

М.С. Алексюк\*, П.Г. Алексюк, А.П. Богоявленский, К.С. Аканова\*,  
Е.С. Молдаханов, А.Н. Манақбаева, А.Б. Толужанова, В.Э. Березин

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», Казахстан, г. Алматы

\*e-mail: madina.a06@gmail.com

## ИЗУЧЕНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ ВИРУСОВ РЫБ В АКВАТОРИИ ЦЕНТРАЛЬНОГО КАСПИЙСКОГО МОРЯ МЕТОДОМ МЕТАГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Развитие индустрии аквакультуры подобно любому производственному циклу сопровождается опасностью возникновения инфекционных заболеваний за счет увеличения особей на единице площади. Проблема усугубляется тем, что в аквакультуре как правило используется вода водоема, примыкающего к производственным резервуарам. Это стало причиной того, что вирус, не обладающий эпидемическим потенциалом в экосистеме в силу достаточного редкого соприкосновения особей одного вида, приобретает выраженные патогенные свойства. При этом некоторые новые вирусные патогены невозможно культивировать и получить к ним специфические антитела, что не даёт возможности их идентифицировать при использовании традиционных методов клеточных культур или иммуноанализа. Метагеномные исследования являются относительно новым многогранным инструментом, позволяющим изучать и идентифицировать единичные вирусные инфекции или коинфекции различных водных организмов, проводить эволюционно-филогенетический анализ вирусов, определять их геномное разнообразие и осуществлять эпидемиологический мониторинг вирусных инфекций.

В представленной статье показаны краткие результаты работ по определению разнообразия вирусов рыб в акватории Центрального Каспия, полученных в ходе метагеномных исследований при помощи NGS. Было показано наличие ряда РНК и ДНК содержащих вирусов, представляющих потенциальную опасность при развитии аквакультуры региона.

**Ключевые слова:** Каспийское море, метагеномика, виром, вирусы рыб, разнообразие.

M.S. Alexyuk\*, P.G. Alexyuk, A.P. Bogoyavlenskiy, K.S. Akanova\*, Y.S. Moldakhanov,  
A.N. Manakbayeva, A.B. Toleuzhanova, V.Y. Berezin

«Research and Production Center for Microbiology and Virology» LLP, Kazakhstan, Almaty

\*e-mail: madina.a06@gmail.com

### Study of the diversity of fish viruses in the water area of the Central Caspian Sea by the method of metagenomic sequencing

The development of the aquaculture industry, like any industrial cycle, is accompanied by the danger of infectious diseases due to an increase in species per unit area. The problem is intensified by the fact that aquaculture usually uses water from a body of water adjacent to the production reservoirs. This caused the virus, which has no epidemic potential in the ecosystem due to the sufficiently rare contact of individuals of the same species, to acquire marked pathogenic properties. At the same time, some new viral pathogens cannot be cultured and specific antibodies to them cannot be obtained, which makes it impossible to identify them using traditional methods of cell culture or immunoassay. Metagenomic studies are a relatively new multifaceted tool for studying and identifying single viral infections or co-infections of different aquatic organisms, conducting evolutionary and phylogenetic analysis of viruses, determining their genomic diversity, and conducting epidemiological monitoring of viral infections. The presented article shows brief results of the work on determining the diversity of fish viruses in the Central Caspian water area obtained during metagenomic studies using NGS. The presence of a number of RNA- and DNA-containing viruses of potential danger in the development of aquaculture in the region was shown.

**Key words:** Caspian Sea, metagenomics, virome, fish viruses, diversity.

М.С. Алексюк\*, П.Г. Алексюк, А.П. Богоявленский, К.С. Аканова\*, Е.С. Молдаханов,  
А.Н. Манакбаева, А.Б. Толеужанова, В.Э. Березин

«Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы» ЖШС, Қазақстан, Алматы қ.

\*e-mail: madina.a06@gmail.com

### Метагеномдық тізбектеу әдісімен Орталық Каспий теңізінің су аймағындағы балық вирустарының әртүрлілігін зерттеу

Аквамәдениет өнеркәсібінің дамуы су ағзаларына әсер ететін жаңа вирустық инфекциялар санының артуына әкелді. Сонымен қатар, кейбір жаңа вирустық қоздырушыларды өсіру мүмкін емес және оларға арнайы антиденелер алынбайды, бұл оларды дәстүрлі торша өсіргісі немесе иммунологиялық талдаулар арқылы анықтау мүмкін емес. Вирустық метагеномика мұндай кедергілерді еңсеруге және үлгілерде бұрын сипатталмаған вирустардың болуын олардың геномдық реттілігі, оларға арнайы антиденелердің болуы және оларды өсіру қажеттілігі туралы алдын ала деректерсіз анықтауға мүмкіндік береді.

Бүкіл вирустық геномды ертерек зерттеу вирустық геномның әртүрлі сегменттеріне бағытталған бірнеше праймерлерді пайдалануды талап ететін айтарлықтай уақытты қажет ететін тапсырма болды. Жаңа үлгідегі өнімділігі жоғары тізбектеу (NGS) әдістерін енгізу және геномдық библиотекаларды құру метагеномикалық зерттеулерде толық вирустық геномдарды реконструкциялау міндетін айтарлықтай жеңілдетті.

Метагеномикалық зерттеулер – әр түрлі су организмдерінің жеке вирустық инфекцияларын немесе коинфекцияларын зерттеуге және анықтауға, вирустардың эволюциялық және филогенетикалық талдауын жүргізуге, олардың геномдық әртүрлілігін анықтауға, вирустық инфекциялардың эпидемиологиялық мониторинг жүргізуге мүмкіндік беретін көп қырлы құрал.

Ұсынылған мақалада NGS көмегімен метагеномикалық зерттеулер барысында алынған Орталық Каспийдегі балық вирустарының әр алуандығын анықтау жұмыстарының қысқаша нәтижелері көрсетілген. Аймақтың аквамәдениетінің дамуына ықтимал қауіп төндіретін бірқатар РНК және ДНК вирустарының болуы көрсетілген.

**Түйін сөздер:** Каспий теңізі, метагеномика, виром, балық вирустары, әртүрлілік.

## Введение

Предположительно рыбоводство зародилось около 3000 лет назад, в древнем Китае, где были обнаружены источники, в которых впервые упоминается использование рыбных аквакультур – карповых. В дальнейшем первые зачатки рыбоводства распространяется по всем основным водным бассейнам где массово обитали люди и активно занимались промыслом морских и речных животных. Одним из таких бассейнов, расположенном в самом центре евразийского континента является Каспийское море с впадающими в него реками.

Каспийское море представляет собой гигантский внутриконтинентальный водоем, расположенный между Европой и Азией, с объемом 78 000 км<sup>3</sup> и площадью поверхности 371 000 км<sup>2</sup> является самым крупным внутренним, бессточным водоёмом на Земле. Подобно Аральскому и Черному морям, когда-то оно было частью мирового океана в составе океанов Тетис и Паратетис, но последние пять миллионов лет представляет собой изолированный водоём [1]. По уникальности биоразнообразия и с

позиции его сохранения, как объекта мирового наследия, Каспий относится к водоемам, имеющим важное международное значение. Богатые водные ресурсы, минеральное сырьё, полезные ископаемые, природные (нефтегазовые) запасы и биологические (рыбные) ресурсы определяют развитие всего Каспийского региона. Автохтонная ихтиофауна бассейна Каспийского моря (включая стоки входящих в него рек) включает 159 видов и подвидов из 60–62 родов (4–6 эндемичных) 19 семейств. Эндемичными для бассейна можно считать 99 видов и подвидов рыб, что составляет 62% от всего видового разнообразия ихтиофауны Каспийского моря. Самым многочисленным семейством является семейство *Cyprinidae* представленное 27-ю родами, затем идёт семейство *Gobiidae* – 12 родов; другие семейства значительно менее многочисленны и представлены 1–3 родами [2]. К промысловым ранее относили 60 видов рыб, обитающих в водах каспийского бассейна, однако в настоящее время количество промысловых видов снизилось до 32. Самыми ценными видами рыб каспийского бассейна являются осетровые, местная популяция которых составляла более 80% от всех осетровых на планете. Но из-за

постоянно увеличивающихся объёмов отлова промысловых пород рыб, а также из-за нарушений естественных условий обитания: строительство ГЭС на реках каспийского бассейна, добыча нефти на каспийском шельфе, происходит значительное сокращения количественного и видового разнообразия фауны каспийского региона. Для компенсации нанесённого ущерба и восстановления промысловых объёмов ценных пород рыб в странах каспийского региона идёт активное развитие рыбоводства [3]. Однако, искусственное разведение рыб происходит в условиях концентрации большого количества особей в ограниченном пространстве, что значительно увеличивает риск возникновения инфекционных заболеваний и появления массовых эпидемий, что в итоге может привести к большому экологическому и экономическому ущербу. Особую опасность представляют вирусные инфекции рыб так как они обладают крайне высокой степенью контагиозности и не поддаются лечению из-за отсутствия препаратов против них.

