серологичните методи, препоръчвани в Наръчника от диагностични тестове за водни животни на Световната организация по здравеопазване на животните (OIE) е трудно (**Ahne et al.**, 1998, **Rowley et al.**, 2001, **Way et al.**, 2003, **Dixon & Longshaw** 2005).

ПВШ най-често протича в остра форма, по-рядко се съобщава за латентна. Боледуват риби от всички възрастови групи, но за 70% от риби на възраст една година и малко над нея, тя може да има фатален изход (**Wolf**, 1988, **Ahne et al.**, 2002). Икономическите загуби от едно такова избухване могат да бъдат много големи. В Европа, където ПВШ е ендемична за някои райони, смъртността достига до 10-15% при едногодишните риби (cfsph.iastate.edu). При по-ниски температури между 11–15°C, смъртността е по-протрахирана в продължение на 2-3 седмици.

Характерните клинични и патологоанатомични признаци са посочени от редица автори (**Bachmann and Ahne**, 1973; 1974; **Fijan et al.**, 1971; **Fijan**, 1972; 1973; 1975; **Negele**, 1977; **Wolf K.**, 1988).

Патологоанатомичната находка при засегнатите индивиди показва хеморагични петна с различна големина и конфигурация по тялото, подуване на корема (асцит), екзофталм, настръхване на люспите при люспестите породи или „кожни мехурчета“, изпълнени със серозно-хеморагичен ексудат при т.нар. „голи“ (огледални) породи шарани, перианално възпаление и оток. Наблюдаваните вътрешни изменения се характеризират с различна степен на перитонит, деструкция на тъканите на бъбрек, далак и черен дроб, което води приживе до асцит, масивен хеморагичен ентерит, петехиални кръвоизливи в мускулатурата, хрилете и по вътрешната ципа на плавателния мехур. Тропизмът и репликацията на вируса в капилярния ендотелиум, а също и в хемопоеичната и екскреторната бъбречна тъкан, води до нарушения във водно-солевия баланс в организма и последващ летален изход. (**Fijan et al.**, 1971; **Negele**, 1977; **Ahne et al.**, 2002). Наличието на множество огнищни хеморагии по плавателния мехур е важен патогномоничен белег и в редица случаи заболяването е описвано като самостоятелно заболяване под наименованието „възпаление на плавателния мехур“ (**Щелкунов**, 2005; **Ahne**, 1973).

При патохистологични изследвания се наблюдават некротични огнища и интензивна конгестия на черния дроб, далака и панкреаса, десквамация на интестиналния епителиум, хиалинна дегенерация в бъбречните екскреторни тубули, хиперемия на кръвоносните съдове в плавателния мехур и възпалителни процеси в перикардиума (**Маклалкова, М. Е.**, 2012; **Petty B. et al.**, 2002).

Вирусът може да бъде изолиран от бъбрек, далак, сърце, мозък, черен дроб (**Ahne** 1978; **Ahne et al.**, 2002). Най-висока смъртност се наблюдава при температура на водата в местообитанията,

където избухва вiremията – от 10 до 15°C (Goodwin A.E., 2009). Тези условия в околната среда са типични за пролетта, но при резки климатични инверсии е възможно спонтанно избухване (Ahne et al., 2002).

Вирусът се отделя с екскретите на клинично инфектирани риби в околната среда и е възможна хоризонтална трансмисия:

- чрез директен контакт между инфектирани риби (чрез урина, фекалии, слуз и кръвоизливи);
- чрез вода, съдържаща вирус (може да бъде пренесен по течението на разстояние до 10-20 km и да инфектира чувствителни популации);
- механично с риболовен и рибовъден инвентар.

Преносът по вода и с инфектирани риба и инвентар се смята за основния начин за инфектиране, но вектори могат да бъдат кръвосмучещи паразити - рибни въшки *Argulus foliaceus* (Crustacea, Branchiura) и пиявици *Piscicola geometra* (Annelida, Hirudinea) или ятрогенно чрез ракообразни организми и водоплаващи птици (Ahne, 1995, <http://library.enaca.org>).

В райони, в които пролетната вiremия по шарана вече е установена като ендемичен патоген, честотата на проявление и нивото на заболяемост и смъртност могат значително да бъдат редуцирани чрез поддържане на оптимални условия на отглеждане и прилагане на целия комплекс от профилактични ветеринарно – санитарни мероприятия, чрез редовна дезинфекция в рибовъдните стопанства на басейни и рибовъден инвентар (мрежи, цистерни за транспорт) и останалото оборудване, за да се предотврати трансмисията към здрави популации риби.

