

Praca oryginalna

Original paper

Analiza filogenetyczna polskich szczepów wirusa posocznicy krwotocznej ryb^{*})

ALEKSANDRA RUSZCZYK, EDWARD GRAWIŃSKI*, ADA SCHOLLENBERGER, ZUZANNA NOWAK**, MAREK NIEMIAŁTOWSKI

Zakład Immunologii Katedry Nauk Przedklinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

*Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Kaprów 10, 80-316 Gdańsk-Oliwa

**Zakład Genetyki Molekularnej Katedry Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt Wydziału Nauk o Zwierzętach SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Ruszczyk A., Grawiński E., Schollenberger A., Nowak Z., Niemiałtowski M.

Phylogenetic analysis of Polish strains of viral hemorrhagic septicemia virus

Summary

Viral hemorrhagic septicemia (VHS) is an emerging disease posing a threat to the European rainbow trout industry. In Poland VHS is diagnosed in every fifth rainbow trout farm. Glycoprotein encoded by gene G of VHSV facilitates virus entrance into the cell and is an important antigen responsible for neutralizing antibody production. Based on sequence analysis of this gene 4 major genotypes of VHSV, with many different sub-groups, have been established. To analyze several Polish strains of VHSV we applied one step RT-PCR and semi-nested PCR for detecting and sequencing the gene encoding variable fragment of virus glycoprotein. We tested 28 samples of spleen and liver from rainbow trout of various sizes (70-300 g). The fish originated from 10 different farms in North-west Poland. Ten virus strains from 3 different rainbow trout farms were isolated in EPC. They were subsequently proved to be VHSV by means of the RT-PCR method. Semi-nested PCR appeared to be more sensitive, since 12 samples out of 28 were identified as being VHSV positive, whereas only 6 samples were positive using RT-PCR. Sequences of gene encoding variable glycoprotein fragments (320 bp) of 5 randomly chosen Polish VHSV strains appeared to be identical, indicating the common origin of VHS outbreaks in all examined rainbow trout farms. Phylogenetic analysis was performed using sequences of one representative Polish VHSV strain and sequences of 22 strains belonging to 4 different genotypes as was previously published. In accordance with earlier results all the VHSV strains sequences were clustered in 4 genotypes. Polish VHSV strain clustered in genotype Ia as did other continental strains of VHSV.

Keywords: VHSV, rainbow trout

Produkcja ryb łososiowatych w Europie wynosi około 234 068 t rocznie, zaś w Polsce około 11 000 t rocznie (7). Jedną z głównych przyczyn strat w hodowli tych ryb są choroby wirusowe, w tym, między innymi, wirusowa posocznica krwotoczna (VHS, viral haemorrhagic septicaemia), zakaźna martwica układu krwiotwórczego (IHN, infectious haematopoietic necrosis) oraz zakaźna anemia łososia (ISA, infectious salmon anaemia), które objęte są wytycznymi zawartymi w dyrektywach Unii Europejskiej (5, 6). W Polsce istotny problem w hodowli pstrąga tęczowego stanowi VHS, gdyż w co piątym badanym gospodarstwie pstrągowym stwierdzono występowanie wirusa tej choroby (VHSV) (1). Do gatunków wrażliwych na zakażenie VHSV należą zarówno ryby słodkowodne (pstrąg tęczowy, *Oncorhynchus mykiss*; pstrąg potokowy, *Salmo trutta m. fario*; szczupak, *Esox lucius*; lipień,

Thymallus thymallus), dwuśrodowiskowe (troć, *Salmo trutta m. trutta*; łosoś atlantycki, *Salmo salar*), jak i morskie (dorsz atlantycki, *Gadus morhua*; dorsz pacyficzny, *Gadus macrocephalus*; śledź pacyficzny, *Clupea pallasii*; turbot, *Scophthalmus maximus*). Jednak epizootie VHS pojawiają się najczęściej w hodowli pstrąga tęczowego, u którego śmiertelność wylęgu i narybku zakażonego VHSV w temperaturze 9-12°C sięgać może nawet 100%, podczas gdy u starszych ryb wynosi 10-50% (16).