Первое документальное свидетельство о вирусной инфекции аквакультуры датируется 1563 годом, где были описаны симптомы весенней виремии карпа и карповая оспа. Согласно отчету Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (FAO) за 2018 год, в качестве аквакультуры по всему миру используется 598 видов рыб, моллюсков, ракообразных и других организмов. Таким образом, количество вирусов, потенциально способных инфицировать эти виды, огромно [4]. Вирусные заболевания могут привести к значительным потерям в аквакультуре и сокращению некоторых популяций диких животных [5]. Общий ущерб от вирусных инфекций в аквакультуре может снизить в производственном цикле выработку биомассы на 20% и создать критические экономические потери [6].

Для оценки реальных рисков и предотвращения распространения вирусных инфекций среди аквакультур необходим научно обоснованный подход и применение методов водной вирусологии, что делает это направление весьма актуальным. Изучение водных вирусов по-

зволяет охватить широкий круг тем связанных с вирусными инфекциями как одноклеточных (микроорганизмы: бактерии, археи, простейшие, водоросли и т. д.), так и многоклеточных организмов (животные, растения и др.). Однако до второй половины XX века, когда выращивание аквакультур стало значимой частью пищевого производства, вирусам рыб уделялось недостаточное внимание [7]. Большое количество вирусных патогенов рыб было выделено и описано после того как использование аквакультуры стало крупномасштабной отраслью, а состояние здоровья рыб стало экономически важным [8,9]. За последнее десятилетие произошло значительное увеличение числа новых и вновь появляющихся водных вирусов [10], которые широко распространены в реках, озерах, морях, водохранилищах и других водных экосистемах [11]. Эти вирусы считаются крупнейшими резервуарами неизученного генетического разнообразия и вносят огромный вклад в биологическую продуктивность Земли [12]. Были выделены и идентифицированы несколько репрезентативных видов, включая иридовирусы, герпесвирусы, рабдовирусы, реовирусы, нодавипуры, нимавирусы и ортомиксовирусы (например, вирус инфекционной анемии лосося, ISAV) и т. д. [13- 16]. Многие из этих вирусов могут инфицировать различных выращиваемых и диких водных животных, таких как, креветки, земноводные, рептилии, водные млекопитающие и рыбы т. д.

На основании всего выше сказанного, можно сделать вывод, что для предотвращения массовых вирусных инфекций аквакультур необходим непрерывный мониторинг, выделение и изучение вирусов рыб. В связи с чем целью наших исследований являлось изучение разнообразия вирусов рыб в метагеномном образце, собранном в акватории Центрального Каспия.

## Материалы и методы

**Сбор образцов.** Пробы воды были отобраны с поверхности Центрального Каспийского моря (Рисунок 1) объемом 10 литров в стерильные бутыли.

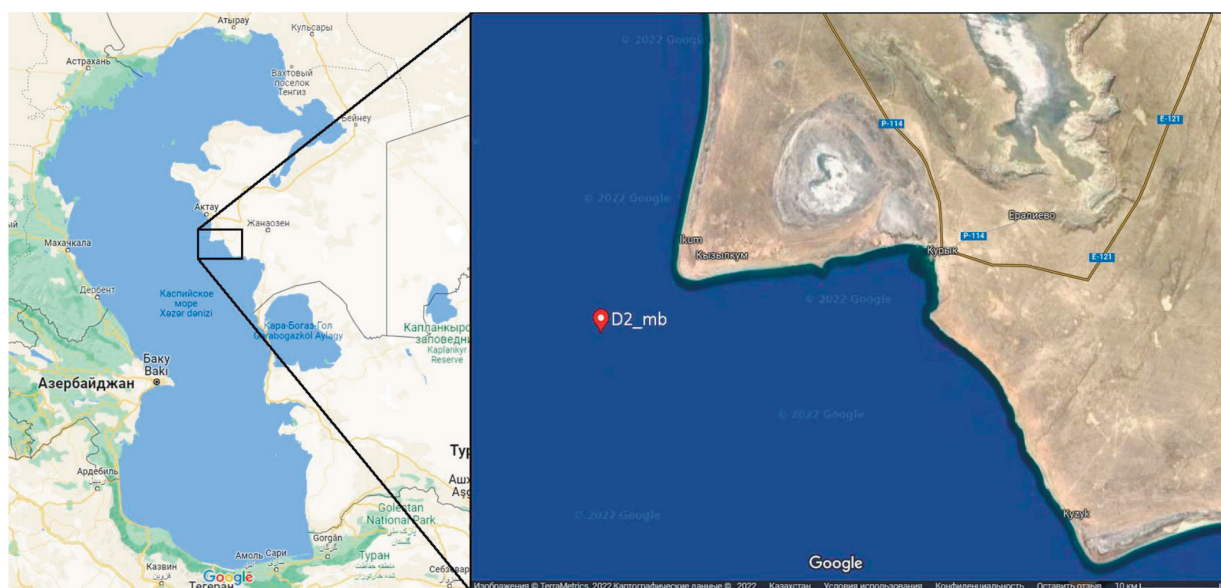


Рисунок 1 – Точка отбора проб воды на акватории Центрального Каспийского моря (D2\_mb 43°05.3N 51°08.8 E)

### Концентрирование водного образца

Образец морской воды последовательно фильтровали через фильтры с размером пор 3 мкм и 0,22 мкм для удаления зоопланктона, фитопланктона и бактерий, а затем концентрировали при помощи тангенциальной проточной фильтрации (TFF) с картриджем 50 кДа (Vivaflow 200, Sartorius, с 200 см<sup>2</sup> полиэфир-сульфоновой мембраны) до конечного объема 500 мл. Для осаждения вирусных частиц сконцентрированный образец центрифугировали на ультрацентрифуге Avanti J-30I компании Beckman Coulter при скорости 29 000 об/мин в течение 2 часов при 4°C. Полученный осадок ресуспендировали в минимальном объеме стерильного фосфатного буфера (pH 7,2) и использовали для выделения нуклеиновых кислот.

### Выделение нуклеиновых кислот

Тотальную нуклеиновую кислоту выделяли при помощи набора Pure Link Viral DNA/RNA kit (Invitrogen) согласно протоколу производителя.

Количественные измерения нуклеиновых кислот проводили с использованием набора Qubit HS (High Sensitivity, Invitrogen, США) согласно инструкции к флуориметру Qubit 3.0. Соотношение A260 – A280 измеряли с помощью мультиридера Tecan с использованием планшета NanoQuant для измерения микроколичеств нуклеиновых кислот (Invitrogen, США).

### Получение сиквенсных библиотек

Геномные библиотеки для секвенирования были получены с использованием набора для подготовки образцов Nextera XT (Illumina, США) в соответствии с инструкциями. В ходе подготовки библиотек проводили ферментативную фрагментацию, лигирование адаптеров, предварительную амплификацию библиотеки, отбор фракций нужной длины и клональную амплификацию выбранной библиотеки. Очистку геномных библиотек и отбор фракций необходимой длины проводили с помощью системы парамагнитных шариков Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter). Качество геномных библиотек определяли с помощью биоанализатора Agilent 2100 с набором DNA 7500 Kit.

Высокопроизводительное секвенирование выполняли при помощи секвенатора Illumina MiSeq с использованием набора MiSeq Kit v3 (2 x 300 п.н.).

### Анализ данных секвенирования

Контроль качества ридов был выполнен с помощью программы Fast QC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Затем полученные данные были обработаны в Trimmomatic v. 0.36, последовательности короче 50 нуклеотидов были исключены из анализа;

адаптеры были удалены. После удаления некачественных прочтений и обрезки адаптеров последовательности были проанализированы программой Kaiju с использованием базы данных не избыточных белков: бактерий, архей, вирусов, грибов и микробных эукариот (NCBI BLAST nr + euk) с параметрами по умолчанию [17].

