

**Резюмета на публикации на английски и български език,  
участващи в справката за изпълнение на минималните национални  
критерии по ЗРАСРБ и допълнителните критерии на ИМикБ-БАН,  
на главен асистент д-р Нели Вилхелмова-Илиева, кандидат в конкурс  
за академична длъжност „Доцент“, ДВ бр. 60, 29.07.2022г.**

**Отнасящи се към Група от показатели В:**

**1. Ellagitannins as synergists of ACV on the replication of ACV-resistant strains of HSV 1 and 2.** Vilhelмова-Илиева, N., Jacquet, R., Quideau, S., Galabov, A.S. *Antiviral Research*, 2014, 110: 104-114, ISSN: 0166-3542.

Abstract

The effects of combinations of three nonhydroxyterphenoyl-bearing C-glucosidic ellagitannins (castalagin, vescalagin and grandinin) with acyclovir (ACV) on the replication of type-1 and type-2 herpes simplex viruses in MDBK cells were tested by the focus-forming units reduction test. Ellagitannins included in these combinations possess a high individual antiviral activity: selectivity index of castalagin and vescalagin versus HSV-1 was similar to that of ACV, and relatively lower against HSV-2. The three-dimensional analytical approach of Prichard and Shipman was used to evaluate the impact of drug–drug interactions. The combination effects of ellagitannins with acyclovir were markedly synergistic.

Резюме

Ефектите от комбинации на три наонахидрокситерфеноил-носещи С-глюкозидни елагитанини (касталагин, вескалагин и грандинин) с ацикловир (ACV) върху репликацията на тип-1 и тип-2 вируси херпес симплекс в MDBK клетки бяха тествани чрез отчитане на намаляването на вирусните микроплаки. Елагитанините, включени в тези комбинации, притежават висока индивидуална антивирусна активност: индексът на селективност на касталагин и вескалагин спрямо HSV-1 е подобен на този на ACV и относително по-нисък спрямо HSV-2. Триизмерният аналитичен подход на Prichard и Shipman беше използван за оценка на въздействието на взаимодействията лекарство-лекарство. Комбинираните ефекти на елагитанини с ацикловир са подчертано синергични.

**2. Chemical composition of Propolis Extract ACF® and activity against herpes simplex virus.** Bankova, V., Galabov, A.S., Antonova, D., Vilhelмова, N., Di Perri, B.. *Phytomedicine*, 2014, 21(11): 1432-1438, ISSN: 0944-7113

Abstract

Propolis Extract ACF® (PPE) is a purified extract manufactured from propolis collected in a Canadian region rich in poplar trees, and it is the active substance of a topical ointment used against herpes labialis (cold sores or fever blisters). Aim of this study was to analyze the chemical composition of PPE in order to understand the plant origin and possible relations

between compounds and antiviral activity, and to characterize the antiviral activity of the extract against herpes simplex virus in vitro. Material and methods: The analysis of the propolis extract samples was conducted by Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS). The antiviral activity was tested against herpes simplex viruses type 1 and type 2 in MDBK cell cultures by treating the cells with PPE at the time of virus adsorption, and by incubating the virus with the extract before infection (virucidal assay). Results: Results from the GC–MS analyses revealed a dual plant origin of PPE, with components derived from resins of two different species of poplar. The chemical composition appeared standardized between extract samples and was also reproduced in the sample of topical ointment. The antiviral studies showed that PPE had a pronounced virucidal effect against herpes simplex viruses type 1 and type 2, and also interfered with virus adsorption.

#### Резюме

Propolis Extract ACF® (PPE) е пречистен екстракт, произведен от прополис, събран в канадски регион, богат на тополови дървета, и е активното вещество на локален мехлем, използван срещу херпес лабиалис. Целта на това изследване беше да се анализира химичният състав на PPE да се разбере растителния произход и възможните връзки между съединенията и антивирусната активност и да се характеризират антивирусната активност на екстракта срещу вирус херпес симплекс in vitro. Материали и методи: Анализът на пробите от екстракт от прополис е извършен от Gas Хроматография–маспектрометрия (GC–MS). Антивирусната активност е тествана срещу вируси на херпес симплекс тип 1 и тип 2 в MDBK клетъчни култури чрез третиране на клетките с PPE по време на вирусната адсорбция и чрез инкубиране на вируса с екстракта преди инфекция (вируциден анализ). Резултати: Резултатите от GC-MS анализите разкриха двоен растителен произход на ЛПС, с компоненти, получени от смоли на два различни вида топола. Химическият състав се появи стандартизиран между екстрактни проби и също беше възпроизведен в пробата от локален мехлем. Антивирусните изследвания показаха, че PPE има изразен вируциден ефект срещу вируси на херпес симплекс тип 1 и тип 2, а също и възпрепятства адсорбцията на вируса.

**3. Synthesis and photophysical characterisation of 3-bromo-4-dimethylamino-1,8-naphthalimides and their evaluation as agents for antibacterial photodynamic therapy.** Staneva, D., Vasileva-Tonkova, E., Grozdanov, P., Vilhelmova-Ilieva, N., Nikolova, I., Grabchev, I.. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2020, 401: 112730, ISSN: 1010-6030

#### Abstract

Through the peripheral modification of a first-generation polypropylene amine dendrimer two new photoactive dendrimers containing 4-dimethylamino-1,8-naphthalimide (3) and 3-bromo-4-dimethylamino-1,8-naphthalimide (4), have been obtained. Photophysical and spectral characteristics of these dendrimers were investigated in two organic solvents. We found that they absorb light in the visible spectral region and emit yellow-green fluorescence. Antimicrobial activity of dendrimers against pathogenic microorganisms has been investigated in solution and after deposition on a cotton fabric. For the first time, 1,8-naphthalimide derivatives have been tested as active components in antibacterial photodynamic therapy. To clarify the dendrimer effect, the results obtained were compared with those from two monomeric 1,8-naphthalimides (1 and 2) containing the same substitutes in the chromophore system. Cytotoxicity and antiviral activity of the dendrimers were also assessed.

## Резюме

Чрез периферната модификация на дендример от полипропилен амин от първо поколение са получени два нови фотоактивни дендримери, съдържащи 4-диметиламино-1,8-нафталимид (3) и 3-бромо-4-диметиламино-1,8-нафталимид (4). Изследвани са фотофизичните и спектралните характеристики на тези дендримери в два органични разтворителя. Открихме, че те абсорбират светлина във видимата спектрална област и излъчват жълто-зелено флуоресценция. Антимикробната активност на дендримерите срещу патогенни микроорганизми е изследвана в разтвор и след нанасяне върху памучен плат. За първи път са открити производни на 1,8-нафталимид тествани като активни компоненти в антибактериалната фотодинамична терапия. За изясняване на ефекта на дендримера, получените резултатите бяха сравнени с тези от два мономерни 1,8-нафталимида (1 и 2), съдържащи същото заместители в хромофорната система. Цитотоксичността и антивирусната активност на дендримерите също бяха оценени.

## **4. Antiviral Activity of *Rosa damascena* Mill. and *Rosa alba* L. Essential Oils against the Multiplication of Herpes Simplex Virus Type 1 Strains Sensitive and Resistant to Acyclovir.** Vilhelmova-Ilieva, N, Dobрева, A, Doynovska, R, Krastev, D, Mileva, M. *Biology*, 2021, 8(10): 746, ISSN: 2079-7737

### Abstract

**Background:** The specific chemotherapeutics against herpes simplex virus type 1 (HSV) are nucleoside analogues such as acyclovir (ACV), but the most important problem is the formation of resistant mutants. The search for new therapeutic alternatives leads us to the purpose of investigating the effects of *Rosa damascena* Mill. and *Rosa alba* L. essential oils on the viral reproduction of susceptible (Victoria) and acyclovir-resistant (R-100) strains of HSV-1 replication in vitro, individually and in combination with acyclovir. **Methods:** Cytopathic effect inhibition test was used for assessment of antiviral activity of the oils, and the three-dimensional model of Prichard and Shipman was applied to evaluate the combined effect of oils with ACV on HSV-1 replication. **Results:** Both oils do not affect the replication of viral strains; they are able to influence only viral adsorption and extracellular virions and protect healthy cells from subsequent infection. In combination with lower doses of acyclovir, both oils demonstrate a significant synergistic effect on the replication of HSV-1, which is more contagious than the Victoria strain. **Conclusions:** The nonspecific mechanism of the reduction in viral reproduction caused by rose oils and the synergistic effect of their co-administration with the lower doses of specific inhibitor ACV makes them suitable therapeutics for overcoming viral resistance to HSV-1 infections.

### Резюме

Специфичните химиотерапевтици срещу херпес симплекс вирус тип 1 (HSV) са нуклеозидни аналози като ацикловир (ACV), но най-важният проблем е образуването на резистентни мутанти. Търсенето на нови терапевтични алтернативи ни води до целта на изследването определяне на ефектите на *Rosa damascena* Mill. и *Rosa alba* L. етерични масла върху вирусната репродукция на чувствителни (Victoria) и резистентни на ацикловир (R-100) щамове на HSV-1 репликация in vitro, индивидуално и в комбинация с ацикловир. **Методи:** Използван е тест за инхибиране на цитопатичния ефект за оценка на антивирусната активност на маслата и е приложен триизмерният модел на Причард и Шипман за оценка на комбинирания ефект на масла с ACV върху репликацията на HSV-

1. Резултати: И двете масла не повлияват репликацията на вирусните щамове; те са в състояние да повлияят само на вирусната адсорбция и извънклетъчните вириони и защитават здравите клетки от последваща инфекция. В комбинация с по-ниски дози от ацикловир, двете масла демонстрират значителен синергичен ефект върху репликацията на HSV-1, който е по-заразен от щама Виктория. Изводи: Неспецифичният механизъм на редукия при вирусна репродукция, причинена от розовите масла и синергичния ефект от съвместното им приложение с по-ниските дози на специфичен инхибитор ACV ги прави подходящи терапевтици за преодоляване на вирусната резистентност на HSV-1 инфекции.

