

Genska karakterizacija virusa proljetne viremije šarana izoliranog iz uzgojenog šarana (*Cyprinus carpio*)

I. Vardić, D. Valić, D. Kapetanović, B.
Kurtović, E. Teskeredžić, Z. Teskeredžić

*Laboratorij za akvakulturu i patologiju akvatičkih organizama
Institut Ruđer Bošković, Zagreb, HR*

E-mail: ivardic@irb.hr



- Zdravstvena skrb u uzgoju slatkovodnih riba →

problem virusnih bolesti

PROLJETNA VIREMIJA ŠARANA, PVŠ

- 1971. god. prvi put u Jugoslaviji (Fijan i sur.)
- Pojava bolesti ovisi o temperaturi vode, starosti i kondiciji ribe, te faktorima stresa

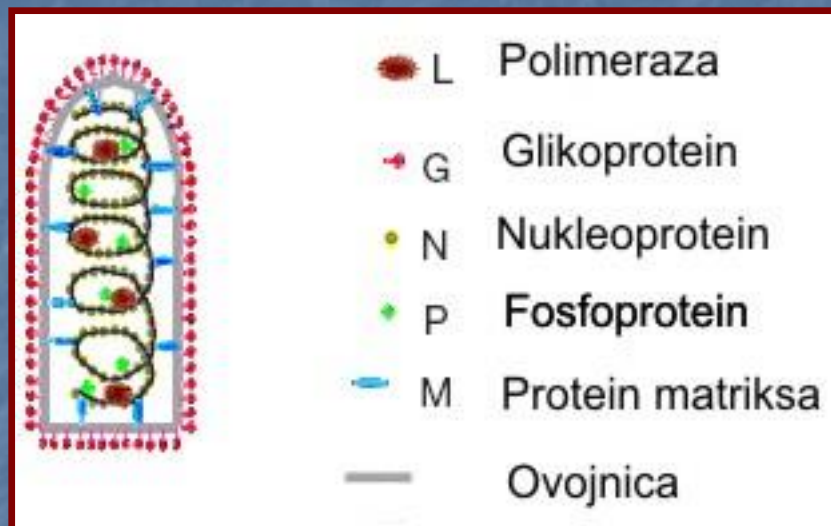


PVŠ se obično javlja u proljeće (travanj-lipanj), pri temperaturama vode ispod 18°C

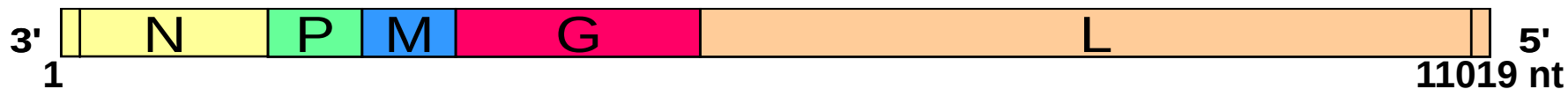
- Klinički znakovi bolesti: tromost, tamnija boja i anemija, nakupljanje tekućine, krvarenja u vanjskim i unutrašnjim organima, koji su blijedi i otečeni
- Ribe bez kliničkih znakova bolesti mogu biti kliconoše, a o subkliničkim pojavama bolesti nema puno podataka

