

ЕТИОЛОГИЧНИ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ НА ЩАМОВЕ НА ВИРУСНАТА ХЕМОРАГИЧНА СЕПТИЦЕМИЯ ПО ПЪСТЪРВАТА, ИЗОЛИРАНИ В БЪЛГАРИЯ

ВАНЯ ЧИКОВА, ЕКАТЕРИНА МИЛЕВА

Национален научноизследователски ветеринарномедицински институт - София

Вирусната хеморагична септицемия (VHS) по пъстървите е включена в списъка на значимите заболявания по рибите на Международното бюро по эпизоотиите от м. май 2004 г. Според последния доклад на Международния комитет за таксономия на вирусите въз основа проучванията на редица автори (**van Regenmortel et al.**, 2000; **Walker et al.**, 2000) етиологичният агент на заболяването се отнася към сем. *Rhabdoviridae*, род *Novirhabdovirus*. При електронномикроскопски изследвания е установено, че VHS вирусът е с куршумоподобна форма и размери 170-180 nm x 60-70 nm (**Skall et al.**, 2005; **Elsayad et al.**, 2006). Той съдържа едноверижна рибонуклеинова киселина (RNA). Вирусният геном се състои от 11158 нуклеотида (nt), кодиращи един неструктурен протеин (Nv) и 5 структурни протеини: нуклеокапсид (N), фосфо- (P), матричен (M), глико- (G) и RNA полимераз (L-) протеин. Гените са аранжирани в следния порядък: 3'-N-P-M-G-Nv-L- 5' (**Schutze et al.**, 1999).

Проучванията върху секвентните вариации на G протеина показват, че VHS вирусните щамове са по-тясно свързани с изолатите от същите географски региони, отколкото те могат да бъдат групирани в зависимост от видовете гостоприемници. При филогенетичните анализи са идентифицирани 4 генотипа на VHS вируса (**Benmansour et al.**, 1997; **Elsayed et al.**, 2006). Генотип I включва широк спектър от вирусни изолати – от сладководни ферми в континентална Европа, т. нар. субтип Ia (**Show et al.**, 1999; **Einer-Jensen et al.**, 2004) и изолати от крайбрежните зони на Северна Европа, изолирани от морски видове риби и определени като субтип Iv. Генотип II включва морски изолати от Балтийско море. Генотип III съдържа вирусни изолати от Северно море и крайбрежието на Великобритания (**Einer-Jensen et al.**, 2004). По-късно Северноамериканските изолати и тези от Япония и Корея са определени като принадлежащи към генотип IV.

Диагностицирането на VHS по пъстървите се базира освен на характерните клинични признаци още и на различни лабораторни методи. Прилагат се взаимно допълващи се диагностични техники за директно доказване на вирусните антигени в инфектирани тъкани и органи от риби или за изолация на вируса в клетъчни линии и

последваща идентификация чрез различни серологични и имуноензимни методи.

Въвеждането в лабораторната практика на молекулярно-биологичните методи за детекция на вирусния геном в теренни проби и в заразени клетъчни култури е перспективно с оглед разширяване на спектъра на диагностичните схеми и увеличаване на възможностите за епидемиологични проучвания.

С настоящата разработка си поставяме за цел да апробираме конвенционална полимеразно-верижна реакция (RT-PCR) за детекция на VHS вирусен геном в заразени клетъчни култури, с оглед оптимизиране на работните протоколи, използвани в лабораторната практика при диагностични и скринингови изследвания във връзка с мониторинга на рибовъдните ферми.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Клетъчни култури. В лабораторните изследвания бяха използвани паралелно *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) клетъчна линия, получена от папилома на шаран (*Cyprinus carpio* L.) и BF-2 клетъчна линия от фибробласти, получена от опашната част на малки риби от вида *Lepomis macrochirus*. За култивирането на тези клетъчни линии бяха използвани синтетични хранителни среди - Eagle's minimum essential medium (EMEM) с добавка на фетален телешки серум и антибиотици, съгласно описаните в Решение 183/2001/ЕС процедури.

Органи суспензии. За инокулиране на клетъчния монослой бяха използвани теренни проби – 10% суспензии от цели риби до 4 cm (след отстраняване на жълтътното мехурче) или органи суспензии (далак, бъбрек и мозък) при риби над 6 cm, произхождащи от две рибовъдни ферми в страната.