## Результаты и обсуждение

Согласно Международному Комитету по таксономии вирусов (ICTV Virus Taxonomy Profile) вирусы, поражающие рыб, принадлежат 23 семействам, из которых с РНК геномом – 17 семейств и с ДНК-геномом – 8 семейств (Таблица 1).

**Таблица 1** – Актуальный список семейств вирусов, среди которых имеются представители, поражающие рыб

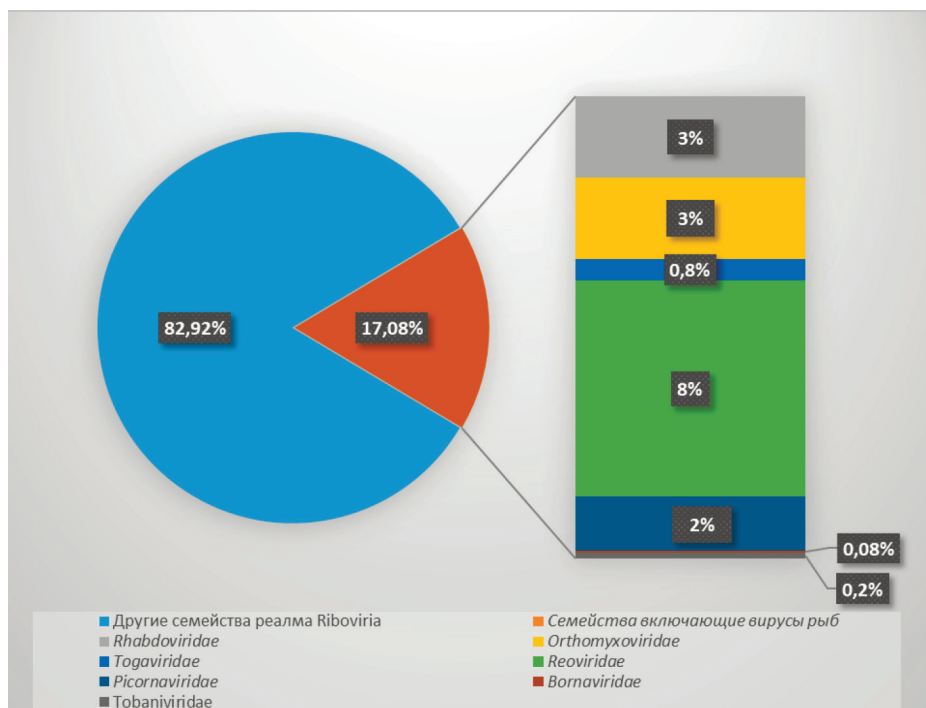
RNA viruses		Ссылка на источник
1	<i>Ortomyxoviridae</i>	<a href="https://ictv.global/report_9th/RNAneg/Ortomyxoviridae">https://ictv.global/report_9th/RNAneg/Ortomyxoviridae</a>
2	<i>Paramyxoviridae</i>	<a href="https://ictv.global/report/chapter/paramyxoviridae/paramyxoviridae/aquaparamyxovirus">https://ictv.global/report/chapter/paramyxoviridae/paramyxoviridae/aquaparamyxovirus</a>
3	<i>Rhabdoviridae</i>	<a href="https://ictv.global/report/chapter/rhabdoviridae/rhabdoviridae">https://ictv.global/report/chapter/rhabdoviridae/rhabdoviridae</a>
4	<i>Retroviridae</i>	<a href="https://ictv.global/report/chapter/retroviridae/retroviridae/epsilonretrovirus">https://ictv.global/report/chapter/retroviridae/retroviridae/epsilonretrovirus</a>
5	<i>Coronaviridae</i>	<a href="https://ictv.global/report_9th/RNApos/Nidovirales/Coronaviridae">https://ictv.global/report_9th/RNApos/Nidovirales/Coronaviridae</a>
6	<i>Caliciviridae</i>	<a href="https://ictv.global/report/chapter/caliciviridae/caliciviridae">https://ictv.global/report/chapter/caliciviridae/caliciviridae</a>
7	<i>Togaviridae</i>	<a href="https://ictv.global/report/chapter/togaviridae/togaviridae">https://ictv.global/report/chapter/togaviridae/togaviridae</a>
8	<i>Tobnaviridae</i>	
9	<i>Picornaviridae</i>	<a href="https://ictv.global/report/chapter/picornaviridae/picornaviridae">https://ictv.global/report/chapter/picornaviridae/picornaviridae</a>
10	<i>Nodaviridae</i>	<a href="https://ictv.global/report_9th/RNApos/Nodaviridae">https://ictv.global/report_9th/RNApos/Nodaviridae</a>
11	<i>Reoviridae</i>	<a href="https://ictv.global/report_9th/dsRNA/Reoviridae">https://ictv.global/report_9th/dsRNA/Reoviridae</a>
12	<i>Birnaviridae</i>	<a href="https://ictv.global/report/chapter/birnaviridae/birnaviridae">https://ictv.global/report/chapter/birnaviridae/birnaviridae</a>
13	<i>Filoviridae</i>	<a href="https://ictv.global/report/chapter/filoviridae/filoviridae">https://ictv.global/report/chapter/filoviridae/filoviridae</a>
14	<i>Bornaviridae</i>	<a href="https://ictv.global/report/chapter/bornaviridae/bornaviridae">https://ictv.global/report/chapter/bornaviridae/bornaviridae</a>
15	<i>Arenaviridae</i>	<a href="https://ictv.global/report/chapter/arenaviridae/arenaviridae">https://ictv.global/report/chapter/arenaviridae/arenaviridae</a>
16	<i>Hepeviridae</i>	<a href="https://ictv.global/report/chapter/hepeviridae/hepeviridae">https://ictv.global/report/chapter/hepeviridae/hepeviridae</a>
17	<i>Spinareoviridae</i>	<a href="https://ictv.global/report/chapter/spinareoviridae/spinareoviridae/aquareovirus">https://ictv.global/report/chapter/spinareoviridae/spinareoviridae/aquareovirus</a>
DNA viruses		
1	<i>Iridoviridae</i>	<a href="https://ictv.global/report/chapter/iridoviridae/iridoviridae">https://ictv.global/report/chapter/iridoviridae/iridoviridae</a>
2	<i>Herpesviridae</i>	<a href="https://ictv.global/report/chapter/herpesviridae/herpesviridae">https://ictv.global/report/chapter/herpesviridae/herpesviridae</a>
3	<i>Adenoviridae</i>	<a href="https://ictv.global/report/chapter/adenoviridae/adenoviridae">https://ictv.global/report/chapter/adenoviridae/adenoviridae</a>
4	<i>Polyomaviridae</i>	<a href="https://ictv.global/report/chapter/polyomaviridae/polyomaviridae">https://ictv.global/report/chapter/polyomaviridae/polyomaviridae</a>
5	<i>Hepadnaviridae</i>	<a href="https://ictv.global/report/chapter/hepadnaviridae/hepadnaviridae">https://ictv.global/report/chapter/hepadnaviridae/hepadnaviridae</a>
6	<i>Circoviridae</i>	<a href="https://ictv.global/report/chapter/circoviridae/circoviridae">https://ictv.global/report/chapter/circoviridae/circoviridae</a>
7	<i>Papillomaviridae</i>	<a href="https://ictv.global/report/chapter/papillomaviridae/papillomaviridae">https://ictv.global/report/chapter/papillomaviridae/papillomaviridae</a>
8	<i>Poxviridae</i>	<a href="https://ictv.global/search/google?keys=salmon%20gill%20poxvirus#gsc.tab=0&amp;gsc.q=salmon%20gill%20poxvirus">https://ictv.global/search/google?keys=salmon%20gill%20poxvirus#gsc.tab=0&amp;gsc.q=salmon%20gill%20poxvirus</a>

Разнообразие вирусов рыб было изучено методом метагеномного анализа после множественного параллельного секвенирования библиотек нуклеиновых кислот, полученных из водного образца, отобранного в акватории Центрального Каспийского моря.

После биоинформатического анализа данных секвенирования, в исследуемом образце, было выявлено наличие 7 семейств в реалме РНК-содержащих вирусов и 3 семейства в реалме ДНК-содержащих вирусов.