VIRUS PROLJETNE VIREMIJE ŠARANA, *Rhabdovirus carpio*

- porodica Rhabdoviridae, rod *Vesiculovirus*
- genom: j1(-)RNA, 6 proteina



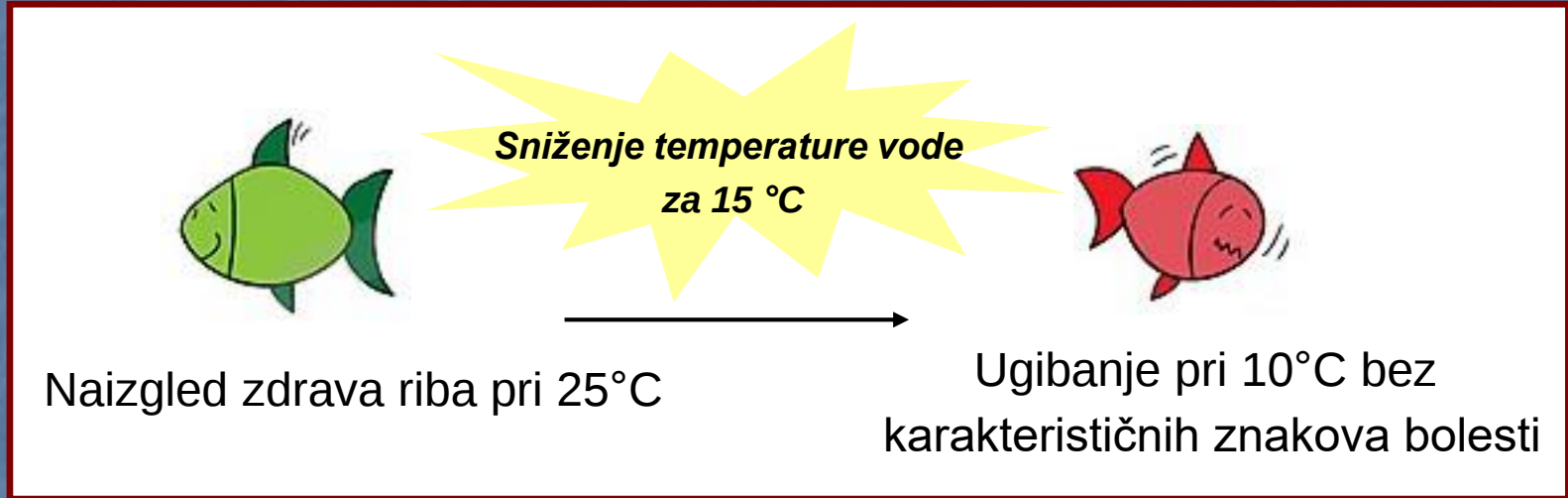
Ahne i sur., Dis Aquat Org, 52, 2002



- za identifikaciju virusa metodom RT-PCR umnožavaju se odsjecci gena G
- Za genotipizaciju izolata virusa PVŠ upotrebljavaju se geni P, M i G

CILJ ISTRAŽIVANJA

- Uzgojeni šarani u ljetnoj sezoni preneseni iz toplovodnog ribnjačarstva u hladniju vodu



1. Utvrditi razlog ugibanja konzumnih šarana
2. Patogen identificirati u tkivima unutrašnjih organa bez znakova bolesti
3. Izvršiti gensku karakterizaciju patogena

MATERIJAL

- Uzgojeni šaran konzumne veličine (prosječna duljina 41,5 cm)
- Cijele jedinke, očišćene jedinke bez utrobe i smrznuti fileti za prodaju



Cijele ribe ili jedinke bez utrobe, $L = 41,5$ cm



slezena, bubreg, srce, mozak, jetra,
mišić, škrge, repna peraja, oko



Smrznuti fileti pohranjeni
duže vrijeme na hladnom



mišić

METODE

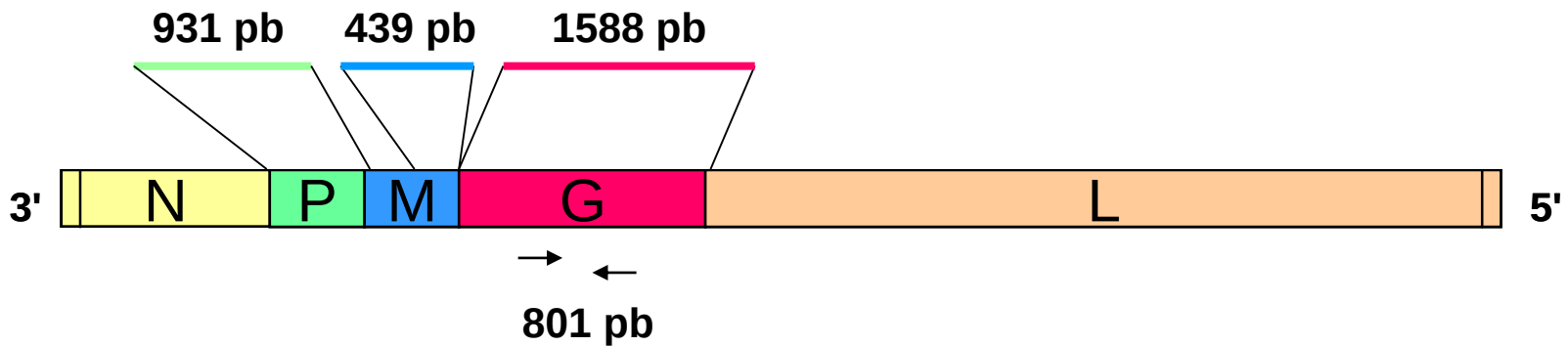
Skupni uzorci (slezena, srce, bubreg i mozak)

Pojedinačni uzorci (slezena, srce, bubreg, mozak, jetra, mišić, škrge, repna peraja, oko)

Homogenizacija i inokulacija na kulturama stanica EPC; detekcija CPE (citopatogenog učinka)