Проучванията на някои автори (Hill, B., 1977; Wolf, K., 1988; Fijan N., 1999; Petty, B. et al., 2002) показват, че различни фактори влияят върху проявлението на пролетната вiremия по шарана. От особено значение са дозата и вирулентността на вируса, температурата на водата (оптимална между 16 и 25°C), възрастта и кондицията на рибите, плътността на посадката и генетичната предразположеност.

При по-висока температура на водата инфектираните риби реагират с имунен отговор и продукция на антитела, които ограничават и неутрализират вирусната репликация. Неутрализиращите антитела се откриват за кратък период и са специфични за протеините, намиращи се по повърхността на вирусните спикули. Титърът на антителата и развитието на хуморален имунен отговор са в пряка зависимост от температурата на водата:

- при температури 13-14°C антитела не се откриват повече от няколко седмици;
 - при температури над 15°C продукцията на антитела се увеличава;
 - най-висок титър се установява при температури над 20°C още на 7-ия ден след инфекцията.
- Имунитетът, който се създава е солиден и траен - т.е. стерилен. (Macura et al., 1983, Ahne et al., 2002). Специфични IgM антитела могат да се открият повече от година след инфекцията чрез ELISA. В допълнение към антителата, SVCV индуцира продукцията на интерферон.

В редица случаи е описано влиянието на стрес факторите (транспорт, технологични манипулации, лоши хидрохимични условия и др.).

През последните години активно се разработват ваксини срещу ПВШ от различни екипи в няколко страни (Щелкунов и сътр., 2005; Kanellos et al., 2006; Emmenegger E.J. & Kurath G., 2008). През 2011 Emmenegger&Kurath патентоват ваксина в САЩ (US Patent, 2011).

Традиционните диагностични техники за откриване и потвърждение на ПВШ са приети като „златен стандарт“ и включват изолиране върху клетъчни култури и последващо потвърждение чрез серологични методи като ELISA (enzyme-linked immune sorbent assay), IFAT (immunofluorescence), ВНР (virus neutralization), имунопероксидазни или имуноензимни тестове. Вирусната репликация се извършва върху чувствителни линии от клетъчни култури, произхождащи от риби или нисши гръбначни животни и се изразява с проява на характерен цитопатичен ефект. Най-добри резултати са получени засега при използване на линии от шаранови риби като EPC (*Epithelioma*

papulosum cyprini) (**Fijan N.**, 1983), FHM (Fathead minnow) (**Gravell and Malsberger**, 1965) и CLC (Carp leukocyte culture) (**Faisal and Ahne**, 1990). **Щелкунов и сътр.** (2011) експериментално са доказали, че линии, произведени от опашен плавник на сибирска есетра (*Acipenser baerii*) са почувствителни към SVCV от приетите за референтни ЕРС. **Завьялова** (2006) установява експериментално, че върху клетъчни линии от гупи (*Poecilia reticulata*) SVCV предизвиква цитопатичен ефект и може да се използват успешно за диагностика и намножаване на вируса.

Откритията в областта на молекулярната биология доведоха до бързо развитие на нова група методи за диагностика на болестите по водните животни, характеризиращи се с висока чувствителност и специфичност. Наред с това все повече приоритет се дава и на бързината на анализа. PCR (polymerase-chain reaction) или полимеразно-верижната реакция е разработена първоначално за *in vitro* синтез на ДНК. Първи опити в тази насока прави Kjell Kleppe – норвежки учен, който през 1968 г. репликира ДНК, използвайки два дублиращи праймера (**Kleppe, K. et al.**, 1968). През 1983 г. Kary Mullis синтезира олигонуклеотиди за проект, който анализира мутации в човешкия геном (**Mullis K. B et al.**, 1986). През 1993 г. Mullis получава Нобелова награда за открития от него метод. През последните години са разработени различни варианти на PCR и метода вече се използва широко и рутинно в най-различни научни и приложни области – генетика, медицина, биоинженерство, криминалистика и т.н.