## Разнообразие РНК-содержащих вирусов рыб

В результате метагеномного анализа водного образца были идентифицированы последовательности вирусов рыб, относящихся к 7 семействам реалма *Riboviria*: *Ortomyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Togaviridae*, *Tobnaviridae*, *Picornaviridae*, *Reoviridae*, *Bornaviridae*, общая численность которых составили 17,08 % от всех обнаруженных РНК-содержащих вирусов (Рисунок 2, Таблица 2).



Процент указан от общего числа последовательностей, принадлежащих к реалму *Riboviria*

**Рисунок 2** – Обнаруженные РНК-содержащие семейства, среди которых имеются представители, поражающие рыб в образце Каспийского моря

**Таблица 2** – Разнообразие РНК-содержащих вирусов рыб в акватории Центрального Каспийского моря

Реалм	Семейство	Количество*	Представитель
<i>Riboviria</i>	<i>Reoviridae</i>	8%	Grass carp reovirus
			Pangasius aquareovirus
			Marbled eel reovirus
	<i>Rhabdoviridae</i>	3%	Infectious hematopoietic necrosis virus
			Viral hemorrhagic septicemia virus
	<i>Orthomyxoviridae</i>	3%	Salmon isavirus
	<i>Picornaviridae</i>	2%	Carp picornavirus 1
	<i>Togaviridae</i>	0,8%	Salmon pancreas disease virus
<i>Tobnaviridae</i>	0,2%	Salmon nidovirus 1	
<i>Bornaviridae</i>	0,08%	White bream virus	
			Sharpbelly cultervirus

\* – процент семейства указан от общего числа последовательностей, принадлежащих к реалму *Varidnaviria*

Среди обнаруженных последовательностей вирусов рыб, наибольшее количество относилось к семейству *Reoviridae*. Реовирусы, поражающие водных животных, относятся к роду

*Aquareovirus*, представители которого характеризуются отсутствием липидных оболочек у вирионов, но наличием двух белковых слоёв у капсида, а также 11 сегментами двухцепочеч-

ной РНК и семью структурными белками [18]. В исследуемом образце Каспийского моря были найдены последовательности вирусов рода *Aquareovirus*, относящихся к виду *Aquareovirus C* – *Grass carp reovirus*, а также к неклассифицированному до вида *Aquareovirus* – *Pangasius aquareovirus*, *Marbled eel reovirus*.

Большинство изолятов аквареовирусов непатогенны или обладают низкой вирулентностью в отношении вида-хозяина. Вирус белого амура (*Grass carp reovirus*; вид *Aquareovirus C*) является исключением и, по-видимому, представляет собой наиболее патогенный аквареовирус. *Grass carp reovirus* был выделен из белого амура в Китайской Народной Республике, данная инфекция вызывает тяжелую геморрагическую болезнь и поражает около 85% популяций сеголетков и годовиков. У пораженных рыб наблюдаются многочисленные кровоизлияния в мышцы, кожу, кишечник и жабры, смертность при этом может достигать 80%. Из-за высоких экономических потерь, связанных с реовирусными инфекциями белого амура, было разработано несколько вакцин для снижения воздействия болезни на выращиваемую рыбу, и в настоящее время в Китае используется живая аттенуированная вирусная вакцина [19].

Также в исследуемом образце были обнаружены вирусные последовательности семейства *Rhabdoviridae*, относящихся к вирусам инфекционного некроза гемопоэтической ткани (*Infectious hematopoietic necrosis virus* – *IHNV*) и геморрагической септицемии (*Viral hemorrhagic septicemia virus* – *VHSV*). Оба этих вируса принадлежат к наименее многочисленному подсемейству *Rhabdoviridae* – к *Gammarhabdovirinae*. В настоящее время подсемейство *Gammarhabdovirinae* включает только один род вирусов, поражающих костистых рыб – род *Novirhabdovirus*, который в свою очередь состоит из четырех видов: *Novirhabdovirus salmonid*, *Novirhabdovirus piscine*, *Novirhabdovirus hirame* и *Novirhabdovirus snakehead* [20].

Вид *Novirhabdovirus salmonid* является причиной развития инфекционного гемопоэтического некроза (*IHNV*). Впервые был выделен в 1982 г. от больной радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) в Айдахо, США [21]. *IHNV* вызывает экономически значимые заболевания у большого разнообразия видов лососевых рыб. Вирус энзоотичен в прибрежных районах и речных системах по всей западной части Северной Америки, но распространился в Азию и Европу в результате перемещения зараженного поголовья.

Вид *Novirhabdovirus piscine* вызывает геморрагическую септицемию (*VHSV*). Данный вирус был изолирован в 1962 г. также от больной радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) в Дании [22]. *VHSV* считается патогеном, имеющим большое экономическое и экологическое значение. Он был выделен или обнаружен у большого числа костистых рыб в Европе, Азии и Северной Америке [23]. *VHSV* делится на четыре основных генотипа (I-IV) и различные подтипы с естественным географическим распространением [24].

Среди вирусов рыб семейства *Ortomyxoviridae* были идентифицированы последовательности, относящиеся к вирусу инфекционной анемии лосося (*Infectious salmon anemia virus* – *Isavirus*). Известно, что данный вирус вызывает явную и фатальную системную инфекцию у выращиваемого на ферме лосося и бессимптомную инфекцию у диких рыб; ситуация аналогична вирусам птичьего гриппа у домашних и диких птиц [25]. Вирусная инфекция анемии лосося проявляется такими симптомами как экзофтальм, кишечное кровотечение и некроз канальцев и печени. Заражение и передача происходят в основном в морской воде, что позволяет предположить, что вирус заражает лососевых во время морской фазы жизненного цикла. Считается, что горизонтальная передача вируса между рыбами происходит в основном через мочу и фекалии [26]. На сегодняшний день вирус инфекционной анемии лосося является единственным полностью описанным ортомиксовирусом рыб.

*Picornoviridae* в исследуемом образце были представлены последовательностями *Carp ricornavirus 1* (*CPV-1*). На сегодняшний день вирус *CPV-1* был выделен от карпа, обыкновенного угря, синезаберного и толстоголового голяна, тем не менее, пути его передачи и патогенность неясны [27].

Среди *Togoviridae* рыб были обнаружены последовательности вируса болезни поджелудочной железы лосося (*Salmon pancreas disease virus* – *SPDV*). Данный вирус является оболочечным одноцепочечным вирусом с положительной смысловой РНК. Инфекции, вызванные данным вирусом, могут стать причиной больших экономических потерь при культивировании лососевых. Характерными признаками инфекции *SPDV* являются тяжелые гистопатологические изменения в сердце, поджелудочной железе и скелетных мышцах больных рыб [28].

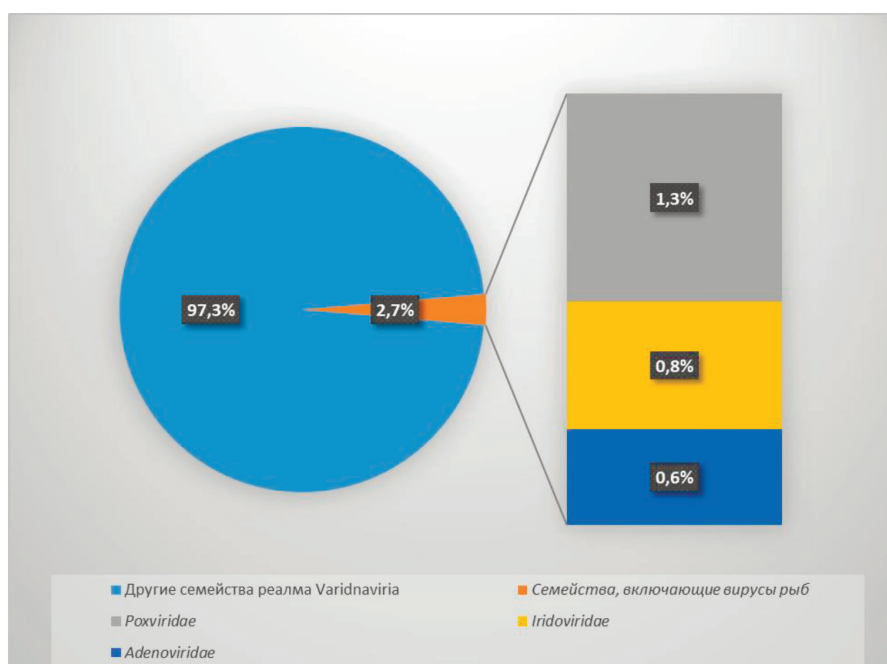
Семейство *Bornaviridae* было представлено последовательностями вируса, поражающего остробрюхого дикого карпа. На данный момент этот вирус является единственным представителем нового рода *Cultervirus*, который был недавно добавлен к семейству *Bornaviridae* [29-31].

