بررسی آلودگی به ویروس IHN در مزارع پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در دو استان تهران و چهارمحال و بختیاری با استفاده از تکنیک آنتی بادی درخشان به روش غیر مستقیم

روزبه فلاحی[1] مهدی سلطانی[2]* سیدجلیل ذریه زهرا[3] فرهید همت زاده[4]

دریافت مقاله: ۹ اسفندماه ۱۳۸۲
پذیرش نهایی: ۵ اردیبهشت ماه ۱۳۸۴

هدف: تشخیص آنتی ژنهای ویروس IHNV در نمونه‌های بافتی برخی از کارگاههای تکثیر و پرورش قزل آلای رنگین کمان ایران.

طرح: نمونه برداری به صورت تصادفی از موارد مشکوک به بیماری.

حیوانات: بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان پرورشی.

روش: تهیه گسترش از تعداد ۹۹ نمونه بافت‌های خون ساز (کلیه و طحال) و کبد بچه ماهیان زیر ۳گرم از کارگاههای تکثیر و پرورش واقع در استانهای تهران و چهارمحال و بختیاری و ثابت نمودن گسترش‌ها توسط استون سرد و سپس انجام آزمایش آنتی بادی درخشان به روش غیر مستقیم و مطالعه گسترش‌ها در زیر میکروسکوپ فلورسانت با بزرگنمایی ۲۰۰ X، ۴۰۰ X و ۱۰۰۰X.

نتایج: از مجموع ۹۹ نمونه مورد مطالعه، تعداد ۱۱ نمونه مثبت تشخیص داده شد که متعلق به کارگاههای استان چهارمحال و بختیاری بودند.

نتیجه‌گیری: با عنایت به تشخیص آنتی ژنهای ویروس IHNV در برخی نمونه‌های مورد مطالعه و با توجه به خسارات اقتصادی قابل توجه این بیماری انجام بررسیهای غربالگری و نیز انجام مطالعات دقیقتر مانند جداسازی و مطالعه پاتوژنیسیته ویروس جداشده امری بدیهی می‌باشد. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۵، دوره ۶۱، شماره ۱، ۲۲-۱۹.

واژه‌های کلیدی: نکروز عفونی بافت‌های خون ساز، آنتی بادی درخشان، قزل آلای رنگین کمان.

Serological Diagnosis of Infectious Haematopoietic Necrosis Disease (IHN) in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) using Indirect Fluorescent Antibody Test

Fallahi, R.[1], Soltani, M.[2], Zorriehzahra, M.E.J.[3], Hemmatzadeh, F.[4]

[1]Unit of Aquatic Animal Health and Diseases, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj- Iran. [2]Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran. [3]Department of Aquatic Animal Health and Diseases, Iranian Fisheries Research Institute, Tehran- Iran. [4]Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran.

Objective: Serological diagnosis of infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) in tissues of kidney, spleen and liver of rainbow trout(*O.mykiss*) fry.

Design: Cross- sectional study.

Animals: Ninty nine samples consisting of smears from kidney, spleen and liver were obtained from rainbow trout.

Procedure: Kidney, spleen and liver from rainbow trout (*O.mykiss*) fry less than 3 g body weight obtained from some farmed rainbow trout of Tehran and Char mahal - va- Bakhtiari provinces. Indirect immunofluorescent antibody test (IFAT) was undertaken using both polyclonal and monoclonal antibodies to IHNV to identify the IHNV antigens in the tissue samples.

Results: Only eleven samples from the region of Char mahal - va - Bakhtiari were positive for IHNV using both monoclonal and polyclonal antibodies to IHNV.

Conclusion: Because of economic losses due to disease caused by IHNV in farmed rainbow trout , it is necessary to do a comprehensive screening test, virus isolation and evaluation of the pathogenicity of recovered virus. ***J.Fac.Vet.Med. Univ. Tehran. 61,1:19-22,2006.***

Keywords: IHNV, IFAT, rainbow trout.

