Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Magdalena Załęska-Wawro

Ocena przydatności wybranych metod biologii molekularnej w diagnostyce choroby aleuckiej norek

Praca doktorska wykonana

w Katedrze Epizootiologii

Promotor:

Dr hab. Jan Siemionek

Olsztyn, 2023 r.

Składam serdeczne podziękowania

Panu dr hab. Janowi Siemionkowi

za wskazanie tematu, życzliwość i pomoc w realizacji rozprawy doktorskiej

Panu prof. dr. hab. Wojciechowi Szwedzie

za umożliwienie realizacji rozprawy doktorskiej w Katedrze Epizootiologii

Pani dr hab. Annie Szczerba-Turek, prof. UWM

za cenne uwagi przy wykonaniu badań molekularnych

Pani mgr Kończyk-Kmiecik Klaudii i mgr Lipczyńskiej-Ilczuk Karolinie

za pomoc w wykonaniu badań molekularnych

Pani dr Joannie Pajdak-Czaus

za okazaną pomoc

Moim rodzicom i rodzinie - za wsparcie

Źródło finansowania

Badania finansowane przez Narodowe Centrum Nauki i wykonane w ramach projektu badawczego własnego nr NN 308 58 62 40 pt. „Badania molekularne w zwalczaniu i monitorowaniu sytuacji epizootycznej choroby aleuckiej” pod kierownictwem dr hab. Jana Siemionka, prof. UWM.

Część wyników, które są zawarte w pracy została opublikowana.

Zgoda komisji etycznej na wykonanie doświadczenia na zwierzętach

Po rozpatrzeniu wniosku pt.: „Zastosowanie wybranych metod biologii molekularnej w nowoczesnej diagnostyce choroby aleuckiej norek” z 17.06.2010 r. lokalna komisja etyczna wyraziła zgodę na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach na mocy uchwały nr 65/2010/DTN.

Spis treści

WYKAZ SKRÓTÓW I AKRONIMÓW 7

1.WSTĘP 8

1.1. Hodowla zwierząt futerkowych, produkcja i znaczenie gospodarcze 9

1.2. Charakterystyka parwowirusów zwierząt i człowieka 12

1.3. Epidemiologia 12

1.4. Etiologia, źródła i drogi zakażenia 13

1.5. Patogeneza i obraz kliniczny 15

1.6. Diagnostyka 18

1.7. Zapobieganie i zwalczanie 20

2. UZASADNIENIE I CEL BADAŃ 22

3. MATERIAŁ I METODY 24

3.1. Zwierzęta doświadczalne 24

3.2. Materiał do badań 26

3.2.1. Materiał do badań serologicznych 26

3.2.2. Materiał do badań molekularnych 26

3.3. Metodyka badań serologicznych 26

3.4. Metodyka badań molekularnych 29

3.4.1. Izolacja genomowego DNA z narządów 29

3.4.2. Izolacja genomowego DNA ze środowiska fermy 30

3.4.3. PCR, nested PCR, real-time PCR 30

3.4.3.1. Amplifikacja fragmentu genu VP2 AMDV, w PCR 30

3.4.3.1.1. Amplifikacja fragmentu genu VP2 AMDV z narządów 30

3.4.3.1.2. Amplifikacja fragmentu genu VP2 AMDV ze środowiska fermy 31

3.4.4. Amplifikacja fragmentu genu NS1 AMDV z narządów w nested PCR 32
3.4.5. Elektroforeza w żelu agarowym 33
3.4.6. Amplifikacja fragmentu genu NS1 AMDV z narządów w real-time PCR..... 34
3.4.7. Przygotowanie produktów uzyskanych w PCR do sekwencjonowania 41
3.4.8. Sekwencjonowanie 41
4. WYNIKI 42
4.1. Wyniki badania serologicznego 42
4.2. Wyniki amplifikacji fragmentu genu VP2 AMDV z narządów w PCR i nested PCR 43
4.3. Wyniki amplifikacji fragmentu genu VP2 AMDV ze środowiska w PCR..... 53
4.4. Wyniki amplifikacji fragmentu genu NS1 AMDV z narządów w real-time PCR.... 56
4.5. Wyniki sekwencjonowania fragmentu genu VP2 AMDV w PCR 59
5. OMÓWIENIE 71
6. WNIOSKI 89
7. PIŚMIENNICTWO 90
STRESZCZENIE 103
SUMMARY 104

WYKAZ SKRÓTÓW I AKRONIMÓW

AMD - (ang. Aleutian Mink Disease), choroba aleucka norek

AMDV – (ang. Aleutian Mink Disease Virus), wirus choroby aleuckiej norek

BSA - (ang. Bovine Serum Albumin), surowicza albumina wołowa

FAM – sonda oligonukleotydowa podwójnie znakowana mająca dołączony na końcu 5' fluorofor, natomiast na końcu 3' jeden z wygaszaczy, jest przeznaczona m.in. do ilościowego oznaczania produktów PCR, detekcji mutacji

ORF - (ang. Open Reading Frame) otwarta ramka odczytu stanowiąca sekwencję DNA lub RNA mogąca ulegać translacji

RPM - (ang. Round Per Minute) liczba obrotów na minutę

PCR - (ang. Polimerase Chain Reaction) łańcuchowa reakcja polimerazy

Nested PCR- PCR gniazdowy

Real-time PCR - łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym

TaqMan - sondy używane w metodzie real-time PCR, składające się z fluorescencyjnie wyznakowanych oligonukleotydów o specyficznej sekwencji

1.WSTĘP

Chorobę aleucką norek (łac. *Morbus aleutica lutreolum*) pierwszy raz stwierdzono w 1940 r., w stadzie fermowych norek amerykańskich, w Ameryce Płn. Etiologii choroby nie ustalono. KARSTAD i PRIDHAM (1962) opisali przebieg choroby w stadzie fermowych norek amerykańskich wysuwając podejrzenie etiologii wirusowej. Patogeneza tej choroby i jej przebieg w stadach fermowych norek odbiegał od zakażeń innych parwowirusów (BLOOM i in. 1994, WU in. 1994).

Choroba aleucka jest nieuleczalną chorobą norek, która przebiega najczęściej bezobjawowo i powoduje duże straty ekonomiczne w fermowej hodowli. W zakażonych stadach norek fermowych obserwuje się poronienia, niską plennością oraz wysoką śmiertelność osesków i upadki kilkumiesięcznych norek (ALEXANDERSEN i BLOOM 1986, GLIŃSKI i KOSTRO 2002, FARID i in. 2012, JENSEN i in. 2014, KOSTRO i in. 1999, REICHERT i KOSTRO 2014a, SIEMIONEK i in. 2017b).

W wyniku intensywnej i ciągłej replikacji wirusa u zakażonych norek rozwija się choroba autoimmunologiczna. Prowadzi ona do nadmiernej syntezy swoistych przeciwciał, intensywnego rozplemu komórek plazmatycznych, hipergammaglobulinemii oraz tworzenia się kompleksów immunologicznych (LARSEN i PORTER 1974, ALEXANDERSEN i in. 1994, ALEXANDERSEN i in. 1989, BEST i BLOOM 2005, HAHN 2002, KOSTRO i in. 1999, WÓJCICKA-LORENTOWICZ i in. 1999).

W latach 60. wdrożono do diagnostyki AMD test jodowo aglutynowy, który jest samodzielnie wykonywany przez hodowców w stadach norek fermowych (STEFFEN i SANDER-WACHOWICZ 1968). W Europie do zwalczania AMDV w stadach norek fermowych stosuje się najczęściej elektroforezę przeciwprądową surowicy tzw. CIEP (CHO i GREENFIELD 1978, KOPCZEWSKI i in. 1991, BLOOM i in. 2001, SIEMIONEK in. 2017b).

Podstawy prawne zwalczanie AMD w krajach o intensywnej hodowli norek amerykańskich są zróżnicowane. W większości krajów choroba jest zwalczana dobrowolnie przez hodowców norek. Dania jest wyjątkowym krajem, bowiem AMD podlega obowiązkowi zgłaszania i zwalczania. Odpowiednie przepisy regulują zasady postępowania, metody diagnostyki i zwalczania (THEMUDO i in. 2012). Brak takich zasad postepowania w innych krajach, także w Polsce, utrudnia skuteczne zwalczanie AMD.

U zwierząt gospodarskich stosuje się immunoprofilaktykę zapobiegającą szerzeniu się chorób (SZWEDA 2009). W stadach fermowych norek amerykańskich podejmowano próby opracowania skutecznych szczepionek p/AMD, na bazie inaktywowanego AMDV lub niestrukturalnego białka kapsydu wirusa. Były one jednak nieskuteczne bowiem nie zapobiegały wystąpieniu choroby po wykonaniu zakażenia kontrolnego (CASTELRUIZ i in. 2005, AASTED i in. 1998).