**Отнасящи се към Група от показатели Г:**

**5. Effect of metal complexes of acyclovir and its acetylated derivative on herpes simplex virus 1 and herpes simplex virus 2 replication**

Varadinova T., Vilhelmova N., Varadinova T., Vilhelmova N., Badenas F., Terron A., Fiol J., Garcia-Raso A., Genova P.. *Acta Virologica*, 2005, 49 (4): 251-260, ISSN: 1336-2305

**Abstract**

The effect of zinc, nickel, cobalt and cadmium complexes of acyclovir (ACV) and its O-acetylated derivative (Ac-ACV) on the replication of wild type (wt) and ACV-resistant (ACVR) strains of Herpes simplex virus 1 (HSV-1) and Herpes simplex virus 2 (HSV-2) was examined. According to cytotoxicity, these compounds followed the order Ni-ACV chloride > Cd-ACV 3 Ni-ACV nitrate > ACV = Zn-ACV nitrate = Ac-ACV = Zn-Ac-ACV > Zn-ACV chloride > Co-ACV. Besides Ac-ACV, the only active complexes in inhibiting virus replication were Zn-ACV nitrate and Zn-Ac-ACV, which effectively suppressed the growth of both wt and ACVR strains of HSV-1 and HSV-2. The most active and most selective inhibitor of the growth of ACVR strains of HSV-1 and HSV-2 was Ac-ACV; its EC50 and SI were 100 and 10 times higher than those of ACV, respectively. Zn-Ac-ACV was less active than Ac-ACV, obviously due to the stability of the complex. Zn-ACV nitrate was active against both wt and ACVR strains of HSV-1; its activity and selectivity were 100 and 75 times higher than those of ACV, respectively. Ac-ACV and Zn-Ac-ACV suppressed the pre-mitotic arrest caused by HSV-1 infection during the first 2 hrs of infection and later on restored the cell division

**Резюме**

Ефектът на цинкови, никелови, кобалтови и кадмиеви комплекси на ацикловир (ACV) и неговото О-ацетилирано производно (Ac-ACV) върху репликацията на див тип (wt) и ACV-резистентни (ACVR) щамове на Herpes simplex virus 1 (HSV) -1) и Херпес симплекс вирус 2 (HSV-2) беше изследван. Според цитотоксичността тези съединения следват реда Ni-ACV хлорид > Cd-ACV 3 Ni-ACV нитрат > ACV = Zn-ACV нитрат = Ac-ACV = Zn-Ac-ACV > Zn-ACV хлорид > Co-ACV. Освен Ac-ACV, единствените активни комплекси за инхибиране на репликацията на вируса са Zn-ACV нитрат и Zn-Ac-ACV, които ефективно потискат растежа както на wt, така и на ACVR щамове на HSV-1 и HSV-2. Най-активният и най-селективен инхибитор на растежа на ACVR щамове на HSV-1 и HSV-2 беше Ac-ACV; неговите EC50 и SI са съответно 100 и 10 пъти по-високи от тези на ACV. Zn-Ac-ACV беше по-малко активен от Ac-ACV, очевидно поради стабилността на комплекса. Zn-ACV нитратът е активен както срещу wt, така и срещу ACVR щамове на HSV-1; неговата активност и селективност са съответно 100 и 75 пъти по-високи от тези на ACV. Ac-ACV и Zn-Ac-ACV потискат премитотичния арест, причинен от HSV-1

инфекция през първите 2 часа от инфекцията и по-късно възстановяват клетъчното делене.

**6. Alterations in oxidative stress parameters in MDBK cells, infected by Herpes simplex virus-1.** Georgieva A, Vilhelmova-Ilieva N, Muckova L., Tzvetanova E., Alexandrova A., Mileva M.. Alterations in oxidative stress parameters in MDBK cells, infected by Herpes simplex virus-1. *Comptes rendus de l'Acad'emie Bulgare des Sciences*, 2017, 70(5): 731-738, ISSN: 1310-1331

#### Abstract

As a member of Herpesviridae family, the herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is a single large double stranded DNA enveloped virus. Once penetrated into the body, the virus persists asymptotically, usually localized in ganglia neurons. Infection can be activated by various stimuli. Many of the cytopathic effects of HSV-1 infection result in tissue damage, mediated by virus-induced oxidative stress. The purpose of our study was to determine the changes in oxidative status of MDBK cells infected by HSV-1. HSV-1 was replicated in monolayer MDBK cells for 48 h. Before analytical measurements both control and infected cell suspensions were sonicated ( $2 \times 15$  s) for destroying the cell membranes. The oxidative stress markers: lipid peroxidation level, total glutathione concentration and the activities of glutathione peroxidase and catalase were evaluated spectrophotometrically. Our results showed a significant increase (more than 3 times) of lipid peroxidation in MDBK cells infected by herpes virus compared to the control cells. As a result of viral invasion a decreased level of intracellular total glutathione was found in infected cells by 24%, and a threefold increase of the activities of the tested antioxidant enzymes. These findings would be useful for elucidation of the mechanisms underlying cell injury induced by HSV-1 and for development of novel approaches for anti-herpes virus therapies and drugs.

#### Резюме

Като член на семейство Herpesviridae, вирусът на херпес симплекс тип 1 (HSV-1) е голям двойноверижен ДНК вирус с обвивка. Веднъж проникнал в тялото, вирусът персистира безсимптомно, обикновено локализиран в невроните на ганглиите. Инфекцията може да се активира от различни стимули. Много от цитопатичните ефекти на HSV-1 инфекцията водят до тъканно увреждане, медирано от вирусно индуциран оксидативен стрес. Целта на нашето изследване беше да определим промени в оксидативния статус на MDBK клетки, заразени с HSV-1. HSV-1 беше репликиран в монослойни MDBK клетки за 48 часа. Преди аналитични измервания както контролните, така и инфектираните клетъчни суспензии бяха обработени с ултразвук ( $2 \times 15$  s) за разрушаване на клетъчните мембрани. Маркерите на оксидативния стрес: липидна пероксидация нивото, общата концентрация на глутатион и активността на глутатион пероксидаза и каталаза бяха оценени спектрофотометрично. Нашите резултати показаха значително увеличение (повече от 3 пъти) на липидната пероксидация в MDBK клетките заразени с херпесен вирус в сравнение с контролните клетки. В резултат на вирусна инвазия е установено понижено ниво на вътреклетъчния общ глутатион при заразените клетки с 24%, и трикратно увеличение на активността на изследвания антиоксидант ензими. Тези открития биха били полезни за изясняване на механизмите, лежащи в основата на клетъчно увреждане, предизвикано от HSV-1, и за разработване на нови подходи за антихерпес вирусни терапия.

**7. Anti-Herpes Simplex Virus Type 1 Activity of Specially Selected Groups of Tannins.** Neli Vilhelmova-Ilieva, Jacquet, R, Deffieux, D, Pouysegu, L, Sylla, T, Chassaing, S, Nikolova, I, Quiddeau, S, Angel Galabov. *Drug Research*, 2019, 69(7): 374-381, ISSN: 2194-9379

**Abstract**

Anti-herpes simplex virus (HSV-1) activity of 9 ellagitannins, including 6 natural compounds (castalin, vescalalin, acutissimin A, epiacutissimins A and B, mongolicain) and 3 vescalagin synthetic derivatives (VgSBuSH, VgSOctSH, VgOMe), and 13 gallotannin-type compounds [Gal-01A, Gal-01B, Gal-02A, Gal-02B, Gal-03M, Gal-04A, Gal-04B, Gal-05M, Gal-07, Gal-08, Gal-09, Gal-11M (tannic acid), as well as Gal-12 (gallic acid), Gal-13 and Gal-14 (ellagic acid)] were examined in MDBK monolayer cell culture. Their antiviral activity was determined by the cytopathic effect (CPE) inhibition test and their cytotoxicity was evaluated through the neutral red uptake assay. In general, the series of ellagitannins showed a significantly stronger activity against HSV-1 replication than that of the gallotannins. Six of the tested ellagitannins manifested a well-pronounced activity: epiacutissimin B (selectivity index, SI>60.6), epiacutissimin A (SI>55.5), acutissimin A (SI > 34.8), mongolicain (SI > 32.5), VgSBuSH (SI > 24.6) and VgOMe (SI > 22.0). Four gallotannin-type compounds inhibited the replication of HSV-1 at a lower but still significant extent: Gal-04B (SI >35.7), Gal-04A (SI >28.5), Gal11M (tannic acid) (SI>25) and Gal-05M (SI=15.6).