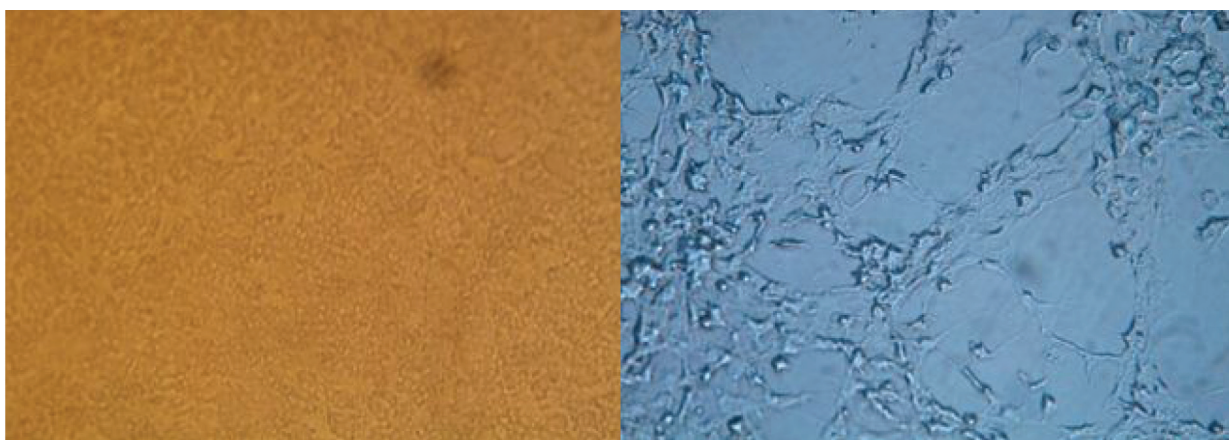
Вирусни щамове. В изследванията бяха включени следните референтни вирусни щамове, предоставени от Европейската Референтна лаборатория по болести на рибите, Копенхаген, Дания:

- VHS вирус, щам DK-5151, датски изолат от дъгова пъстърва, лиофилизиран, 5-ти пасаж на EPC клетъчна линия, с инфекциозен титър $5,9 \cdot 10^6$ TCID₅₀/ml (**Olesen**



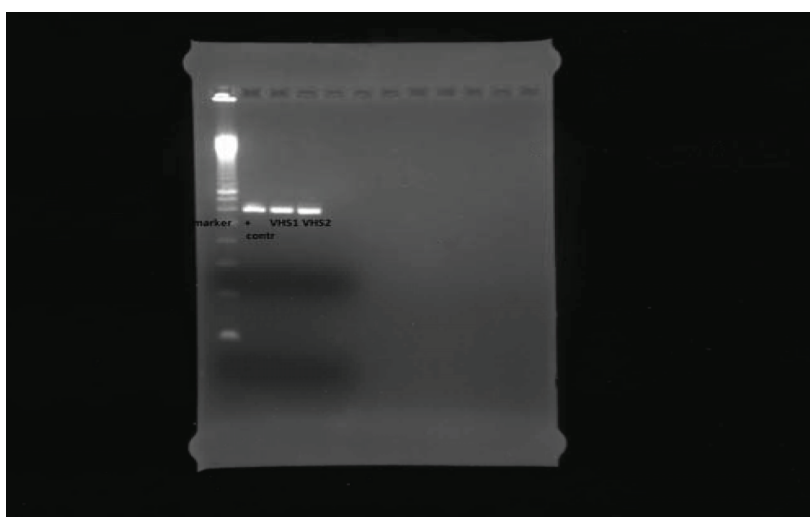
Снимка 1. Клиника на *VHS* с характерни хеморагии в плавателния мехур, мускулатурата и перивисцералната мастна тъкан.

Photo 1. *VHS* typical clinical signs with hemorrhagic swim bladder, muscles and perivisceral tissue



Снимка 2. Стабилна клетъчна линия *EPC*. Контролна неинфектирана тъкан и *CPE* на 72 h след заразяване с *VHSV*.

Photo 2. *EPC* cell line – uninfected and 72 hours after inoculation with *VHSV*



Снимка 3. Резултати от PCR – *VHS1/Ia*, *VHS2/Id*, контрола – референтен щам

Photo 3. PCR results after gel electrophoresis – bands at 505bp

et al., 1993). Genotype Ia, Gen Bank accession number: AF345859 (G-gene) (Ejner-Jensen et al., 2004).