Skuteczność zwalczania AMDV zależy głownie od dostępu do nowoczesnych metod diagnostycznych, umożliwiających natychmiastową eliminację zakażonych norek ze stada. W tym celu podejmowane są badania nad opracowaniem nowoczesnych metod diagnostycznych uwzględniające nowatorskie metody ELISA i biologii molekularnej.

1.1. Hodowla zwierząt futerkowych, produkcja i znaczenie gospodarcze

Od najdawniejszych czasów skóry zwierząt były przydatne w życiu człowieka. Skóry zwierząt szlachetnych stanowiły okrycie możnowładców, świadcząc o ich wysokim statusie społecznym (KOWALSKA i in. 2016). W średniowieczu były one towarem luksusowym. Na terenie Rusi w X-XII w. skóry zwierząt futerkowych były środkiem płatniczym, cennym prezentem oraz stanowiły część posagu bogatej panny młodej. W XVII - XIX w. po przyłączeniu Syberii do Rosji kraj ten był największym producentem skór.

Hodowlę mięsożernych zwierząt futerkowych tj. lisa polarnego, pospolitego oraz norki amerykańskiej rozpoczęto w Ameryce Północnej w XIX w. Ich import w XX w. do Europy zapoczątkował hodowlę fermowych lisów srebrzystych. W Polsce fermy lisów postały w 1924 r., fermy norek amerykańskich w 1928 r. Hodowli sprzyjał rosnący popyt na skóry zwierząt futerkowych i coraz większe trudności w ich pozyskiwaniu od zwierząt dziko żyjących (GLIŃSKI i KOSTRO 2002).

Fermy zwierząt futerkowych produkują ok. 85% skór, natomiast pozostałe skóry są pozyskiwane od dziko żyjących. Przemysł futrzarski chętnie skupuje skóry od hodowlanych zwierząt futerkowych. Dzisiaj są to głównie skóry mięsożernych zwierząt futerkowych.

Pozyskiwanie skór królików jest obecnie nieopłacalne, bowiem nastąpiły zmiany w technologii hodowli królików, w kierunku intensywnej produkcji ras mięsnych.

W 2009 r. 64,73% światowej produkcji skór norek i 55,6% skór lisów pochodziło z europejskich ferm hodowlanych. Największym producentem skór norek na świecie były Dania (ok. 30,1%), Chiny (19,3%), Holandia (9,7%) i Polska (7,9%).

USA produkowały ok 4 mln. skór norek fermowych, głównie odmiany czarnej.

Dużym producentem skór lisów w Europie była Szwecja i Finlandia. Łotwa, Litwa i Estonia dostarczały skóry do greckiej Kastorii – znanego ośrodka produkcji futrzarskiej.

Hodowla i produkcja skór zwierząt futerkowych w Polsce jest jednym z najlepiej zorganizowanych działów rolnictwa. W 2018 r. Polska była drugim po Danii producentem skór norek w Europie (ok. 10 mln). Skóry sprzedawane były tylko przez domy aukcyjne w Helsinkach, Kopenhadze, Seatle, Toronto (HODOWCA ZW. FUTERKOWYCH 2017, tab. 1). Głównymi odbiorcami były ChRL, Rosji, USA. Surowe skóry norek, lisów, jenotów, szynszyli były nielicznymi polskimi produktami rolnymi eksportowanymi do ChRL.

Tab.1. Światowa produkcja skór norek fermowych (Hodowca zw. futerkowych 15,73, 2017)

Państwo	2015 r. (tys.)	2016 r. (tys.)	2017 r. (tys.)
Belgia	150	150	110
Dania	17800	18600	17100
Finlandia	1900	1900	1600
Francja	180	200	140
Grecja	1800	2250	1700
Hiszpania	750	800	680
Holandia	5300	5300	4000
Irlandia	150	150	75
Islandia	200	220	210
Niemcy	200	200	100
Polska	**8000**	**9000**	**9000**
Ukraina	2800	3850	3200
Włochy	150	160	120

Chiny	32000	20000	8000
Kanada	2400	2800	2000
Rosja	2400	1800	1700
USA	42000	45000	42000

Zgodnie z polskim ustawodawstwem norki, lisy hodowlane są zwierzętami gospodarskimi. Mimo bardzo krótkiego tj. 100 letniego okresu domestykacji, czyli 100 pokoleń norek uzyskano znaczną poprawę głównych cech hodowlanych. W wyniku domestykacji nastąpił m.in. 30-50% wzrost masy ciała, uzyskano nowe odmiany barwne i pożądane cechy behawioralne. Obecnie norki przeznaczone do dalszej hodowli musza być spokojne, łagodne, o zrównoważonym temperamencie i bardzo ufne wobec człowieka. Gospodarstwa hodowli zwierząt futerkowych podlegają okresowej kontroli m.in. przez Powiatową Inspekcję Weterynaryjną (SIEMIONEK 2001, GLIŃSKI i KOSTRO 2002).

Hodowla i produkcja zwierząt futerkowych w Polsce jest ważną częścią gospodarki o dużym znaczeniu ekonomicznym. Fermy mięsożernych zwierząt futerkowych zagospodarowują w ciągu roku ok. 400 tys. t. ubocznych produktów pochodzenia zwierzęcego. Są one pozyskiwane z zakładów przetwórstwa mięsnego, drobiarskiego, rybnego. W mniejszym stopniu pozyskuje się uboczne produkty zbożowe z zakładów przemysłu zbożowego. Produkty te są niezdatnych do spożycia dla ludzi lub nie są dla nich przeznaczone. W Polsce od 1995. r. w żywieniu mięsożernych zwierząt futerkowych nie stosuje się padliny.

Polskie gospodarstwa hodowli zwierząt futerkowych zapewniają pracę dla ok. 50 tys. pracowników. Roczne przychody polskich hodowców wynoszą ok. 400 mln €.

Hodowcy i producenci zwierząt futerkowych dla podwyższenia jakości produkcji zrzeszeni są w związkach branżowych tj. Polski Związek Hodowców i Producentów Zwierząt Futerkowych (PZHiPZF) oraz Polski Związek Zwierząt Futerkowych (PZF). Głównym celem działalności obu związków jest systematyczne szkolenie hodowców m.in. w celu wdrożenia zasady dobrej praktyki hodowli, ze szczególnym uwzględnieniem dobrostanu. Fermy mięsożernych zwierząt futerkowych zlokalizowane są głównie w województwach wielkopolskim, zachodniopomorskim i lubelskim (JEŻEWSKA-WITKOWSKA i in. 2014).

1.2. Charakterystyka parwowirusów zwierząt i człowieka

Wirusy z rodzaju *Parvoviridae* są patogenami wielu gatunków zwierząt oraz człowieka. Porcine Parvovirus (PPV) wywołuje parwowirozę świń, Canine Parvovirus (CPV) chorobę parwowirusową psów, Feline Parvovirus (FPV) panleukopenię kotów, Racoon Parvovirus (RPV) zakażenia parwowirusowe szopów, Blue Fox Parvovirus (BFPV) – zakażenia parwowirusowe lisów niebieskich.

Człowiek jest także wrażliwy na zakażenie parwowirusem B19 (HALL i MCCANDLISH 1991, BEST i BLOOM 2005). Stwierdzano sporadyczne zachorowania ludzi, w stadach norek chorych na AMD (JEPSEN i in. 2009).

W populacji norek krążą dwa autonomiczne parwowirusy, które wywołują całkowicie odmienne klinicznie choroby. Mink Enteritis Virus (MEV) wywołuje wirusowe zapalenie jelit norek, natomiast Aleutian Mink Diseases Virus (AMDV) jest czynnikiem etiologicznym choroby aleuckiej norek (AMD).

AMDV jest bardzo mały, ma średnicę ok. 18-26 nm i nie posiada otoczki. Jego DNA zawiera ok. 5000 zasad. Kapsyd parwowirusa determinuje powinowactwo do określonego gatunku zwierząt. Genom parwowirusa zawiera białka VP2, VP1 oraz trzy niestrukturalne białka NS1, NS i NS3 (HUANG i in. 2014).

Determinują one immunogenność AMDV oraz powinowactwo do określonego gatunku zwierząt i tropizm. VP2 warunkują prawdopodobnie patogenność (CANUTI i in. 2015, CANUTI i in. 2022, SIEMIONEK i in. 2017a). Bierna odporność matczyna oraz czynna odporność swoista powinny zapobiegać rozwojowi choroby. W okresie luki immunologicznej szczenięta norek są szczególnie wrażliwe na zakażenie AMDV (BLOOM i in. 1997, BLOOM i in. 2001, INGRAM I CHO 1984.