Редица вируси, в това число вируси, патогенни за рибите – както и SVCV, притежават геном, изграден от РНК. Поради това не е възможно директно прилагане на класическата PCR техника. Необходимо е най-напред да се синтезира ДНК верига, комплементарна на търсения за амплифициране фрагмент от изходната РНК (т.нар. cDNA). Това е първата стъпка от една двустепенна реакция, каквато е RT-PCR. Едва тогава може да се пристъпи към втория етап, представляващ всъщност класическа PCR реакция.

Първото описание на PCR, използвана за амплифициране на РНК посредством комплементарна ДНК верига, е на **Seeburg P. et al.** (1986, UCLA Symposium, unpublished). Една година по-късно **Veres et al.** (1987) правят първата публикация на вариант на RT-PCR. (**Veres, G. et al.**, 1987). Днес методът RT-PCR (reverse transcriptase – polymerase chain reaction) намира широко приложение при проучванията на биологични обекти с РНК-ов геном. Различни модификации на този съвременен метод са приложени и за диагностика и идентификация на SVCV.

Техниката на изпълнение на PCR включва използването на оптимален температурен режим за *in vitro* протичане, наличие на термостабилен ензим – ДНК полимераза, който в естествена среда участва в репликацията на НК, нуклеотиди и накрая добавяне в работния разтвор на подходяща последователна верига от специфични синтетични олигонуклеотиди с малка големина, които са комплементарни на началната и крайната последователност на търсения участък от генома на вируса. (**Eisenstein B. I.**, 1990; **True K.**, 2002). При RT-PCR в реакционната смес се добавя и ензимът обратна транскриптаза (reverse transcriptase), с чието участие се създава комплементарна на вирусната РНК ДНК (cDNA). За първи път PCR техника за доказване на ПВШ е публикувана от **Oreshkova et al.** (1995).

Друг метод е т.нар. nested PCR, който включва две последователни стъпки, при които се използват две двойки праймери. При първата стъпка (primary reaction) двойката праймери са конструирани така, че да ограничат един по-голям фрагмент от търсената НК, който след това служи като прицелен шаблон във втората стъпка на реакцията (nested step). При нея се използват втора двойка праймери, специфични за определен регион вътре във вече синтезирания при първата стъпка фрагмент. По този начин се повишават чувствителността и специфичността на реакцията, тъй като неспецифично амплифицираните при първата реакция участъци не се амплифицират по време на втората. Приложението на този метод е особено подходящо при изследване на проби с нисък вирусен титър (**Koutna et al.**, 2002).

rtRT-PCR е друг много чувствителен и използван вариант. Основава се на използването на флуорогенна сонда (probe), която се хибридизира с комплементарен участък от таргетната секвенция, осигурявайки по-висока специфичност на теста. Паралелно с това на базата на флуоресцентно излъчване по време на амплифициране се определя количественото съдържание на търсената НК. (Zhiqin Y. et al., 2008). Разновидност на описания метод е мултиплексният rtRT-PCR. При него едновременно се амплифицира повече от една секвенция с използване на няколко двойки специфични праймери (Zongxiao L. et al., 2008).

Освен PCR, други молекулярни методи, които с успех се използват през последните години при изследване генома на SVCV са:

- LAMP (RT-LAMP, Loop-mediated isothermal amplification) – метод, подобен на процедурата, използвана при изпълнение на PCR (RT-PCR), но без да се налага промяна на температурния режим. Визуализацията на продукта може да стане чрез стандартната гел-електрофореза и UV-светлина, но може да се използва и директно in situ оцветяване на ДНК. (Liu Z. et al., 2008)

- Рестрикционен анализ (RFLP, restriction fragment length polymorphism) – рестрикционен молекулярен анализ, използван при секвенция на генома (Shchelkunov et al., 2005)

- AuNPs метод (gold nanoparticles) – при него се използва свойствата на повърхностното напрежение на златни микрочастици (surface plasmon resonance) – метод за бърза детекция на вируса, отнемаш не повече от 15 минути. (Saleh M. et al., 2012).

Подходът при избора на метод за доказване наличие на SVCV – а този избор стои при доказване на всички инфекциозни болести по рибите, зависи на първо място от целта. Тя може да бъде за:

- диагностика на случаи с изявена клиника;
- мониторинг за установяване здравен статус на ферми за аквакултури;
- скрийнинг на популацията в ареал от дивата природа;
- идентификация на вирусния геном с научна цел – секвенция и проследяване на филогенезата на определен щам.

