

# Filogenetyczna analiza wirusa wiosennej wiremii karpia SVC identyfikowanego na terenie Polski

JOANNA MAJ-PALUCH, EWA BORZYM, MAREK MATRAS,  
MAGDALENA STACHNIK, MICHAŁ REICHERT

Zakład Chorób Ryb, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach,  
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Otrzymano 14.05.2018

Zaakceptowano 12.07.2018

Maj-Paluch J., Borzym E., Matras M., Stachnik M., Reichert M.

## Phylogenetic analysis of spring viremia of carp virus (SVCV) identified in Poland

### Summary

Spring viremia of carp (SVC) is a disease caused by a virus belonging to the genus *Vesiculovirus*, family *Rhabdoviridae*. The SVC virus is divided into four genogroups, Ia, Ib, Ic, and Id, due to its geographical distribution. This study aimed to identify the genotype of the SVC virus circulating in Poland. Polish SVC virus isolates were propagated on EPC and FHM cell lines, and genetic material (RNA) was isolated. The virus was detected in test samples by reverse transcription, sequenced and analyzed using MEGA 6.06 software. The phylogenetic tree was constructed by the Neighbor-Joining method. The results of phylogenetic analysis revealed the presence of two genogroups of the SVC virus in Poland. Most of Polish isolates belonged to the genogroup Id, as do isolates AY196200 from the Czech Republic, Z37505 from Belgium and EF593149 from the United States. Only two Polish isolates from Silesian Voivodeship were more closely related to Chinese and US isolates belonging to the genogroup Ia. There were no isolates belonging to the genogroups Ib and Ic. Nucleotide sequence analysis revealed certain point mutations between particular isolates. Knowledge on the genetic variants of the SVC virus circulating in Poland will be useful in epizootic investigations and preventive measures to protect Polish aquaculture from new variants from the neighboring countries.

**Keywords:** spring viremia of carp, phylogenetic analysis, cytopathic effect

Wiosenna wiremia karpia jest chorobą wywołaną przez wirusa SVC (*spring viremia of carp*) należącego do rodzaju *Vesiculovirus*, rodziny *Rhabdoviridae*. Materiałem genetycznym wirusa SVC jest kwas rybonukleinowy (RNA). Niesegmentowany genom wirusa składa się z 11,019 nukleotydów kodujących pięć głównych białek: nukleoproteinę (N), fosfoproteinę (P), białko macierzy (M), glikoproteinę (G), RNA zależną polimerazę (L) (6, 14). Wirus dostaje się do gospodarza przez skrzela, a stąd rozprzestrzenia się na wątrobę, nerkę, śledzionę, układ pokarmowy. Może być identyfikowany również w odchodach. W efekcie ingerencji wirusa pojawiają się problemy z oddychaniem, brak koordynacji ruchowej, ryby zaczynają pływać na boku. Obserwuje się również wysadzenie gałek ocznych, obrzęk ciała związany z obecnością płynu w jamie ciała oraz wybroczyny w skórze, oczach i u nasady płetw (2, 15).

Pierwszy raz wirus SVC był wyizolowany w Jugosławii w 1970 r., skąd rozprzestrzenił się na inne kraje centralnej i południowej Europy. Jego obecność

diagnozowano w USA, Kanadzie, Chinach i Brazylii (7-9, 11). Najczęściej występuje u karpia (*Cyprinus carpio*) i karpia koi (*Cyprinus carpio*), rzadziej jego obecność identyfikowano u innych ryb karpiowatych np. amurów (*Ctenopharyngodon idella*), tołpyg białych (*Hypophthalmichthys molitrix*) i pstrych (*Aristichthys mobilis*), karasi srebrzystych (*Carassius auratus*) i pospolitych (*Carassius carassius*) czy linów (*Tinca tinca*) (2). Wirus atakuje ryby głównie wiosną, gdy po zimie temperatura wody wzrasta (1, 4).