Corresponding author's email:msoltani@ut.ac.ir

عامل بیماری نکروز عفونی بافتهای خون ساز (IHN)، نوعی رابدو ویروس است که خسارات قابل توجهی در ماهیان آزاد اقیانوس آرام (همه گونه‌های *Oncorhynchus*)، ماهی آزاد اطلس (*Salmo salar*) و قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) ایجاد می‌کند (۱۸، ۱۷، ۱۴، ۱۲). بیماری که اولین بار در سال ۱۹۳۵ در ماهی آزاد قرمز (*O. nerka*) و از سواحل غربی آمریکای شمالی گزارش گردید امروزه به تعدادی از کشورهای اروپایی و آسیایی سرایت و موجب تلفات قابل توجه در مزارع آزاد ماهیان می‌شود (۱۸، ۱۷، ۱۴، ۲).

در سال ۱۹۶۷، IHN در ماهیان آزاد قرمز در بریتیش کلمبیا و نیز برای اولین بار در قزل آلای رنگین کمان گزارش شد. چند سال بعد ویروس عامل IHN در آلاسکا باعث همه گیری در ماهیان آزاد قرمز شد. در سال ۱۹۶۸ ویروس در ژاپن از طریق تخمهای وارد شده از آلاسکا جدا گردید. در سال ۱۹۸۵ ویروس عامل IHN به شمال شرقی چین از طریق واردات تخم‌های آلوده از ژاپن وارد گردید. واردات تخم‌های آلوده قزل آلای رنگین کمان به ایتالیا باعث شد که اولین تشخیص بیماری در سال ۱۹۸۷ در ایتالیا داده شود (۱۸، ۱۷).

۱) مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی حصارک، کرج - ایران.
۲) گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۳) مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران - ایران.
۴) گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
*) نویسنده مسؤول: msoltani@ut.ac.ir

در کشورهای تایوان، کره، فرانسه، بلژیک و اسلونی گزارشاتی مبنی بر جداسازی ویروس IHN طی سالهای ۱۹۸۵ تا ۲۰۰۲ ارائه گردیده است. عامل بیماری IHN به هر دو روش افقی و عمودی منتقل می‌گردد. بنابراین محدوده جغرافیایی این بیماری گسترده می‌باشد. مهاجرت ماهیان و انتقال تخم و ماهیان آلوده باعث گسترش بیماری می‌گردد. برای جلوگیری از انتقال بیماری تدابیر خاصی در کشورهای مختلف صورت می‌گیرد که از آن جمله صدور گواهی سلامت ماهیان برای صادرات و واردات، الزامی می‌باشد.

علاوه بر همه گیری بیماری، گاهی موارد شیوع انفرادی نیز در برخی مناطق از جمله ژاپن دیده می‌شود. اگرچه توجه به جنبه‌های اپیدمیولوژی بیماری از جمله سن ابتلاء، درجه حرارت آب، میزان تلفات و بعضاً علائم بالینی مانند تیرگی پوست و اگزوفتالمی می‌تواند ما را در راه تشخیص بیماری یاری نماید اما تشخیص صحیح بیماری مستلزم کشت و جداسازی ویروس و یا بکارگیری روشهای سرولوژی و مولکولی حساس می‌باشد. از جمله روشهای سرولوژی توصیه شده توسط O.I.E (2000) استفاده از تکنیک آنتی بادی درخشان به روش غیر مستقیم است. بررسی وضعیت این بیماری در مزارع قزل‌آلای ایران نشان می‌دهد که برخی مولدین به نوعی ویروس مشابه عامل IHN آلوده هستند(۸). بعلاوه بررسی سرولوژی به روش الایزا نیز مؤید مثبت بودن تیتر سرمی برخی مولدین قزل آلاست(۸). همچنین قبل از این در مطالعه‌ای توسط اخلاقی در سال ۱۳۷۹ و با استفاده از روش الایزا به وجود آنتی ژن ویروسی IHN در برخی مزارع قزل آلا در دو استان کهگیلویه و بویراحمد و فارس پی برده شد. لذا با توجه به موارد جداسازی ویروس و تشخیص‌های سرولوژی (تیتر آنتی بادی بالا و تعیین آنتی ژن‌ها در بافت‌ها)، مطالعه مذکور به منظور بررسی میزان آلودگی برخی مزارع با تلفات بالا و مشکوک به بیماری IHN انجام گرفته است.