Помимо вышеописанных вирусов, в исследуемом образце были идентифицированы последовательности вирусов, поражающие лососевых (*salmon nidovirus 1*) и карповых (*White bream virus*), и относящихся к семейству *Tobnaviridae*.

Эти два представителя сгруппированы в подсемейство вирусов рыб – *Piscanivirus* [32].

### Разнообразие ДНК-содержащих вирусов рыб

В ходе таксономического анализа данных, полученных после метагеномного секвенирования исследуемого образца были выявлены последовательности вирусов рыб, относящихся к трем семействам ДНК-содержащих вирусов реалма *Varidnaviria* (Рисунок 3, Таблица 3).



Процент указан от общего числа последовательностей, принадлежащих к реалму *Varidnaviria*

**Рисунок 3** – Обнаруженные ДНК-содержащие семейства, среди которых имеются представители, поражающие рыб в образце Каспийского моря.

**Таблица 3** – Разнообразие ДНК-содержащих вирусов рыб в акватории Центрального Каспийского моря

Реалм	Семейство	Количество*	Представитель
<i>Varidnaviria</i>	<i>Poxviridae</i>	1,3%	Salmon gillpox virus
	<i>Iridoviridae</i>	0,8 %	Erythrocytic necrosis virus
			Lymphocystis disease virus
<i>Adenoviridae</i>	0,6 %	Short-finned eel ranavirus	
		Infectious spleen and kidney necrosis virus	
			Scale drop disease virus
			White sturgeon adenovirus 1

\* – процент указан от общего числа последовательностей, принадлежащих к реалму *Varidnaviria*



Обнаруженные последовательности семейства *Poxviridae* составляли 1,3% от всех обнаруженных последовательностей вирусов рыб реалма *Varidnaviria* и относились к вирусу *Salmon gillpox virus*.

Инфекции, вызываемые представителями *Poxviridae*, обладают высокой смертностью и были выделены от разводимых на фермах лососа, кои, карпа и айю. Во всех случаях поксвирусы рыб поражают жабры и нарушают их функциональность. Единственным опубликованным и охарактеризованным геномом вируса оспы рыб является вирус оспы жабр лосося, который является филогенетически наиболее древним обнаруженным хордопоксвирусом [33].

Наибольшее разнообразие последовательностей идентифицированных ДНК вирусов рыб было выявлено в семействе *Iridoviridae*, одним из них является вирус лимфоцитарной болезни – *Lymphocystis disease virus* (LCDV). Это оболочечный ДНК-вирус, принадлежащий к роду *Lymphocystivirus* [34], возбудитель лимфоцитарной болезни, поражающей более 140 диких и культивируемых видов морских, солоноватоводных и пресноводных рыб во всем мире. Данная инфекция редко вызывает смерть, но может привести к вторичному заражению другими микроорганизмами, что является причиной многочисленной гибели рыб [35].

В исследуемом образце так же были обнаружены последовательности вируса эритроцитарного некроза (*Erythrocytic necrosis virus* – VEN), ещё одного представителя семейства *Iridoviridae* поражающего рыб. Данный вирус способен инфицировать более 20 видов морских и проходных рыб, таких как сельдь, горбуша, кета, лосось, чавыча и т.д. и вызывает заболевание, связанное с тяжелыми нарушениями крови у инфицированных рыб [36]. Инфекцию традиционно диагностируют при микроскопическом исследовании окрашенных мазков крови на наличие телец включения в цитоплазме инфицированных эритроцитов. Электронная микроскопия показывает, что инфицированные эритроциты содержат икосаэдрические вирионы, которые и получили название вируса некроза эритроцитов [37, 38].

К семейству *Iridoviridae* принадлежат вирусы рыб рода *Ranavirus* последовательности которых были обнаружены в водном образце из центрального Каспия [39, 40]. Они имеют широкий круг восприимчивых хозяев, поражают рыб, земноводных и рептилий, и являются причиной

увеличения эпидемий этих видов животных. Найдены последовательности относящиеся к вирусу *Short-finned eel ranavirus* вызывающему заболевания угря.

Так же, были выявлены последовательности вирусов инфекционного некроза селезенки и почек (*Infectious spleen and kidney necrosis virus* – ISKNV) и вирус чешуйчатой болезни (*Scale drop disease virus* – SDDV) являющиеся типовыми видами рода *Megalocyctivirus* семейства *Iridoviridae*. Мегалоцитивирусы поражают более 50 видов рыб и в настоящее время угрожают индустрии аквакультуры, вызывая большие экономические потери в Китае, Японии и Азии [41].

Помимо представителей семейства *Poxviridae* и *Iridoviridae* в исследуемом образце из центрального Каспия были обнаружены последовательности вирусов рыб, относящихся к семействам *Adenoviridae*, в частности было определено наличие последовательностей вирусу белого осетра (*White sturgeon adenovirus 1* – WSAdV-1). В большинстве случаев аденовирусы выделяют от людей и широкого круга видов животных, но заражение рыб аденовирусами редкое явление, описано всего несколько случаев. К ним относятся гиперплазия эпидермиса у атлантической трески и гиперплазия у японского красного морского леща. Единственным известным аденовирусным заболеванием рыб является болезнь белого осетра [42].

Основная проблема в борьбе с вирусными заболеваниями в аквакультуре – это длительный период времени, который проходит с момента первого обнаружения болезни до идентификации этиологического (инфекционного) агента. К примеру, вирусы, вызывающие инфекционный панкреонекроз лососевых [43] и синдром рыбьего миокардита [44] были идентифицированы и охарактеризованы спустя 20 лет после первого сообщения о клинических признаках, вызванных их инфекцией [45, 46]. Подобная задержка затрудняет разработку своевременных стратегий борьбы с вирусными инфекциями. Использование метагеномных подходов дает уникальную возможность одновременно определить наличие нескольких вирусов в одном образце и тем самым ускорить процесс идентификации новых вирусов, способных поражать различные водные организмы, прежде чем они вызовут вспышки заболеваний, достигающие масштабов эпидемии. Более того, метагеномика способствует расширению информации о существующем вирусном разнообразии и предполагаемых

вирусных патогенов рыб, в связи с чем может напрямую влиять на биобезопасность систем аквакультуры [47].

### Заключение

В результате проведенных метагеномных исследований были выявлены последовательности вирусов рыб, которые относились к 10 различным вирусным семействам. Таксономический анализ позволил идентифицировать как РНК-, так и ДНК содержащие вирусы. Большинство вирусных последовательностей было отнесено к реалму *Riboviria*, которые принадлежали семействам *Ortomyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Togaviridae*, *Tobaniviridae*, *Picornaviridae*, *Reoviridae*, *Bornaviridae*. Остальные последова-

тельности вирусов рыб были отнесены к семействам реалма *Varidnaviria*, включая *Poxviridae*, *Iridoviridae*, *Adenoviridae*.

### Источник финансирования

Работа выполнена в рамках проекта АР09058580 «Сравнительное изучение виroma Каспийского моря, как важная составляющая сохранения биоразнообразия и биобезопасности Казахстана»

### Конфликт интересов

Все авторы прочитали и ознакомлены с содержанием статьи и не имеют конфликта интересов.