- VHS вирус, 33-TN/93, теренен изолат, лиофилизиран, репликиран на EPC клетъчна култура, с инфекциозен титър $1,3 \cdot 10^6$ TCID₅₀/ml;

- VHS вирус, щам DK-6137, изолиран при избухване на заболяване в морски аквакултури с висока смъртност (1991), 3-ти пасаж на EPC клетъчна линия, с инфекциозен титър $5.9 \cdot 10^6$ TCID₅₀/ml. Genotype Ia Gen Bank accession number: AY546593

- VHS вирус, щам 1p8, морски изолат от херинга (*Clupea harengus*) (1996) улов от Балтийско море (Mortensen et al., 1999); 6-ти пасаж на BF-2 клетъчна линия. Genotype Ib, Gen Bank accession number: AY546573 (G-gene) and AY356652 (N-gene) (Mortensen H. F. et al., 1999; Ejner-Jensen et al., 2004; Snow et al., 2004).

В изследванията бяха включени и клинични изолати от две рибовъдни ферми в страната:

- VHS вирус, наш изолат BG 2008-50-209-1

- VHS вирус, наш изолат BG 2008-50-209-2

За проучване и идентифициране на изолираните в нашата страна вирусни щамове, паралелно с традиционно използваните индиректен имунофлуоресцентен тест (IFAT) и ензимсвързан имуносорбентен тест (ELISA), бе апробиран и RT-PCR.

Изпитани бяха сравнително два кита за екстракция на вирусна РНК (Viral DNA/RNA Rapid Extraction kit и QIAampViral RNA Mini kit) от заразени клетъчни култури и праймери. Необходими бяха минимум два праймера – primer forward, който определя началото на синтеза и primer reverse, ограничаващ края на фрагмента за амплификация.

За детекция на VHS вирусния геном приложихме едностъпкова RT-PCR техника, като използвахме QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) съгласно инструкциите на фирмата производител. Заложихме по 5 µl от всяка приготвена проба в общ обем от 25 µl. Крайната смес за реакциите съдържаше 1.5 µl от всеки праймер

Амплификацията протичаше в термоциклер, програмиран за следните параметри на редуване на различни температурни режими: 1 цикъл на денатурация – при 94°C

или 95°C за 15 min, впоследствие протича свързване на праймерите към комплементарния им участък от ДНК, ограничавайки помежду си търсения фрагмент за амплификация. Необходимата температура зависеше от броя на азотните бази. В случая приложихме 1 цикъл на 50 °C за 30 min, 1 цикъл: 95 °C за 15 min, последвани от 35 цикъла: 94 °C за 30 s; 55°C за 30 s; 68 °C за 60 s; 55 °C за 30 s, 1 цикъл: 68 °C за 7 min и накрая до достигане на 10 °C.

Тези праймери и параметрите на реакцията верифицирахме при провеждането на организирани от Европейската референтна лаборатория по болести на рибите, ежегодни интеркалибрационни тестове за пригодност и компетентност.

Секвенирането на нашите изолати, анализът на данните и конструирането на филогенетичното дърво бяха проведени в Европейската референтна лаборатория.

Получените продукти бяха подложени на електрофореза в агарозен гел при използването на специални маркери с известен брой базови двойки (MWM – molecular weight marker) и бяха визуализирани с етидиев бромид, който при облъчване с UV лъчи дава специфично светене.

При положителен резултат амплификационният продукт съдържа 505 bp (on the gel) за VHS вируса.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Рутинно използваните в НРЛ „БРММР“ постоянни клетъчни линии EPC и BF-2 се характеризират с висока чувствителност за изолация на различни вирусни агенти, патогенни за рибите. Цитопатичния ефект (CPE) отчитахме визуално при наблюдение на светлинен микроскоп. Първоначални промени в клетъчните култури след заразяване с референтни щамове на VHSV са установени на 48-72-ия час след инокулиране. Инфектираните клетки губят своята характерна вретеновидна форма. CPE се характеризира с поява на увеличени, окръглени “блестящи” клетки, превръщащи се в гроздовидно струпани големи балониращи клетки. На 96-120-ия час се наблюдава пълна деструкция на клетъчния монослой.

Изоляцията в чувствителни клетъчни култури и наблюдаването на характерен CPE бяха едни от етапите на

Таблица 1. Използвани праймери (Snow et al., 2004)
Table 1. The primers used for RT-PCR (Snow et al., 2004)

• Праймери за RT-PCR	Нуклеотидна последователност (5' – 3')	Геномна локализация	Авторски колектив
Универсални праймери за VHSV		VN	Snow M. et al., 2004
Forward Primer	ATG GAA GGA GGA ATT CGT GAA GCG		
Reverse Primer	GCG GTG AAG TGC TGC AGT TCC C		

диагностичните изследвания. Наблюдаваните промени в заразени 24-часови *EPC* клетъчни култури са проследени в динамика.