مواد و روش کار

نمونه برداری و آماده سازی نمونه‌ها: در فاصله زمانی مهرماه ۱۳۷۹ لغایت دی ۱۳۸۱ از تعداد ۹۹ نمونه شامل کلیه (۴۰نمونه)، طحال (۳۵نمونه) و کبد (۲۴نمونه) بچه ماهیان زیر ۳ گرم که از ۶ کارگاه در استان تهران (۳۲ نمونه) و ۴ کارگاه در استان چهارمحال و بختیاری (۶۷نمونه)، از هر نمونه دو گسترش بر روی لام شیشه‌ای تهیه گردید. گسترشها به روش اثرانگشتی (imprinting) تهیه و بعد از خشک شدن در معرض هوا بوسیله استون سرد ثابت شده و بعد از ثبت کامل مشخصات و بسته بندی در ورقه‌های آلومینیمی در شرایط ۴ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه منتقل و تا زمان انجام آزمایش IFAT در فریزر ۲۰ - درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

آزمایش آنتی بادی درخشان به روش غیر مستقیم (IFAT): انجام این آزمایش با استفاده از آنتی بادیهای پلی کلونال و مونوکلونال ضد IHNV و براساس روش بیان شده توسط O.I.E (۲۰۰۰) صورت گرفت. ابتدا مقدار ۲۰۰µL از بافر بلوکه کننده (با اضافه نمودن آلبومین سرم گاوی به میزان ۱درصد به محلول PBS-Tween آماده می‌گردید) به هر گسترش اضافه نموده، گسترشها را در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده و سپس برای چهار مرتبه آنها را با محلول PBS-Tween (با اضافه نمودن Tween 80 به PBS به میزان ۰/۰۵ درصد تهیه می‌گردید.) شستشو داده، سپس مقدار ۱۰۰µL از آنتی بادی پلوکلونال ضد IHNV تهیه شده در خرگوش و یا آنتی بادی مونوکلونال ضد (Arhus, Denmark) IHNV رقیق شده (به نسبت ۱/۲۰ با PBS-Tween) اضافه گردید. آنگاه گسترشها را به مدت ۶۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری و بعد از چهارمرتبه شستشو با محلول PBS-Tween، مقدار ۱۰۰µL کونژوگه رقیق شده (به نسبت ۱/۲۰ با محلول PBS) حاوی آنتی ایمونوگلوبولین ضد خرگوش (IgG خوکی) و یا آنتی ایمونوگلوبولین ضد موش (IgG خرگوشی) (FITC , Dako, Denmark) به آنها اضافه گردید. بعد از ۶۰ دقیقه انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد و چهار مرتبه شستشو با PBS-Tween و آبگیری از گسترشها با عمل مونته کردن با استفاده از بافر گلیسرول آلکالین دار (۰/۷۲۹g $NaHCO_3$، ۰/۰۱۶gNa_2CO_3، آب مقطر استریل ۱۰ml گلیسرول ۹۰ml، pH=۹) انجام شد. مطالعه گسترش‌ها پس از قرار دادن لامل بر روی آنها با میکروسکوپ فلورسانت (Olympus B×50) و بزرگنمایی ۲۰۰ ×، × و یا ۱۰۰۰ × انجام شد. نتایج حاصله براساس توصیه LaPatra (1989) قرائت و ضمناً نمونه‌های کنترل منفی (بافت‌های ماهیان سالم) و مثبت گسترشهای آماده ارسالی از مؤسسه تحقیقات شیلاتی روسیه، ARRIFF) به روش بیان شده در مورد آزمایش IFAT در نظر گرفته شد.

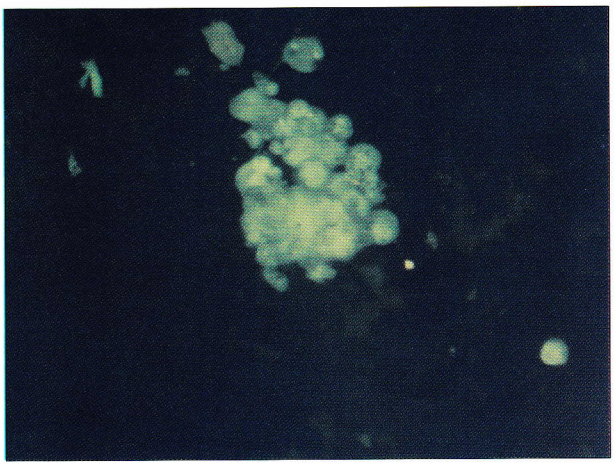
نتایج

نتایج مشاهدات بالینی: از نظر علائم بالینی بچه ماهیان بیمار یا در حال مرگ که اکثراً در کنار حوضچه‌ها بدون حرکت مشاهده می‌شدند دارای علائمی از قبیل بی حالی، تیرگی رنگ بدن، تورم شکم، اگزوفتالمی و لاغری بودند. تلفات در برخی کارگاههای مورد نمونه برداری، قابل توجه و عمده تلفات نیز در نوزادان زیر گرم بود.