Polska jest krajem, który obok Niemiec jest największym importerem karpia w Europie, jednak rozmiar europejskiej akwakultury wydaje się znikomy w porównaniu z akwakulturą azjatycką. (13). Według danych FEAP z 2017 r. Polska i Czechy znajdują się na pierwszym miejscu w Europie w produkcji karpia – 18 000 ton rocznie. W związku z powyższymi danymi ważne jest, aby karp polski był jak najlepszy jakościowo i wolny od chorób, w tym również od wiosennej wiremii karpia, herpeswirusa koi (3) czy wirusa obrzęku karpia (12), czyli głównych chorób

karpi. W przeciwnym razie poważne konsekwencje dotknęłyby hodowców tych ryb, a tym samym polską akwakulturę, dlatego ważne jest monitorowanie stanu zdrowotnego karpia i ryb karpiowatych. W ostatnich latach obserwuje się spadek przypadków zachorowań na wiosenną wiremę karpia. Może to wynikać zarówno z większej świadomości hodowców, jak i dbałości o jakość produkowanych karpia, ale też może być to wynik nie zgłaszania do laboratoriów przypadków chorób ryb. Mimo to, wirus wiosennej wiremii karpia jest stale obecny na terenie Polski, ponieważ pojedyncze przypadki są diagnozowane przez laboratoria ZHW, głównie w Bydgoszczy oraz Zakład Chorób Ryb Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach (ZCHR PIWet-PIB). Pierwszy przypadek wirusa został zdiagnozowany w 2000 r. przez zespół wirusologiczny ZCHR PIWet-PIB.

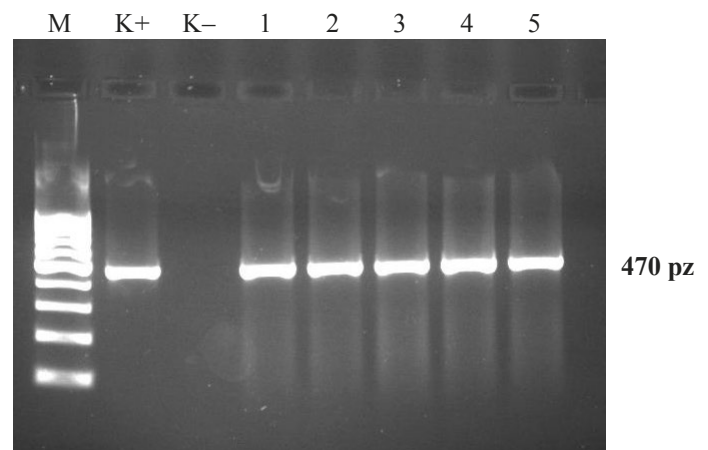
Analiza filogenetyczna bazująca na regionie genu glikoproteiny pozwoliła podzielić izolaty SVCV ze względu na rozmieszczenie geograficzne na 4 genogrupy: Ia zawiera izolaty pochodzące z Azji, genogrupy Ib i Ic zawierają izolaty z Mołdawii, Ukrainy, Rosji, natomiast genogrupa Id – izolaty z Europy, UK i części byłego Związku Radzieckiego (5, 11, 16, 17). Celem badań była analiza filogenetyczna i określenie przynależności izolatów wirusa wiosennej wiremii karpia występujących na terenie Polski do odpowiedniej genogrupy.

### Materiał i metody

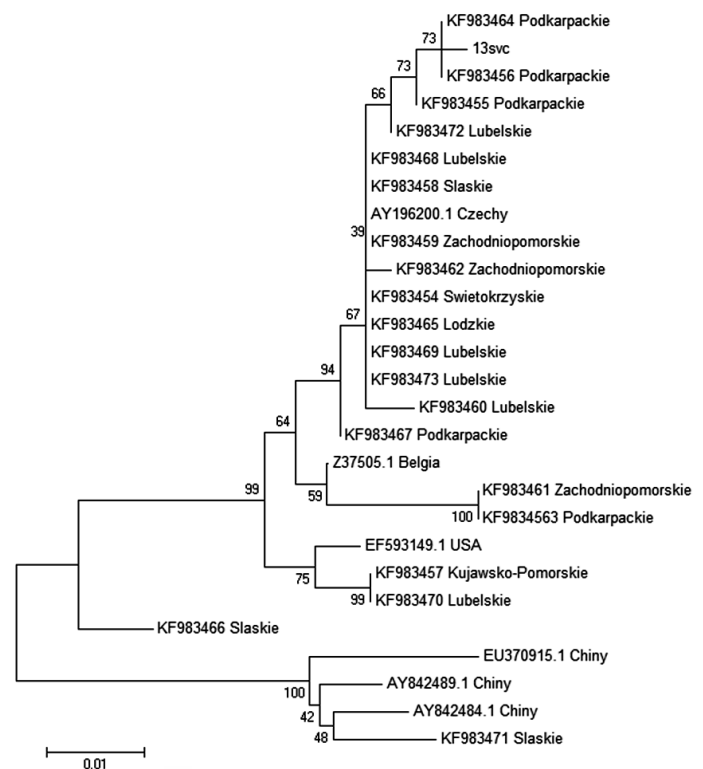
Od 2000 do 2017 r. zebrano łącznie 21 próbek z różnych województw Polski. Próbki do badania pochodziły z karpiowych gospodarstw rybackich zlokalizowanych na terenie Polski, głównie w części południowej i południowo-wschodniej. Tylko jedna badana próbka w ilości 30 sztuk ryb pochodziła od karasi, pozostałe od karpia. Narządy wewnętrzne (nerka, serce) od maksimum 10 ryb były łączone w jedną zbiorczą próbkę, następnie poddawane obróbce poprzez homogenizowanie wraz z płynem transportowym złożonym z następujących komponentów: Eagle's MEM, antibiotic-antimycotic z buforem Tris, pH 7,6. Przygotowane próbki wirowano przez 15 minut, przy prędkości  $3000 \times g$ . Supernatant filtrowano za pomocą sączków  $0,45 \mu\text{m}$ , a następnie zakazano przygotowane wcześniej linie komórkowe.