Вирусните изолати от клетъчни култури с характерен *CPE* идентифицирахме с *VHS ELISA* и индиректен имунофлуоресцентен тест (*IFAT*) търговски кит *BioX*, Belgium. В сравнителните изследвания като положителни контроли използвахме съответни референтни щамове.

Всички положителни за *VHS* вирус проби бяха тествани и с *RT-PCR*. Търговските китове за изолиране на РНК “*Viral DNA/RNA Rapid Extraction kit*” и *QIAamp Viral RNA Mini kit* дадоха добри резултати при изолиране на РНК както от проби с малък на брой копия, така и от проби с висока концентрация от изследваните вируси. Търговските китове за обратна транскрипция и амплификация на вирусна нуклеинова киселина “*Taqman Universal PCR master mix*“ на “*Applied Biosystems*” и “*One step RT-PCR Kit*” на “*Guangzhou Geneshun Biotech Ltd.*” бяха с достатъчна чувствителност за диагностика на вируса на вирусната хеморагична септицемия по пъстървата.

Всички щамове на *VHS* вируса бяха изследвани чрез едностъпкова *PCR* при използването на две двойки универсални видовоспецифични праймери за установяване на висококонсервативни фрагменти от вирусния геном.

Проведени бяха и опити за оптимизация на температурния режим на използвания едностъпков протокол, при различна температура на първична денатурация на използваните видовоспецифични праймери – съответно 50° С и 60° С.

При заложените положителни проби за *VHSV* наблюдавахме ясно обособен бенд между 500 и 600 bp. Получените до момента резултати за получените амплификационни продукти при залагане в реакцията на референтни щамове на *VHS* вируса и нашите изолати и съответните маркери бяха документирани със снимков материал:

Не установихме различие в получените резултати и по отношение на чувствителността на метода.

Използваните сет праймери позволиха ефективна амплификация и показаха 100% чувствителност за детекция на българските щамове, изолирани през декември 2008 г. от ПС Бяла река в района на община Карлово и през януари 2009 г. от ПС Беден 1 в района на община Девин, което ги прави подходящи за целите на диагностиката на заболяването у нас на този етап. Изследванията показаха, че нашите изолати принадлежат към серотип I на *VHS* вируса, а използваните праймери осигуряват специфична детекция. Тези резултати ни дават основание да смятаме, че тестът може да бъде прилаган с успех за установяване на *VHS* вирус в клетъчнокултурални суспензии, заразени с теренни проби, но предстои да бъде изпитана неговата специфичност и пригодност за директно доказване в органни суспензии от съмнително болни риби. Важна диагностична стойност има

липсата на неспецифична (фалшиво положителна реакция) с вируса на инфекциозната хемопоеична некроза по пъстървата. В резултат от проведените експерименти и участия в провежданите от Референтната лаборатория на ЕС интерлабораторни тестове извършихме оптимизация на протоколите за *RT-PCR* (Snow et al., 2004) и проучихме приложението им за доказване на консервативни участъци от съответните вирусни геноми. Резултатите от проведения секвентен анализ в Референтната лаборатория на ЕС показват, че изолираните от нас щамове на *VHSV* принадлежат към серогрупа I, но са два различни субтипа – Ia, който е широко разпространен в пъстървовите стопанства на континентална Европа и Id, характерен за морските садкови стопанства на Норвегия и Финландия

Получените резултати показват, че липсата на 100% комплементарност на използваните праймери не намалява чувствителността им за установяване на вирусния геном в изследваните теренни проби. Наличието на промени (замествания) в нуклеотидната последователност на българските изолати на *VHS* вируса са отразени на фиг. 1.

Данните от филогенетичния анализ могат да бъдат използвани за проследяване на епизоотологичните взаимовръзки между отделните изолати и откриване на вероятния източник на инфекцията.

В резултат от проведените проучвания са оптимизирани параметрите на конвенционален *RT-PCR* за диагностика на *VHS* и са изготвени съответни стандартни оперативни процедури с оглед актуализация на диагностичната схема. Апробираният едностъпков метод на *RT-PCR* за идентификация на *VHS* вирус дава достоверни резултати, а използваните праймери позволяват детекция на *VHS* щамове които са характерни за континентална Европа. Интерес в бъдеще ще представляват проучванията за тяхната специфичност при откриване на щамове от другите генотипове на вируса, които не са доказвани в страните от Централна и Източна Европа и Балканския полуостров, макар че понастоящем нямат епизоотично значение за региона.

Предстои сравнително изпитване на *RT-PCR* метода за доказване на *VHS* вируса директно в тъканите на заразени риби, но на този етап изолацията върху възприемчиви клетъчни линии остава класически метод за диагностика на вирусната хеморагична септицемия поради значително по-ниската чувствителност на *ELISA* и *ИФ*.