Homogenizacija direktno u Tri reagensu

Izdvajanje RNA, RT-PCR i gel-elektroforeza



- Određivanje sljedova nukleotida ABI PRISM 3100 Analyzer, “DNA servis”, IRB
- Programi Blast2, ClustalX i MEGA 4.1 beta verzija upotrijebljeni za analize sljedova nukleotida

REZULTATI

- klinička slika i identifikacija virusa -

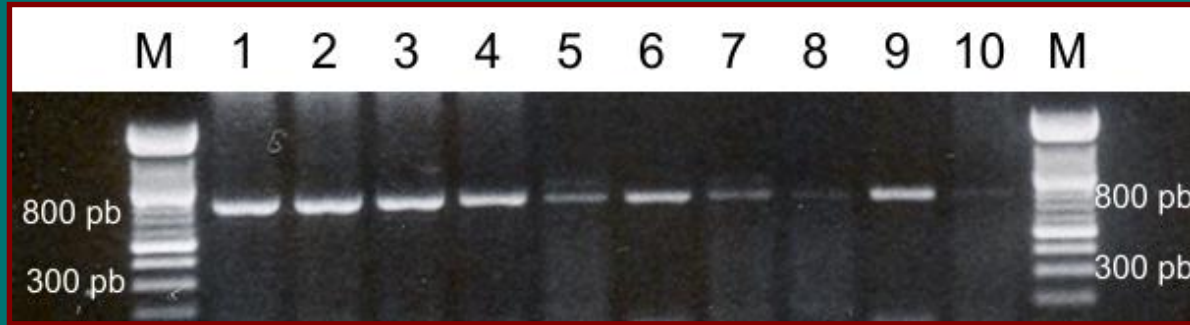
- Uzgojeni šarani su bili anemični i imali su mala područja krvarenja na koži
- Nije bilo promjena na unutrašnjim organima



- Dva dana nakon inokulacije homogenizata na kulture stanica EPC, pojavio se citopatogeni učinak (CPE)
- U reakciji RT-PCR iz stanica sa izraženim CPE umnožen je specifični produkt veličine 801 pb (dio gena G) → potvrda da je izolat iz stanica virus proljetne viremije šarana

REZULTATI

- klinička slika i identifikacija virusa -



Slika 2. Analiza produkata reakcija RT-PCR umnoženih sa specifičnim početnicama za dio gena G (801 pb) iz ukupne RNA izdvojene iz različitih početnih materijala

M – molekularni biljeg

1 – supernatant zaražene EPC

2 – slezena

3 – bubreg

4 – srce

5 – mozak

6 – mišić (filetirano tkivo)

7 – jetra

8 – škrge

9 – repna peraja

10 – oko

- analiza sljedova nukleotida virusa PVŠ -

● Razlika između nt sljedova Cro08 i ostalih svjetskih izolata: 0,75% - 11,2%

G221 UK2004
Cro08 Croatia2008
OM75 USA 2003

```

GGATAAGACAGTCAAGGAAATAGAAGAACAGGTATCGAGTATGGAACAGC 100
GGATAAGACAGTCAAGGAAATAGAAGAACAGGTATCGAGTATGGAACAGC 100
AGAGAGAGACGTTTAAGAAATAGAAGAACAGATATCGACTATGGAACAGC 100
** ***** ** * ***** ***** ****

```

G221 UK2004
Cro08 Croatia2008
OM75 USA 2003

```

CTGTTCCAAAGACAGTCAAATATGTTACAATTGAAGAGAAC TTGTCTGAG 150
CTGTTCCAAAGACAGTCAAATATGTTACCTTTGAAGAGAAC TTGTCTGAG 150
CCGTTCCAAAGACAGTAAATATGTTACCTTTGAGCAGGCTTTGTCTGAA 150
* ***** ***** ***** *** *****

```

G221 UK2004
Cro08 Croatia2008
OM75 USA 2003

```

GAGGAATGGGAATCAGATTTCGGGAGATGATGATGAAGACTCAATCGATGA 200
GAGGAATGGGAATCAGATTTCGGGAGATGATGATGAAGACTCAATCGATGA 200
GGGACTGGGAATCAGATTTCGGGAGATGATGATGAAGACTCAATCGATGA 200
* ** ***** ***** ** *****

```

G221 UK2004
Cro08 Croatia2008
OM75 USA 2003

```

CTCTTTAATCCCTGATTATCTCAGAGAAAGTATTAGCATTACAGTGGATG 250
CTCTTTAATCCCTGATTATCTCAGAGAAAGTAGCAGCATTACAGTGGATG 250
ATCTTTGATCCCCTGATTACCTCAGAGAAATAGCAGCATCACAGTGGATG 250
***** ***** ***** ***** ** ***** *****