1.3. Epidemiologia

Choroba występuje u wszystkich odmian norki amerykańskiej. Norki odmiany aleuckiej są najbardziej podatne na zakażenie AMDV, co objawia się syndromem Chediak-Higashi (PADGETT i in. 1964). Jest to dziedziczny autosomalny, recesywny defekt układu odpornościowego, objawiający się u szczeniąt już w pierwszych dniach życia. Powoduje on wystąpienie objawów klinicznych, przebiegających przewlekle i prowadzi do śmierci. U innych odmian norek AMD przebiega najczęściej bezobjawowo lub subklinicznie. Zdaniem badaczy istnieje potencjalne zagrożenie AMDV dla innych gatunków zwierząt.

Na zakażenie AMDV wrażliwe są inne gatunki z rodziny łasicowatych (*Mustelidae*) oraz inne zwierzęta drapieżne. Zagrożone jest wielu gatunków tj.: fretka domowa (*Mustela putorius furo*), gronostaj europejski (*Mustela erminea*), kuna leśna (*Martes martes*), kuna domowa (*Martes foina*), wydra europejska (*Lutra lutra*), wydra kanadyjska (*Lontra canadensis*), borsuk europejski (*Meles meles*), skunks zwyczajny (*Mephitis mephitis*), szop pracz (*Procyon lotor*), ryś rudy (*Lynx rufus*), żeneta zwyczajna -*Genetta genetta* (FARID 2013, FOURNIER-CHAMBRILLON i in. 2004, MAÑAS i in. 2001, STEINEL i in. 2001). LEIMANN i in. (2015) wykazali możliwość zakażenia jenota azjatyckiego (*Nyctereutes procynoides*) oraz tchórza zwyczajnego (*Mustela putorius*). Spontanicznie AMDV występuje u fretek (UNE i in. 2000).

1.4. Etiologia, źródła i drogi zakażenia

Choroba aleucka norek wywołana jest przez AMDV z rodziny *Parvoviridae*, podrodziny *Parvovirinae*, rodzaju *Amdoparvovirus,* podrodzaju Carnivore amdoparvovirus-1 Do niedawna AMDV był jedynym przedstawiciel rodzaju *Amdoparvovirus* (NITUCH i in. 2012, COTMORE i in. 2014, SIEMIONEK i in. 2017b). Obecnie do tego rodzaju zalicza się Gray Fox Amdovirus – GFAV, określany także jako Carnivore amdoparvovirusy 2 (CANUTI i in. 2015, 2022). Stwierdzono występowanie przeciwciał/ zakażeń AMDV u różnych odmian norek fermowych, u dzikich norek amerykańskich - *Neovison vison* oraz u norek europejskich -*Mustela lutreola* (JENSEN i in. 2012, MAÑAS i in. 2001, OLOFSSON i in. 1999, PERRSON i in. 2015, PÕDRA i GÓMEZ 2018, YAMAGUCHI i MACDONALD 2001).

Carnivore amdoparvovirus-1 posiada pojedynczy łańcuch DNA składający się z 4748 zasad (OLEKSIEWICZ i in. 1996, KOSTRO i in. 1999, NITUCH i in. 2012).

Wykazano obecność dwóch otwartych ramek odczytu (ORF - Open Reading Frame) w obrębie genomu AMDV. Lewa część - 5’ ORF odpowiada za kodowanie białek NS1 i NS2. Prawa część - 3’ ORF genomu koduje białka VP1 i VP2 (OIE i in. 1996).

Replikacja następuje poprzez przepisanie materiału genetycznego AMDV na dwuniciowy DNA a następnie na mRNA (Bloom i in. 1997, 1998).

Geny NS1, VP1 i VP2 odpowiedzialne są za replikację wirionu przez kodowanie białek kapsydu oraz immunogenność.

Białko NS1 jest odpowiedzialne głównie za prawidłową replikację i efektywną transkrypcję (BLOOM i in. 1997, OLEKSIEWICZ i in. 1996, KOSTRO i in 1999).

Białko NS2 reguluje produkcję białek wirusa (OLEKSIEWICZ i in. 1996). Białko VP2 zawierające 647 aminokwasów (90% wszystkich białek) odgrywa istotną rolę w patogenności wirusa. Odpowiada także za neutralizację AMDV przez swoiste przeciwciała, co niestety nie jest zapobiega replikacji wirusa (BLOOM i in. 2001, NITUCH i in. 2012, WANG i in. 2014).

Niektórzy badacze uważają, że geny NS1, VP2 warunkują zjadliwość i patogenność, ale ich funkcje nie zostały jednoznacznie wykazane (GOTTSCHALCK i in. 1991, OIE i in. 1996, OLOFSSON i in. 1999). Białka VP1 i VP2 AMDV wykazują tylko 52% podobieństwo do analogicznych białek CPV psów (COSTELLO i in. 1998).

Genom wirusa AMD jest bardzo zmienny, wcześniejsze analizy epidemiologiczne wirusa w Europie wykazały, że szczepy AMDV można przyporządkować do 3 głównych kladów, mających wspólne sekwencje nukleotydowe. Taka klasyfikacja wirusów jest przydatna m.in. w celu ustalenia miejsca jego pochodzenia.

Przyporządkowanie szczepów AMDV do określonego kladu nie zależy jednak od: stopnia wirulencji, lokalizacji geograficznej lub okresu izolacji AMDV (KNUUTTILA i in. 2009b, SCHUIERER i in. 1997). Nadal nie wiadomo, co warunkuje filogenetyczne przyporządkowanie izolatów AMDV do określonego kladu. Obserwuje się liczne mutacje w obrębie genu NS1 i VP2 kodującego białka. Na ich podstawie wyróżnia się szczepy wirusa o różnym stopniu zjadliwości. Zjadliwość szczepu AMDV nie jest jednak związana z budową genomu (JENSEN i in. 2014, PARK i in. 2005).

Wokół ognisk AMD, w okolicznych stadach fermowych norek stwierdza się znaczne różnice w budowie AMDV (CANUTI i in. 2016). Do szczepów wysoce patogennych zalicza się AMDV-Utah, AMDV-DK, AMDV-United, natomiast do mniej zjadliwych AMDV-Pullman i AMDV-G (WANG i in. 2014).

Szczep AMDV-Utah powoduje przetrwałe zakażenia prowadzące do upośledzenia funkcjonowania układu immunologicznego norek (QUI i in. 2005). Oseski zakażone szczepem wysoce zjadliwym AMDV giną w 90-100%, wśród objawów klasycznej postaci choroby. Zakażone szczepem AMDV mniej zjadliwym chorują 50-70% lub nie wykazują objawów klinicznych. Ich śmiertelność waha się w granicach 30 - 50% (KOSTRO i in. 1999).

Głównym źródłem zakażenia bezpośredniego są norki chore lub nosiciele bezobjawowi AMDV. Transmisja wirusa odbywa się głównie drogą poziomą tj. z krwią, moczem, śliną oraz kałem (TONG i in 2020). Do zakażenia dochodzi także drogą pionową (w okresie ciąży- przez łożysko). Zakażenie przez owady jest dyskusyjne, chociaż pewną rolę w szerzeniu się zakażenia AMDV mogą odgrywać muchy (PRIETO i in. 2018). Obsługa pracująca na innych fermach może także przenieść zakażenie AMDV drogą jatrogenną (NITUCH i in. 2012).

Wirus pojawia się w kale, moczu i ślinie już 10. dnia po zakażeniu. W mleku występuje do 40 dnia po porodzie (KOSTRO i in. 1999, SIEMIONEK i in. 2017a). Bramą zakażenia jest układ pokarmowy, rozrodczy, rzadziej uszkodzona skóra. NITUCH i in. (2012) wskazują na możliwość zakażenia drogą aerogenną. LARSEN I PORTER (1974) wykazali AMDV w tkankach, w surowicy i moczu. Po eksperymentalnym zakażeniu wykryto DNA AMDV i przeciwciała swoiste (FARID i in. 2015) oraz potwierdzono jego obecność w kale (JENSEN i in. 2011, TONG i in. 2020).

Wykazano obecność AMDV w środowisku fermy dlatego może być ona wtórnym źródłem zakażenia (PRIETO i in. 2017).

Prawdopodobnie naturalnym rezerwuarem AMDV mogą być dzikie norki, inne łasicowate i rzadziej lisy, psy, koty, króliki, myszy (KOSTRO i in. 1999, SIEMIONEK i in. 2017a, ZALEWSKI I IN. 2021).

AMDV jest oporny na działanie czynników środowiskowych oraz na eter, chloroform, enzymy, niskie pH. Może przebywać w glebie przez wiele lat. Ulega inaktywacji w temp. 100°C (HUSSAIN in. 2014) oraz pod wpływem formaliny, chloraminy, jodyny, chlorowodoru, wodorotlenku sodu. W celu skuteczniejszej dezynfekcji w fermach norek stosowana jest dezynfekcja chemiczna oraz fizyczna (KOSTRO i in. 1999).