**Резюме**

Анти-херпес симплекс вирус (HSV-1) активност на 9 елагитанини, включително 6 природни съединения (касталин, вескалин, акутисимин А, епиакутисимини А и В, монголикаин) и 3 синтетични производни на вескалагин (VgSBuSH, VgSOctSH, VgOMe) и 13 съединения от тип гало танин [Gal-01A, Gal-01B, Gal-02A, Gal-02B, Gal-03M, Gal-04A, Gal-04B, Gal-05M, Gal-07, Gal-08, Gal-09, Gal-11M (танинова киселина), както и Gal-12 (галова киселина), Gal-13 и Gal-14 (елагова киселина)] бяха изследвани в MDBK монослойна клетка култура. Тяхната антивирусна активност беше определена чрез теста за инхибиране на цитопатичния ефект (CPE) и тяхната цитотоксичност беше оценена чрез теста за поглъщане на неутрално червено. Като цяло групата на елагитанините показаха значително по-силна активност срещу HSV-1 репликация от тази на галотанините. Шестима от тестваните елагитанините проявяват добре изразена активност: епиакутисимин В (индекс на селективност, SI>60.6), епиакутисимин А (SI>55.5), акутисимин А (SI > 34,8), монголикаин (SI > 32,5), VgSBuSH (SI > 24,6) и VgOMe (SI > 22,0). Четири съединения от галотанинов тип инхибират репликацията на HSV-1 при по-ниска, но все пак значителна степен: Gal-04B (SI >35.7), Gal-04A (SI >28.5), Gal 11M (танинова киселина) (SI>25) и Gal-05M (SI=15.6).

**8. Tannins as Antiviral Agents. In Tannins-Structural Properties, Biological Properties and Current Knowledge.** Vilhelmova-Ilieva N., Galabov AS, Mileva M.. Editor Alfredo Aires, IntechOpen, 2020, DOI:10.5772/intechopen.86490, 1-13, ISBN: 978-1-83968-358-9

**Abstract**

Tannins possess a variety of biological effects, not a small part of which is of medical significance. Tannins, isolated from plants as well as synthetically obtained, manifest activity against a large spectrum of viruses: enteroviruses (polio- and coxsackie-), caliciviruses (feline calicivirus, mouse norovirus), rotavirus, influenza virus A, rhabdo- (vesicular stomatitis virus),

paramyxoviruses (Sendai and Newcastle disease viruses), human immunodeficiency virus, herpes simplex virus, and adenoviruses. A special importance merits several ellagitannins manifesting pronounced effects against herpes simplex virus type 1 and 2 and on some herpes viruses affecting domestic animals, causing diseases of economic importance. An advantage of ellagitannins as anti-herpesvirus agents is that they have a non-nucleoside structure. Their targets are virus-specific proteins, so they retain activity against acyclovir-resistant strains of HSV types 1 and 2. Besides, these tannins manifest a synergistic effect with acyclovir when combined. Some initial results on their mechanism of action were carried out. In addition, it was found that most of the tannins have antioxidant properties in experimental models *in vitro* as well as in experimental influenza viral infection in mice.

#### Резюме

Танините притежават разнообразни биологични ефекти, не малка част от които с медицинско значение. Танини, изолирани от растения, както и синтетично получени, проявяват активност срещу широк спектър от вируси: ентеровируси (полио- и коксаки), калицивируси (котешки калицивирус, миши норовирус), рота вирус, грипен вирус А, рабдо- (вирус на везикуларен стоматит), парамиксовируси (вируси на Сендай и Нюкясълска болест), човешки имунодефицитен вирус, херпес симплекс вирус и аденовируси. Особено значение заслужават няколко елагитанина проявяващи изразени ефекти срещу вируса на херпес симплекс тип 1 и 2 и други някои херпесни вируси, засягащи домашни животни, причиняващи икономически важни заболявания. Предимство на елагитанините като антихерпесвирусни средства е, че те имат ненуклеозидна структура. Техните мишени са специфични за вируса протеини, така че те запазват активност срещу резистентни на ацикловир щамове на HSV типове 1 и 2. Освен това, тези танини проявяват синергичен ефект с ацикловир, когато се комбинират. За някои бяха получени първоначални резултати за техния механизъм на действие. Освен това беше установено, че повечето от танините имат антиоксидантни свойства в експериментални модели *in vitro*, както и при експериментална грипна вирусна инфекция при мишки.

**9. Antiviral, Cytotoxic and Antioxidant Effects of *Tanacetum vulgare* L. Crude Extract *in vitro*.** Vilhelmova, N., Simeonova, L., Nikolova, N., Pavlova, E., Gospodinova, Z., Antov, G., Galabov, A., Nikolova, I.. *Folia Medica*, 2020, 62(1): 172-179, ISSN: 1314-2143

#### Abstract

**Introduction:** Due to the high prevalence of viral infections having no specific treatment and the constant emergence of resistant viral strains, searching for effective antiviral compounds is crucial. The present study explores *in vitro* the antiviral activity of ethanolic extract from aerial parts of *Tanacetum vulgare* L. against viral strains of three taxonomic groups, including agents that cause socially significant diseases in humans for which antiviral chemotherapy is indicated, namely coxsackievirus B1 (family Picornaviridae), herpes simplex virus type 1 (family Herpesviridae) and influenza A virus (family Orthomyxoviridae). **Aim:** The aim of the current study was to evaluate antiviral activity of ethanolic extract from herbaceous plant *Tanacetum vulgare* L. against some important human viruses for which antiviral chemotherapy is needed and to characterize extract for its antioxidant activity *in vitro*. **Materials and methods:** The crude aqueous ethanolic extract from aerial parts of *Tanacetum vulgare* L. contained flavonoids determined as apigenin, coumarins determined as aesculin, tannic compounds determined as tannin, and others. Antiviral activity of ethanolic extract from herbaceous plant *Tanacetum*

vulgare L. against coxsackievirus B1, influenza A and herpes simplex virus type 1 was evaluated by viral yield reduction technique. The total antioxidant activity was determined by measuring the capacity of the sample to inhibit the generation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Results: The results show that the extract has the lowest toxicity on the MDBK cell line and similar cytotoxicity in Hep-2, whereas in the MDCK cells it has more than twice the highest toxicity. Testing the antiviral activity of *Tanacetum vulgare* L. extract revealed a slight inhibition of replication of HSV-1 with a selective index of 7.07 and IAV/H3N2 (SI = 3.69) but no specific antiviral effect against CVB1 replication was found. The evaluation of the antioxidant activity showed great antioxidant activity of the ethanolic extract from *T. vulgare* – 26 mmol/l for the applied 20 mg/ml extract. Conclusion: The crude extract from aerial parts of the medicinal plant *Tanacetum vulgare* L. demonstrated low cytotoxicity in Hep-2, MDBK and moderate cytotoxic effects in MDCK cells. It exerted significant antiviral activity against HSV-1 as determined by the recorded inhibition of viral replication, the blockage of virus entry - absorption stage and direct virucidal effects on extracellular virions. The observed effect when testing *Tanacetum*'s extract on influenza A H3N2 virus infection in vitro was milder, which probably resulted from the interference with the cellular pathways involved in the replication cycle. The presence of virucidal and adsorption-suppressing activity but the absence of viral replication inhibitory effects against CBV-1 suggests a possible interaction of the extract's components with viral capsid proteins or related cell receptors.

#### Резюме

Въведение: Поради широкото разпространение на вирусни инфекции без специфично лечение и постоянната поява на резистентни вирусни щамове, търсенето на ефективни антивирусни съединения е от решаващо значение. Настоящото изследване изследва *in vitro* антивирусната активност на етанолов екстракт от надземни части на *Tanacetum vulgare* L. срещу вирусни щамове от три таксономични групи, включително агенти, които причиняват социално значими заболявания при хора, за които е показана антивирусна химиотерапия, а именно коксаки вирус В1 (семейство Picornaviridae), херпес симплекс вирус тип 1 (семейство Herpesviridae) и вирус на грип А (семейство Orthomyxoviridae). Цел: Целта на настоящото изследване е да се оцени антивирусната активност на етанолов екстракт от тревисто растение *Tanacetum vulgare* L. срещу някои важни човешки вируси, за които е необходима антивирусна химиотерапия и за характеризиране на екстракта за неговата антиоксидантна активност *in vitro*. Материали и методи: Суровият водно-етанолен екстракт от надземни части на *Tanacetum vulgare* L. Съдържа флавоноиди, определени като апигенин, кумарини, ескулин, танинови съединения, определени като танин и др. Антивирусна активност на етанолов екстракт от тревисто растение *Tanacetum vulgare* L. срещу коксаки вирус В1, грип А и херпес симплекс вирус тип 1 беше оценен чрез метод за намаляване на вирусния добив. Общата антиоксидантна активност се определя чрез измерване на капацитета на пробата за инхибиране на генерирането на реактивни вещества с тиобарбитурова киселина (TBARS). Резултати: Резултатите показват, че екстрактът има най-ниска токсичност върху MDBK клетъчната линия и подобна цитотоксичност при Hep-2, докато в MDCK клетките има повече от два пъти по-висока токсичност. Тестването на антивирусната активност на екстракта от *Tanacetum vulgare* L. разкрива леко инхибиране на репликацията на HSV-1 със селективен индекс 7,07 и IAV/H3N2 (SI = 3,69), но без специфичен антивирусен ефект срещу репликацията на CVB1. Оценката на антиоксидантната активност показва голяма антиоксидантна активност на етаноловия екстракт от *T. vulgare* – 26 mmol/l за приложения 20 mg/ml екстракт. Заключение: Суровият екстракт от надземни части на лечебното растение *Tanacetum vulgare* L. показва ниска цитотоксичност при Hep-2, MDBK и умерени цитотоксични ефекти в



MDCK клетки. Той проявява значителна антивирусна активност срещу HSV-1, както се определя от регистрираното инхибиране на вирусната репликация, блокирането на навлизането на вируса - етап на абсорбция и директните вирусоцидни ефекти върху извънклетъчните вириони. Наблюдаваният ефект при тестване на екстракта от *Tanacetum* върху инфекция с вируса на грип А H3N2 *in vitro* е по-лек, което вероятно е довело до от намесата в клетъчните пътища, включени в цикъла на репликация. Наличието на вируцидни и потискащи адсорбцията активност, но липсата на инхибиторни ефекти върху вирусната репликация срещу CBV-1 предполага възможно взаимодействие на компонентите на екстракта с вирусни капсидни протеини или свързани клетъчни рецептори.