Редица авторски колективи разработват различни варианти на RT-PCR за диагностика на SVCV чрез установяване на различни фрагменти от неговия геном. PCR засега е все още скъп метод и за доказване наличие на SVCV се използват конвенционални техники чрез инокулация върху клетъчни култури и последваща идентификация чрез ELISA или IFAT. Използването на клетъчни култури в клиничната практика е изпитан, сравнително евтин, чувствителен и достъпен метод. Сравнението между най-използваните методики от двете групи методи обаче дава предимство на PCR, който е по-бърз, по-чувствителен и специфичен, а автоматизирането на процесите за протичане на отделните междинни реакции за екстракция на НК и провеждане на PCR вече е детайлно презицирано.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Завьялова, Елена А.**, 2006. Цитоморфологическая характеристика культур клеток рыб и их чувствительность к некоторым вирусам, “ВИЭВ им.Я. Р.Коваленко”, Москва
2. **Маклалкова, Мария Е.**, 2012. Иммуно-физиологический статус у рыб из природных популяций и аквакультур в норме и при патологии, ”МГУ им М. В.Ломоносова“, Москва
3. **Щелкунов, И.С., О. С. Воронова, Г. Н. Николенко, С. Ф. Орешкова, Т. И. Щелкунова, А. А. Ильичев**, 2005. Иммунопротективные свойства экспериментальных рекомбинантных вакцин против весенней виiremии карпа. Биотехнология, 6: 44 – 45

4. **Щелкунов, И. С.**, 2005. Разработка тест-систем для идентификации возбудителя весенней виремии карпа на основе методов анализа генома, г. Покров – филиал МГГУ
5. **Щелкунов, И. С., Т. И. Щелкунова**, 2011. Получение и свойства двух постоянных линий клеток плавников сибирского осетра, *Acipenser baerii*. Клеточные культуры, 27: 13–24
6. **Abo, Eisa**, 2011. Some studies on the Spring Viraemia of Carp in cultured freshwater fish. M.V.Sc. Thesis, Faculty of Veterinary Medicine, Alexandria University
7. **Ahne, W.**, 1978. Uptake and multiplication of Spring viremia of carp virus in carp, *Cyprinus carpio*, L., *J Fish Dis* 1978, 205 - 208
8. **Ahne, W.**, 1998. Rhabdovirus carpio-Infektion beim Karpfen (*Cyprinus carpio*), Untersuchungen über Reaktionen des Wirtsorganismus. *Fortschr, Vet* 30:180–183
9. **Ahne, W., Bjorklund H. V., Essbauer S., Fijan N., Kurath G., Winton J. R.**, 2002. Spring Viremia of Carp (SVC). *Dis Aquat Org* 52: 261-272
10. **Bachmann, P. A, Ahne W.**, 1973. Isolation and characterization of agent causing swim bladder inflammation in carp. *Nature* 244: 235-237
11. **Bachman, P A, Ahne W.**, 1974. Biological properties and identification of the causative agent causing swim bladder inflammation in carp *Archiv für die gesamte Virusforschung*, Volume 44, Issue 3, pp 261-269
12. **Betts, A. M., Stone D. M., Way K., Torhy C., Chilmonczyk S., Benmansour A., de Kinkelin P.**, 2003. Emerging vesiculo-type virus infections of freshwater fishes in Europe, *Dis Aquat Organ*, 57(3):201-12.
13. **Bjorklund, H. V., Higman K. H. & Kurath G.**, 1996. The glycoprotein genes and gene junctions of the fish rhabdoviruses spring viremia of carp virus and hirame rhabdovirus – analysis of relationships with other rhabdoviruses. *Virus Res.*, 42, 65–80
14. **Bootsma, R., Ebregt D.**, 1983. Spring Viraemia of Carp. In: Anderson, D.P., Dorson, M. and Dubourget, P. (eds) *Antigens of Fish Pathogens*. Collection Fondation Marcel Merieux, Lyons, France, 81-86
15. cfsph.iastate.edu – the Center for Food Security&Public Health, 2012, Iowa State University of Science and Technology
16. **Dikkeboom, D. L, Radi C., Kurth K. T., Marcquenski S., Engel M., Goodwin A. E., Way K., Stone D. M., Longshaw C.**, 2004. First Report of Spring Viremia of Carp Virus (SVCV) in Wild Common Carp in North America, *J Aquat Anim Health*, Vol 16, Issue 4, 169-178
17. **Dixon, P. F., Longshaw C. B.**, 2005. Assessment of commercial test kits for identification of spring viraemia of carp virus. *Dis. Aquat. Org.*, 67, 25–29
18. **Eisenstein, B. I.**, 1990. The Polymerase Chain Reaction — A New Method of Using Molecular Genetics for Medical Diagnosis, *N Engl J Med* 322:178-183
19. **Emmeneger, E. J. & Kurath G.**, 2008. DNA vaccine protects ornamental koi (*Cyprinus carpio* koi) against North American spring viremia of carp virus. *Vaccine*, 26, 6415–6421.
20. **Faisal, M., Ahne W.**, 1990. A cell line (CLC) of adherent peripheral blood mononuclear leucocytes of normal common carp *Cyprinus carpio*, *Dev. Comp. Immunol.* 14, 255–260
21. **Fijan, N.**, 1972. Infectious dropsy in carp – a disease complex In: Mawdesley-Thomas LE (ed) *Diseases of fish. Symposia of the Zoological Society of London*, London, p 39–51
22. **Fijan, N.**, 1973. Spring viremia of Carp (SVC)—a review. In: W.A. Dill (Ed.), *Symposium on the Major Communicable Fish Diseases in Europe and Their Control*. EIFAC (Eur. Inland Fish. Advis. Comm.) Tech. Pap. No. 17, Suppl. 2, 119–123
23. **Fijan, N.**, 1975. Advances in knowledge of viral diseases of fish. In: LE Page (Ed.), *Wildlife Diseases*. Plenum Press, New York, 127–133
24. **Fijan, N.**, 1983. Diagnostic work and Research on Fish Diseases and Fish Health Monitoring at FARTC (CIFRI), Dhauri. *FAO Field Document* 5 (FI : DP/ IND/75/031), 1–21