1.5. Patogeneza i obraz kliniczny

Przebieg choroby aleuckiej norek zależy głownie od wieku norek. AMD u szczeniąt przebiega ostro, natomiast u starszych norek przewlekle (BEST i in. 2005). Niezależnie od przebiegu choroby wpływ AMDV na organizm norek jest bardzo znaczny. AMDV jest przyczyną dużych strat w stadach fermowych norek amerykańskich (ALEXANDERSEN i in. 1994, INGRAM i CHO 2005).

AMDV nie ma właściwości hemaglutynacyjnych. Jego replikacja następuje w jądrze komórkowym i zależy głownie od biochemicznej aktywności białek niestrukturalnych (CHRISTENSEN i in. 1995, OLEKSIEWICZ i in. 1996).

AMDV ulega replikacji w narządach tj. w tkance limfatycznej śledziony, węzłach chłonnych, w komórkach Browicz-Kuppfera, w limfocytach B i T (AASTED i BLOOM 1983, JENSEN i in. 2000). Możliwa jest replikacja AMDV in vivo oraz in vitro (BLOOM i in. 1998)

W stadzie norek fermowych wolnym od AMDV, po zakażeniu szczeniąt choroba objawia się jako ostre śródmiąższowe zapalenie płuc (ALEXANDERSEN i BLOOM 1986). Okres inkubacji waha się w granicach 24 -120 dni (GLIŃSKI I KOSTRO 2002). Po zakażeniu AMDV replikuje się w błonie hialinowej pneumocytów II stopnia (ALEXANDERSEN I BLOOM 1986, ALEXANDERSEN i in. 1988, ALEXANDERSEN i in. 1989, Oleksiewicz i Alexandersen 1997, STORGAARD i in. 1997, WOJCICKA-LORENOWICZ i in. 1999, WU i in. 1994).

Postać przewlekła choroby jest wynikiem wcześniejszego zakażenia norek. Obraz kliniczny choroby nie jest wówczas tak charakterystyczny. Przebieg może być bezobjawowy lub podkliniczny. Obserwuje się utratę połysku, elastyczności okrywy włosowej. Upośledzony apetyt prowadzi do zmniejszonych przyrostów masy ciała oraz wychudzenia.

Najistotniejsze objawy AMD są wynikiem zaburzeń w funkcjonowaniu układu rozrodczego tj. liczne poronienia, resorpcja płodów, martwe płody lub rodzenie mało żywotnych osesków norek (BROLL I ALEXANDERSEN 1996, QUI i in. 2005). Czasami u fermowych norek amerykańskich występują objawy neurologiczne (JAHNS i in. 2010)

Do ciężkich objawów należą kłębuszkowe zapalenie nerek lub zapalenie mózgu. Zmiany zapalne w naczyniach krwionośnych mogą występować w innych tkankach i są wynikiem powstawania kompleksów antygen-przeciwciało. Ciągłe stymulowanie układu immunologicznego prowadzi do nadmiernej produkcji immunoglobulin, powstawania nacieków komórek plazmatycznych (TABEL I INGRAM 1970) oraz zapaleń błony naczyniowej oraz rogówki oka (HADLOW 1982). Sporadycznie występują smoliste biegunki, charakterystyczne dla krwi w płynnym kale oraz objawy neurologiczne tj. zaburzenia równowagi (JAHNS i in. 2010)

U norek zakażonych AMDV następuje znaczny spadek odporności, dlatego możliwe są wtórne zakażenia bakteryjne wywołane przez *Pasteurella spp., Salmonella spp., Streptococcus spp.* (WOJCICKA-LORENOWICZ i in. 1999).

Inne parwowirusy także powodują zakażenie organizmu, ale indukują odpowiedź immunologiczną, która chroni zakażone zwierzęta przed dalszym rozwojem choroby. Niestety, w wyniku zakażenia AMDV odpowiedź immunologiczna stymuluje nasilenie objawów AMD (CASTELRUIZ i in. 2005, MCKENNA i in. 1999).

Zakażenie AMDV wywołuje bardzo silną odpowiedź immunologiczną, ale nawet bardzo wysokie miana swoistych przeciwciał nie mogą neutralizować wirusa, dlatego nadal intensywnie się replikuje (CASTELRUIZ i in. 2005, CANUTI i in 2015).

Parwowirus wykazuje tropizm do tkanki limfoidalnej tj. do limfocytów B i T oraz śledziony, węzłów chłonnych i szpiku kostnego. U osesków replikacja wirusa następuje w nabłonku pęcherzyków płucnych typu II. Za powinowactwo do określonych tkanek odpowiada prawdopodobnie białko ABP (ADV Binding Protein) będące receptorem komórkowym umożliwiającym wnikanie wirusa do komórki. Swoiste przeciwciała dla AMDV są ciągle produkowane przez organizm zakażonej norki. Powstają kompleksy immunologiczne które odkładają się w tkankach, prowadzi to do powstawania zmian zapalnych (MCKENNA i in. 1999).

W surowicy następuje gwałtowny wzrost poziomu gammaglobulin od 50 do 100 mg/ml lub wyższy (COSTELLO i in. 1998, WU i in. 1994). Stwierdza się zwiększony poziom białka całkowitego oraz obniżony poziom albumin (WOJCICKA-LORENOWICZ i in. 1999). U nowonarodzonych osesków norek gammaglobuliny nie są wykrywalne, bowiem budowa łożyska uniemożliwia przenikanie ich od matki do płodów. Oseski norek otrzymują gammaglobuliny z siarą matki (ALEXANDERSEN i in. 1994). Stwierdza się zwiększenie liczby komórek CD 8^{+}, gammaIFN i IL-4-limfocytów (CHEN i AASTED 1998, JENSEN i in. 2000, JENSEN i in. 2003, OLEKSIEWICZ I ALEXANDERSEN 1997). Czasami stwierdzana jest mocznica prowadząca do śmierci (WOJCICKA-LORENOWICZ i in. 1999).

Zmiany anatomopatologiczne u osesków norek lokalizują się głównie w płucach, które są bezpowietrzne, przekrwione i pokryte wybroczynami. U starszych norek zmiany występują także w innych narządach. Obserwuje się wychudzenie, matowość okrywy włosowej, zażółcenie tkanki podskórnej oraz nadżerki w błonie śluzowej jamy ustnej.

Charakterystyczne zmiany lokalizują się w narządach miąższowych tj. śledziona, nerki, wątroba, węzły chłonne krezkowych, które są szczególnie przydatne w diagnostyce AMDV. Śledziona jest powiększona lub zmniejszona, barwy ciemnowiśniowej. Powiększone lub

pomniejszone nerki są na powierzchni pomarszczone. Wątroba tęgiej konsystencji jest brązowo-żółta lub żółta. Węzły chłonne są powiększone i przekrwione (KOSTRO i in. 1999, WOJCICKA-LORENOWICZ i in. 1999).

Histopatologicznie stwierdza się uszkodzenie układu siateczkowo-śródbłonkowego wątroby, nerek, śledziony. Przeciwciała autoagresywne uszkadzają białko cytoplazmy i lizosomów (KOSTRO i in. 1999, WOJCICKA-LORENOWICZ i in. 1999).

1.6. Diagnostyka

Choroba aleucka norek będąc problem światowym stanowi wyzwanie dla badaczy. Prowadzone są badania nad doskonaleniem znanych metod diagnostycznych i poszukiwaniem nowych oraz epizootiologią AMD. Głównym celem jest opracowanie szybkich i skutecznych metod zapobiegania i zwalczanie AMD w stadach norek fermowych.

Przed wykonaniem badań diagnostycznych, w stadzie fermowych norek amerykańskich konieczne jest przeprowadzenie dochodzenia epizootycznego. Ocena stanu zdrowia norek na fermie norek powinna wykluczyć zaburzenia rozrodu, zapalenia wątroby i nerek oraz krwotoczne zapalenia płuc wywołane przez inne przyczyny (KOSTRO i in. 1999).

W diagnostyce terenowej AMDV pierwotnie stosowano test jodowo aglutynacyjny, a tylko sporadycznie test immunofluorescencyjny tzw. FIA - ang. fluorescent immunoassay, testu immunodyfuzji (ID). Następnie opracowano test immunoelektroforezy przeciwprądowej (CHO I GREENFIELD 1978, KOPCZEWSKI i in. 1991, MAÑAS 2001, SHIMIZU i in. 1980, YAMAGUCHI i in. 2001).

Test jodowy aglutynacyjny (JAT) został wdrożony w Polsce (KOPCZEWSKI i in. 1991) oraz przez zespół badawczy Instytutu Zootechniki (KOWALCZYK I JAKUBCZAK 2015). Jego zaletą jest łatwość wykonania w warunkach fermowych, krótki czas wykonania i niskie koszty wykonania.