**10. Rose flowers—A Delicate Perfume or a Natural Healer?** Mileva, M, Ilieva, Y, Jovtchev, G, Gateva, S, Zaharieva, MM, Georgieva, A, Dimitrova, L, Dobрева, A, Angelova, Ts, Vilhelmova-Ilieva, N, Valcheva, V, Najdenski, H. *Biomolecules*, 2021, 11(1): 127-159, ISSN: 2218-273X

#### Abstract

Plants from the Rosacea family are rich in natural molecules with beneficial biological properties, and they are widely appreciated and used in the food industry, perfumery, and cosmetics. In this review, we are considering *Rosa damascena* Mill., *Rosa alba* L., *Rosa centifolia* L., and *Rosa gallica* L. as raw materials important for producing commercial products, analyzing and comparing the main biological activities of their essential oils, hydrolates, and extracts. A literature search was performed to find materials describing (i) botanical characteristics; (ii) the phytochemical profile; and (iii) biological properties of the essential oil and extracts of these so called “old roses” that are cultivated in Bulgaria, Turkey, India, and the Middle East. The information used is from databases PubMed, Science Direct, and Google Scholar. Roses have beneficial healing properties due to their richness of beneficial components, the secondary metabolites as flavonoids (e.g., flavones, flavonols, anthocyanins), fragrant components (essential oils, e.g., monoterpenes, sesquiterpenes), and hydrolysable and condensed tannins. Rose essential oils and extracts with their therapeutic properties—as respiratory antiseptics, anti-inflammatories, mucolytics, expectorants, decongestants, and antioxidants—are able to act as symptomatic prophylactics and drugs, and in this way alleviate dramatic sufferings during severe diseases.

#### Резюме

Растенията от семейство Rosacea са богати на естествени молекули с полезни биологични свойства и са широко ценени и използвани в хранително-вкусовата промишленост, парфюмерията и козметиката. В този преглед разглеждаме *Rosa damascena* Mill., *Rosa alba* L., *Rosa centifolia* L. и *Rosa gallica* L. като суровини, важни за производството на търговски продукти, анализирани и сравнявани на основните биологични дейности на техните етерични масла, хидролати и екстракти. Търсене на литература беше извършено за намиране на материали, описващи (i) ботанически характеристики; (ii) фитохимичен профил; и (iii) биологични свойства на етеричномаслените екстракти от тези така наречени „стари рози“, които са култивирани в България, Турция, Индия и Близкия изток. Използваната информация е от бази данни PubMed, Science Direct и Google Scholar. Розите имат полезни лечебни свойства поради тяхното богатство от полезни компоненти, вторичните метаболити като флавоноиди (напр. флаволи, флавоноли, антоцианини), ароматни компоненти (етерични масла, напр.

монотерпени, сесквитерпени), и хидролизирани и кондензирани танини. Розови етерични масла и екстракти с тяхната терапевтичност свойства - като респираторни антисептици, противовъзпалителни средства, муколитици, отхрачващи средства, деконгестанти, и антиоксиданти - могат да действат като симптоматична профилактика и лекарства и по този начин да облекчат страданията по време на тежки заболявания.

**11. Antiviral activity of rapana thomasiana hemocyanin against bovine rotavirus.**  
Vilhelmova-Ilieva, N, Idakieva, K, Doumanova, L, Galabov, A.S. Acta Microbiologica  
Bulgarica, 2021, 37(1): 46-50, ISSN: 0204-8809

**Abstract**

The aim of this study was to investigate the antiviral activity of hemocyanin isolated from natural marine snail *Rapana thomasiana* (RtH) and its structural subunit RtH-1 against Bovine rotavirus (BRV). *R. thomasiana* is widespread in the Black Sea, Mediterranean Sea and Marmara Sea, and hemocyanins have received extensive research in recent years due to their antitumor, antibacterial, antiviral and antifungal activities. We examined RtH from *R. thomasiana* and its subunit (RtH-1) for its effect on the replication of Bovine rotavirus (BRV), Negovan strain, in Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells. The experiments were performed at non-toxic concentrations of both products - lower than the maximum tolerable concentration (MTC) (10 mg/mL). The anti-BRV activity of RtH and RtH-1 was determined in two time intervals - at 48 hours and 120 hours of exposure. At 48 hours, the activity of both products was significant, showing dependence on the concentration of the applied substance. In RtH-1 the most noticeable decrease in viral titer with  $\Delta \lg = 2.25$  was observed at concentrations higher than 1 mg/mL, and in RtH the same effect was observed at a concentration of 3.2 mg/mL. In the second time interval (120 hours), the activity of both products decreased significantly. It could be concluded that conformational changes in proteins are the most likely reason for the clear antiviral activity at 48 hours, followed by a decrease in activity as time progresses to 120 hours. On the other hand, virus molecules can also undergo conformational changes over time.

**Резюме**

Целта на това проучване е да се изследва антивирусната активност на хемоцианина, изолиран от морския охлюв *Rapana thomasiana* (RtH) и неговата структурна субединица RtH-1 срещу говеждия ротавирус (BRV). *R. thomasiana* е широко разпространен в Черно, Средиземно и Мраморно море, а хемоцианините се изследват интензивно през последните години поради техните активности - антибактериална, антитуморна, антивирусна, антигъбична и пр. Ние изследвахме ефекта на хемоцианина от *R. thomasiana* (RtH) и неговата субединица (RtH-1) върху репликацията на говеждия ротавирус (BRV), щам Negovan в клетки Madin-Darby bovine kidney (MDBK). Експериментите бяха проведени при нетоксични концентрации и за двата тествани продукта, а именно по-ниски от максимално допустимата концентрация (МТС) (10 mg/mL). Анти- BRV активността на RtH и RtH-1 беше определена в два времеви интервала - на 48-ия час и 120-ия час от въздействието. След 48-ия час активността на двата продукта е отчетлива, като показва зависимост от концентрацията на прилаганото вещество. При RtH-1 най-забележимо намаляване на вирусния титър с  $\Delta \lg = 2.25$  се наблюдава при концентрации по-високи от 1 mg/mL, а при RtH същият ефект се наблюдава при концентрация от 3.2 mg/mL. На втория изследван времеви интервал (120-ия час) активността и на двата продукта значително намалява. В заключение, най-

вероятно причина за отчетливата антивирусна активност на 48-ия час, последвано от намаляване на активността с напредването на времето до 120 часа са конформационни промени в протеините. От друга страна, вирусните молекули също могат да претърпят конформационни промени с течение на времето.

**12. Viral pathogens with economic impact in aquaculture.** Mancheva, K, Danova, S, Vilhelmova-Ilieva, N, Dobрева, L, Kostova, K, Simeonova, L, Atanasov, G. Viral pathogens with economic impact in aquaculture. *Acta Microbiologica Bulgarica*, 2021, 37(3): 111-121, ISSN: 0204-8809

#### Abstract

Abstract Intensive fish farming provides an increasing part of the human diet and is a major economic resource in many countries. Keeping a large number of animals together increases the risk of disease outbreaks, including viral infections. This paper aims to provide a general overview of up-to-date information on the most common viral pathogens causing serious economic losses in fish farming, with a focus on the main aquaculture farming species grown in our country: common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758), European catfish (*Silurus glanis* Linnaeus, 1758), pikeperch (*Sander lucioperca* Linnaeus, 1758), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792), Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt and Ratzeburg, 1833), etc. Despite the lack of sustainable antiviral drugs suitable for aquatic environment, fish farming is a fast-growing economic sector that needs well-thought-out combinations of immunostimulants, antiviral drugs and/or vaccination. Good management practices could reduce the number of viral outbreaks or even provide solid protection against viral diseases and could enhance the sustainable growth of fish farming by contributing to the welfare of wild fish populations.

#### Резюме

Интензивното развъждане на риба осигурява все по-голяма част от храната на човечеството и е основен икономически ресурс в много страни. Отглеждането на голям брой животни заедно, увеличава риска от огнища на заболявания, включително вирусни инфекции. Тази статия има за цел да представи обобщен преглед на актуалната информация за най-честите вирусни патогени, причиняващи сериозни икономически загуби в рибовъдството, с акцент върху основните аквакултури, отглеждани в страната ни: обикновен шаран (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758), европейски сом (*Silurus glanis* Linnaeus, 1758), бяла риба (*Sander lucioperca* Linnaeus, 1758), дъгова пъстърва (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792), руска есетра (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt and Ratzeburg, 1833) и др. Въпреки липсата на устойчиви антивирусни лекарства, подходящи за водна среда, рибовъдството е бързо развиващ се икономически сектор, който показва необходимостта от добре обмислени комбинации от имуностимуланти, антивирусни препарати и/или ваксинация. Добрите практики на управление могат да намалят броя на вирусните огнища или дори да осигурят солидна защита срещу вирусни заболявания и биха могли да увеличат устойчивото развитие на рибовъдния сектор и да сътрудничат за опазване здравето на популациите на дива риба.