### Литература

1. Krijgsman W., Tesakov A.S., Yanina T.A., et. Al Quaternary time scales for the Pontocaspian domain: interbasinal connectivity and faunal evolution // *Earth-Science Rev.* – 2019. – Vol. 188. – P. 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2018.10.013>.
2. Naseka A.M., Bogutskaya N.G. Fishes of the Caspian Sea: zoogeography and updated check-list // *Zoosystematica Rossica* – 2009. – Vol.18 (2). – P. 295–317 (<https://doi.org/10.31610/zsr/2009.18.2.295>)
3. Ходоревская Р.П. Значение естественного нереста и искусственного осетроводства в формировании запасов осетровых каспийского моря // *Астраханский вестник экологического образования.* – 2015. – №2. – С. 74 – 89.
4. FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018—Meeting the Sustainable Development Goals; Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO; Fisheries and Aquaculture Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy, 2018.
5. Campbell L.J., Hammond S.A., Price S.J. et.al A novel approach to wildlife transcriptomics provides evidence of disease-mediated differential expression and changes to the microbiome of amphibian populations // *Molecular Ecology.* – 2018. – Vol. 27. – P.1413–1427 (<https://doi.org/10.1111/mec.14528>)
6. Mishra S., Das R., Swain P. Status of Fish Diseases in Aquaculture and assessment of economic loss due to disease // *Contemporary Trends in Fisheries and Aquaculture / ed. by P. Nagaraja, B.N. Pandey, R.N. Pandey, B.D. Joshi.* – New Delhi: Today & Tomorrow's Printers and Publishers, 2019 – P. 183–198.
7. Wolf K. *Fish Viruses and Fish Viral Diseases.* – Ithaca: Cornell University Press, 1988. – 480 pp.
8. Bateman A.W., Schulze A.D., Kaukinen K.H., Tabata A., Mordecai G., Flynn K., Bass A., Di Cicco E, Miller K.M. Descriptive multi-agent epidemiology via molecular screening on Atlantic salmon farms in the northeast Pacific Ocean // *Sci Rep.* – 2021. – Vol. 11(1). – P.3466. (<https://doi.org/10.1038/s41598-020-78978-9>).
9. Long A., LeBlanc F., Arseneau J-R., Gagne N., Einer-Jensen K., Lovy J., Polinski M., Jones S., Garver K.A. Distribution and Pathogenicity of Two Cutthroat Trout Virus (CTV) Genotypes in Canada // *Viruses.* – 2021. – Vol. 13(9). – P.1730 (<https://doi.org/10.3390/v13091730>)
10. Bellas C.M., Sommaruga R. Polinton-like viruses are abundant in aquatic ecosystems // *Microbiome.* – 2021. – Vol. 9(1). – P.13. (<https://doi.org/10.1186/s40168-020-00956-0>).
11. de Oliveira Santos L., Guedes I.A., Azevedo S.M.F.d. et al. Occurrence and diversity of viruses associated with cyanobacterial communities in a Brazilian freshwater reservoir // *Braz J Microbiol.* – 2021. – Vol. 52. – P.773–785 (<https://doi.org/10.1007/s42770-021-00473-8>)
12. Tilman D., Isbell F., Cowles J. M. Biodiversity and Ecosystem Functioning // *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics.* – 2014. – Vol. 45(1). – P.471 – 493 (<https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-120213-091917>)
13. Zhang Q., Gui J.F. Virus genomes and virus-host interactions in aquaculture animals // *Sci. China Life Sci.* – Vol. 2015. – Vol. 58. – P.156–169 (<https://doi.org/10.1007/s11427-015-4802-y>).
14. Frederick S.B. Kibenge Emerging viruses in aquaculture. *Current Opinion in Virology*, 2019, 34:97-103 (<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.12.008>)
15. Zhang Q.Y. An overview on several large DNA viruses in freshwater ecosystems // *Acta Hydrobiologica Sinica.* – 2020. – Vol. 44(5). – P. 961-975 (<https://doi.org/10.1016/j.watbs.2022.100062>).
16. Abbadi M. et al. Increased virulence of Italian infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) associated with the emergence of new strains // *Virus evolution.* – 2021. – Vol.7 (2). – C.veab056 (<https://doi.org/10.1093/ve/veab056>).

17. Menzel P. et al. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju // *Nat. Commun.* – 2016. – Vol.7. – 11257.
18. Leong J.C. Fish Viruses // *Encyclopedia of Virology* / ed. by B.W.J. Mahy, Marc H.V. H.V. van Regenmortel. – Strasbourg: Academic Press Inc, 2008. – P. 227–34 (doi: 10.1016/B978-012374410-4.00400-3).
19. Wang Q., Ji W., Xu Z. Current use and development of fish vaccines in China // *Fish Shellfish Immunol.* – 2020. – Vol. 96. – P. 223-234 (doi: 10.1016/j.fsi.2019.12.010).
20. Kurath G. Fish novirhabdoviruses. In: *Rhabdoviruses: Molecular Taxonomy, Evolution, Genomics, Ecology, Cytopathology, and Control* /Dietzgen R.G., Kuzmin I.V. (eds.). Caister Academic Press; Norfolk, UK, 2012. pp. 98–116.
21. Morzunov S.P., Winton J.R., Nichol S.T. The complete genome structure and phylogenetic relationship of infectious hematopoietic necrosis virus // *Virus Res.* – 1995. – Vol.38. – P.175–192 (doi: 10.1016/0168-1702(95)00056-V).
22. Jensen M.H. Research on the virus of Egtved disease // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1965. – Vol. 126. –P. 422–426. (doi: 10.1111/j.1749-6632.1965.tb14292.x).
23. Skall H.F., Olesen N.J., Møllergaard S. Viral haemorrhagic septicaemia virus in marine fish and its implications for fish farming — A review // *J. Fish. Dis.* – 2005. – Vol. 28. – P. 509–529. (doi: 10.1111/j.1365-2761.2005.00654.x.)
24. Emmenegger E.J., Moon C.H., Hershberger P.K., Kurath G. Virulence of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) genotypes Ia, IVa, IVb, and IVc in five fish species // *Dis. Aquat. Org.* – 2013. – Vol. 107. – P.99–111 (doi: 10.3354/dao02671.).
25. Nylund A., Hovland T., Hodneland K., Nilssen F., Lwík P. Mechanisms for transmission of infectious salmon anaemia (ISA) // *Diseases of Aquatic Organisms.* – 1994. – Vol.19. – P. 95-100.
26. Scott C.J.W., Morris P.C., Austin B., Cellular, molecular, genomics, and biomedical approaches, *Molecular Fish Pathology* // *Encyclopedia of Fish Physiology* / ed. by Anthony P. Farrell. – New York: Academic Press, 2011 – P. 2032-2045.
27. Lange J., Groth M., Fichtner D., et al. Virus isolate from carp: genetic characterization reveals a novel picornavirus with two aphthovirus 2A-like sequences // *Journal of General Virology.* – 2014. – Vol.95. – P. 80-90. (doi.org/10.1099/vir.0.058172-0).
28. Herath T.K., Ferguson H.W., Weidmann M.W. et al. Pathogenesis of experimental salmonid alphavirus infection in vivo: an ultrastructural insight // *Vet Res.* – 2016. – Vol. 47. – P.7 (https://doi.org/10.1186/s13567-015-0300-2).
29. Mustafayev N.J., Ibrahimov Sh.R., Levin B.A. Sharpbelly Hemiculter leucisculus (Basilewsky, 1855) (Cypriniformes, Cyprinidae) is a New Species of Azerbaijan Fauna // *Russian Journal of Biological Invasions.* – 2015. – Vol. 6 (4). – P. 252–259 (https://link.springer.com/article/10.1134/S2075111715040049#citeas).
30. Amarasinghe G.K., Ayllón M.A., Bào Y. et al. Taxonomy of the order Mononegavirales: update // *Arch Virol.* – 2019. – Vol. 164. – P.1967–1980 (https://doi.org/10.1007/s00705-019-04247-4).
31. Shi M., Lin X.-D., Chen X., Tian J.H., Chen L.J., Li K., Wang W., Eden J.S., Shen J.J., Liu L., Holmes E.C., Zhang Y.Z. The evolutionary history of vertebrate RNA viruses // *Nature.* – 2018. – Vol. 556. – P. 197–202 https://www.nature.com/articles/s41586-018-0012-7#citeas).
32. Ferron F., Debat H.J., Decroly E., Canard B. Identification of a Nidovirales Orf1a N7-guanine cap Methyltransferase signature-sequence as a genetic marker of large genome Tobaniviridae // *bioRxiv.* – 2019. – Vol. 639369 (https://www.biorxiv.org/content/10.1101/639369v2.full)
33. Gjessing M.C., Yutin N., Tengs T., Senkevich T., Koonin E., Rønning H.P., Alarcon M., Ylving S., Lie K.I., Saure B., Tran L., Moss B., Dale O.B. Salmon Gill Poxvirus, the Deepest Representative of the Chordopoxvirinae // *J Virol.* – 2015. – Vol. 89(18). – P. 9348-67 (doi: 10.1128/JVI.01174-15.)
34. Yan X.Y., Wu Z.H., Jian J.C., Lu Y.S., Sun X.Q. Analysis of the genetic diversity of the lymphocystis virus and its evolutionary relationship with its hosts // *Virus Genes.* – 2011. –Vol. 43. – P. 358–366 (doi: 10.1007/s11262-011-0646-0.)
35. Sheng X., Wu R., Tang X., Xing J., Zhan W. Tissue Localization of Lymphocystis Disease Virus (LCDV) Receptor-27.8 kDa and Its Expression Kinetics Induced by the Viral Infection in Turbot (*Scophthalmus maximus*) // *Int. J. Mol. Sci.* – 2015. – Vol. 16. – P. 26506–26519 (doi: 10.3390/ijms161125974.).
36. Hershberger P.K., Elder N.E., Grady C.A., Gregg J.L., Pacheco C.A., Greene C., Rice C., Meyers T.R. Prevalence of Viral Erythrocytic Necrosis in Pacific Herring and Epizootics in Skagit Bay, Puget Sound, Washington // *J. Aquat. Anim. Health.* – 2009. – Vol. 21. – P.1–7 (doi: 10.1577/H08-035.1.).
37. Emmenegger E.J., Glenn J.A., Winton J.R., Batts W.N., Gregg J.L., Hershberger P.K. Molecular Identification of Erythrocytic Necrosis Virus (ENV) from the Blood of Pacific Herring (*Clupea pallasii*) // *Vet. Microbiol.* – 2014. – Vol.174. – P.16–26 (https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.08.028).
38. Pagowski V.A., Mordecai G.J., Miller K.M., Schulze A.D., Kaukinen K.H., Ming T.J., Li S., Teffer A.K., Tabata A., Suttle C.A. Distribution and Phylogeny of Erythrocytic Necrosis Virus (ENV) in Salmon Suggests Marine Origin // *Viruses.* – 2019. – Vol. 11(4). – P. 358 (doi: 10.3390/v11040358.)
39. Chinchar V.G. Ranaviruses (Family: Iridoviridae): emerging cold-blooded killers // *Arch Virol.* – 2002. – Vol. 147. – P. 447–470 (doi: 10.1007/s007050200000.)
40. Bayley A.E., Hill B.J., Feist S.W. Susceptibility of the European common frog *Rana temporaria* to a panel of ranavirus isolates from fish and amphibian hosts // *Diseases of aquatic organisms.* – 2013. – Vol. 103. – P.171–183 (doi: 10.3354/dao02574).
41. Guo C.J., Wu Y.Y., Yang L.S., Yang X.B., He J., Mi S., Jia K.T., Weng S.P., Yu X.Q., He J.G. Infectious spleen and kidney necrosis virus (a fish iridovirus) enters Mandarin fish fry cells via caveola-dependent endocytosis // *J Virol.* – 2012. – Vol. 86(5). – P. 2621-31 (doi: 10.1128/JVI.06947-11).
42. Nagy É. Adenoviruses of Fish // *Aquaculture Virology* / ed. by S.B.F. Kibenge, M.G. Godoy. – New York: Academic Press, 2016. – P. 173-176 (doi.org/10.1016/B978-0-12-801573-5.00010-3).