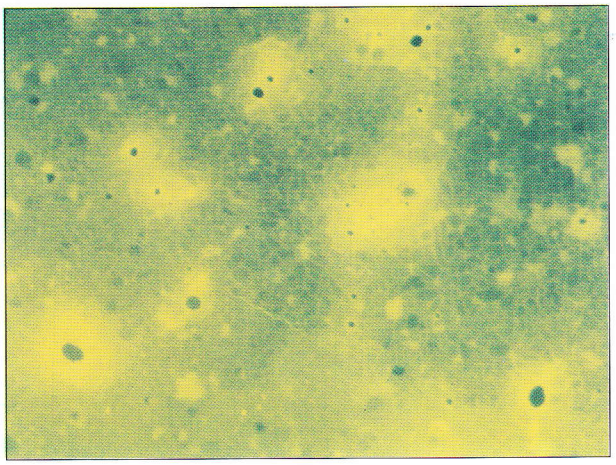
نتایج سرولوژی(IFAT): از مجموع ۹۹ نمونه گسترشهای اثرانگشتی از کلیه، طحال و کبد بچه ماهیان زیر ۳ گرم که از هر کدام دوگسترش برای جستجوی آنتی ژن ویروسی IHN با استفاده از آنتی بادیهای پلی کلونال و مونوکلونال تهیه و بعد از طی مراحل آماده سازی، زیر میکروسکوپ فلورسانت مورد بررسی قرار گرفتند ۱۱ مورد مثبت در گسترشهای تهیه شده از کلیه (۸ مورد) و طحال (۳ مورد) بچه ماهیان ۲ کارگاه در استان چهارمحال و بختیاری مشاهده گردید. تمام موارد مثبت با هر دو نوع آنتی بادی پلی کلونال و مونوکلونال واکنش داده بودند (تصاویر ۱و۲). در سایر موارد نتایج حاصله منفی بود.

بحث

استفاده از روش ایمنوفلورسانس در تحقیقات ویروس شناسی ماهیان از سال ۱۹۷۲ متداول گشته و بطور گسترده‌ای جهت تشخیص و شناسایی



تصویر۱- واکنش مثبت در IFAT(نمونه: کلیه بچه ماهیان زیر ۳گرم ازکارگاه ۱ در استان چهارمحال وبختیاری، آنتی بادی مورد استفاده: مونوکلونال بر علیه IHNV، بزرگنمایی: ۴۰۰×).



تصویر۲- واکنش منفی در IFAT (نمونه: کنترل، آنتی بادی مورد استفاده: پلی کلونال بر علیه IHNV، بزرگنمایی: ۲۰۰×).

ویروس IHN و سایر عوامل ویروسی استفاده می‌شود. از آنجایی‌که تاکنون روش پیشگیری (واکسن تجاری کاملاً مؤثر) و کنترلی (روشهای درمانی) برای بیماری IHN وجود ندارد، تشخیص سریع همه گیریهای IHNجهت کنترل و ریشه کنی از اهمیت بالایی برخوردار است (۱۸، ۱۷، ۱۳، ۹، ۷، ۵).

در میان روشهای تشخیصی برای IHN، استفاده از کشت سلول و مشاهده ضایعات سلولی به حداقل ۷۲-۴۸ ساعت پس از تلقیح نمونه نیاز دارد. البته تشخیص قطعی با انجام مطالعات میکروسکوپ الکترونی همراه با انجام یکی از آزمایشهای سرمی با استفاده از آنتی بادیهای اختصاصی الزامی می‌باشد.

در میان روشهای سرمی، آزمایش خنثی سازی سرم (Serum Neutralization Test) به ۱۰-۷ روز زمان احتیاج دارد در حالی‌که با انجام آزمایش آنتی بادی درخشان می توان در مدت زمان بسیار کوتاهی نسبت به تشخیص بیماری اقدام نمود. در روش غیر مستقیم آن، از آنتی بادی اولیه غیر نشاندار استفاده می‌گردد که با استفاده از فلورسین ایزوتیوسیانات (FITC) کونژوگه شده با یک آنتی بادی ثانویه تشخیص صورت می‌گیرد (۱۸، ۱۷، ۹).