VHSV należy do rodziny *Rhabdoviridae*, rodzaju *Novirhabdovirus* (14). Jego wirion stanowi typowy dla rodziny *Rhabdoviridae* kapsyd w kształcie pocisku otoczony osłonką z glikoproteinowymi wypustkami oraz jednoniciowy, niesegmentowany RNA o ujemnej polarności. W skład genomu o długości 11 158 pz wchodzi 6 genów, z których pięć koduje białka strukturalne: gen N – białko nukleokapsydu, gen P – fosfo-

^{*}) Praca finansowana w ramach grantu wewnętrznego SGGW nr 50402340011.

proteinę, gen M – białko matrix, gen G – glikoproteinę, gen L – RNA polimerazę, zaś szósty – gen NV – koduje białko niestrukturalne występujące tylko w zakażonej komórce, którego rola do tej pory nie została wyjaśniona (2, 15).

Niezwykle istotną rolę w patogenezie VHS odgrywa glikoproteina, która umożliwia przyleganie i wnikanie wirusa do komórek oraz stymuluje odpowiedź immunologiczną zakażonego gospodarza, stanowiąc główny antygen indukujący produkcję przeciwciał neutralizujących (3, 4). W związku z tym gen G jest wykorzystywany do analizy filogenetycznej umożliwiającej porównanie stopnia genetycznego pokrewieństwa pomiędzy izolatami VHSV, co jest niezwykle istotne z punktu widzenia prowadzenia dochodzenia epizootycznego oraz lepszego zrozumienia biologii tego wirusa. Analiza filogenetyczna sekwencji genu G 62 szczepów VHSV pozwoliła na wyróżnienie czterech genotypów wirusa korelujących z geograficznym pochodzeniem badanych izolatów, ale nie z gatunkiem ryb, od których je wyizolowano (8). Szczepy pochodzące od ryb morskich pojawiły się we wszystkich czterech genotypach, natomiast izolaty od ryb słodkowodnych należały do genotypu I. Genotyp I charakteryzuje się największą zmiennością i w związku z tym wyodrębniono w nim dodatkowe podgrupy. Badania przeprowadzone przez Einer-Jensen i wsp. (8) wykazały, że szczepy morskie VHSV adaptowały się do pstrąga tęczowego najprawdopodobniej kilkakrotnie w ciągu ostatnich 50 lat, wciąż stanowiąc potencjalne zagrożenie dla hodowli ryb słodkowodnych.

Celem badań było opracowanie czułego testu do wykrywania zakażeń VHSV u ryb chorych i nosicieli oraz przeprowadzenie analizy filogenetycznej polskich szczepów VHSV.

Materiał i metody

Ryby. Przebadań przeprowadzono na 28 próbkach pobranych od pstrągów tęczowych o masie od 70 do 300 g. Ryby pochodziły z 10 gospodarstw pstrągowych z terenu północno-zachodniej Polski. Objawy kliniczne ostrego VHS wykazywały ryby z gospodarstw numer 1, 3, i 4. Ryby z pozostałych gospodarstw nie wykazywały żadnych objawów klinicznych. Część fragmentów śledziony i nerki zawieszano w 1 ml odczynnika TizoTM (Invitrogen), a część w płynie transportowym (płyn lubelski) w stosunku 1 : 5 w celu izolacji RNA i izolacji wirusa w hodowli komórkowej. Następnie pobrane próbki przechowywano w -20°C do czasu wykonania odpowiedniego badania.

Hodowle komórkowe i referencyjne szczepy wirusowe. Izolację i namnażanie terenowych i referencyjnych szczepów VHSV przeprowadzono w temperaturze 15°C w hodowli komórek nabłonka karpia (EPC, *epithelioma papulosum cyprini*) Hodowlę EPC uzyskano dzięki uprzejmości dr Olgi L.M. Haenen z holenderskiego referencyjnego laboratorium chorób ryb w Lelystad. Szczepy stan-

Tab. 1. Startery i warunki reakcji RT-PCR i semi-nested PCR dla genu G VHSV

Test	Startery dla genu G VHSV	Warunki reakcji	Produkt
RT-PCR	VHSP1: 5' CAGGGTGGTCAAGGCAAT 3' VHSP2: 5' GAATGACCAATCCGAAGG 3'	42°C – 60 min. 95°C – 5 min. 95°C – 40 sek. 54°C – 1 min. 72°C – 50 sek. 72°C – 10 min.	35 × 679 pz
semi-nested PCR	VHSP1: 5' CAGGGTGGTCAAGGCAAT 3' VHSP3: 5' TGGGACGAACTTTGAGAGG 3'	95°C – 5 min. 95°C – 40 sek. 55°C – 40 sek. 72°C – 50 sek. 72°C – 10 min.	30 × 320 pz

dardowe VHSV: DK-F1 i DK-3592B oraz IHNV 32/87 uzyskano dzięki uprzejmości dr. Nielsa J. Olesena z referencyjnego laboratorium chorób ryb UE w Arhus, Dania.