Przy poziomie gammaglobulin powyżej 50 mg/ml, charakterystycznym dla większości zakażonych norek AMDV, w teście jodowy aglutynacyjnym występuje precypitacja. Po połączeniu badanej surowicy norki z roztworem wodnego jodu w jodku potasu następuje wytrącenie się gammaglobulin w postaci precypityn.

Niestety JAT nie jest testem swoistym ponieważ możliwe są wyniki fałszywie ujemne lub fałszywie dodatnie np. w przypadku procesu zapalnego badanej norki wywołanego na tle

innej przyczyny. Nawet w tym przypadku tj. przy nieswoistym wyniku dodatnim norkę należy natychmiast eliminować z dalszej hodowli.

Obecnie JAT jest wypierany przez inne bardziej swoiste metody w diagnostyce zakażeń AMDV, chociaż w Kanadzie jest nadal powszechnie stosowany przez hodowców.

W krajach europejskich, do wykrywania swoistych przeciwciał dla AMDV używa się immunoelektroforezę przeciwprądową tzw. Counter Current Immunoelectrophoresis (CIEP).

Podstawą działania CIEP jest zjawisko przemieszczania się antygenu i przeciwciał w podłożu agarowym poddanym rozdziałowi elektroforetycznemu. Jeśli w badanej surowicy występują swoiste dla antygenu przeciwciała AMDV to występuje precypitacja w postaci prążką precypitacyjnego. Metoda ta jest uważana za „złoty standard”w diagnostyce AMDV. Porównując ją do bardziej nowoczesnych metod wykazano, że CIEP może dawać wyniki fałszywie ujemne np. przy zbyt niskim poziomie przeciwciał swoistych lub we wczesnym okresie zakażenia (KOWALCZYK I JAKUBCZAK 2015).

Metody biologii molekularnej pozwalają na wykrycie DNA AMDV oraz potwierdzenie jego przynależności do określonego szczepu wirusa lub kladu (CHRISTENSEN i in. 1993, CHRISTENSEN i in. 1995, ZHANG i in. 2015). Metody te mogą ułatwić ocenę stopnia patogenności oraz wykrywać źródła i drogi zakażenia AMDV. Transmisja wirusa na świecie sprzyja międzynarodowy obrót żywych norek, którego celem jest uzyskanie potomstwa o lepszym pokroju, pożądanych cechach genetycznych i behawioralnych. Zakażenia AMDV rozprzestrzeniają się także przez zakupioną infrastrukturę zlikwidowanej fermy norek (WANG i in. 2014). Brak przestrzegania zasad bioasekuracji ułatwia szerzenie się zakażenia AMDV drogą pośrednią.

FOX I BLOOM (1999) opisali metody identyfikacji AMDV w hodowlach komórkowych nerek kotów (CRFK- Crandell feline kidney cells).

Opracowane w latach 80. ELISA nie były wystarczająco czułe i swoiste (WRIGHT i in. 1982). W ostatnich latach, w Danii, Holandii, Finlandii i Chinach podjęto badania w celu opracowania nowoczesnych zestawów ELISA, które mogłyby konkurować z CIEP (LU i in 2021, MA i in. 2016, KNUTILLA i in. 2014).

Największe nadzieje związane są jednak z wykrywaniem DNA AMDV przy użyciu metod biologii molekularnej. Przykładem jest łańcuchowa reakcja polimerazy (Polymerase Chain

Reaction - PCR), w której można wykonać amplifikację fragmentu genu VP2, NS1 DNA AMDV z badanego narządu, krwi, wymazu, w obecności odpowiednich starterów (GLIŃSKI I KOSTRO 2002, LI I IN. 2012, MULLIS i in. 1986, REICHERT I KOSTRO 2014b).

Zdaniem niektórych badaczy skuteczne zwalczanie AMDV, w stadach fermowych norek, będzie możliwe tylko przy zastosowaniu metod biologii molekularnej. Będą one konieczne w badaniach epidemiologii molekularnej AMDV amerykańskich norek fermowych, norek europejskich, innych łasicowatych itp. (ANDERSSON I WALLGREN 2013, CHEN i in. 2015, JENSEN i in. 2011, CUI i IN. 2018, GONG i in. 2020, FARID i SEGERVALL 2014, KNUUTTILA i in. 2015, PRIETO i in. 2014, PRIETO i in. 2020, ZAŁĘSKA-WAWRO i in. 2021).

1.7. Zapobieganie i zwalczanie

Zwalczanie AMD stanowi ogromny problem ze względu na powszechne występowanie AMDV. Głównym sposobem jej zwalczania w stadach fermowych norek jest eliminacja chorych lub zakażonych norek, co jest najczęściej stwierdzane w czasie okresowych badań serologicznych (CHRISTENSEN i in. 1995).

W eliminacji większości chorób zakaźnych u zwierząt gospodarskich orazb człowieka główną rolę odgrywają coraz bardziej nowatorskie szczepionki. Jest to jedna z najskuteczniejszych metod zwalczania chorób. Przykładem skutecznej immunoprofilaktyki jest szczepionka przeciw ospie prawdziwej (*Variola vera)* która doprowadziła do całkowitej jej eradykacji na świecie (SHCHELKUNOVA I SHCHELKUNOV 2017).

Większość szczepionek zawiera antygen lub jego elementy wywołujące reakcję układu immunologicznego, po ich wprowadzeniu do ciała. Rozwija się wówczas odporność poszczepienna, która najczęściej zapobiega pełnoobjawowej chorobie. Niestety w przypadku AMD nie udało się dotychczas opracować skutecznych szczepionek.

Próby immunizacji norek wirusem AMD inaktywowanym formaliną nie zapewniły odpowiedniej odporności poszczepiennej na zakażenie kontrolne. Także szczepionki zawierające rekombinowane białka AMDV nie dały efektu ochronnego. Szczepionki zawierające białka VP1 i VP2 prowadziły nawet do rozwoju ostrej postaci AMD.

Tylko częściową ochronę przed AMD dawały szczepionki zawierające samo białko NS1 AMDV (AASTED i in. 1998, CASTELRUIZ i in. 2005). Norkom podano także szczepionki zwierające parvowirusy swoiste dla innych gatunków np. PPV, CPV, FPV, MEV. Niestety

tylko częściowo ograniczały one szerzenie się choroby, która przebiegała podklinicznie (AASTED i in. 1998, BLOOM i in. 2001).

Podejmowano próby specyficznego leczenia chorych norek, ale były one całkowicie nieskuteczne. Przykładowo, oseskom norek podawano anty-ADV-gammaglobuliny lub przeciwciała monoklonalne myszy dla białek NS1 AMDV. Obserwowano wprawdzie zmniejszoną śmiertelność, ale występowały objawy podostrego zapalenia płuc (ALEXANDERSEN i in. 1994). Mimo wysokiego poziomu przeciwciał swoistych dla AMDV nie uzyskano eradykacji AMDV (JENSEN i in. 2003). Niestety u szczepionych młodych norek obserwowano nadostry przebieg choroby (AASTED i in. 1998)

W celu uzyskania dobrej jakości skór od początku XIX w. norki amerykańskie hodowano w izolowanych fermach europejskich. Niestety norki przenikały do naturalnego środowiska Europy różnymi drogami np. w wyniku świadomej introdukcji (ZSRR), przypadkowych ucieczek z ferm, celowego wypuszczanie norek z klatek itp.

Sprzyja to zagrożeniu AMDV dla populacji dzikich norek przez ich hybrydyzację, działanie konkurencyjne lub nawet dla norek europejskich (PODRA i GOMEZ 2018).

Wszystkie te okoliczności skłoniły do podjęcia badań w kilku światowych ośrodkach naukowych, w celu poszukiwania skuteczniejszych, nowoczesnych metody diagnostyki AMDV. Należy także mieć na względzie potencjalne zagrożenie AMDV, które czasami u ludzi pracujących w zakażonych AMDV stadach fermowych może objawiać się zaburzeniami oddechowymi i pokarmowymi (PRIETO i in. 2014, WANG i in. 2014).

Równocześnie obserwuje się ewolucję AMDV i możliwość wywoływania zakażeń u innych gatunków zwierząt. Stwierdza się rozpowszechnienie tego wirusa w środowisku naturalnym oraz jego obecność u innych gatunków z rodziny *Mustelidae* tj. łasica, skunks, szop oraz u kotowatych np. u rysia rudego - *Lynx Rufus* (JENSEN i in. 2014, NITUCH i in. 2012, STEINEL i in. 2001, WANG i in. 2014).

Warunkuje to konieczność wdrożenia wyjątkowo czułych metod diagnostycznych, w celu oceny rzeczywistej sytuacji epizootycznej AMDV w stadach fermowych norek oraz w poszukiwaniu AMDV środowisku naturalnym (CUI i in. 2018, BUSTIN 2000, BUSTIN i in. 2009, ZAŁĘSKA-WAWRO i in. 2021).