**13. In Vitro Antineoplastic and Antiviral Activity and In Vivo Toxicity of Geum urbanum L. Extracts.** Zaharieva MM, Dimitrova LL, Philipov S, Nikolova I, Vilhelmova N, Grozdanov P, Nikolova N, Popova M, Bankova V, Konstantinov SM, Zheleva-Dimitrova D, Najdenski H. *Molecules*, 2022, 27(1): 245, ISSN: 1420-3049, Q1, DOI:10.3390/molecules27010245

#### Abstract

This study evaluated the in vitro antineoplastic and antiviral potential and in vivo toxicity of twelve extracts with different polarity obtained from the herbaceous perennial plant *Geum urbanum* L. (Rosaceae). In vitro cytotoxicity was determined by ISO 10993-5/2009 on bladder cancer, (T-24 and BC-3C), liver carcinoma (HEP-G2) and normal embryonic kidney (HEK-293) cell lines. The antineoplastic activity was elucidated through assays of cell clonogenicity, apoptosis induction, nuclear factor kappa B p65 (NFκB p65) activation and total glutathione levels. Neutral red uptake study was applied for antiviral activity. The most promising *G. urbanum* extract was analyzed by UHPLC–HRMS. The acute in vivo toxicity analysis was carried out following OECD 423. The ethyl acetate extract of aerial parts (EtOAc-AP) exhibited the strongest antineoplastic activity on bladder cancer cell lines (IC<sub>50</sub> = 21.33–25.28 μg/mL) by inducing apoptosis and inhibiting NFκB p65 and cell clonogenicity. EtOAc and n-butanol extracts showed moderate antiviral activity against human adenovirus type 5 and human simplex virus type I. Seventy four secondary metabolites (gallic and ellagic acid derivatives, phenolic acids, flavonoids, etc.) were identified in EtOAc-AP by UHPLC–HRMS. This extract induced no signs of acute toxicity in liver and kidney specimens of H-albino mice in doses up to 210 mg/kg. In conclusion, our study contributes substantially to the detailed pharmacological characterization of *G. urbanum*, thus helping the development of health-promoting phytopreparations.

#### Резюме

Това проучване оценява in vitro антинеопластичния и антивирусен потенциал и in vivo токсичността на дванадесет екстракта с различна полярност, получени от тревисто многогодишно растение *Geum urbanum* L. (Rosaceae). In vitro цитотоксичността е определена от ISO 10993-5/2009 за рак на пикочния мехур, (T-24 и BC-3C), чернодробен карцином (HEP-G2) и клетъчни линии на нормален ембрионален бъбрек (HEK-293). Антинеопластичната активност беше изяснена чрез анализи на клетъчна клоногенност, индукция на апоптоза, активиране на ядрен фактор карпа В р65 (NFκB p65) и общи нива на глутатион. Неутрално червено поглъщане беше приложено проучване за антивирусна активност. Най-обещаващият екстракт от *G. urbanum* е анализиран от UHPLC–HRMS. Анализът на остра in vivo токсичност беше извършен след OECD 423. Етил ацетатен екстракт от надземни части (EtOAc-AP) показва най-силната антинеопластична активност върху пикочния мехур ракови клетъчни линии (IC<sub>50</sub> = 21,33–25,28 μg/mL) чрез индуциране на апоптоза и инхибиране на NFκB p65 и клетъчна клоногенност. Екстрактите от EtOAc и n-бутанол показват умерена антивирусна активност срещу човешки аденовирус тип 5 и човешки симплекс вирус тип I. Седемдесет и четири вторични метаболита (гална и производни на елагова киселина, фенолни киселини, флавоноиди и др.) са идентифицирани в EtOAc-AP чрез UHPLC–HRMS. Този екстракт не предизвиква признаци на остра токсичност в чернодробни и бъбречни проби на H-albino мишки в дози до 210 mg/kg. В заключение, нашето проучване допринася значително за детайлното фармакологично охарактеризиране на *G. urbanum*, като по този начин подпомага развитието на поддържащи здравето фитопрепарати.

**14. Microwave-Assisted Synthesis of Lactose Acetates with Antimicrobial, Cytotoxic and Antiviral Properties.** Arabadzhieva, R., Ivanov, I., Petkova, N., Todorova, M., Tumbarski, Y., Vlaeva, I., Vilhelmova-Ilieva, N., Nikolova, I., Simeonova, L.. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 2022, 12(6): 8453-8470, ISSN: 2069-5837

#### Abstract

The task of this study was to perform the "green" synthesis of lactose octaacetate through microwave irradiation and to establish their biological activities. Lactose ester was prepared after microwave-assisted esterification of lactose with acetic anhydride (yield 85-90 %). Lactose octaacetate was characterized by a high degree of acetylation (DS 3.2-3.7). The lactose esters' structure was elucidated by infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy. Lactose octaacetate showed better antifungal activities than antibacterial activities. It possessed slight to moderate antifungal activities against *Aspergillus niger* ATCC 1015, *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Fusarium moniliforme* ATCC 38932. Lactose acetates demonstrated low cytotoxicity against three cell lines: Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells, human epithelial type 2 (HEp-2), and Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. This is the first report for antiviral activity of lactose acetates against herpes simplex virus type 1 (HSV-1), influenza virus A/Panama/2007/99/H3N2 - (IAV/H3N2), PV-1 and Coxsackievirus B1. It was found that this compound showed activity with SI = 2.4 only against PV-1, but against HSV-1, IAV/H3N2, and Coxsackievirus B1 was inactive. The current study demonstrated the applications of lactose acetates as antimicrobial and antiviral substances in food, pharmaceutical, agricultural and cosmetic preparations.

#### Резюме

Задачата на това изследване беше да се извърши "зелен" синтез на лактоза октаацетат чрез микровълново облъчване и да се установи тяхната биологична активност. Лактозният естер се получава след микровълнова естерификация на лактоза с оцетен анхидрид (добив 85-90 %). Лактозният октаацетат се характеризира с висока степен на ацетиране (DS 3.2-3.7). Структурата на лактозните естери е изяснена чрез инфрачервена спектроскопия и спектроскопия с ядрено-магнитен резонанс. Лактозният октаацетат показва по-добри противогъбични действия от антибактериалните. Притежава лека до умерена противогъбична активност срещу *Aspergillus niger* ATCC 1015, *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Fusarium moniliforme* ATCC 38932. Лактозните ацетати показват ниска цитотоксичност срещу три клетъчни линии: клетки от говежди бъбрек Madin-Darby (MDBK), човешки епителен тип 2 (HEp-2) и клетки от кучешки бъбрек на Madin-Darby (MDCK). Това е първият доклад за антивирусна активност на лактозни ацетати срещу херпес симплекс вирус тип 1 (HSV-1), грипен вирус A/Panama/2007/99/H3N2 - (IAV/H3N2), PV-1 и Coxsackievirus B1. Установено е, че това съединение показва активност с SI = 2,4 само срещу PV-1, но срещу HSV-1, IAV/H3N2 и Coxsackievirus B1 е неактивен. Настоящото проучване демонстрира приложенията на лактозните ацетати като антимикробни и антивирусни вещества в хранителни, фармацевтични, селскостопански и козметични препарати.

**15. Anti-herpes virus activity of lactobacillus' postbiotics.** Vilhelmova-Ilieva, N., Georgi Atanasov, Lora Simeonova, Lili Dobрева, Kapka Mancheva, Madlena Trepechova, Svetla Danova. *BioMedicine*, 2022, 12(1): 21-29, ISSN: 2211-8020.

## Abstract

**Background:** Recently various lactic acid bacteria (LAB) and their post-metabolites have shown many positive effects on human and animal welfare. They appear to be beneficial in different disorders and pathological conditions, including in a broad-spectrum of infectious diseases. **Aim:** To estimate in vitro the anti-herpes simplex activity of 11 postbiotic samples (lysates or cell-free supernatants - CFS) produced during the fermentation of six candidate-probiotic *Lactobacillus* strains isolated from Bulgarian fermented milk products. **Materials and methods:** In vitro protocols for assessment of different LAB samples on the Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) replication, adsorption and virucidal effects were applied using MDBK cells. **Results:** Four of the studied LAB samples expressed a statistically significant inhibition of the replication of HSV-1. The highest selective index (79.75) was calculated for the post-metabolites of *Lactiplantibacillus plantarum*, followed by a high molecular fraction of cell-derived fragments of *Limosilactobacillus fermentum* culture (S6) (SI  $\frac{1}{4}$  34.63), CFS from late exponential *L. plantarum* (SI  $\frac{1}{4}$  28.26) and neutralized CFS from *L. fermentum* (SI  $\frac{1}{4}$  28.11). Pronounced virucidal activities of the postbiotics S1, S11 (*L. fermentum*), S3 (*L. plantarum*) and S6 (*L. fermentum*) were recorded, too. The inhibitory effect of the majority of the samples on the stage of adsorption of the virus to MDBK cells was remarkable. In addition, almost all of the postbiotics exerted a protective effect on healthy cells and significantly reduced viral yield at subsequent infection. **Conclusion:** Pre-selected *Lactobacillus* strains demonstrated strain-specific effects against HSV-1. These postbiotics influence different stages of viral infection in cell cultures and their promising characteristics are currently evaluated.