Izolacja RNA. Całkowite RNA z próbek zawieszonych w odczynniku TrizolTM izolowano wg zaleceń producenta i zawieszano w 20-40 µl wody wolnej od RNaz. Analizę ilości i jakości uzyskanego RNA przeprowadzono przy pomocy spektrofotometru Termo Spectronic (Biometra GmbH).

RT-PCR i semi-nested PCR. Reakcję jednostopniowego RT-PCR przeprowadzono w aparacie TGradient (Biometra) w warunkach przedstawionych w tab. 1. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły: 1 µg badanego RNA, 1 µl 10 mM starterów VHSP1 i VHSP2 (tab. 1), 1 µl 10 mM dNTP (Sigma), 1 U Taq polimerazy (Fermentas), 100 U odwrotnej transkryptazy MMLV (Promega) oraz bufor dla MMLV. Całość uzupełniano wodą do objętości 25 µl. Reakcję semi-nested PCR przeprowadzono przy użyciu 1 µl 10 mM starterów VHSP1 i VHSP3 w warunkach przedstawionych w tabeli 1. Ponadto w skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły: 1 µl DNA, 1 µl 10 mM dNTP, 1 U Taq polimerazy (Fermentas) oraz bufor dla polimerazy. Całość uzupełniano wodą do objętości 50 µl. Kontrolę pozytywną RT-PCR oraz nPCR stanowiły referencyjne szczepy VHSV: DK-F1 i DK-3592B, zaś kontrolę negatywną referencyjny szczep IHNV 32/87 i niezakażona hodowla komórkowa. Produkty RT-PCR i nPCR analizowano na 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny i wykonywano dokumentację fotograficzną. Czułość testów RT-PCR oraz semi-nested PCR określono przy użyciu kolejnych, 10-krotnych rozcieńczeń RNA standardowego szczepu VHSV DK-F1.

Izolacja i identyfikacja wirusa. Materiał pobrany w celu izolacji wirusa homogenizowano i odwirowywano przy 3000 g przez 15 min. w 4°C. Supernatant dodawano do wrażliwej na zakażenie hodowli komórek EPC i inkubowano w 15°C przez 10 dni. Wynik uznawano za ujemny, jeśli po wykonaniu pierwszego pasażu nie obserwowano efektu cytopatycznego wywoływanego przez wirus. Wyizolowane szczepy VHSV identyfikowano przy użyciu techniki RT-PCR.

Sekwencjonowanie i analiza filogenetyczna. Produkty semi-nested PCR uzyskane po amplifikacji materiału pochodzącego bezpośrednio z badanych narządów przygotowywano do sekwencjonowania przy pomocy zestawu do oczyszczania DNA po reakcjach enzymatycznych (DNA Gdańsk). Uzyskany fragment sekwencjonowano w obu kierunkach przy użyciu starterów VHSP1 i VHSP3. Sekwen-

Tab. 2. Wynik RT-PCR, nPCR i izolacji wirusa w hodowli EPC

Gospodarstwo	Liczba badanych próbek	Pozytywny wynik RT-PCR	Pozytywny wynik nPCR	Pozytywny wynik izolacji wirusa w hodowli EPC**
1	6	2	6	5
3	5	3	5	4
4	1*	1	1	1

Objaśnienia: * – próbka zbiorcza z 10 ryb; ** – wszystkie wyizolowane szczepy zidentyfikowano jako VHSV przy użyciu testu RT-PCR