```

G221 UK2004
Cro08 Croatia2008
OM75 USA 2003

```

AAGATGAAGAAGATCAGAAAGAAGACAGAGAAAGAACATCTCCCACAGTC 300
AAGATGAAGAAGATCAGAAAGAAGACAGGGAAGAACATCTCCCACAGTC 300
AAGATGAAGAAGATCAGAAAGCAGATGAAGAAAGATATCTTCCGACAGTC 300
***** ***** ** ***** **** *****

```

G221 UK2004
Cro08 Croatia2008
OM75 USA 2003

```

AGCTGGGAAGAAGAACCACAGGAATAGATATAGGGTTTTGGGCCTGGGAT 350
AGCTGGGAAGAAGAACCACAGGAATAGATATAGGGTTTTGGGCCTGGGAT 350
AGTGGGAAGAAGAATCCACAGCATAGATCTAGGGTTTTGACCTGGGAT 350
** ***** ***** ***** ***** *****

```

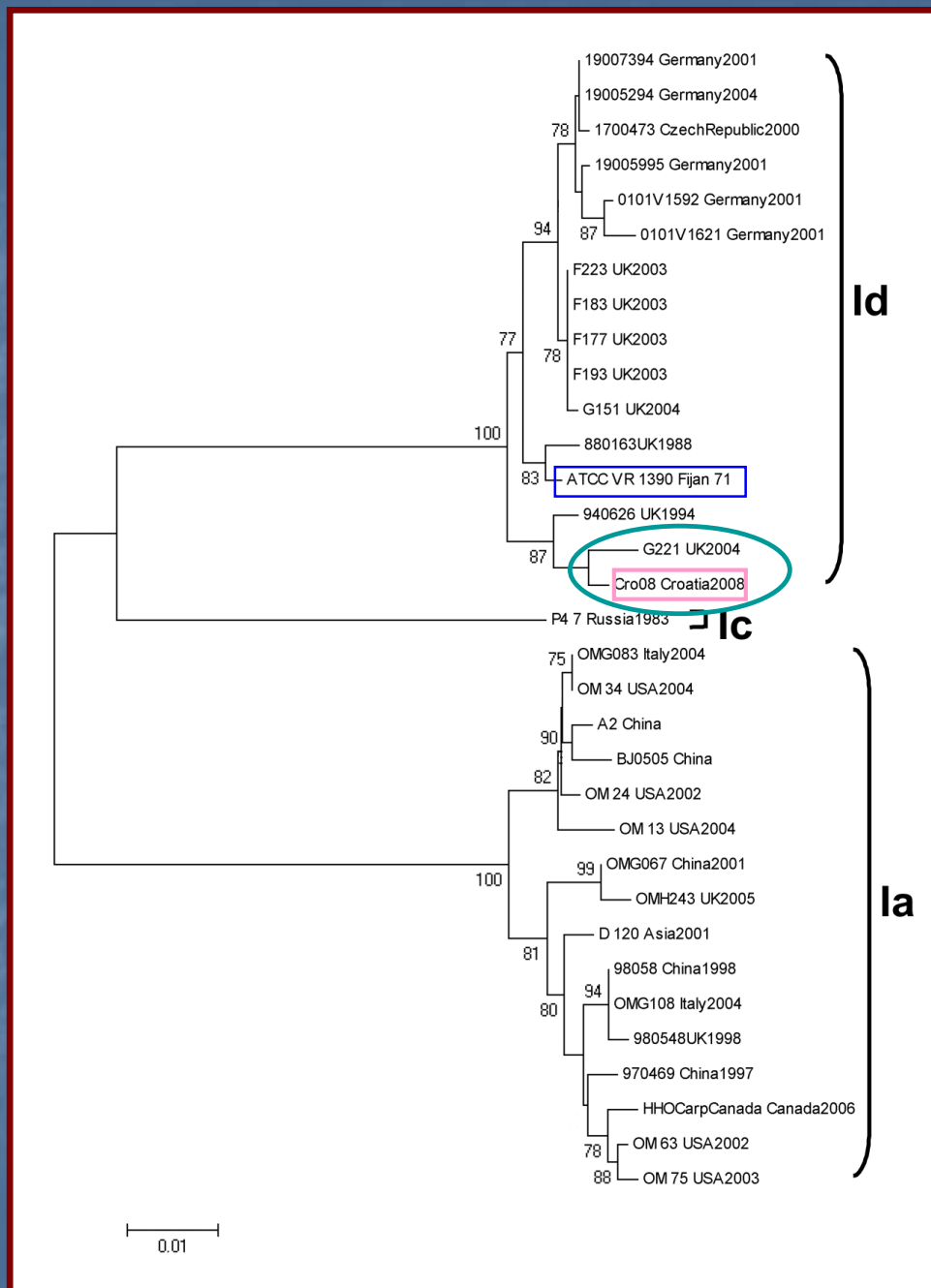
G221 UK2004
Cro08 Croatia2008
OM75 USA 2003

```

AGTGATGCCATCTGTGTCAAACCATGAGGGAGGTACATATGTTTCGCTATA 400
AGTGATGCCATCTGTGTCAAACCATGAGGGAGGTACATATGTTTCGCTATA 400
AGTGATGCCATCTGTGTGCAACCATGAGGGAGGTACATATGTTTCGCTATA 400
***** ***** ***** ***** *****