## Резюме

Наскоро различни млечнокисели бактерии (LAB) и техните пост-метаболити показваха много положителни ефекти върху хуманно отношение към хората и животните. Те се оказват полезни при различни разстройства и патологични състояния, включително при широк спектър от инфекциозни заболявания. Цел: Да се оцени in vitro активността срещу херпес симплекс на 11 постбиотични проби (лизати или безклетъчни супернатанти - CFS), получени по време на ферментацията на шест кандидат-пробиотични щамове *Lactobacillus*, изолирани от български ферментирани млечни продукти. Материали и методи: In vitro протоколи за оценка на различни лабораторни проби на Herpes simplex вирус тип 1 (HSV-1) репликация, адсорбция и вируцидни ефекти бяха приложени с помощта на MDBK клетки. Резултати: Четири от изследваните LAB проби показват статистически значимо инхибиране на репликацията на HSV-1. The най-високият селективен индекс (79,75) е изчислен за пост-метаболитите на *Lactiplantibacillus plantarum*, последван от високомолекулярна фракция от клетъчни фрагменти от култура на *Limosilactobacillus fermentum* (S6) (SI = 34,63), CFS от късен експоненциален *L. plantarum* (SI = 28.26) и неутрализиран CFS от *L. fermentum* (SI = 28.11). Изразен вирусоциден активностите на постбиотиците S1, S11 (*L. fermentum*), S3 (*L. plantarum*) и S6 (*L. fermentum*) също са записани. Инхибиторният ефект на по-голямата част от пробите върху етапа на адсорбция на вируса към MDBK клетки беше забележителен. Освен това, почти всички постбиотици упражняват защитен ефект върху здравите клетки и значително намаляват вирусния добив при последваща инфекция. Заключение: Предварително избрани щамове *Lactobacillus* демонстрират специфични за щамове ефекти срещу HSV-1. Тези постбиотици влияят на различни етапи на вирусна инфекция в клетъчни култури и в момента се оценяват техните обещаващи характеристики.

**16. In Vitro Study of the Biological Potential of Wastewater Obtained after the Distillation of Four Bulgarian Oil-Bearing Roses.** Ilieva, Y., Dimitrova, L., Georgieva, A., Vilhelmova-Ilieva, N., Zaharieva, M., Kokanova-Nedialkova, Z., Dobрева, A., Nedialkov, P., Kussovski, V., Kroumov, A., Najdenski, H., Mileva, M., *Plants*, 2022, 11(8): 1073, ISSN: 2223-7747.

**Abstract**

The wastewater after rose oil distillation is usually discharged into the drainage systems and it represents a serious environmental problem. While being rich in polyphenols, which have beneficial biological activity and application in the pharmaceutical industry, limited research has been carried out about the biological activity of the specific wastewaters per se. Wastewaters after distillation of the four Bulgarian oil-bearing roses *Rosa damascena* Mill., *R. alba* L., *R. centifolia* L., and *R. gallica* L. exerted significant antioxidant activity and good antiherpes simplex virus type-1 (HSV-1) activity while maintaining a good toxicological safety profile (low cytotoxic effect) towards normal cell lines. More precisely, the non-tumorigenic cells were a human (HEK-293 embryonic kidney cells) and a mouse cell line (CCL-1 fibroblasts, which are recommended as a standard for cytotoxicity evaluation in Annex C of ISO 10993-5). The concentrations that achieved antioxidant and radical scavenging effects (0.04–0.92% v/v) were much lower than most of the maximum tolerated concentrations for the tissue culture cells (0.2–3.4% v/v). The wastewaters had a weak antiproliferative effect against *Staphylococcus aureus*. None of the wastewaters had activity against Gram-negative bacteria or a bactericidal or antifungal effect. We can conclude that these four species, which are the most preferred species worldwide for producing high-quality rose oil, have the potential to be developed as promising antioxidant and antiherpesvirus nutraceuticals.

**Резюме**

Отпадъчните води след дестилация на розово масло обикновено се заустват в дренажните системи и представлява сериозен екологичен проблем. Понеже са богати на полифеноли, които имат полезна биологична активност и приложение във фармацевтичната индустрия, има ограничени изследвания за биологичната активност на конкретните отпадъчни води per se. Отпадни води след дестилация на четирите български маслодайни рози *Rosa damascena* Mill., *R. alba* L., *R. centifolia* L., и *R. gallica* L. проявяват значителна антиоксидантна активност и добър антихерпес симплекс вирус тип-1 (HSV-1) активност при поддържане на добър токсикологичен профил на безопасност (нисък цитотоксичен ефект) към нормални клетъчни линии. По-точно, нетуморогенните клетки са човешки (HEK-293 ембрионални бъбречни клетки) и клетъчна линия на мишка (фибробласти CCL-1, които се препоръчват като стандарт за оценка на цитотоксичността в приложение С към ISO 10993-5). Концентрациите, които постигат антиоксидантен ефект и ефектите на извличане на радикали (0,04–0,92% v/v) са много по-ниски от повечето от максимално поносимите концентрации за клетки от тъканна култура (0,2–3,4% v/v). Отпадъчните води имат слабо антипролиферативно действие срещу *Staphylococcus aureus*. Нито една от отпадъчните води не е имала активност срещу Грам-отрицателни бактерии или бактерициден или противогъбичен ефект. Можем да заключим, че тези четири вида, които са най-предпочитаните видове в световен мащаб за производство на висококачествено розово масло, имат потенциал да бъдат разработен като обещаващ антиоксидант и антихерпесвирусни хранителни добавки.

**17. Bulgarian medicinal extracts as natural inhibitors with antiviral and antibacterial activity.** Nikolova, I., Paunova-Krasteva, T., Petrova, Z., Grozdanov, P., Nikolova, N., Tsonev, G., Triantafyllidis, A., Andreev, S., Trepechova, M., Milkova, V., Vilhelmova-Ilieva, N., *Plants*, 2022, 11(13): 1666, ISSN: 2223-7747

#### Abstract

**Background:** Bulgaria is a country with a wide range of medicinal plants, with uses in traditional medicine dating back for centuries. **Methods:** Disc diffusion assay was used to evaluate the antimicrobial activity of the plant extracts. A cytopathic effect inhibition test was used for the assessment of the antiviral activity of the extracts. The virucidal activity of the extracts, their influence on the stage of viral adsorption, and their protective effect on uninfected cells were reported using the end-point dilution method, and  $\Delta I_{50}$  was determined as compared to the untreated controls. **Results:** The results of the study reveal that the antibacterial potential of *G. glabra* and *H. perforatum* extracts in Gram-positive bacteria is more effective than in Gram-negative bacteria. When applied during the replication of HSV-1 and HCoV-OC-43, only some of the extracts showed weak activity, with SI between 2 to 8.5. Almost all tested extracts inhibited the extracellular virions of the studied enveloped viruses (HSV-1 and HCoV-OC-43) to a greater extent than of the non-enveloped viruses (PV-1 and HAdV-5). They inhibited the stage of viral adsorption (HSV-1) in the host cell (MDBK) to varying degrees and showed a protective effect on healthy cells (MDBK) before they were subjected to viral invasion (HSV-1). **Conclusion:** The antipathogenic potential of extracts of *H. perforatum* and *G. glabra* suggests their effectiveness as antimicrobial agents. All 13 extracts of the Bulgarian medicinal plants studied can be used to reduce viral yield in a wide range of viral infections.

#### Резюме

България е страна с широк спектър от лечебни растения, с приложение в традиционна медицина, датираща от векове. **Методи:** За оценка беше използван анализ на дискова дифузия антимикробната активност на растителните екстракти. Използван е тест за инхибиране на цитопатичния ефект за оценка на антивирусната активност на екстрактите. Вирулицидната активност на екстрактите, тяхното влияние върху етапа на вирусна адсорбция и техният защитен ефект върху неинфектирани клетки е докладван с помощта на метод на крайното разреждане и  $\Delta I_{50}$  се определя в сравнение с нетретирани контроли. **Резултати:** Резултатите от изследването показват, че антибактериалният потенциал на екстрактите от *G. glabra* и *H. Perforatum* при Грам-положителни бактерии е по-ефективен отколкото при Грам-отрицателни бактерии. Когато се прилага по време на репликацията на HSV-1 и HCoV-OC-43, само някои от екстрактите показват слаба активност, със SI между 2 и 8,5. Почти всички тествани екстракти инхибират извънклетъчните вириони на изследваните обвити вируси (HSV-1 и HCoV-OC-43) в по-голяма степен, отколкото вируси без обвивка (PV-1 и HAdV-5). Те инхибират етапа на вирусна адсорбция (HSV-1) в клетката гостоприемник (MDBK) и показва защитен ефект върху здравите клетки (MDBK), преди да бъдат подложени на вирусна инвазия (HSV-1). **Заключение:** Антипатогенният потенциал на екстрактите от *H. perforatum* и *G. Glabra* предполага тяхната ефективност като антимикробни средства. Всички 13 екстракта от български лечебни растения използвани в проучването може да се използва за намаляване на добива на вируси при широк спектър от вирусни инфекции.