25. **Fijan, N.**, 1999. Spring viremia of carp and other diseases and agents of warm-water fish. In: Woo, P.T.K. and Bruno, D.W. (eds.), *Fish Diseases and Disorders, Volume 3, Viral, Bacterial and Fungal Infections*, CABIPublishing, Oxon, UK, 177-244
26. **Fijan, N., Petrinc, Z., Sulimanovic, D., Zwillenberg, L.**, 1971. Isolation of the viral causative agent from the acute form of infectious dropsy of carp, *Veterinarski Arhiv* 41:125-138
27. **Garver, K A, Dwilow A. G, Richard J., Booth T. F, Beniac D. R, Souter B. W.**, 2007. First detection and confirmation of spring viraemia of carp virus in common carp, *Cyprinus carpio* L., from Hamilton Harbour, Lake Ontario, Canada, *J. Fish Dis.*, Nov;30(11):665-71
28. **Goodwin, A.E.**, 2002. First Report of Spring Viremia of Carp Virus (SVCV) in North America, *J. Aquat Anim Health*, Vol 14, Issue 3, 161-164
29. **Goodwin, A.E.**, 2009. Spring Viremia of Carp Virus (SVCV): Global Status of Outbreaks, Diagnosis, Surveillance, and Research. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*, 61(3), 180-187
30. **Gravell, M., Malsberger R. G.**, 1965. A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Ann. NY. Acad. Sci.*, 126: 555-565
31. **Haenen, O., Davidse A.**, 1993. Comparative pathogenicity of two strains of pike fry rhabdovirus and spring viremia of carp virus for young roach, common carp, grass carp and rainbow trout, *Dis aquat Org*, Vol. 15: 87 - 92
32. **Haghighi, Khiabani Asl A., Bandehpour M., Sharifnia Z., Kazemi B.**, 2008. The first report of spring viraemia of carp in some rainbow trout propagation and breeding by pathology and molecular techniques in Iran. *Asian J. Anim. Vet. Adv.*, 3: 263–268
33. **Hill, B.**, 1977. Studies of spring viremia of carp virulence and immunization. *Bulletin de L'Office International des Epizooties* 87:455-456.
34. **Jeremić S., Ivetić V., Radosavljević V.**, 2006. Rhabdovirus *carpio* as a causative agent of disease in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* – Walbaum), *Acta Veterinaria (Beograd)*, Vol. 56, No. 5-6, 553-558
35. **Johnson, M.C., Maxwell J. M., Loh P. C., Leong J. A.**, 1999. Molecular characterization of the glycoproteins from two warm water rhabdoviruses: snakehead rhabdovirus and rhabdovirus of penaeid shrimps (RPS)/spring viremia of carp virus, *Virus Res*, 64:95-106
36. **Koutna, M., Vesely T., Psikal I., Hulova J.**, 2003. Identification of spring viraemia of carp virus (SVCV) by combined RT-PCR and nested PCR. *Dis. Aquat. Org.*, 55, 229–235
37. **Kleppe, K, Ohtsuka E., Kleppe R., Molineux I., Khorana H. G.**, 1971. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol.* 56:341-361
38. library.enaca.org, Aquatic Animal Diseases Significant to Asia-Pasific, 2012
39. **Liu, H, Gao L, Shi X, Gu T, Jiang Y, Chen H**, 2004. Isolation of spring of carp virus (SVCV) from cultured koi (*Cyprinus carpio koi*) and common carp (*Cyprinus carpio carpio*) in P.R. China. *Bull Eur Ass Fish Pathol*, 24:194-198
40. **Liu, Z., Teng Y., Xie X., Li H., Lv J., Gao L., Tian F., Jiang Y., Chu Z., Xie C. Liu H.**, 2008. Development and evaluation of a one-step loop-mediated isothermal amplification for detection of spring viraemia of carp virus, *Journal of Applied Microbiology*, 105: 1220 – 1226
41. **Lu, Y., Loh P.C.**, 1994. Infectivity studies of rhabdovirus in the penaeid blue shrimp. *Aquacult. Int.*, 2, 123–127
42. **Macura, B., Tesarcik J., Rehulka J.**, 1983. Survey of methods of specific immunoprophylaxis of carp spring viremia in Czechoslovakia. *Práce VÚRH (Vyzkumny ústav rybársky a hydrobiologický) Vodnany (English = Papers of RIFH [Research Institute of Fishery and Hydrobiology] Vodnany)*
43. **Miller, O., Fuller F. J., Gebreyes W. A., Lewbart G. A., Shchelkunov I. S., Shivappa R. B., Joiner C., Woolford G., Stone D. M., Dixon P. F., Raley M. E., Levine J. F.**, 2007. Phylogenetic analysis of Spring viremia of carp virus reveals distinct subgroups with common origins for recent isolates in North America and the UK, *Dis Aquat Org*, Vol 76: 193-204