Leong و همکاران در سال ۱۹۸۳ اولین گزارش مبنی بر تشخیص ویروس IHN را با آزمایش آنتی بادی درخشان به روش غیر مستقیم ارائه و بیان می‌دارند که این روش سریع، اختصاصی و حساس می‌باشد (۱۸، ۱۴).

LaPatra و همکاران در سال ۱۹۸۹ با استفاده از این روش نشان دادند که تمام سویه‌های ویروس عامل IHN که از نقطه نظر الکتروفورزی با یکدیگر اختلافاتی داشتند با استفاده از این روش و بکارگیری هر دو نوع آنتی بادی پلی‌کلونال و مونوکلونال قابل تشخیص است. سویه‌های ویروسی مورد مطالعه آنها از مراحل مختلف سنی آزاد ماهیان مناطق مختلف جغرافیایی دنیا بدست آمده بود. بنابراین با استفاده از این روش می توان نسبت به شناسایی آنتی ژنهای ویروس عامل IHN در گسترشهای بدست آمده از بافت ها، کشت سلولی، ترشحات تناسلی و گسترشهای خونی در نوزادان و حاملین به ظاهر سالم اقدام نمود(۹). از نقطه نظر میزان حساسیت نیز این روش با روش سنجش پلاک برابر اما به زمان کمتری نیاز دارد و به همین دلیل امروزه بعنوان یکی از روشهای تشخیصی حساس، سریع و نسبتاً ارزان توصیه شده توسط O.I.E می باشد (۹،۱۱). به هر حال با توجه به وارداتی بودن برخی مواد مورد نیاز انجام آن فعلا گران می باشد.

در این مطالعه که با هدف ردیابی آنتی ژنهای ویروسی IHNV در برخی کارگاههای قزل آلای رنگین کمال مشکوک به بیماری بویژه در مراحل نوزادی و با تلفات قابل توجه صورت گرفته است، با بکارگیری این روش نشان داده شد که برخی کارگاههای پرورش قزل آلای کشور به ویروس عامل IHN آلوده هستند به طوری که از مجموع ۹۹ نمونه گسترشهای اثر انگشتی از کلیه، طحال و کبد بچه ماهیان زیر ۳ گرم که از هر کدام دوگسترش برای جستجوی آنتی ژن ویروسی IHN با استفاده از آنتی بادیهای پلی کلونال و مونوکلونال تهیه و مورد بررسی قرار گرفتند ۱۱ مورد مثبت در گسترشهای تهیه شده از کلیه (۸ مورد) و طحال (۳ مورد) بچه ماهیان ۲ کارگاه در استان چهارمحال و بختیاری مشاهده گردید. لذا استفاده از این روش بویژه با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال و مشاهده موارد مثبت، ضرورت توجه جدی به بررسیها و مطالعات بیشتر برای اتخاذ تدابیر پیشگیری را دو چندان می نماید. لذا با عنایت به نتایج مطالعات قبلی مبنی بر جداسازی نوعی رابدو ویروس شبه IHNV (فلاحی و همکاران در سال ۲۰۰۳) و نیز شناسایی آنتی ژنهای ویروس IHNV در این مطالعه و همچنین مطالعه انجام شده توسط اخلاقی در سال ۱۳۷۹ انجام بررسیهای غربالگری مراکز تکثیر کشور جهت بررسی عوامل ویروسی ضروری است. زیرا از دیدگاه اپیدمیولوژی، بیماری فوق به هر دو روش افقی و عمودی قابل انتقال بوده و لذا مولدین حامل می توانند خطر بالقوه و تهدید کننده‌ای باشند. از طرف دیگر در حال حاضر حمل و نقل تخم‌های چشم زده، لاروها و نوزادان این ماهی در بین مزارع کشور امری رایج و متداول است و می تواند موجب گسترش بیماری به سایر مزارع غیر آلوده شود. در خاتمه قابل ذکر است که بررسی علت و یا علل تلفات نوزادان قزل آلا (سندرم تلفات لاروهای قزل آلا) در مزارع ایران همانند سایر مناطق درگیر در