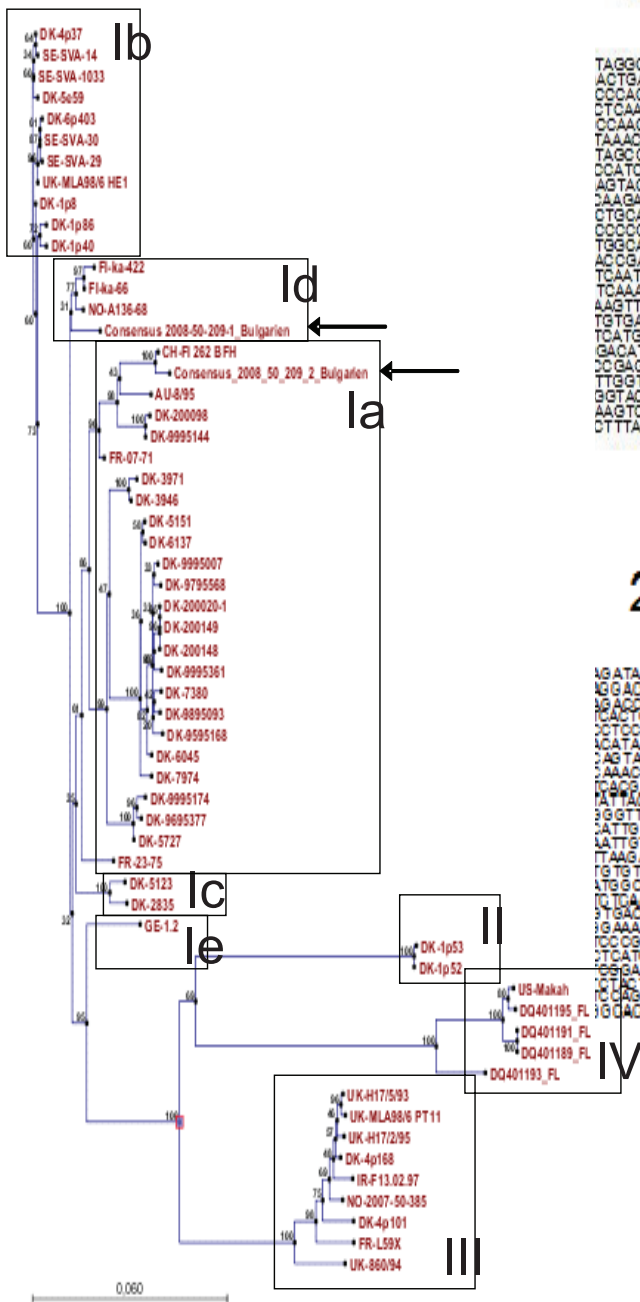
Изследванията на редица автори показват, че съвременните молекулярно биологични методи са с по-висока специфичност, чувствителност и диагностични възможности в сравнение с класическите вирусологични методи, използвани в нашата лаборатория. Внедряването им в лабораторната практика в допълнение на класическите методи ще увеличи спектъра на диагностичните техники, прилагани при надзор на икономически значимите вирусни инфекции в рибовъдните ферми у нас.