```

Filogenetsko stablo Neighbor-Joining
u kojem su analizirani sljedovi
nukleotida gena P (931 pb) različitih
izolata virusa PVŠ u programu
MEGA4.1 β

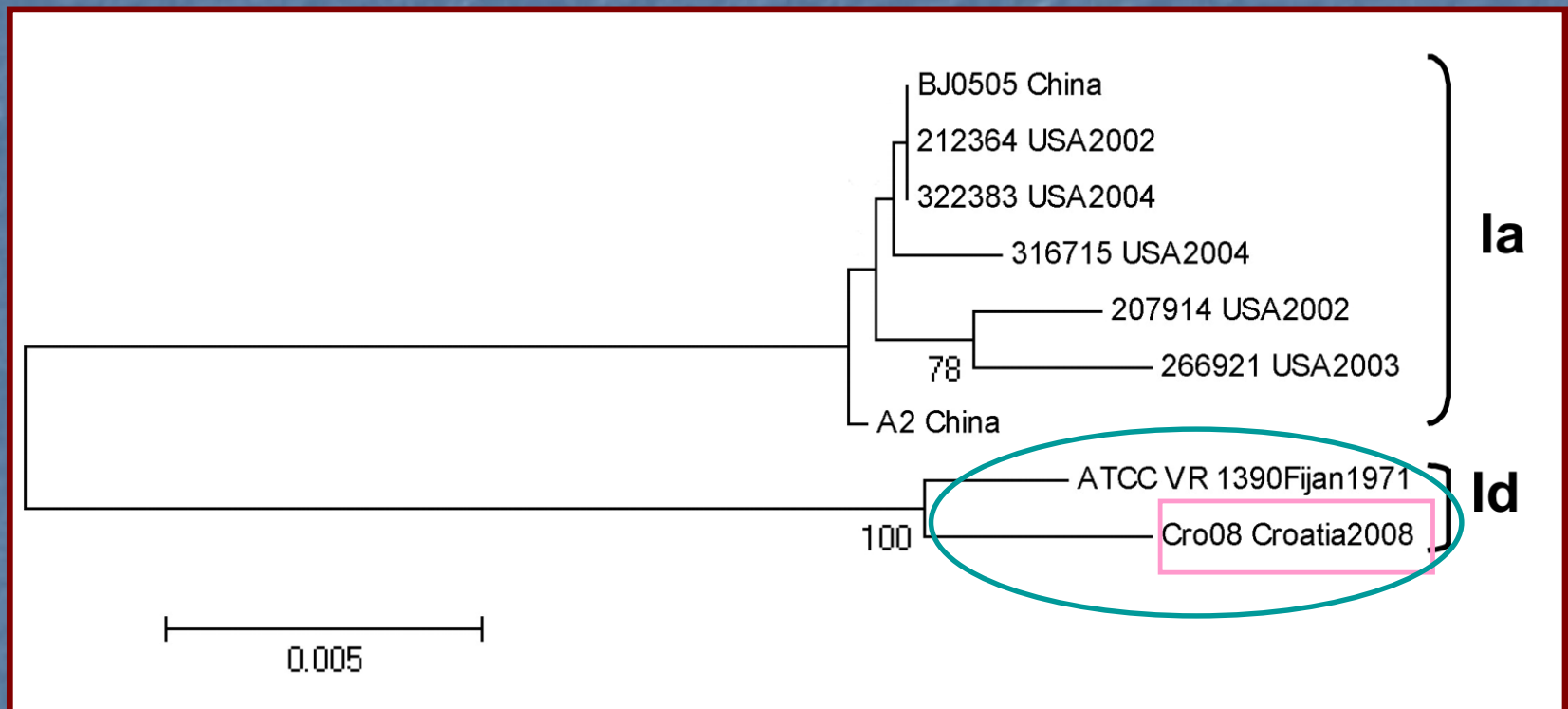


REZULTATI