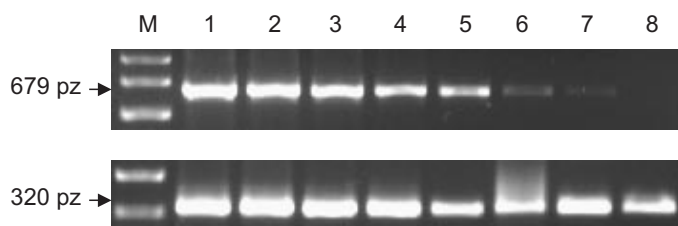
Sekwencjonowanie wykonano metodą Sangera przy pomocy Big-Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) w aparacie AbiPrism® 3100 Genetic Analyser. Kontrolę sekwencjonowania stanowiły produkty semi-nested PCR standardowych szczepów VHSV: DK-F1 oraz DK-3592B. Porównanie nukleotydowej sekwencji i przewidywanej sekwencji aminokwasowej fragmentu genu G polskich szczepów oraz 22 szczepów VHSV dostępnych w bazie danych EMBL przeprowadzono po wykluczeniu sekwencji starterów przy użyciu programu Mega 2 (9). Analizie filogenetycznej poddano sekwencję jednego reprezentacyjnego szczepu polskiego oraz 22 sekwencji szczepów będących przedstawicielami 4 genotypów VHSV dostępnych w bazie danych GenBank (tab. 2). Na podstawie wybranych sekwencji wyliczono dystans genetyczny oraz skonstruowano drzewo filogenetyczne przy zastosowaniu programu Mega 3.1 (9). Dystans genetyczny został wyliczony przy użyciu metody Tamura-Nei (12). Do konstrukcji drzewa filogenetycznego na podstawie badanych sekwencji wykorzystano metodę największej oszczędności (maximum parsimony, DNAPARS), najbliższego sąsiada (neighbor-joining, NJ) i najwyższej wiarygodności (maximum likelihood, DNAML). Moc wyjaśniającą powstałego drzewa sprawdzono metodą bootstrap, przeprowadzając 1000 powtórzeń.

Wyniki i omówienie

RT-PCR i seminested PCR. Przy użyciu techniki jednostopniowego RT-PCR uzyskano produkt wielkości 679 pz, zaś nPCR produkt wielkości 320 pz. Obecność wybarwionego bromkiem etydyny prążka po reakcji RT-PCR stwierdzano przy rozcieńczeniu 10^{-6} RNA szczepu DK-F1 (880 fg), zaś w reakcji nPCR czułość wzrastała 10-krotnie i widzialny na żelu prążek pojawiał się przy rozcieńczeniu 10^{-7} RNA tego szczepu (88 fg) (ryc. 1). Obecność wirusowego RNA w badanych próbkach stwierdzono w gospodarstwach nr 1, 3 i 4 (tab. 2), natomiast w pozostałych 7 badanych gospodarstwach wszystkie próbki były negatywne.

Izolacja i identyfikacja wirusa. Z 28 badanych próbek we wrażliwej na zakażenie hodowli EPC wyizolowano 10 szczepów wirusa z materiału pochodzącego z gospodarstw 1, 3 i 4. Uzyskane szczepy zidentyfikowano jako VHSV przy użyciu techniki RT-PCR (tab. 2).

Sekwencjonowanie i analiza filogenetyczna. Zsekwencjonowano produkty semi-nested PCR uzyskane