2. UZASADNIENIE I CEL BADAŃ

Niektóre kraje, prowadzące intensywną fermową hodowlę norek amerykańskich (wizon amerykański) już w latach 70. XIX w. wdrożyły badania serologiczne. Obecnie realizują programy zwalczania choroby aleuckiej norek. Sytuacja epizootyczna AMD w Polsce do 2010 r. była nieznana. W krajowych stadach amerykańskich norek fermowych często obserwowano zaburzenia rozrodu, ale tylko sporadycznie rozpoznawano chorobę w laboratorium diagnostyki AMD. W innych stadach norek nie stwierdzono zaburzeń rozrodu co nie wyklucza występowania zakażeń bezobjawowych.

Należy przypuszczać że rzeczywiste przyczyny zaburzeń rozrodu w stadach fermowych norek amerykańskich nie zawsze były właściwie rozpoznawane. Tylko nieliczni właściciele stad realizowali okresowe badania w kierunku zakażeń norek AMDV. Liczebność stad norek fermowych, ich lokalizacja geograficzna oraz warunki sanitarno-weterynaryjne w Polsce w badanym okresie była zróżnicowane.

Większość ferm przestrzegała dobrostanu hodowli norek oraz zasady bezpieczeństwa biologicznego tj. bioasekuracji. Organy administracji tj. Główny Inspektorat Ochrony Środowiska, Państwowa Inspekcja Sanitarna, Główny Inspektorat Weterynarii (GIW), Główny Urząd Nadzoru Budowlanego mają za zadanie zapewnić właściwy nadzór nad funkcjonowaniem ferm norek. W imieniu GIW kontrolę dobrostanu i zdrowia stad norek fermowych sprawuje Powiatowy Lekarz Weterynaryjny.

W krajach czołowych producentów norek hodowlanych tj. Dania, Holandia, Kanada, USA zakażenia AMDV są wykrywane w czasie okresowych badań laboratoryjnych. W zagranicznych ośrodkach naukowych z tych krajów prowadzi się badania nad doskonaleniem metod diagnostyki zakażeń AMDV w stadach norek fermowych.

W wyniku koncentracji i intensywnego rozwoju hodowli norek w Polsce wzrosło znaczenie choroby aleuckiej norek, będącej główną przyczyną strat ekonomicznych. W Polsce, tak jak w większości krajów Europy, podstawową metodą rozpoznawania AMDV są badania serologiczne.

Wzrost zakażeń AMDV oraz rozwijające się dynamicznie metod molekularnych skłoniły do podjęcia badań własnych, nad zastosowaniem tych metod w diagnostyce zakażeń AMD,

w krajowych stadach norek. Badania wykonano w losowo wybranych krajowych stadach fermowych norek amerykańskich.

Na wstępie wykonano badania serologiczne testem CIEP, dla określenia sytuacji epizootycznej AMD w stadach fermowych norek amerykańskich i częstotliwością występowania swoistych przeciwciał dla AMDV.

Głównym zadaniem pracy były badania nad oceną przydatności metod biologii molekularnej, ich implementacją do diagnostyki zakażeń AMDV oraz analiza filogenetyczna izolowanych fragmentów genów AMDV.

Cel badań

1. Ocena przydatności serologicznej metody CIEP dla określenia częstotliwości. występowania zakażeń i oceny sytuacji epizootycznej AMD w Polsce .
2. Ocena czułości klasycznego PCR w diagnostyce AMDV.
3. Ocena czułości nested PCR w diagnostyce AMDV .
4. Ocena czułości real-time PCR w diagnostyce AMDV.
5. Poszukiwanie nowych izolatów AMDV, w krajowych stadach fermowych norek amerykańskich.
6. Analiza filogenetyczna izolatów AMDV, w krajowych stadach fermowych norek amerykańskich.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Zwierzęta doświadczalne

Do badań wybrano losowo stada fermowych norek amerykańskich zlokalizowane w Polsce północnej, wschodniej i centralnej, których sytuacja epizootiologiczna AMD była zróżnicowana. Zgodnie z wymogami hodowli dla norek zapewniono im stały dostęp do wody w ciągu doby oraz i karmiono 2-3 krotnie w ciągu dnia mieszanką pokarmową przez cały tydzień.

Mieszanka pokarmowa zwana na fermach karmą zawierała niezbędne dla rozwoju i zdrowia norek składniki odżywcze. W celu zabezpieczenia norek przed szybko szerzącymi się chorobami stosowano profilaktykę swoistą. Stada norek były szczepione przeciw nosówce, wirusowemu zapaleniu jelit, krwotocznemu zapaleniu jelit oraz botulizmowi.

Badania wykonano w latach 2010 – 2020, w losowo wybranych krajowych stadach fermowych norek, odmiany standard. W niektórych stadach norek fermowych obserwowano zaburzenia rozrodu, spadek masy ciała i zwiększoną upadkowość szczeniąt mogące wskazywać na możliwość występowania AMD. W innych stadach norek fermowych nie stwierdzono objawów klinicznych nasuwających podejrzenie AMD.

W czasie realizacji badań losowo wybrane stada fermowych norek amerykańskich podlegały dodatkowym kontrolom przez Powiatowe Inspektoraty Weterynaryjne. Wyniki kontroli badanych norek wykazały, że dobrostan zwierząt hodowlanych oraz stan sanitarno-weterynaryjny badanych ferm był bardzo dobry lub dobry.

W pierwszym etapie badania realizowano w 6 stadach fermowych norek amerykańskich liczących ogółem 22140 zwierząt, zlokalizowanych w różnych rejonach kraju. Stada liczyły pod 2400 - 5000 norek i nie wykazywały objawów klinicznych wskazujących na występowanie AMD.

Do badań serologicznych wybrano losowo 1007 żywych norek amerykańskich z w/w stad fermowych norek.

Pobierano od nich krew do heparynizowanych rurek hematokrytowych w celu szybkiego wykonania badania serologiczne.

W zależności od stopnia realizacji programu zwalczania AMD stado fermowych norek amerykańskich zaliczano do grupy I,II lub III co przedstawiono w tab. 2.

W grupie I znalazły się 3 stada norek, w których pobrano krew od 494 zwierząt. Do grupy II zaliczono stado w którym pobrano 229 surowic a do III – 2 stada, w których pobrano ogółem 384 próbki krwi.

Tab. 2. Przyporządkowanie stad fermowych norek amerykańskich do określonej grupy, w zależności od stopnia realizacji programu zwalczania choroby aleuckiej norek

Grupa	Ferma	Liczba norek fermowych*	Liczba pobranych próbek #	Etapy wdrożenia programów zwalczania choroby
I	H	5000	250	Program zwalczania choroby aleuckiej norek wdrożony od kilku lat
	J	2480	124	
	I	2400	120	
II	B	4580	229: 138 samic 91 samców	Program zwalczania choroby aleuckiej norek- wdrożony w czasie rozpoczęcia badań
III	G	5280	264: 219 samic 45 samców	Program zwalczania choroby aleuckiej norek nie był nigdy realizowany
	E	2400	120 samic	

*Liczba norek fermowych w badanym stadzie

Liczba próbek badanych serologicznie (stanowiących 5% stada norek)

Do badań molekularnych pobrano narządy 174 norek amerykańskich pochodzących z w/w stad fermowych norek amerykańskich.

3.2. Materiał do badań

3.2.1. Materiał do badań serologicznych

Materiał do badań serologicznych stanowiły próbki krwi pobrane przyżyciowo od 1007 zdrowych klinicznie fermowych norek. Stanowiły one 5% ogólnego stanu stad fermowych norek amerykańskich (tab. 2).

3.2.2. Materiał do badań molekularnych

Materiał do badań molekularnych stanowiły 174 próbki z narządów amerykańskich norek fermowych, pobrane bezpośrednio po ich śmierci. U niektórych obserwowano objawy nasuwające podejrzenie AMD (KNUTILLA i in. 2009b). Próbki umieszczano w odpowiednich pojemnikach w temp. chłodni. Transportowano je w termoizolacyjnym transporterze z wkładem chłodzącym do Laboratorium Diagnostyki Molekularnej, Katedry Epizootiologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

Większość próbek pobierano bezpośrednio w sali sekcyjnej Katedry Epizootiologii. Następnie próbki przechowywano w temp. -20°C, do czasu wykonania badania lub izolowano DNA bezpośrednio po ich otrzymaniu, w ciągu 48 h.

Ponadto do badań molekularnych pobrano 29 wymazów ze środowiska fermowego, po 2 letnim okresie kontumacji. Na terenie fermy od 2 lat nie było norek.

Używano wymazówek służących do pobierania próbek z powierzchni nieożywionych stosowane w badaniach przez Powiatowe Inspektoraty Weterynaryjne.