**18. Biological activity and toxicological profile of *Geum urbanum* L. extracts and compounds.** Dimitrova L., Zaharieva M., Mileva M., Popova M., Philipov S., Nikolova I.,



Vilhelmova N., Kroumov A., Tserovska L., Miteva-Staleva J., Kostadinova N., Krumova E., Bankova V., Najdenski H. Modern microbiology: A challenge for improving the quality of life: Editor-in-Chief: Prof. Penka Petrova, DSc, Publishing house "Farrago", 2022, 145-156, ISBN: 978-619-206-207-1

#### Abstract

*Geum urbanum* L. is a medicinal plant used from ancient times against gastrointestinal disorders, bleeding and inflammation of mucous membranes, gums (gingivitis), etc. In the present study we demonstrate the biological activity and toxicological profile of twelve extracts from *G. urbanum* L. roots and aerial parts – methanol, petroleum ether, ethyl acetate (EtOAc), n-butanol, water, and 20% ethanol. Seven compounds from the EtOAc fraction of methanol root extracts possessing good antibacterial and radical scavenging effects were examined too. Two of them are the known catechin and gaein. For the first time we found two acetylated ellagic acid rhamnoses, new for the *Geum* – 3-O-methylellagic acid-3'-O- $\alpha$ -3''-O-acetylramnopyranoside and 3-O-methylellagic acid-3'-O- $\alpha$ -2''-O-acetylramnopyranoside. Three additional compounds, new for the species *G. urbanum* L.: 3,3'-di-O-methylellagic acid-4-O- $\beta$ -D-glucopyranoside and the triterpenoids tormentic acid and niga-ichigoside F1 were identified. In vitro cytotoxicity was determined on bladder cancer, liver carcinoma, Burkitt's lymphoma, and normal embryonic kidney cell line. The antiviral activity was studied against poliovirus type 1, coxsackie B, human respiratory syncytial virus A2, human adenovirus, and herpes simplex. The EtOAc extract from aerial parts showed high antistaphylococcal activity and low cytotoxic effect enforcing evaluation of the possibility of the fraction to provoke acute and subacute toxicity. Further studies on its potential for the development of a food additive are in progress.

#### Резюме

*Geum urbanum* L. е лечебно растение, използвано от древни времена срещу стомашно-чревни разстройства, кръвене и възпаление на лигавиците, венците (гингивит) и др. В настоящото изследване ние демонстрираме биологичната активност и токсикологичния профил на дванадесет екстракта от *G. urbanum* L., корени и надземни части – метанол, петролев етер, етилацетат (EtOAc), n-бутанол, вода и 20% етанол. Бяха изследвани и седем съединения от EtOAc фракцията на метанолови екстракти от корени, притежаващи добри антибактериални и радикални ефекти. Два от тях са известните катехин и гейн. За първи път открихме два ацетилрани рамнозида на елаговата киселина, нови за *Geum* – 3-O-methylellagic acid-3'-O- $\alpha$ -3''-O-acetylramnopyranoside и 3-O-methylellagic acid-3'-O- $\alpha$ -2''-O-acetylramnopyranoside. Идентифицирани са три допълнителни съединения, нови за вида *G. urbanum* L.: 3,3'-ди-O-метилелагова киселина-4-O- $\beta$ -D-глюкопиранозид и тритерпеноидите торментова киселина и нига-ихигозид F1. In vitro цитотоксичността е определена върху рак на пикочния мехур, карцином на черния дроб, лимфом на Бъркит и нормална ембрионална бъбречна клетъчна линия. Антивирусната активност е изследвана срещу полиовирус тип 1, коксаки B, човешки респираторен синцитиален вирус A2, човешки аденовирус, и херпес симплекс. Екстрактът от EtOAc от частите на въздуха показва висока антистафилококова активност и нисък цитотоксичен ефект, което налага оценка на възможността фракцията да провокира остра и подостра токсичност. В ход са допълнителни проучвания за потенциала му за разработване на хранителна добавка.

**19. Human coronavirus 229E and OC43 as experimental models for studying potential inhibitors of SARS-COV-2.** Nikolova I., Vilhelmova N., Nikolova N., Kandinska M., Burdzhiev N., Ishkitiev N., Tzachev Ch., Vasilev A., Dobrikov G., Grozdanov P. Modern microbiology: A challenge for improving the quality of life, Editor-in-Chief: Prof. Penka Petrova, DSc, Publishing house "Farrago", 2022, 192-200, ISBN: 978-619-206-207-1

#### Abstract

The lack of effective drug treatment and the associated high rates of morbidity and mortality from the current SARS CoV 2 epidemic as well as the potential of other members of the Coronaviridae family to cause epidemics, underscore the need to discover new drugs to treat CoV infections. This article will review the history and characteristics of the Coronavirus family, as well as review some of the project work in the future experience of developing adequate anti coronavirus therapy that will lead to successful treatment, transmission interruption, and ultimately reducing the prevalence, morbidity, and mortality from coronavirus infection on a regional and global scale. Comprehensive drug detection approaches should be used together during emerging CoV outbreaks to identify candidate drug compounds that can be broadly classified into virus-based and host-based treatment options.

#### Резюме

Липсата на ефективно лекарствено лечение и свързаните с това високи нива на заболяемост и смъртност от настоящата епидемия от SARS CoV 2, както и потенциалът на други членове на семейство Coronaviridae да причиняват епидемии, подчертават необходимостта от откриване на нови лекарства за лечение на инфекции с CoV. Тази статия ще направи преглед на историята и характеристиките на семейството на коронавирусите, както и ще направи преглед на някои от работата на проекта в бъдещия опит за разработване на адекватна антикоронавирусна терапия, която ще доведе до успешно лечение, прекъсване на предаването и в крайна сметка намаляване на разпространението, заболяемостта, и смъртност от коронарусна инфекция в регионален и световен мащаб. Всеобхватните подходи за откриване на лекарства трябва да се използват заедно по време на възникващи огнища на CoV, за да се идентифицират кандидат-лекарствени съединения, които могат да бъдат широко класифицирани в базирани на вируси и базирани на гостоприемник възможности за лечение.

**20. Natural products inhibitors of human and animal Herpes viruses.** Vilhelmova-Ilieva N., Nikolova I., Mileva M., Petrova Z., Grozdanov P., Nikolova N., Trepechova M., Galabov A. Modern microbiology: A challenge for improving the quality of life, Editor-in-Chief: Prof. Penka Petrova, DSc, Publishing house "Farrago", 2022, 201-211, ISBN: 978-619-206-207-1

#### Abstract

In herpes infections, the specific chemotherapeutics are nucleoside analogues such as acyclovir (ACV), but the most important problem in therapy is the formation of resistant mutants. The search for new therapeutic alternatives leads us up to the purpose of investigating the effects of different groups of natural products. One study is with *Rosa damascena* Mill. and *Rosa alba* L. essential oils on the viral reproduction of susceptible (Victoria) and acyclovir-resistant (R-100) strains of HSV-1 replication in vitro, individually, and in combination with acyclovir. Anti-herpes simplex virus (HSV-1) activity of 9 ellagitannins and 13 gallotannin-type compounds was also determined, and it was found in general that the series of ellagitannins showed a significantly stronger activity against HSV-1 replication than that of the gallotannins. They

were investigated three ellagitannins - castalagin, vescalagin and grandinin against replication of three of the most common herpes viruses infecting animals, namely Bovine herpesvirus- 1 (BoHV-1), Suid herpesvirus 1 (SuHV-1) and Caprine herpesvirus-1 (CapHV -1). The highest activity is demonstrated by castalagin followed by vescalagin against replication of SuHV-1. The most active ellagitannin, castalagin, was tested for activity against various stages of viral reproduction and was found to have a marked virucidal effect on HSV-1. Castalagin also suppressed HSV-1 particle attachment to MDBK cells and evidently, castalagin target is located in the earlier stages of the HSV-1 replication cycle.

#### Резюме

При херпесните инфекции специфичните химиотерапевтици са нуклеозидни аналози като напр ацикловир (ACV), но най-важният проблем в терапията е образуването на резистентни мутанти. Търсенето на нови терапевтични алтернативи ни води до целта да изследваме ефектите от различни групи природни продукти. Едно проучване е с *Rosa damascena* Mill. и *Rosa alba* L. етерични масла върху вирусната репродукция на чувствителни (Виктория) и резистентни на ацикловир (R-100) щамове на репликация на HSV-1 in vitro, индивидуално и в комбинация с ацикловир. Антихерпес симплекс вирус (HSV-1) активност на 9 елагитанини и 13 галотанинов тип съединения също бяха определени и беше установено като цяло, че серията от елагитанини показва значително по-силна активност срещу репликацията на HSV-1 от тази на галотанините. Изследвани са три елагитанина - касталагин, вескалагин и грандинин срещу репликация на три от най-често срещаните херпесни вируси, заразяващи животни, а именно говежди херпесвирус-1 (BoHV-1), Suid херпесвирус 1 (SuHV-1) и кози херпесвирус-1 (CapHV -1). Най-високата активността се демонстрира от касталагин, последван от вескалагин срещу репликация на SuHV-1. Най-активният елагитанин, касталагин, е тестван за активност срещу различни стадии на вируса репродукция и е установено, че има изразен вируциден ефект върху HSV-1. Касталагин също потиснат HSV-1 прикрепване на частици към MDBK клетки и очевидно мишената на касталагина се намира в по-ранните етапи от цикъла на репликация на HSV-1.