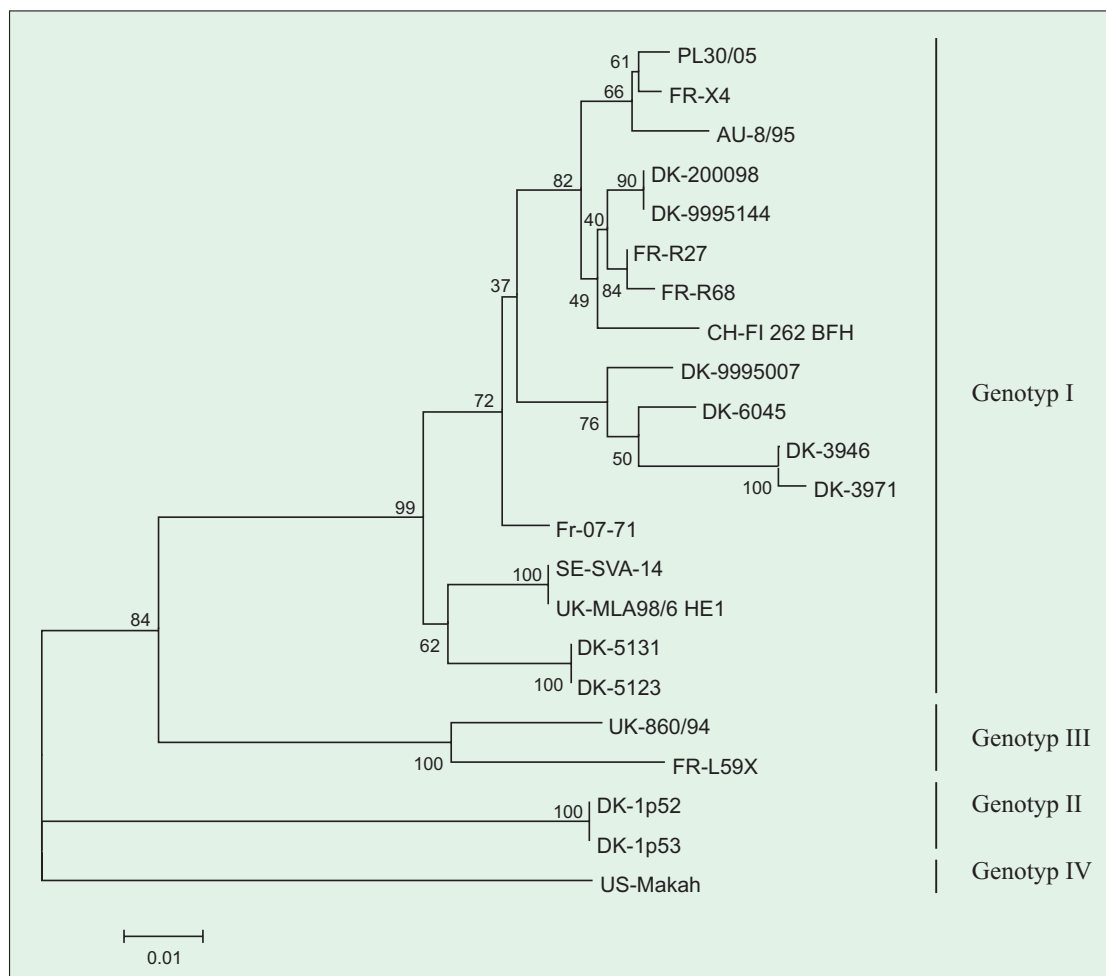


Ryc. 1. Czułość testu RT-PCR i seminested PCR. M – marker masy cząstkowej. 1 – szczep DK-F1. 2-8 – kolejne dziesięciokrotnie wzrastające rozcieńczenia RNA szczepu DK-F1

po amplifikacji materiału pochodzącego bezpośrednio z badanych narządów pięciu pstrągów tęczowych: dwóch z gospodarstwa nr 1 (PL11/05 i PL14/05), dwóch z gospodarstwa nr 3 (PL20/05 i PL22/05) i jednego z gospodarstwa nr 4 (PL30/05). Szczepy PL11/05 i PL14/05 oraz PL20/05 i PL22/05 pochodziły od pstrągów tęczowych z gospodarstw znajdujących się w miejscowości odpowiednio: Gościcino i Bolszewo, położonych na tym samym cieku wodnym. Szczep PL30/05 pochodził z innego gospodarstwa położonego w miejscowości Gościcino. Uzyskane sekwencje umieszczono w bazie danych GenBank pod numerem