**Izolacja wirusa w liniach komórkowych.** Do izolacji wirusa SVC wykorzystano linie komórkowe EPC (*epithelioma papulosum cyprini* – komórki epitelialne karpia) i FHM (Fat head minnow – komórki epitelialne ciernika promienistego) przygotowane na płytkach 24-dołkowych ze świeżym medium (buforowany Eagle's MEM z Trisem i 10% surowicą bydlęcą). Następnie przygotowane linie komórkowe zakazano 150  $\mu\text{l}$  supernatantu z homogenatu badanej próbki i inkubowano w cieplarni w temperaturze  $21^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ . Po otrzymaniu efektu cytopatycznego komórki linii komórkowej zbierano w celu izolacji materiału genetycznego RNA wirusa SVC.

**Izolacja RNA.** Do izolacji RNA użyto komercyjnego zestawu Total RNA Mini, firmy A&A Biotechnology i po-



**Ryc. 1. Elektroforegram potwierdzający obecność materiału genetycznego wirusa SVC o wielkości 470 par zasad**  
Objaśnienia: M – marker wielkości; K+ kontrola dodatnia, materiał odniesienia – RNA izolatu referencyjnego; K – kontrola ujemna; 1-5 – RNA badanych próbek terenowych



**Ryc. 2. Drzewo filogenetyczne skonstruowane przy użyciu metody Neighbor-Joining i programu Mega 6.06**

stępowano według instrukcji producenta. RNA rozpuszczano w 100  $\mu\text{l}$  wody czystej od RNAz i przechowywano w temperaturze poniżej  $-20^\circ\text{C}$  do dalszych analiz.

Reakcję odwrotnej transkrypcji i amplifikacji cDNA przeprowadzano przy użyciu zestawu Super Script One Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen, USA). Mieszanka reakcyjna zawierała 5  $\mu\text{l}$  of RNA, 2  $\times$  Reaction Mix (zawierający mieszaninę 0,4 mM dNTP-ów oraz 2,4 mM  $\text{MgSO}_4$ ), RT/Platinum Taq mix, 10  $\mu\text{M}$  specyficzne startery oraz wolną od RNAz wodę. Startery specyficzne dla genu glikoproteiny (G) zaprojektowane przez Koutna i wsp. (11) umożliwiały amplifikację fragmentu wielkości 470 pz. Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono w następujących warunkach temperaturowo-czasowych:  $50^\circ\text{C}$