#### По допълнителните критерии на ИМикБ-БАН

**21. Tannins as Natural Helpers in Reinforcement of Human Health.** Neli Vilhelmova-Pieva, Angel S. Galabov. Acta Microbiologica Bulgarica, 2017, 33(3): 105-110, ISSN: 0204-8809

#### Abstract

Since ancient times, folk medicine has used the potency of a wide range of plants for treatment of various diseases. In recent years, the development of technology has made it possible to identify the active ingredients determining these properties of plants. One of the largest group of substances isolated from plants are polyphenols. Tannins are a type of polyphenols that have already proven to possess different biological activities important to human health, such as antioxidant, antitumoral, antimicrobial, antiviral, etc.. As an integral part of many food products, tannins are included in the daily diet of many people suffering from various diseases. Tannins can naturally enhance the body's ability to cope with various infections and diseases, improving the immune response and also having a positive effect on patients with heart disease and high blood pressure, which makes them promising therapeutic agents. All of the activities described above allow tannins to be considered as promising therapeutic agents. Keywords:

tannins, ellagitannins, plant substances, biological activities, antiviral effects, therapeutic agents.

#### Резюме

От древни времена народната медицина използва ефективността на голям асортимент от растения за лечение на различни заболявания. През последните години развитието на технологиите направи възможно идентифицирането на активните съставки, които определят тези свойства на растенията. Една от най-големите групи вещества, изолирани от растения, са полифенолите. Танините са вид полифеноли, вече доказали различни свои биологични активности важни за човешкото здраве, като антиоксиданта, антитуморна, антимикробна, антивирусна и други. Като неделима част от много хранителни продукти танините са включени в ежедневната диета на много хора, страдащи от различни заболявания. Танините подобряват способността на организма да се справя с различни инфекции и заболявания, усилвайки имунния отговор. Също така те имат положителен ефект върху сърдечно-съдовите заболявания и високото кръвно налягане. Описаните активности позволяват танините да се смятат за обещаващи лечебни средства.

**22. Testing of Silanes for Antiviral Activity.** Galabov, A.S., Nikolaeva-Glomb, L., Stoyanova, A., Nikolova, I., Petrov, N., Ilieva-Vilhelmova, N., Mukova, L., Vassileva-Pencheva, R., Salama, Z.. *Acta Microbiologica Bulgarica*, 2018, 34(3): 134-148, ISSN: 0204-8809

#### Abstract

Forty-three organosilicon class of compounds were tested for antiviral activity using a wide scope screening program *in vitro* (in cell cultures) including eight model strains of viruses belonging to seven taxonomic groups including causative agents of infections in which applications of chemotherapy is indicated. The results obtained demonstrated a marked activity of di(hexadecanoyloxy)diphenylsilan (compound 27) only against human cytomegalovirus (SI = 30.9). A marked activity toward this virus at a low m.o.i. was recorded also by 1-*o*-dimethyl(octadecyl)silyl-(2,3,4,6-*o*-tetraacetyl- $\beta$ -D-glucopyranosid) (compound 20). Small to borderline effect against this virus was found by silanes 2, 7, 15, 19 and 34, at silanes 2, 3 and 25 toward influenza virus A(H3N2) and at silane 9 versus vaccinia virus. As concerns the cytotoxicity it was established a strong variation towards different cell cultures used, the higher susceptibility of the HEP-2 cells been recorded.

#### Резюме

Четиридесет и три съединения от класа органосиликони бяха изпитани за антивирусна активност чрез широко-спектърна скринингова програма *in vitro*, състояща се от осем моделни щамове на вируси, принадлежащи към седем таксономични групи, включващи причинители на инфекции, при които е показано приложение на химиотерапия. Получените резултати показаха отчетлива активност на ди(хексаноилокси)дифенилсилан (съединение 27) само срещу човешкия цитомегаловирус (SI = 30.9). Отчетлива активност спрямо този вирус при ниска множественост на инфекцията бе отчетена също от 1-*o*-диметил(октадецил)силлил-(2,3,4,6-*o*- $\beta$ -D-глюкопиранозид) (съединение 20). Слаб до граничен ефект спрямо този вирус бе намерена при силани 2, 7, 15, 19 и 34, при силани 2, 3 и 25 срещу грипен вирус A(H3N2) и при силан 9 срещу вирус вакциние. Що се касае до цитотоксичността,

установено бе силно вариране спрямо различните използвани клетъчни култури, като най-висока чувствителност бе отчетена при клетки HEp-2.

**23. Viral pathogens with economic impact for aquaculture.** Mancheva, K, Danova, S, Vilhelmova-Ilieva, N, Simeonova, L, Dobрева, L, Atanasov, G. III International Baku Scientific Research Congress, Baku Eurasia University, 2021, 960-964, ISBN: 978-1-955094-17-7

#### Abstract

Aquaculture practices provide an increasing part of the human food and are a major economic resource in many countries. However, keeping a large number of fish together increases the risk of disease outbreaks, including viral infections. Viral diseases can cause mass morbidity and high mortality rate either in farmed and wild fish populations. Fish viral pathogens are very difficult for direct treatment, especially in open water environment, because of that, it is a great challenge to prevent viral outbreaks and to determinate temperature range in which outbreaks occur. The number and the distribution of fish viral pathogens worldwide rapidly grow. There are both DNA and RNA viruses that are in special supervision because generate significant economic losses infecting commercially important fish, both cultured and wild catch. The World Organization for Animal Health has a list of eleven reportable viral fish diseases: Epizootic haematopoietic necrosis, Infectious salmon anaemia, Infectious haematopoietic necrosis, Koi herpesvirus disease, Oncorhynchus masou virus disease, Red sea bream iridovirus disease, Salmonid alphavirus disease, Spring viraemia of carp, Tilapia lake virus disease, Viral encephalopathy and retinopathy, Viral haemorrhagic septicaemia [www.oie]. These viral diseases can be characterised with 95% morbidity and over 95% mortality of the infected fish [www.cabi]. Even if mortality is lower, these diseases induce huge economic losses, affecting fish biomass, slowing fish growth rate and decreasing fillet quality [www.oie]. Also, fish with viral diseases are more susceptible to bacterial infections which additionally increase health damages and induce financial losses.

In this paper we propose a short description about geographic distribution, temperature range of the outbreaks, morbidity and mortality, typical host species, and typical clinical signs of the diseases caused by Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNS), Infectious salmon anaemia virus (ISAV), Infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV), Koi herpesvirus (KHV), Oncorhynchus masou virus (OMV), Red sea bream iridovirus (RSBI), Salmonid alphavirus (SA), Spring viraemia of carp virus (SV), Tilapia lake virus (TiLV), Viral nervous necrosis virus (VNNV), Viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV).

#### Резюме

Практиките за аквакултури осигуряват все по-голяма част от човешката храна и са основен икономически ресурс в много страни. Въпреки това, държането на голям брой риби заедно увеличава риска от огнища на болести, включително вирусни инфекции. Вирусните заболявания могат да причинят масова заболеваемост и висока смъртност както в популациите на отглеждани във ферми, така и в диви риби. Рибните вирусни патогени са много трудни за директно лечение, особено в открита водна среда, поради което е голямо предизвикателство да се предотвратят вирусни огнища и да се определи температурният диапазон, в който възникват огнища. Броят и разпространението на рибните вирусни патогени по света бързо нараства. Има както ДНК, така и РНК вируси, които са под специален надзор, тъй като генерират значителни икономически загуби,

заразявайки важни за търговската мрежа риби, както култивирани, така и диви уловени. Световната организация за здравеопазване на животните има списък от единадесет вирусни болести по рибите, подлежащи на докладване: Епизоотична хематопоеична некроза, Инфекциозна анемия на съомгата, Инфекциозна хематопоеична некроза, Кой херпесвирусна болест, *Oncorhynchus masou* вирусна болест, Червеноморска ципура иридовирусна болест, *Salmonid alphavirus* болест, Пролетна виремия на шаран, болест на *Tilapia lake virus*, вирусна енцефалопатия и ретинопатия, вирусна хеморагична септицемия [www.oie]. Тези вирусни заболявания могат да се характеризират с 95% заболяемост и над 95% смъртност на заразените риби [www.cabi]. Дори ако смъртността е по-ниска, тези заболявания причиняват огромни икономически загуби, засягайки рибната биомаса, забавяйки скоростта на растеж на рибата и намалявайки качеството на филето [www.oie]. Освен това рибите с вирусни заболявания са по-податливи на бактериални инфекции, които допълнително увеличават щетите за здравето и водят до финансови загуби.

В тази статия предлагаме кратко описание на географското разпространение, температурния диапазон на огнищата, заболяемостта и смъртността, типичните видове гостоприемници и типичните клинични признаци на заболяванията, причинени от вируса на епизоотична хематопоеична некроза (EHNS), вируса на инфекциозната анемия на съомгата (ISAV), вирус на инфекциозна хематопоеична некроза (IHNV), вирус на кой херпес (KHV), вирус *Oncorhynchus masou* (OMV), иридовирус на червена морска ципура (RSBI), алфавирус на *Salmonid* (SA), вирус на пролетна виремия на шарана (SV), вирус на тилапия (TiLV), вирус на вирусна нервна некроза (VNNV), вирус на вирусна хеморагична септицемия (VHSV).