Startery. Do amplifikacji określonego fragmentu genu AMDV w PCR stosowano swoiste dla konserwatywnego regionu genu startery, które opisano w każdym etapie badania.

3.3. Metodyka badań serologicznych

Badania serologiczne wykonano metodą immunoelektroforezy przeciwprądowej (CIEP) pozwalającej na wykrycie w surowicy badanych norek fermowych przeciwciał swoistych dla antygenu AMDV. Badania wykonano w żelu agarowym, w polu działaniu pola elektrycznego.

Krew pobraną do rurek hematokrytowych wirowano w zmodyfikowanej wirówce hematokrytowej, w celu rozdziału surowicy od pozostałych składników krwi. Uzyskaną surowicę przenoszono do studzienek w żelu agarowym (Ryc.1).

W celu oceny rzeczywistych wyników konieczne było każdorazowo wykonanie kontroli dodatniej i kontroli ujemnej testu CIEP. W kontroli dodatniej zamiast badanej surowicy do żelu wprowadzono surowicę zwierająca swoiste przeciwciała, natomiast w kontroli ujemnej surowicę nie zawierająca przeciwciał swoistych dla AMDV .

Jeżeli w badanej surowicy występowały swoiste przeciwciała wówczas obserwowano precypitację powstającą w wyniku reakcji antygenu z przeciwciałem. Odpowiednio rozcieńczony antygen umieszczano po stronie katody [elektrody (-)], a badaną surowicę po stronie anody [elektrody (+)]. Antygeny w odpowiednim buforze migrują zgodnie z przepływem prądu w stronę przeciwciał, przesuwających się odwrotnie do kierunku przepływu prądu, dzięki występowaniu osmozy (Ryc.2).

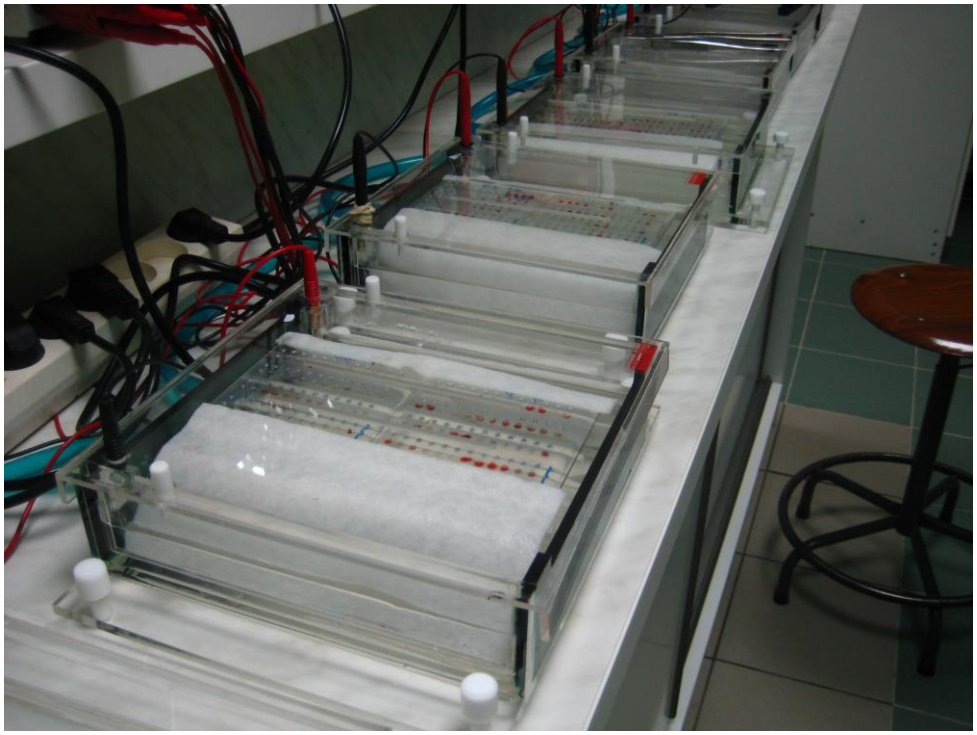
Buforem w którego środowisku odbywa się elektroforeza jest zwykle roztwór TAE jednostężony (1x) składający się z Tris (hydroksymetylaminometanu), EDTA (kwas etylenodiaminotetraoctowy, kwas wersenowy) i kwasu octowego.

Żel agarowy przygotowano w 1,5 % stężeniu. Napięcie potrzebne do przeprowadzenia reakcji wahało się w zakresie od 80 do 120 V, zaś natężenie od 55 do 60 mA.

Ryc. 1. Badanie serologiczne metodą CIEP – aplikowanie antygenu do studzienek w żelu



Ryc. 2. Elektroforeza w żelu agarowym, badanych surowic norek fermowych



3.4. Metodyka badań molekularnych

3.4.1. Izolacja genomowego DNA z narządów

W Laboratorium Diagnostyki Molekularnej Katedry Epizootiologii pobrano z próbek wycinki narządów w ilości ok. 10 mg i rozdrabniano w moździerzu. Następnie przystępowano do izolacji materiału genetycznego z pobranych próbek z użyciem komercyjnego zestawu do izolacji Genomic Mini (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland). Zestaw ten był przeznaczony do izolacji genomowego DNA z bakterii, hodowli komórkowych i tkanek stałych.

Izolacja materiału genetycznego polegała na jego oczyszczeniu z tkanek poprzez ich lizę z udziałem m. in. Proteinazy K i użyciu złóż krzemionkowych bogatych w sole chalotropowe z którymi kwas deoksyrybonukleinowy ma szczególną zdolność wiązania. Badany materiał w ilości 15 mg przenoszono do probówek reakcyjnych, typu eppendorf. Do każdej probówki dodawano po 100 µl buforu Tris, 50 µl uniwersalnego roztworu lizującego LT oraz 20 µl roztworu proteinazy K. Całość mieszano w wytrząsarce typu „vortex" i umieszczono w termomikserze w temp. 50°C a następnie inkubowano do całkowitego strawienia tkanki.

Czas inkubacji wydłużono, wg modyfikacji własnej, do ok. 20 godz. a następnie wymieszano próbki i dodano 150 µl buforu LT zgodnie z zaleceniami producenta. Próbki mieszano w wytrząsarce przez 20 sek. i wirowano przez 10 min. przy 14,5 tys. RPM.

Następnie zebrany supernatant przenoszono na minikolumnę do oczyszczania DNA ze specjalnym złożem krzemionkowym. Minikolumnę wirowano przez 1 min. przy 14,5 tys. RPM w celu osadzenia się DNA na złożu.

Złoże w kolumnie przemywano roztworem płuczącym A1 każdorazowo wirując przez 1 min. przy 14,5 tys. RPM. Przenoszono minikolumnę do nowej probówki 2 ml. i dodawano do kolumny 400 µl roztworu płuczącego A1. Wirowano 2 min. przy 14,5 tys. RPM. Minikolumnę umieszczono w nowej probówce 1,5 ml. typu eppendorf i dodawano 200 µl buforu Tris zgodnie z procedurą.

Inkubowano próbkę przez 5 min. w temp. pokojowej a po inkubacji wirowano 1 min. przy 14,5 tys. RPM. Ilość oczyszczonego DNA znajdujące się w probówce oznaczano spektrofotometrycznie. Izolowane DNA przechowywano w temp. -20^{o}C do czasu dalszych analiz.

3.4.2. Izolacja genomowego DNA ze środowiska fermy

Izolacja materiału z wymazów ze środowiska fermy norek przebiegała w sposób opisany uprzednio w rozdziale 3.4.1. Zamiast narządów w probówce typu eppendorf umieszczono wymaz z materiałem pobranym z badanego środowiska fermowy. Następnie inkubowano zgodnie z uprzednim opisem. Po zakończeniu inkubacji wymazów usuwano je z probówek, a pozostałe etapy izolacji genomowego DNA realizowano dalej wg opisu w rozdziale 3.4.1.

3.4.3. PCR, nested PCR, real-time PCR

3.4.3.1. Amplifikacja fragmentu genu VP2 AMDV w PCR

3.4.3.1.1. Amplifikacja fragmentu genu VP2 AMDV z narządów

Została przeprowadzona w celu amplifikacji fragmentu genu VP2 AMDV wielkości 680 par nukleotydów. W skład mieszaniny reakcyjnej oprócz 3 µl roztworu wyizolowanego DNA wchodził master mix w ilości 25 µl (JumpStart™ REDTaq® ReadyMix™ Reaction Mix Sigma-Aldrich) i woda uzupełniona do ilości 50 µl mieszaniny.

Jako startery posłużyły sekwencje nukleotydów opublikowane przez OIE I IN. (1996). Sekwencje starterów były następujące: AMDV-Gf 5'-CTT GTC ACG CTA CTA GAA TGG T-3', AMDV-Gr 5'-AGC TTA AGG TTA GTT TAC ATG GTT TAC T-3' (OIE i in. 1996). Dodawano je w ilości 0,2 µl każdego (Tab. 3).