przez 30 min wraz ze wstępną denaturacją 2 min w 94°C, następnie zastosowano 35 cykli składających się z denaturacji 15 sek. w 94°C, hybrydyzacji starterów przez 1 min w 52°C oraz elongacji łańcucha przez 1 min w 68°C. Proces amplifikacji zakończono elongacją trwającą 7 min w temp. 68°C. Jako dodatkowej kontroli użyto izolatu referencyjnego SVCV 56/70, należącego do genogrupy Id, wyizolowanego w 1970 r. od karpia. Izolat ten został opisany przez Stone'a i wsp. (17), a jego sekwencja dostępna jest w Gene Bank pod numerem AJ538061. Produkt reakcji PCR uwidaczniano w 2% żelu agarozowym z bromkiem etydyny. Wielkość produktu, tak jak oczekiwano, odpowiadał 470 pz (ryc. 1). Otrzymane produkty sekwencjonowano w firmie Genomed w Warszawie, a następnie analizowano je za pomocą programów: FinchTV 1.4.0. oraz Mega 6.06. Większość sekwencji polskich izolatów została zamieszczona w bazie Gene Bank, otrzymując swój numer akcesyjny. Drzewo filogenetyczne skonstruowano za pomocą metody najbliższego sąsiada Neighbour-Joining w programie MEGA 6.06 (ryc. 2). Podobieństwo między izolatami określono na za pomocą programu CLUSTAL Omega (tab. 3).

Tab. 1. Izolaty użyte w celu skonstruowania drzewa filogenetycznego metodą neighbour-joining

Nazwa izolatu	Miejsce pochodzenia wirusa (kraj, województwo)	Gatunek ryby	Rok izolacji wirusa
KF983454	Polska, świętokrzyskie	<i>Cyprinus carpio</i>	2010
KF983455	Polska, podkarpackie	<i>Cyprinus carpio</i>	2010
KF983456	Polska, podkarpackie	<i>Cyprinus carpio</i>	2010
KF983457	Polska, kujawsko-pomorskie	<i>Cyprinus carpio</i>	2006
KF983458	Polska, śląskie	<i>Cyprinus carpio</i>	2008
KF983459	Polska, zachodniopomorskie	<i>Cyprinus carpio</i>	2008
KF983460	Polska, lubelskie	<i>Cyprinus carpio</i>	2010
KF983461	Polska, zachodniopomorskie	<i>Cyprinus carpio</i>	2005
KF983462	Polska, zachodniopomorskie	<i>Cyprinus carpio</i>	2005
KF983463	Polska, podkarpackie	<i>Cyprinus carpio</i>	2005
KF983464	Polska, podkarpackie	<i>Cyprinus carpio</i>	2005
KF983465	Polska, łódzkie	<i>Cyprinus carpio</i>	2004
KF983466	Polska, śląskie	<i>Crucian carp, Carassius carassius L.</i>	2000
KF983467	Polska, podkarpackie	<i>Cyprinus carpio</i>	2001
KF983468	Polska, lubelskie	<i>Cyprinus carpio</i>	2002
KF983469	Polska, lubelskie	<i>Cyprinus carpio</i>	2004
KF983470	Polska, lubelskie	<i>Cyprinus carpio</i>	2000
KF983471	Polska, śląskie	<i>Cyprinus carpio</i>	2011
KF983472	Polska, lubelskie	<i>Cyprinus carpio</i>	2011
KF983473	Polska, lubelskie	<i>Cyprinus carpio</i>	2012
13svc	Polska, wielkopolskie	<i>Cyprinus carpio</i>	2013
AY196200	Czechy	<i>Cyprinus carpio</i>	-
Z37505.1	Belgia	<i>Cyprinus carpio</i>	-
EF593149	USA	<i>Cyprinus carpio</i>	-
EU370915	Chiny	<i>Cyprinus carpio</i>	-
AY842489	Chiny	<i>Cyprinus carpio</i>	-
AY842484	Chiny	<i>Cyprinus carpio</i>	-

## Wyniki i omówienie

We wszystkich badanych próbkach w pierwszym pasażu obserwowano efekt cytopatyczny (CPE), zarówno na linii komórkowej EPC, jak i FHM. Reakcja odwrotnej transkrypcji potwierdziła obecność wirusa SVC w komórkach i supernatancie z linii komórkowych poprzez obecność specyficznych prążków w żelu agarozowym. Otrzymane sekwencje polskich izolatów porównano do sekwencji izolatów pochodzących z bazy Gene Bank. Dane na temat wykorzystanych izolatów do konstrukcji drzewa filogenetycznego zamieszczono w tab. 1.

Większość polskich izolatów wirusa SVC tworzy jedną genogrupę Id, z której można wyodrębnić trzy podgrupy. Izolaty z podgrupy pierwszej wykazują duże podobieństwo do izolatu AY196200 pochodzącego z Czech, co mogłoby sugerować niekontrolowany handel z tym państwem. Podgrupa zawierająca izolaty KF983461 oraz KF983463 jest bliżej spokrewniona z belgijskim izolatem referencyjnym Z37505 zwanym

Fijan, od nazwiska odkrywcy. Kolejną podgrupę tworzą izolaty KF983457 oraz KF983470 wraz z izolatem EF593149 pochodzącym ze Stanów Zjednoczonych.