2008-50-209-1_Bulgarien

```
TAGGCCATTC CCCC AAGGGAC CCGAAGCGCAGATCTG GAACCTCC TCTGTCC BACCTC GGTAGACCGAAA
ACTGAC TCAGGTC TGAGAC CACACTCCCATTAGAT AGAAAAAATGG CACA TTTGTGCACACAATAAGC TA
CCGACAAATGGAATGGAATTTTTCTTGTGATC TTGATCATCATG TTAAGAGCACCACACACAGAT
CTCAACGACCTCC GGTC GAAAACTCTCGACGTACCAT GCAGATTGG BACACTCCGCTATACACTCATCC
CCAACTGCAGGGAAGATTTCCTTTGTCCGATTCGACCAAGCTCAACTCAGGTGTCTCATGAA TTTGAA
TAACAAGGGACTGG TTTCCGTCCCAAC TCAGATCA TCCATCTCCCGCTA TCAGTCAC CAGCGTCTACGC
TAGC GATGGCCACTACCTGCACAGATGACTTATCGCGTCACTCTTGCACCGATTCCTTGGAGGGCA
CCATGAAAAAGACCACTTGGAGGCGAAATGTCTGTCGTCAGGAGGCCACAAAAAGGCAAGCAAGGATCA
AGTACCCGTTCTCCCGTGAACCTCTGCACTGTGATGAAAAAATGTCCATAAGAGCATAACTCACTAT
JAAGACCCAAAAACAGTATCGGTGGATCTCTACAGCAGGAAATTCGCAACCCTGATTTTCATAGAGGGG
CTGCACAACTCC GGCCTGCAAACTATTGGCAGGGAGTCTATTGGTCCGCGCCACACCTACAGCCCAT
CCCGGAGTCGGAACACTGAAAGGAC ACC TGTCCACCGACCCCATGATCAGAGGGTGTGCAAGGCAAT
TGGCAGGCCATCACTCCCTGGGGACTCAC AATGGCATGCACAGTGACATCTTGCGGGACAGAAATGGATCA
ACCGACCTGGGGGACCTGATCAAGGTGACAGGACCGGGGGGGCGGAGGAAAC TGAC TCCAAAAAATG
TCAA TGCCGATATCCBATGAGGGGGGCAACAGACGACTTTTCTTATCTCAACCATCTCATCAAGCAATG
TCAAAGAACCGAGTGCCTGATCAAGTCCCATAGGATATCACCCGCTTCCGGGAAAAATTCCTCATTTCTCCCT
AAGTTCTGCTCCAGCCACCTGGACCCGGCAAGGCACACTATCTTCTCGACGGTCAAAATCATGCGAGGGT
TGTACTATGAGGCGAGTAGTCAAGCATCAACTACAAATAGTGTCTCAATACAAGACGGTGAACAAACATGGA
TCATGGAACGGGTAGAACAAACACAGAC GGGTACCGATGGGATGATTTTGGGGACAAATGATCATCC
GACATCGAAGAGCTATCAGAGTGTCTTATGACAGTGGAAATGCCTGTTCAAAGAAACCTTGTGAAAGTCCCTG
TCGAGCATGGTGTCTTCTCCAAACATA TCCGATCTTTCTCAC TAA TCACA TCACACCAAGCAAGCAAGTAA TCCCTTGT
TTGGTCA TTAACCTGAGTCTT TGGC GATCATTC TGGGATGGGGTGTGGGAGGGCCCTTCTCTA
GATCTGCTGCTTGTGTCAGAGCGCTCCCTCTATTCCAAATTCAGGGATCCG GATGCGACGATCTCC
AAGTCAAGCGGTCTGAGCACACCTGTCCGAAATGACCACAATTTCTCTTAGGTAGATAGAAAAAATGGC
CTTTATGATAAAGAAACATG
```