44. **Mullis, K. B., Faloona F. A., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H., 1986.** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, 51, 1:263-73
45. **Negele R. D., 1977.** Histopathological changes in some organs of experimentally infected Carp fingerlings with Rhabdovirus carpio. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 87: 449 – 450
46. Office International des Epizooties (OIE), *Aquatic Code*, 2012
47. OIE *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*, 2012
48. **Oreshkova, S. F., Tikunova N. V., Shchelkunov I. S., Ilyichev A. A., 1995.** Detection of spring viremia of carp virus by hybridization with biotinylated DNA probes, *Vet Res* 26(5-6):533-5
49. **Oreshkova, S. F., Shchelkunov I. S., Tikunova N. V., Shchelkunova T. I., Puzyrev A.T., Ilyichev A. A., 1999.** Detection of spring viremia of carp virus isolates by hybridization with nonradioactive probes and amplification by polymerase chain reaction. *Virus Res*, 63:3–10
50. **Petty, B., Riggs A. C., Klinger R. E., Yanong R. P. E., Francis-Floyd R., 2002.** Spring Viremia of Carp, Department of Fisheries and Aquatic Sciences, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
51. **Phelps, N. B., Armien A. G., Mor S. K., Goyal S. M., Warg J. V., Bhagyam R., Monahan T., 2012.** Spring viremia of carp virus in Minnehaha Creek, Minnesota, *J Aquat Anim Health*. 24(4):232-7
52. **Rowley, H., Graham D. A., Campbell S., Way K., Stone D.M., Curran W. L., Bryson D.G., 2001.** Isolation and characterisation of rhabdovirus from wild common bream *Abramis brama*, roach *Rutilus rutilus*, farmed brown trout *Salmo trutta* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in Northern Ireland. *Dis Aquat Org* 48:7–15
53. **Saad, T. T., 2005.** Some Studies on the effects of Spring Viraemia of Carp Virus on cultured Carp species. Ph. D. Thesis, Fac. Vet. Med. Alex. Univ, Alexandria, Egypt
54. **Saleh, M., Soliman H., Schachner O., El-Matbouli M., 2012.** Direct detection of unamplified spring viraemia of carp virus RNA using unmodified gold nanoparticles, *Dis Aquat Organ*, 100(1):3-10
55. **Shchelkunov, I. S., Oreshkova S. F., Popova A. G., Nikolenko G. N., Shchelkunova T. I., Ilyichev A. A., 2005.** Development of PCR-based techniques for routine detection and grouping of spring viremia of carp virus. In: Cipriano RC, Shchelkunov IS, Faisal M, (eds.) *Health and diseases of aquatic organisms: bilateral perspectives*, Michigan State University Press, East Lansing, 260-284
56. **Siwicki, A. K., Pozet F., Morand M., Kazun B., Trapkowska S., Malaczewska J., 2003.** Influence of methisoprinol on the replication of rhabdoviruses isolated from carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus melas*): in vitro study. *Polish J. Vet. Sci.*, 6, 47–50
57. **Soliman, M. K., Aboeisa M. M., Mohamed S. G., Saleh W. D., 2008.** First record of isolation and identification of spring viraemia of carp virus from *Oreochromis niloticus* in Egypt. 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture, 1287–1306.
58. **Stone, D. M., Ahne W., Denham K. D., Dixon P. F., Liu C.T.Y., Sheppard A. M., Taylor G. R., Way K., 2003.** Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp virus and pike fry rhabdovirus isolates reveals four genogroups, *Dis. Aquat. Org.*, 53, 203–210
59. **Teng, Y., Liu H., Lv J. Q., Fan W. H., Zhang Q.Y., Qin Q. W., 2007.** Characterization of complete genome sequence of the spring viremia of carp virus isolated from common carp (*Cyprinus carpio*) in China. *Arch. Virol.*, 152, 1457 – 1465
60. **Tony, S., 1995.** Applications and Limitations of Polymerase Chain Reaction Amplification, Impact of basic research on tomorrow's medicine, *CHEST*; 108:1393-1404
61. **True, K., 2002.** Expanding Fish Health Capabilities with Quantitative Polymerase Chain Reaction (QPCR), U. S. Fish and Wildlife Service, California-Nevada Fish Health Center
62. **Veres, G., Gibbs R. A., Scherer S. E., Caskey C. T., 1987.** The molecular basis of the sparse fur mouse mutation, *Science* 237: 415 – 417