Tab. 3. Dane dotyczące szczepów VHSV użytych do analizy filogenetycznej

Symbol szczepu	Data izolacji	Pochodzenie szczepu	Numer dostępu
PL-30/05	2005	Polska, pstrąg tęczowy	DQ897661
FR-X4	1999	Francja, szczupak	AJ487055
FR-R27	1993	Francja, pstrąg tęczowy	AJ487052
FR-R68	1993	Francja, pstrąg tęczowy	AJ487054
Fr-07-71	1971	Francja, pstrąg tęczowy	AY546616
FR-L59X	1987	Francja, węgorz	AY546618
AU-8/95	1995	Austria, pstrąg tęczowy	AY546571
CH-FI 262 BFH	1999	Szwajcaria, pstrąg tęczowy	AY546571
DK-200098	2000	Dania, pstrąg tęczowy	AY546604
DK-9995144	1999	Dania, pstrąg tęczowy	AY546602
DK-9995007	1999	Dania, pstrąg tęczowy	AY546601
DK-1p52	1996	Morze Bałtyckie, szprot	AY546576
DK-1p53	1996	Morze Bałtyckie, śledź	AY546577
DK-6045	1991	Dania, pstrąg tęczowy	AY546592
DK-5123	1988	Dania, pstrąg tęczowy	AY546588
DK-5131	1988	Dania, pstrąg tęczowy	AF345858
DK-3971	1987	Dania, pstrąg tęczowy	AY546587
DK-3946	1987	Dania, pstrąg tęczowy	AY546586
DK-3592B	1986	Dania, pstrąg tęczowy	X66134
SE-SVA-14	1998	Cieśnina Kattegat, pstrąg tęczowy	AY546622
UK-MLA98/6 HE1	1998	Morze Północne, śledź	AY546631
UK-860/94	1994	Szkocja, turbot	AY546628
US-Makah	1988	USA, łosoś kizucz	U28747



Ryc. 2. Drzewo filogenetyczne skonstruowane przy pomocy metody najbliższego sąsiada (neighbor-joining, NJ), na podstawie sekwencji fragmentu V2 glikoproteiny G reprezentacyjnego szczepu polskiego PL30/05 oraz 22 sekwencji szczepów będących przedstawicielami 4 genotypów VHSV dostępnych w bazie danych GenBank

dostępny DQ897660-DQ897664. Zsekwencjonowane jako kontrola fragmenty duńskich szczepów standardowych VHSV: DK-F1 i DK-3592B były zgodne z opublikowanymi wcześniej w bazie danych GenBank. Porównano produkty nPCR po wykluczeniu sekwencji starterów, o długości 282 nukleotydów (pozycja od 715 do 995 nukleotydu) oraz przewidywane sekwencje aminokwasowe polskich szczepów i 22 szczepów VHSV dostępnych w bazie danych GenBank (tab. 3). Wszystkie polskie badane szczepy miały 100% homologię porównywanej sekwencji. Stwierdzono, że największy procent homologii sekwencji nukleotydowej (99%) z polskimi szczepami VHSV wykazywał szczep FR-X4 wyizolowany w 1999 r. od szczupaka we Francji (18). Kolejno, 98% homologii z polskimi szczepami posiadały szczepy: FR-R68 i FR-R27 wyizolowane w 1993 r. od pstrągów tęczowych we Francji oraz szczep AU-8/95 wyizolowany w 1995 r. od pstrąga tęczowego w Austrii (8, 18). Stwierdzono, że różnice w sekwencji nukleotydowej pomiędzy polskimi szczepami VHSV a 22 szczepami z bazy danych GenBank wynikały z podstawień pojedynczych nukleotydów przy braku delekcji i/lub insercji. Zaistniałe różnice w sekwencji nukleotydowej nie prowadziły do

zmian w przewidywanej sekwencji aminokwasowej w stosunku do szczepów polskich w przypadku szczepu FR-X4. W przypadku szczepów FR-27 i FR-68 prowadziły do zmiany jednego aminokwasu w pozycji 258, zaś w przypadku szczepu AU-8/95 do zmiany dwóch aminokwasów w pozycji 258 i 290.

Uzyskane metodą NJ drzewo filogenetyczne przedstawione jest na ryc. 2. Podobne wyniki uzyskano przy użyciu metod: DNAPARS i DNAML. Wartości testu bootstrap powyżej 50 wskazują na istotną współzależność pogrupowanych sekwencji. Wszystkie sekwencje szczepów uzyskanych z bazy danych grupowały się tak, jak w opublikowanych

wcześniej pracach, tworząc 4 genotypy. Szczep polski znajdował się w grupie razem z izolatami FR-X4, AU-8/95, CH-F1, FR-R68, FR-R27, DK-9995144, DK-200098, DK-9995007, DK-3592B, DK-6045, FR-07-71 w obrębie podgrupy Ia genotypu I.