43. McGonigle R.H. Acute catarrhal enteritis of salmonid fingerlings // *Trans. Am. Fish. Soc.* – 1941. – Vol. 70. – P. 297-303.
44. Amin A., Trasti J. Endomyocarditis in Atlantic salmon in Norwegian sea farms // *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* – 1988. – Vol. 8. – P. 70–71.
45. Wolf K., Snieszko S.F., Unbar C.E., Pyle E. Virus nature of infectious pancreatic necrosis in trout // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1960. – Vol. 104. – P.105-8 (doi: 10.3181/00379727-104-25743.)
46. Haugland O., Mikalsen A.B., Nilsen P., Lindmo K., et al. Cardiomyopathy syndrome of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is caused by a double-stranded RNA virus of the Totiviridae family // *J Virol.* – 2011. – Vol. 85. – P. 5275–5286 (doi/10.1128/JVI.02154-10).
47. Alavandi S.V., Poornima M. Viral metagenomics: A tool for virus discovery and diversity in aquaculture // *Indian J. Virol.* – 2012. – Vol. 23(2). – P. 88-98 (doi: 10.1007/s13337-012-0075-2).

### References

1. Krijgsman, W., Tesakov, A.S., Yanina, T.A., et al. “Quaternary time scales for the Pontocaspian domain: interbasinal connectivity and faunal evolution.” *Earth-Science Rev.* 188, (2019): 1–40. doi: 10.1016/j.earscirev.2018.10.013.
2. Naseka, A.M., Bogutskaya, N.G. “Fishes of the Caspian Sea: zoogeography and updated check-list.” *Zoosystematica Rossica* 18, no 2 (2009): 295–317. doi: 10.31610/zsr/2009.18.2.295.
3. Hodorevskaya, R.P. “Znachenie estestvennogo neresta i iskusstvennogo osetrovodstva v formirovanii zapasov osetrovyyh kaspijskogo morya.” *Astrahanskij vestnik ekologicheskogo obrazovaniya* 2, no 32 (2015): 74 – 89. (In Russian).
4. FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 – Meeting the sustainable development goals. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 2018.
5. Campbell, L.J., Hammond, S.A., Price, S.J. et al. “A novel approach to wildlife transcriptomics provides evidence of disease-mediated differential expression and changes to the microbiome of amphibian populations.” *Molecular Ecology* 27, (2018): 1413–1427. doi: 10.1111/mec.14528.
6. Mishra, S., Das, R., Swain, P. “Status of Fish Diseases in Aquaculture and assessment of economic loss due to disease.” In *Contemporary Trends in Fisheries and Aquaculture*, edited by Nagaraja P., Pandey B.N., Pandey R.N., Joshi B.D., 183–198. New Delhi: Today & Tomorrow’s Printers and Publishers, 2019.
7. Wolf, K. *Fish Viruses and Fish Viral Diseases*. Ithaca: Cornell University Press, 1988. – 480 pp.
8. Bateman, A.W., Schulze, A.D., Kaukinen, K.H. et al. “Descriptive multi-agent epidemiology via molecular screening on Atlantic salmon farms in the northeast Pacific Ocean” *Sci Rep.* 11, no 1 (2021): 3466. doi: 10.1038/s41598-020-78978-9.
9. Long, A., LeBlanc, F., Arseneau, J.-R., Gagne, N., et al. «Distribution and Pathogenicity of Two Cutthroat Trout Virus (CTV) Genotypes in Canada» *Viruses* 13, no. 9 (2021): 1730. doi: 10.3390/v13091730.
10. Bellas, C.M., Sommaruga, R. “Polinton-like viruses are abundant in aquatic ecosystems.” *Microbiome* 9, no 1 (2021): 13. doi: 10.1186/s40168-020-00956-0.
11. de Oliveira Santos, L., Guedes, I. A., Azevedo, S. M. F. O. E., and Pacheco, A. B. F. “Occurrence and diversity of viruses associated with cyanobacterial communities in a Brazilian freshwater reservoir.” *Braz J Microbiol* 52, (2021): 773–785. doi: 10.1007/s42770-021-00473-8.
12. Tilman, D., Isbell, F., Cowles, J. M. “Biodiversity and Ecosystem Functioning” *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 45, no 1 (2014): 471-493. doi: 10.1146/annurev-ecolsys-120213-091917.
13. Zhang, Q., Gui, J.F. “Virus genomes and virus-host interactions in aquaculture animals” *Sci. China Life Sci.* 58, (2015): 156–169. doi: 10.1007/s11427-015-4802-y.
14. Frederick, S.B. “Kibenge Emerging viruses in aquaculture.” *Current Opinion in Virology* 34, (2019): 97-103. doi: 10.1016/j.coviro.2018.12.008.
15. Zhang, Q.Y. “An overview on several large DNA viruses in freshwater ecosystems.” *Acta Hydrobiologica Sinica* 44, no 5 (2020): 961-975. doi: 10.1016/j.watbs.2022.100062.
16. Abbadi, M. et al. “Increased virulence of Italian infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) associated with the emergence of new strains.” *Virus evolution* 7, no 2 (2021): C.veab056. doi: 10.1093/ve/veab056.
17. Menzel, P. et al. “Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju” *Nat. Commun* 7, no 11257 (2016). doi: 10.1038/ncomms11257.
18. Leong, J.C. “Fish Viruses.” In *Encyclopedia of Virology*, edited by Mahy B.W.J., Marc H.V., H.V., van Regenmortel, 227–34. Strassbourg: Academic Press Inc, 2008. (doi: 10.1016/B978-012374410-4.00400-3).
19. Wang, Q., Ji, W., Xu, Z. “Current use and development of fish vaccines in China.” *Fish Shellfish Immunol* 96, (2020): 223-234. doi: 10.1016/j.fsi.2019.12.010.
20. Kurath, G. “Fish novirhabdoviruses.” In *Rhabdoviruses: Molecular Taxonomy, Evolution, Genomics, Ecology, Cytopathology, and Control*, edited by Dietzgen R.G., Kuzmin I.V., 98-116. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2012.
21. Morzunov, S.P., Winton J.R., Nichol S.T. “The complete genome structure and phylogenetic relationship of infectious hematopoietic necrosis virus.” *Virus Res* 38, (1995): 175–192. doi: 10.1016/0168-1702(95)00056-V.
22. Jensen, M.H. “Research on the virus of Egtved disease.” *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 126, (1965): 422–426. doi: 10.1111/j.1749-6632.1965.tb14292.x.