- analiza sljedova nukleotida virusa PVŠ -

Analiza sljedova nukleotida odsječka gena M

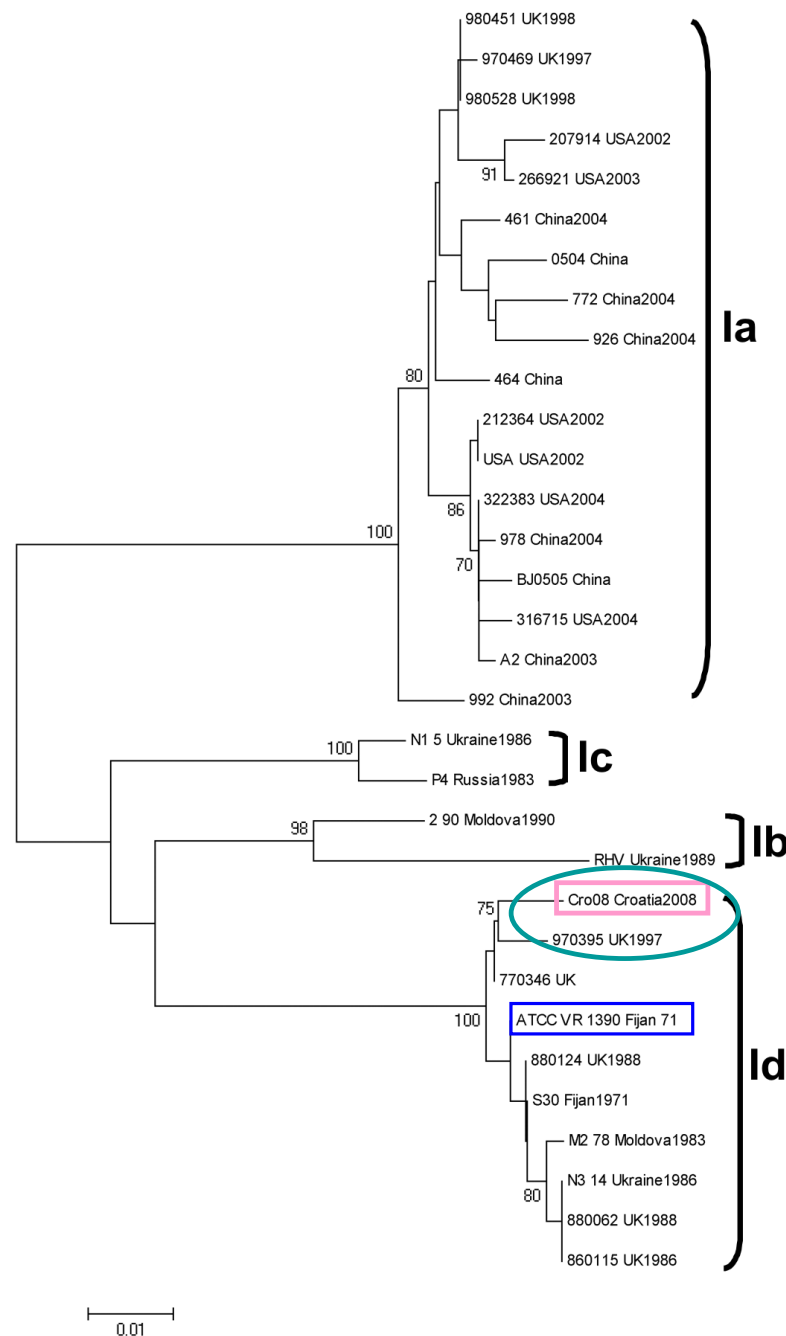
- Razlika između nt sljedova Cro08 i ostalih svjetskih izolata: 1,4% - 8,2%