Badania przeprowadzone przez Antychowicza i wsp. (1) wykazały, że w Polsce 30% ryb jest bezobjawowymi nosicielami VHSV. Badania te przeprowadzone zostały przy pomocy tradycyjnych metod diagnostyki wirusologicznej: izolacji wirusa w hodowli komórkowej, testu ELISA, a także metod biologii molekularnej: RT-PCR. Wykazano, że najbardziej czułym testem do identyfikacji bezobjawowych zakażeń VHSV jest wykrywanie wirusowego RNA w bezpośrednio pobranych narządach metodą RT-PCR, a następnie nPCR (11). Miller i wsp. (11) opracowali test dwustopniowego RT-PCR, a następnie semi-nested PCR, który umożliwił identyfikację podklinicznie zakażonych osobników. Badania przeprowadzone na innym wirusie atakującym ryby – ISAV wykazały, że metoda jednostopniowego RT-PCR była dużo czulsza w porównaniu do dwustopniowego (10). W związku z tym, aby uprościć metodę oraz zwiększyć jej czułość, w tych badaniach opracowano test jednostopniowego RT-

-PCR, a następnie semi-nested PCR. Wykorzystane w tej pracy startery do RT-PCR zostały opracowane na podstawie porównania genu G kilkunastu szczepów VHSV dostępnych w bazie danych GenBanku tak, aby zawierały maksymalnie konserwatywne sekwencje. Po ich zaprojektowaniu okazało się, że starter VHSP1 jest niemalże identyczny ze starterem V2R, zaś starter VHSP2 jest identyczny ze starterem V2F – startery V2R i V2F zostały opisane w publikacji Thiéry i wsp. (18). Stwierdzono, że czułość opracowanych testów jest wysoka, jednak ich przydatność do wykrywania bezobjawowych nosicieli wirusa powinna zostać potwierdzona badaniami przeprowadzonymi na większej liczbie ryb.

Kolejnym celem niniejszych badań była analiza filogenetyczna polskich szczepów VHSV. Prowadzone do tej pory badania dotyczące ewolucji VHSV opierały się na szczepach pochodzących przede wszystkim z Europy Zachodniej i Północnej (Francji, Danii, Anglii i Szwecji) (8, 17, 18). Zgodnie z dostępnymi danymi piśmiennictwa niniejsza praca jest pierwszą, w której analizie poddano szczepy z Polski. W związku z tym, że glikoproteina VHSV jest niezwykle istotnym białkiem uczestniczącym zarówno w procesie zakażenia komórek, jak i indukowania produkcji przeciwciał neutralizujących, większość prac dotyczących analizy filogenetycznej szczepów VHSV opiera się na sekwencji tego genu (8, 13, 17, 18). Dlatego też, aby dokonać analizy genetycznej polskich szczepów VHSV wybrano fragment V2 glikoproteiny G, który wg Benmasour i wsp. (4) kumuluje większość mutacji, stanowiąc doskonałe narzędzie do przeprowadzania dochodzenia epizootycznego pojawiających się ognisk VHS.

Przeprowadzono także analizę reprezentacyjnej sekwencji szczepu polskiego oraz 22 sekwencji szczepów zagranicznych, z których zdecydowana większość (16) zostało użytych wcześniej do analizy filogenetycznej przez Einer-Jensen i wsp. (8). Trzy analizowane szczepy uzyskano od Thiéry i wsp. (18), zaś pozostałe trzy badane były przez obu autorów. Einer-Jensen i wsp. (8) porównywali sekwencje całego genu G 62 szczepów VHSV, uzyskując drzewo filogenetyczne z czterema genotypami, które korelowały z geograficznym pochodzeniem izolatu wirusa (8). Topologia drzewa filogenetycznego skonstruowanego w niniejszych badaniach przy użyciu fragmentu V2 glikoproteiny G, pokrywała się z wynikami uzyskanymi przez Einer-Jensen i wsp. (8), potwierdzając tym samym przydatność tej krótkiej sekwencji do analizy ewolucji VHSV.