2008-50-209-2_Bulgarien

```
AGATAGGCATTC CCCC AAGGGAC CCGAAGCGCAGATCTG GAACCTCC TCTGTCC BACCTC GGTAGACCGAAA
ACTGAC TCAGGTC TGAGAC CACACTCCCATTAGAT AGAAAAAATGG CACA TTTGTGCACACAATAAGC TA
CCGACAAATGGAATGGAATTTTTCTTGTGATC TTGATCATCATG TTAAGAGCACCACACAGAT
CTCAACGACCTCC GGTC GAAAACTCTCGACGTACCAT GCAGATTGG BACACTCCGCTATACACTCATCC
CCAACTGCAGGGAAGATTTCCTTTGTCCGATTCGACCAAGCTCAACTCAGGTGTCTCATGAA TTTGAA
TAACAAGGGACTGG TTTCCGTCCCAAC TCAGATCA TCCATCTCCCGCTA TCAGTCAC CAGCGTCTACGC
TAGC GATGGCCACTACCTGCACAGATGACTTATCGCGTCACTCTTGCACCGATTCCTTGGAGGGCA
CCATGAAAAAGACCACTTGGAGGCGAAATGTCTGTCGTCAGGAGGCCACAAAAAGGCAAGCAAGGATCA
AGTACCCGTTCTCCCGTGAACCTCTGCACTGTGATGAAAAAATGTCCATAAGAGCATAACTCACTAT
JAAGACCCAAAAACAGTATCGGTGGATCTCTACAGCAGGAAATTCGCAACCCTGATTTTCATAGAGGGG
CTGCACAACTCC GGCCTGCAAACTATTGGCAGGGAGTCTATTGGTCCGCGCCACACCTACAGCCCAT
CCCGGAGTCGGAACACTGAAAGGAC ACC TGTCCACCGACCCCATGATCAGAGGGTGTGCAAGGCAAT
TGGCAGGCCATCACTCCCTGGGGACTCAC AATGGCATGCACAGTGACATCTTGCGGGACAGAAATGGATCA
ACCGACCTGGGGGACCTGATCAAGGTGACAGGACCGGGGGGGCGGAGGAAAC TGAC TCCAAAAAATG
TCAA TGCCGATATCCBATGAGGGGGGCAACAGACGACTTTTCTTATCTCAACCATCTCATCAAGCAATG
TCAAAGAACCGAGTGCCTGATCAAGTCCCATAGGATATCACCCGCTTCCGGGAAAAATTCCTCATTTCTCCCT
AAGTTCTGCTCCAGCCACCTGGACCCGGCAAGGCACACTATCTTCTCGACGGTCAAAATCATGCGAGGGT
TGTACTATGAGGCGAGTAGTCAAGCATCAACTACAAATAGTGTCTCAATACAAGACGGTGAACAAACATGGA
TCATGGAACGGGTAGAACAAACACAGAC GGGTACCGATGGGATGATTTTGGGGACAAATGATCATCC
GACATCGAAGAGCTATCAGAGTGTCTTATGACAGTGGAAATGCCTGTTCAAAGAAACCTTGTGAAAGTCCCTG
TCGAGCATGGTGTCTTCTCCAAACATA TCCGATCTTTCTCAC TAA TCACA TCACACCAAGCAAGCAAGTAA TCCCTTGT
TTGGTCA TTAACCTGAGTCTT TGGC GATCATTC TGGGATGGGGTGTGGGAGGGCCCTTCTCTA
GATCTGCTGCTTGTGTCAGAGCGCTCCCTCTATTCCAAATTCAGGGATCCG GATGCGACGATCTCC
AAGTCAAGCGGTCTGAGCACACCTGTCCGAAATGACCACAATTTCTCTTAGGTAGATAGAAAAAATGGC
CTTTATGATAAAGAAACATG
```