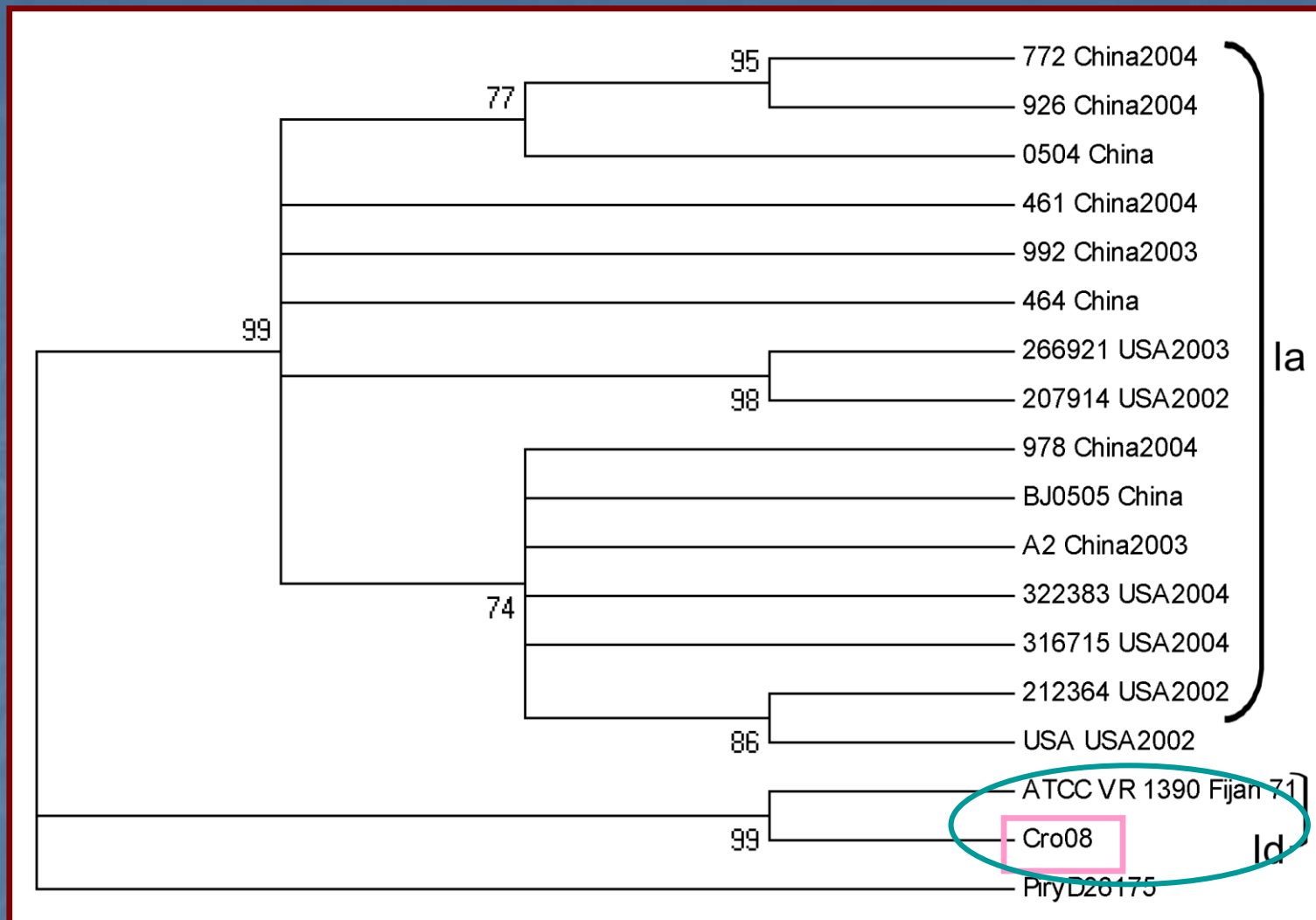


Filogenetsko stablo Neighbor-Joining u kojem su analizirani odsječci gena M (439 pb) različitih izolata virusa PVŠ u programu MEGA4.1β

Analiza sljedova nukleotida odsječka gena G

- Razlika između nt sljedova Cro08 i ostalih svjetskih izolata: 1,1% - 12,0%
- Filogenetsko stablo Neighbor-Joining u kojem su analizirani odsječci gena G (550 pb) različitih izolata virusa PVŠ u programu MEGA4.1β
- Izolirani PVŠ se od ostalih izolata najviše razlikovao u slijedu nukleotida gena G (550 pb) . To je u skladu s razlikama u aminokiselinskom slijedu proteinskog produkta koji stvara trimerne peplomere na površini virusa i nositelj je epitopa važnog u imunološkom odgovoru domaćina