63. **Vicenova, M., Reschova S, Pokorova D., Hulova J., Vesely T.,** 2011. First detection of pike fry-like rhabdovirus in barbel and Spring viraemia of carp virus in sturgeon and pike in aquaculture in the Czech Republic., *Dis Aquat Organ*, 95(2):87-95

64. **Walker, P. J., Benmansour A., Calisher C. H., Dietzgen R.** and 7 others, 2000. Family Rhabdoviridae. In: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB and 7 others (eds) *The Seventh Report of the International Committee for Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, CA, 563–583

65. **Way, K., Bark S. J., Longshaw C. B., Denham K. L., Dixon P. F., Feist S. W., Gardiner R., Gubbins M. J., Le Deuff R. M., Martin P. D., Stone D. M., Taylor G.R.,** 2003. Isolation of a rhabdovirus during outbreaks of disease in cyprinid fish species at fishery sites in England. *Dis Aquat Organ* 57:43-50

66. **Wolf, K.,** 1988. *Fish viruses and fish viral diseases*. Cornell University Press, Ithaca, NY

67. **Zhiqin, Yue, Yong Teng, Chengzhu Liang, Xiayang Xie, Biao Xu, Laihua Zhu, Zhiwen Lei, Junqiang He, Zongxiao Liu, Yulin Jiang, Hong Liu, Qiwei Qin,** 2008. Development of a sensitive and quantitative assay for spring viremia of carp virus based on real-time RT-PCR, *Journal of Virological Methods*, Volume 152, Issues 1–2, September, Pages 43–48

68. **Zongxiao Liu, Yong Teng, Hong Liu, Yulin Jiang, Xiayang Xie, Huifang Li, Jiangqiang Lv, Longying Gao, Junqiang He, Xiujie Shi, Feiyan Tian, Jingshun Yang, Congxin Xie,** 2008. Simultaneous detection of three fish rhabdoviruses using multiplex real-time quantitative RT-PCR assay, *Journal of Virological Methods*, Volume 149, Issue 1, Pages 103–109