Odrębną genogrupę Ia tworzą izolaty pochodzące z Chin i Stanów Zjednoczonych do których duże podobieństwo wykazują polskie izolaty KF983466

Tab. 2. Mutacje punktowe: tranzycje i transwersje między izolatami pochodzącymi z genogrupy Ia i Id

Pozycja w genie	Zmiana punktowa
3	C → T
25	A → G
48	G → A
78	G → A
96	G → A
100	C → T
105	A → G
120	C → T
129	T → C
138	C → T
159	T → C
210	C → A
240	A → G
246	G → A
252	C → T
261	T → C
312	C → T
318	T → C
360	C → T





3. *Antychowicz J., Reichert M., Matras M., Bergmann S. M., Haenen O.*: Epidemiology, pathogenicity and molecular biology of Koi herpesvirus isolated in Poland. *Bull. Vet. Inst.* 2005, 49, 367-373.
4. *Ashraf U., Lu Y., Lin L., Yuan J., Wang M., Liu X.*: Spring viraemia of carp virus: recent advances. *J. Gen. Virol.* 2016, 97, 1037-1051.
5. *Basic A., Schachner O., Bilic I., Hess M.*: Phylogenetic analysis of spring viraemia of carp isolates from Austria indicates the existence of at least two subgroups within genogroup Id. *Dis. Aquat. Org.* 2009, 85, 31-40.
6. *Carsten E. B.*: Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* 2010, 155, 133-146.
7. *Fijan N.*: Infectious dropsy in carp – a disease complex. *Symposia of the Zoological Society of London* 30. 1972, 39-51.
8. *Fijan N.*: Spring viremia of carp and other viral diseases of warm-water fish, [w:] *Fish Disease and Disorders* Vol. 3, ed. by P.T.K. Woo & D.W. Bruno, CAB International, London 1999, s. 177-244.
9. *Garver K. A., Dwilow A. G., Richard J., Booth T. F., Beniac D. R., Souter B. W.*: First detection and confirmation of spring viraemia of carp virus in common carp, *Cyprinus carpio* L., from Hamilton Harbour, Lake Ontario, Canada. *J. Fish. Dis.* 2007, 30, 665-671.
10. *Goodwin A. E.*: Spring Viremia of Carp Virus (SVCV). *Global Status of Outbreaks, Diagnosis, Surveillance and Research.* *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh.* 2009, 61, 180-187.
11. *Koutna M., Veseley T., Psikal I., Hulova J.*: Identification of spring viraemia of carp virus (SVCV) by combined RT-PCR and nested PCR. *Dis. Aquat. Org.* 2003, 55, 229-235.
12. *Lirski A.*: Stan gospodarki karpiovej w Unii Europejskiej w Chów karpia w Europie – stan obecny, trudności, perspektywy. *Wydawnictwo Instytutu Rybactwa Śródlądowego, Olsztyn* 2011, 15-23.
13. *Matras M., Borzym E., Stone D., Way K., Stachnik M., Maj-Paluch J., Palusińska M., Reichert M.*: Carp edema virus in Polish aquaculture – evidence of significant sequence divergence and a new lineage in common carp *Cyprinus carpio* (L.). *J. Fish Dis.* 2017, 40, 319-325.
14. OIE – *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Organism.* Chapter 2.3.9, 2017, 1-18.
15. *Prost M.*: Choroby ryb. *Wisenna wiremia karpia (SVC).* Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa 1989, s. 53-63.
16. *Sheppard A. M., Le Deuff R.-M., Martin P. D., Woolford G., Way K., Stone D. M.*: Genotyping spring viraemia of carp virus and other piscine vesiculo-like viruses using reverse hybridisation. *Dis. Aquat. Org.* 2007, 76, 163-168.
17. *Stone D. M., Ahne W., Denham K. L., Dixon P. F., Liu C. T.-Y., Sheppard A. M., Taylor G. R., Way K.*: Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp virus and pike fry rhabdovirus isolates reveals four genogroups. *Dis. Aquat. Org.* 2003, 53, 203-210.

**Adres autora: mgr inż. Joanna Maj-Paluch, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: joanna.maj@piwet.pulawy.pl**