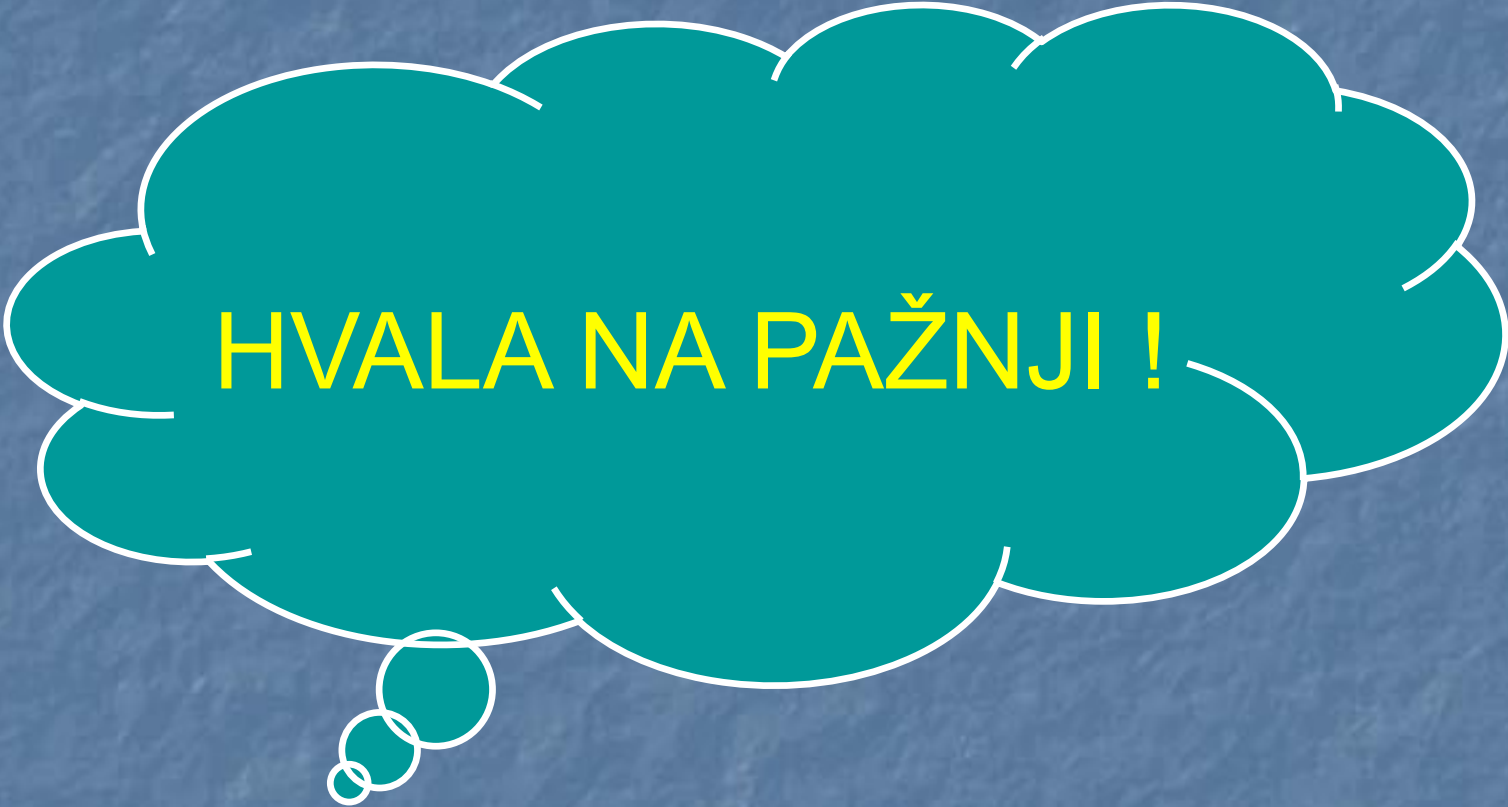




Kondenzirano filogenetsko stablo Neighbor-Joining u kojem su analizirani cjelokupni geni G (1588 nt) različitih izolata virusa PVŠ u programu MEGA4.1β. Za zakorjenjivanje stabla je upotrijebljen slijed nukleotida gena G virusa Piry

ZAKLJUČCI

- ➡ Ključni faktor za ugibanje šarana u ljetnim mjesecima od bolesti proljetne viremije šarana je bilo naglo sniženje temperature vode → *ribe su vjerojatno bile pasivni nosioci virusa, koji je u stresnim uvjetima izazvao bolest i ugibanja*
- ➡ U radu je po prvi put opisana primjena metode RT-PCR za detekciju virusa u filetiranom, mišićnom tkivu šarana već pripremljenom za prodaju → *moguć je retrospektivni pregled materijala za koji postoji sumnja da je bio zaražen*
- ➡ Filogenetske analize sljedova nukleotida gena G, M i P omogućile su *genogrupiranje izoliranog virusa PVŠ u skupinu geografski bliskih, europskih izolata*



HVALA NA PAŽNJI !