Фиг. 1. Филогенетичен и секвентен анализ на българските изолати от *VHS*
 Fig. 1. Phylogenetic tree after sequence analysis of Bulgarian isolates of *VHS*

ИЗВОДИ

За първи път в страната са апробирани молекулярно биологичните методи (RT-PCR) за диагностика на ВХС вирусна инфекция в рибовъдните ферми у нас.

Конвенционалният RT-PCR метод е високочувствителен и специфичен и с използването от нас праймери се постигат достоверни резултати, което позволява включване в диагностичната схема като потвърдителен тест за детекция на VHS вирусни геноми.

Изпитаните търговски китове за екстракция, обратна транскрипция и амплификация на вирусна нуклеинова киселина са с достатъчна чувствителност при приложение в диагностичната дейност и дават добри резултати при изолиране на РНК както от проби с малък на брой копия, така и от проби с висока концентрация от изследваните вируси.

Получените резултати при лабораторните изследвания потвърждават антигенната идентичност на нашите теренни вирусни изолати с референтен щам на VHS вируса – серогрупа I, съответно субтип Ia и Id.

ЛИТЕРАТУРА

- Benmansour A, B. Basurco, A. F. Monnier, P. Vende, J. R. Winton, P. de Kinkelin**, 1997. Sequence variation of the glycoprotein gene identifies three distinct lineages within field isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus, a fish rhabdovirus. *J. Gen. Virol.* 78: 2837–2846.
- Bruchhof B, O. Marquart, P. J. Enzmann**, 1995. Differential diagnosis of fish pathogenic rhabdoviruses by reverse transcriptase-dependent polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, 55:111-119.
- Einer-Jensen, K., N. J. Olesen, N. Lorenzen, P. E. V. Jørgensen**, 1995. Use of the polymerase chain reaction (PCR) to differentiate serologically similar viral haemorrhagic septicaemia (VHS) virus isolates from Europe and America. *Vet. Res.* 26:464–469.
- Einer-Jensen, K., H. Bjorklund, S. Oreshkova, I. Shchelunkov, T. Vesely, N. Lorenzen**, 2002. Detection and typing of fish viruses. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 22, 158–165;
- Einer-Jensen K, P. Ahren, R. Forsberg, N. Lorenzen**, 2004. Evolution of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicaemia virus. *Journal of General Virology* 85, 1167-1179.
- Elsayed, E., M. Faisal, M. Thomas, G. Whelan, W. Batts, J. Winton**, 2006. Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus from muskellunge, *Esox masquinongy* (Mitchill), in Lake St Clair, Michigan, USA reveals a new sublineage of the North American genotype. *J. Fish Dis.* 29:611–619.
- Fijan, N., D. Sulimanovic, M. Bearzotti, D. Muzinic, L. O. Zwillenberg, S. Chilmonczyk, J. F. Vautherot, P. de Kinkelin**, 1983. Some properties of the epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell line from carp (*Cyprinus carpio*). *Annales de l'Institut Pasteur Virologie*, 134 E, 207–220.
- Lopez-Lastra, M., M. Gonzalez, M. Jashes, and A. M. Sandino**, 1994. A detection method for infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) based on reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR). *J. Fish Dis.* 17:269–282.
- Miller, T., A. J. Rapp, U. Wastlhuber, R. W. Hoffmann, P. J. Enzmann**, 1998. Rapid and enzyme sensitive reverse transcriptase polymerase chain reaction based detection and differential diagnosis of fish pathogenic rhabdoviruses in organ samples and cultured cells, *Dis. Aquat. Org.*, 34, 13-20.
- Mortensen, H. F, O. E. Heuer, N. Lorenzen, L. Otte, N. J. Olesen**, 1999. Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild marine fish species in the Baltic Sea, Kattegat, Skagerrak and the North Sea. *Virus Research* 63, 97-108.
- Mortensen, H. F.**, 1999. Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild marine fish species in the Baltic Sea, Kattegat, Skagerrak and the North Sea. *Vir. Res.* 63: 95-106.
- Olesen, N. J., N. Lorenzen, S. La Patra**, 1999. Production of neutralizing antisera against viral hemorrhagic septicaemia (VHS) virus by intravenous injections of rabbits. *Journal of Aquatic Animal Health* 11, 10-16.
- Olesen, N. J., N. Lorenzen, P. E. V. Jørgensen**, 1993. Serological differences among isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus detected by neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies. *Diseases of Aquatic Organisms* 16, 163-170.
- Raja-Halli, M, T. K. Vehmas, E. Rimaila-Parnanen, S. Sainmaa, H. F. Skall, N. J. Olesen, H. Tapiovaara**, 2006. Viral haemorrhagic septicaemia (VHS) outbreaks in Finnish rainbow trout farms. *Dis. Aquat. Org.*, 72:201–211
- Schutze, H, E. Mundt, T. C. Mettenleiter**, 1999. Complete genomic sequence of viral hemorrhagic septicaemia virus, a fish rhabdovirus. *Virus Genes*, 19:59–65
- Skall, H. F., N. J. Olesen, S. Møllergaard**, 2005. Viral haemorrhagic septicaemia virus in marine fish and its implications for fish farming: a review. *J. Fish Dis.*, 28:509–529
- Snow, M., C. O. Cunningham, W. T. Melvin, G. Kurath**, 1999. Analysis of the nucleoprotein gene identifies distinct lineages of viral haemorrhagic septicaemia virus within the European marine environment. *Virus Res.* 63, 35–44.
- Snow, M, N. Bain, J. Black, V. Taupin, O. Cunningham, J. A. King, H. F. Skall, R. S. Raynard**, 2004. Genetic population structure of marine viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV). *Dis. Aquat. Org.*, 61, 11-21.
- Stone, D. M., K. Way, P. F. Dixon**, 1997. Nucleotide sequence of the glycoprotein gene of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) viruses from different geographical areas: A link between VHS in farmed fish species and viruses isolated from North Sea cod (*Gadus morhua* L.). *J. Gen. Virol.*, 78: 1319-1326.

20. Walker P. J. , A. Benmansour, R. Dietzgen, R. X. Fang, 2000. Family Rhabdoviridae. In: Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB and others (eds) Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Academic Press, San Diego, CA, 563–583

21. Winton, J. R., K. Einer-Jensen, 2002. Molecular diagnosis of infectious haematopoietic necrosis and viral

hemorrhagic septicemia. In: Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases. Cunningham C.O., ed. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, 49–79.

22. Wolf, K, M. Gravell, R. G. Malsberger, 1966. Lymphocystis virus: isolation and propagation in centrarchid fish cell lines. Science, 151:1004–1005

VIRAL HEMORRHAGIC SEPTICEMIA VIRUS ISOLATES FROM FARMED TROUT IN BULGARIA: ETIOLOGY AND MOLECULAR CHARACTERIZATION

V. Chikova, E. Mileva

National diagnostic research veterinary medical institute - Sofia

SUMMARY

Viral haemorrhagic septicemia (VHS) in trout is an acute viral disease listed by the OIE. In Bulgaria, the virus has also been established repeatedly. Sequence analysis on the phylogeny of the strains allow assigning to two different genotypes. One of them from Scandinavian region – unrepresentative but apparently market performance. Molecular methods developed in the Bulgarian NRL for fish diseases, allowing fast and accurate diagnosis, tracing the origins of the isolated strains and the ways of their penetration in the country.

Key words: *VHS, sequence analysis, molecular diagnosis, phylogenetic tree.*

katrin_r@abv.bg