Stu procentowa homologia wszystkich zsekwencjonowanych fragmentów genu glikoproteiny polskich szczepów VHSV świadczy o wspólnym źródle ognisk VHS w badanych gospodarstwach pstrągowych. Analiza filogenetyczna wykazała, że reprezentacyjny polski szczep VHSV grupował się tak, jak wszystkie szczepy tego wirusa z kontynentalnej Europy, w obrębie genotypu I. Szczep ten znajdował się w obrębie

podgrupy Ia razem z kilkoma szczepami z Francji i całą grupą szczepów z Danii. Szczep PL-30/05 wykazywał najbliższe pokrewieństwo ze szczepem FR-X4 wyizolowanym od szczupaka we Francji oraz szczepem AU8/95 wyizolowanym od pstrąga tęczowego w Austrii, co wskazuje na wspólne pochodzenie tych szczepów, a nie na wprowadzenie wirusa do polskich gospodarstw pstrągowych z niezależnego zewnętrznego źródła. Jednakże w celu przeprowadzenia dokładnej analizy zmienności polskich szczepów VHSV konieczne są badania większej liczby izolatów pochodzących z gospodarstw położonych w innych częściach Polski.

Piśmiennictwo

1. Antychowicz J., Pékala A.: Wirusowa krwotoczna posocznica (VHS) i zakaźna martwica układu krwiotwórczego (IHN) u ryb w Polsce i krajach europejskich. *Medycyna Wet.* 2002, 58, 341-343.
2. Basurco B., Benmasour A.: Distant strains of the fish rhabdovirus VHSV maintain a sixth functional cistron which codes for a nonstructural protein of unknown function. *Virology* 1995, 212, 741-745.
3. Bearzotti M., Monnier A. F., Vende P., Grosclaude J., de Kinkelin P., Benmasour A.: The glycoprotein of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV): antigenicity and role in virulence. *Vet. Res.* 1995, 26, 413-422.
4. Benmasour A., Basurco B., Monnier A. F., Vende P., Winton J. R., de Kinkelin P.: Sequence variation of the glycoprotein gene identifies three distinct lineages within field of viral haemorrhagic septicaemia virus, a fish rhabdovirus. *J. Gen. Virol.* 1997, 78, 2837-2846.
5. Anon.: Commission Decision 2001/183/EC of 22 February 2001 laying down the sampling plans and diagnostic methods of the detection and confirmation of certain fish diseases and repealing Decision 92/532/EEC.
6. Anon.: Council Directive 91/67/EEC of 28 January 1991, concerning the animal health conditions governing the placing on the market of aquaculture animals and products.
7. Anon.: FAO: FISHSTAT Plus 2001.
8. Einer-Jensen K., Ahrens P., Forsberg R., Lorenzen N.: Evolution of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicaemia virus. *J. Gen. Virol.* 2004, 85, 1167-1179.
9. Kumar S., Tamura K., Nei M.: MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 2004, 5, 150-163.
10. Mikalsen A. B., Teig A., Helleman A.-L., Mjaaland S., Rimstad E.: Detection of infectious salmon anaemia virus (ISAV) by RT-PCR after cohabitant exposure in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis. Aquat. Organ.* 2001, 47, 175-181.
11. Miller T. A., Rapp J., Wasthuber U., Hoffmann R. W., Enzmann P.-J.: Rapid and sensitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction based detection and differential diagnosis of fish pathogenic rhabdoviruses in organ samples and cultured cells. *Dis. Aquat. Organ.* 1998, 34, 13-20.
12. Nei M., Kumar S.: *Molecular Evolution and Phylogenetics*. University Press Oxford Inc. 2000.
13. Nishizawa T., Iida H., Takano R., Isshiki T., Nakajima K., Murowa K.: Genetic relatedness among Japanese, American and European isolates of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) based on partial G and P genes. *Dis. Aquat. Organ.* 2002, 48, 143-148.
14. Regenmortel M. H. V. van, Fauquet C. M., Bishop D. H. L.: *Virus Taxonomy*. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego 2000.
15. Schütze H., Mundt E., Mettenleiter T. C.: Complete genomic sequence of viral hemorrhagic septicemia virus, a fish rhabdovirus. *Virus Genes* 1999, 19, 59-65.
16. Smail D. A.: *Viral Haemorrhagic Septicaemia: Fish Diseases and Disorders*. T. 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections. Cab International, New York 1999, 123-145.
17. Stone D. M., Way K., Dixon P. F.: 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.* 1997, 78, 1319-1326.
18. Thiéry R., de Boissesson C., Jeffroy J., Castric J., de Kinkelin P., Benmasour A.: Phylogenetic analysis of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) isolates from France (1971-1999). *Dis. Aquat. Organ.* 2002, 52, 29-37.

Adres autora: dr Aleksandra Ruszczyk, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: aleksandra_ruszczyk@sggw.pl