23. Skall, H.F., Olesen, N.J., Møllergaard, S. "Viral haemorrhagic septicaemia virus in marine fish and its implications for fish farming — A review" *J. Fish. Dis.* 28, (2005): 509–529. doi: 10.1111/j.1365-2761.2005.00654.x.
24. Emmenegger, E.J., Moon, C.H., Hershberger, P.K., Kurath G. "Virulence of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) genotypes Ia, IVa, IVb, and IVc in five fish species." *Dis. Aquat. Org.* 107, (2013): 99–111. doi: 10.3354/dao02671.
25. Nylund, A., Hovland, T., Hodneland, K., Nilsen, F., Lwík, P. "Mechanisms for transmission of infectious salmon anaemia (ISA)." *Diseases of Aquatic Organisms* 19, (1994): 95-100.
26. Scott, C.J.W., Morris, P.C., Austin, B. "Cellular, molecular, genomics, and biomedical approaches, Molecular Fish Pathology." In *Encyclopedia of Fish Physiology*, edited by Anthony P. Farrell, 2032-2045. New York: Academic Press, 2011.
27. Lange, J., Groth, M., Fichtner, D., et al. "Virus isolate from carp: genetic characterization reveals a novel picornavirus with two aphthovirus 2A-like sequences." *Journal of General Virology* 95, (2014): 80-90. doi:10.1099/vir.0.058172-0.
28. Herath, T.K., Ferguson, H.W., Weidmann, M.W. et al. "Pathogenesis of experimental salmonid alphavirus infection in vivo: an ultrastructural insight." *Vet Res* 47, (2016): 7. doi: 10.1186/s13567-015-0300-2.
29. Mustafayev, N.J., Ibrahimov, Sh.R., Levin, B.A. "Sharpbelly Hemiculter leucisculus (Basilewsky, 1855) (Cypriniformes, Cyprinidae) is a New Species of Azerbaijan Fauna." *Russian Journal of Biological Invasions* 6, no 4 (2015): 252–259. <https://link.springer.com/article/10.1134/S2075111715040049#citeas>.
30. Amarasinghe, G.K., Ayllón, M.A., Bào, Y. et al. "Taxonomy of the order Mononegavirales: update" *Arch Virol* 164, (2019): 1967–1980. doi: 10.1007/s00705-019-04247-4.
31. Shi, M., Lin, X-D., Chen, X., Tian, J.H., et al. "The evolutionary history of vertebrate RNA viruses" *Nature* 556, (2018): 197–202. <https://www.nature.com/articles/s41586-018-0012-7#citeas>.
32. Ferron, F., Debat, H.J., Decroly, E., Canard, B. "Identification of a Nidovirales Orf1a N7-guanine cap Methyltransferase signature-sequence as a genetic marker of large genome Tobamoviridae." *bioRxiv* 639369, (2019). <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/639369v2.full>.
33. Gjessing, M.C., Yutin, N., Tengs, T., Senkevich, T., et al. "Salmon Gill Poxvirus, the Deepest Representative of the Chordopoxvirinae" *J Virol* 89, no 18 (2015): 9348-9367. doi: 10.1128/JVI.01174-15.
34. Yan, X.Y., Wu, Z.H., Jian, J.C., Lu, Y.S., Sun, X.Q. "Analysis of the genetic diversity of the lymphocystis virus and its evolutionary relationship with its hosts." *Virus Genes* 43, (2011): 358–366. doi: 10.1007/s11262-011-0646-0.
35. Sheng, X., Wu, R., Tang, X., Xing, J., Zhan, W. "Tissue Localization of Lymphocystis Disease Virus (LCDV) Receptor-27.8 kDa and Its Expression Kinetics Induced by the Viral Infection in Turbot (*Scophthalmus maximus*)." *Int. J. Mol. Sci.* 16, (2015): 26506–26519. doi: 10.3390/ijms161125974.
36. Hershberger, P.K., Elder, N.E., Grady, C.A., Gregg, J.L., et al. "Prevalence of Viral Erythrocytic Necrosis in Pacific Herring and Epizootics in Skagit Bay, Puget Sound, Washington." *J. Aquat. Anim. Health* 21, (2009): 1–7. doi: 10.1577/H08-035.1.
37. Emmenegger, E.J., Glenn, J.A., Winton, J.R., Batts, W.N., Gregg, J.L., Hershberger, P.K. "Molecular Identification of Erythrocytic Necrosis Virus (ENV) from the Blood of Pacific Herring (*Clupea pallasii*)." *Vet. Microbiol.* 174, (2014): 16–26. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.08.028.
38. Pagowski, V.A., Mordecai, G.J., Miller, K.M., Schulze, A.D., et al. "Distribution and Phylogeny of Erythrocytic Necrosis Virus (ENV) in Salmon Suggests Marine Origin" *Viruses* 11, no 4 (2019): 358. doi: 10.3390/v11040358.
39. Chinchar, V.G. "Ranaviruses (Family: Iridoviridae): emerging cold-blooded killers." *Arch Virol.* 147, (2002): 447–470. doi: 10.1007/s007050200000.
40. Bayley, A.E., Hill, B.J., Feist, S.W. "Susceptibility of the European common frog *Rana temporaria* to a panel of ranavirus isolates from fish and amphibian hosts." *Diseases of aquatic organisms* 103, (2013): 171–183. doi: 10.3354/dao02574.
41. Guo, C.J., Wu, Y.Y., Yang, L.S., Yang, X.B., et al. "Infectious spleen and kidney necrosis virus (a fish iridovirus) enters Mandarin fish fry cells via caveola-dependent endocytosis." *J Virol.* 86, no 5 (2012): 2621-31. doi: 10.1128/JVI.06947-11.
42. Nagy, É. "Adenoviruses of Fish." In *Aquaculture Virology*, edited by S.B.F. Kibenge, M.G. Godoy, 173-176. Academic Press, 2016. doi: 10.1016/B978-0-12-801573-5.00010-3.
43. McGonigle, R.H. "Acute catarrhal enteritis of salmonid fingerlings." *Trans. Am. Fish. Soc.* 70, (1941): 297-303. doi: 10.1577/1548-8659(1940)70[297:ACEOSF]2.0.CO;2.
44. Amin, A., Trasti, J. "Endomyocarditis in Atlantic salmon in Norwegian seafarms." *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 8, no 4 (1988): 70–71.
45. Wolf, K., Snieszko, S.F., Unbar, C.E., Pyle, E. "Virus nature of infectious pancreatic necrosis in trout." *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 104, (1960): 105-108. doi: 10.3181/00379727-104-25743.
46. Haugland, O., Mikalsen, A.B., Nilsen, P., Lindmo, K., et al. "Cardiomyopathy syndrome of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is caused by a double-stranded RNA virus of the Totiviridae family." *J Virol.* 85, (2011): 5275–5286. doi: 10.1128/JVI.02154-10.
47. Alavandi, S.V., Poornima, M. "Viral metagenomics: A tool for virus discovery and diversity in aquaculture." *Indian J. Virol.* 23, no 2 (2012):88-98. doi: 10.1007/s13337-012-0075-2.