دنیا نیازمند مطالعات همه جانبه با علل عفونی مانند عوامل باکتریایی و ویروسی و غیرعفونی مانند عوامل محیطی، تغذیه‌ای و ژنتیکی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تهران مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی و مؤسسه تحقیقات شیلات ایران انجام گرفته است که بدین وسیله از مسئولین محترم تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

۱.اخلاقی، م. (۱۳۷۹): مطالعه ایمنولوژیکی بیماریهای ویروسی مشکوک به نکروز عفونی بافت‌های خون ساز و لوزالمعده‌ای قزل آلا. مجله تحقیقات دامپزشکی ایران، دانشگاه شیراز، دوره۱، شماره ۲، صفحه: ۹۵-۸۵.

۲. سلطانی، م. (۱۳۸۰): بیماریهای آزاد ماهیان، انتشارات دانشگاه تهران.

۳. سلطانی، م.، رستمی، م. (۱۳۷۶): عفونت ناشی از ارگانیسم‌های شبیه سایتوفاگا/فلکسی باکتر در مزارع پرورش قزل آلای رنگین کمان، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۲، شماره ۳، صفحه: ۲۳-۱۳.

۴. سلطانی، م.، رستمی، م.، ابراهیم زاده موسوی، ح.، میرزرگر، س. س.، فلاحی، ر. (۱۳۸۰): مطالعه سندرم تلفات بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان در استانهای تهران و لرستان. پژوهش و سازندگی، شماره ۵۳، صفحه: ۵-۲.

5. Arnzen, J.M., Ristow S. S., Hesson, C.P. and Lientz, J. (1991): Rapid fluorescent antibody tests for infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) utilizing monoclonal antibodies to the nucleoprotein and glycoprotein. J Aqua. Anim. Health. 3: 109-113.

6. Chou, H. Y., Fukuda, H. and Sano, T. (1993): Application of a monoclonal antibody against viral nucleoprotein to an aetiological study of infectious heamatopoietic necrosis. Fish Dis. 16:149-153.

7. Danton, M., Ristow, S.S., Hattenberger-Baudouy, A.M. and De-Kinkelin, P. (1994): Typing of French isolates of infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) with monoclonal antibodies using indirect immunofluoressence. Dis. Aqua. Org. 18: 223-226.

8. Fallahi, R., Soltani, M., Kargar, R. , Zorriehzahra, M.E.J., Shchelkunov, I. , Hemmatzadeh, F. and Nouri, A. (2003): Isolation and identification of the infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) - like agent from farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. Archives of Razi Institute. 56 : 37-45.

9. Lapatra, S.E., Roberti, K.A., Rohovec, J.S. and Fryer, J.L. (1989): Fluorescent antibody tests for the rapid diagnosis of infectious hematopoietic necrosis, J. of Aqua. Anim. Health. 1: 29-36.

10. Noga, E.J. (2000): Fish disease-diagnosis and treatment. Iowa State University Press.

11. O.I.E (2000): Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases.

12. Plumb, T.A. (1999): Trout and Salmon Viruses. In: Health Maintenance and Principal Microbial Diseases of Cultured Fishes. Iowa State Uriversity Press, PP: 103-110.

13- Ristow, S.S. and Arnzen, J.M. (1991): Monoclonal antibodies to the glycoprotein and nucleoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) reveal differences among isolates of the virus by fluorescence, neutralization and electrophoresis. Dis. Aqua. Org. 11: 105-115.

14. Roberts, R.J. (2001): Fish Pathology. Third edition. W.B. Saunders.

15. Soltani, M., Tarahomi, M. (2002): Pathogenicity of *Yersinia* ruckeri-like isolates recovered from farmed rainbow trout in Tehran province. In: second convention of lranian veterinary clinicians, Book of Abstracts, P. 37.

16. Winton, J.R., Arakawa, C.K., Lannan, C.N. and fryer, J.L. (1988): Neutralizing monoclonal antibodies recognize antigenic variants among isolates of infectious hematopoietic necrosis virus. Dis. Aqua. Org. 4: 199-204.

17. Wolf, K. (1988): Fish Viruses and Fish Viral Diseases. Cornell University Press.

18. Woo, P.T.K., Bruno D.W. (1999): Fish Diseases and Disorders Vol3. Viral, Barterial and Fungal Infections, CABI Publishing.