Tab. 3. Skład mieszaniny reakcyjnej do PCR dla fragmentu genu VP2 AMDV o dł. 680 nukleotydów.

Skład mieszaniny reakcyjnej	
Składnik	Ilość w µl
DNA	3
Starter AMDV-Gf	0,2

Starter AMDV-Gr	0,2
Master Mix	25
woda do reakcji	21,6

PCR wykonano w termocyklerze Eppendorf. Łańcuchowa reakcja polimerazy składała się z denaturacji przebiegającej w temp. 94°C, trwającej przez 2 min, 30 cykli na które wchodziły denaturacja przebiegająca w temp. 94°C, przez 30 sek., faza przyłączania starterów przebiegająca w temp. 70°C, przez 30 sek., faza wydłużania starterów przebiegająca w temp. 72°C, przez 2 min. oraz faza końcowego wydłużania starterów przebiegająca w temp. 72°C, przez 5 min (Tab. 4).

Tab. 4. Profil temperaturowy w PCR dla fragmentu genu VP2 AMDV

Etap PCR	Czas trwania	Temperatura
Denaturacja	2 min	94°C
Denaturacja	30 s	94°C
Hartowanie	30 s	70°C
Wydłużanie	2 min	72°C
Wydłużanie końcowe	5 min	72°C

3.4.3.1.2. Amplifikacja fragmentu genu VP2 AMDV ze środowiska fermy

Uzyskany materiał z wymazów pobranych ze środowiska fermy norek amerykańskich pododawano dalszym badaniom zgodnie z metodyką umieszczoną w rozdziale 3.4.1.

3.4.4. Amplifikacja fragmentu genu NS1 AMDV z narządów w nested PCR

W skład mieszaniny reakcyjnej oprócz 1 µl DNA wchodziło: 2,5 µl buforu, 1 µl dNTP, 0,5 µl polimerazy i 18,5 µl wody znajdującej się w zestawie do odwrotnej reakcji łańcuchowej polimerazy (Enhanced Avian RT-PCR, Sigma-Aldrich). Dodano startery o sekwencjach AMDV NS1 1R 5'-ATCACCACCTCCAG-3', AMDV NS1 2R 5'-GGTTGCTTTACTCCAGAAGA-3', AMDV NS1 1F 5'-TACCACACTCTTCAGCCC-3' w ilości 0,5 µl każdy. Sekwencje te stosowali REICHERT I KOSTRO, 2014 b. (Tab. 5.)

Proces amplifikacji w nested PCR składał się z 2 oddzielnych reakcji. Pierwsza reakcja składała się z denaturacji przebiegającej w temp. 94°C trwającej przez 2 min, 34 cykli na które wchodziły denaturacja przebiegająca w temp. 94°C, przez 15 s, faza przyłączania starterów przebiegająca w temp. 54°C, przez 30 sek., faza wydłużania starterów przebiegająca w temp. 72°C, przez 1 min. oraz fazy końcowego wydłużania starterów przebiegająca w temp. 72°C, przez 5 min. Druga reakcja składała się z denaturacji przebiegającej w 94°C trwającej przez 2 min, 36 cykli, denaturacji przebiegającej w 94°C przez 15 s, fazy przyłączania starterów w temp. 62°C, przez 30 sek., fazy wydłużania starterów w temp. 72°C, przez 1 min. oraz fazy końcowego wydłużania starterów przebiegająca w temp. 72°C, przez 5 min (Tab. 6 i 7). Cały proces amplifikacji wykonano w termocyklerze firmy Eppendorf.

Tab. 5. Skład mieszaniny reakcyjnej w nested PCR

Skład mieszaniny reakcyjnej	
Składnik	Ilość w µl
DNA	1
bufor	2,5
dNTP	1
polimeraza	0,5
Starter AMDV NS1 1R	0,5
Starter AMDV NS1 2R	0,5
Starter AMDV NS1 1F	0,5
woda do reakcji	18,5

Tab. 6. Profil temperaturowy w nested PCR (reakcja nr 1).

Etap PCR (reakcja nr 1)	Czas trwania	Temperatura	Ilość powtórzeń
Wstępna inkubacja	2 min	94°C	1
Denaturacja	15 s	94°C	34
Hartowanie	30 s	54°C	
Wydłużanie	1 min	72°C	
Wydłużanie końcowe	5 min	72°C	1

Tab. 7. Profil temperaturowy w nested PCR (reakcja nr 2).

Etap PCR (reakcja nr 2)	Czas trwania	Temperatura	Ilość powtórzeń
Wstępna inkubacja	2 min	94°C	1
Denaturacja	15 s	94°C	36
Hartowanie	30 s	62°C	
Wydłużanie	1 min	72°C	

3.4.5. Elektroforeza w żelu agarowym

Rozdział produktów powstałych w wyniku reakcji PCR przeprowadzono w 2% żelu agarowym, w buforze TAE z dodatkiem bromku etydyny o stężeniu końcowym 0,5 ug/ml, przy napięciu 5V/cm żelu .

Na żel nanoszono 12 ul DNA z dodatkiem obciążnika Loading Dye Solution, w stosunku 6:1. Elektroforezę prowadzono przez 30 min. pod w/w napięciem prądu (KOPCZEWSKI i in. 1991). Do oceny wielkości produktu używano markera GeneRuler™ 100 typ Ladder Plus

(Fermentas. Do wizualizacji stosowano promienie UV. Wyniki elektroforezy zapisywano przy użyciu systemu do dokumentacji żeli GelDoc™ EQ (Bio-Rad. Hercules).

Żel oglądano w świetle UV i archiwizowano przy użyciu systemu do dokumentacji żeli GelDoc firmy BioRad w obecności markera GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus firmy Fermentas (układanie się prążków w żelu przy następujących wielkościach produktu: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 i 1000 par zasad).

3.4.6. Amplifikacja fragmentu genu NS1 AMDV z narządów w real-time PCR

Metoda real-time PCR jest stosowana rzadziej w diagnostycznych badaniach molekularnych (KOZERA I RAPACZ 2013, PRIETO I in. 2014, TUBURSKI I in. 2008). W badaniu użyto komercyjny zestaw do detekcji wirusa choroby aleuckiej z firmy A&A Biotechnology, Gdynia Poland. We współpracy z firmą zaprojektowano sondę i startery dla najbardziej konserwatywnych rejonów genomu wirusa choroby aleuckiej norek (Ryc. 3).

Do oceny struktury genomu użyto oprogramowania firmy CLC Bio. Wśród kilku możliwości wybrano sekwencje starterów i sondę, które spełniały podstawowe zasady doboru sekwencji przy real-time PCR tj. odpowiednia długość starterów, produktu czy temperatura topnienia.

Użyto następujących sekwencji starterów: 165Fx 10 µM 5'-TAA CAG AAA CCA ACC AAG GTA ACG CA-3' oraz 165R2x 10 µM 5'-ATT GGG TTG GTT TGG TTG CTC TCC A-3' i sondę 165xProbe 10 µM 5'-[6FAM] TCT AAA GCA ACY TGT AAY GAY GCA GTT[BHQ1]-3'.

W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły także Real Time 2x PCR Mix MAb Probe (A&A Biotechnology, Gdynia Poland) w ilości 10 µl oraz 7,8 µl wody. Użyto wspomnianych starterów i sondy po 0,4 µl . Dodano do mieszaniny reakcyjnej po 1 µl wyizolowanego DNA (Tab. 8). Profil temperaturowy reakcji był następujący: 95°C przez 3 min, następnie 95°C przez 15 sek. i 60°C przez 1 min w 45. powtórzeniach (Tab. 9). Kontrolą pozytywną było DNA plazmidowe z wklonowanym, amplifikowanym fragmentem AMDV o stężeniu $1x10^{11}$ kopii/µl (wielkość DNA plazmidowego ok. 3 kpz).

Przygotowano standardowe rozcieńczenie DNA. Wykonano seryjne 10-krotne rozcieńczenia kontroli pozytywnej. W tym celu przeniesiono po 18 µl 0,1% BSA do 7

probówek reakcyjnych eppendorf. Do pierwszej probówki dodano 2 µl DNA kontroli pozytywnej o stężeniu 10^{10} kopii/l, wymieszano i otrzymano stężenie 10^{9} kopii/l.

Następnie z tak przygotowanego roztworu przeniesiono 2 µl do probówki zawierającej 18 µl 0,1% BSA, wymieszano i uzyskano stężenie 10^{8} kopii/l. W analogiczny sposób przygotowano kolejne rozcieńczenia. Wszystkie oznaczenia zarówno dla badanych prób jak i standardu DNA wykonano w trzech powtórzeniach.

Tab. 8. Skład mieszaniny reakcyjnej w real-time PCR

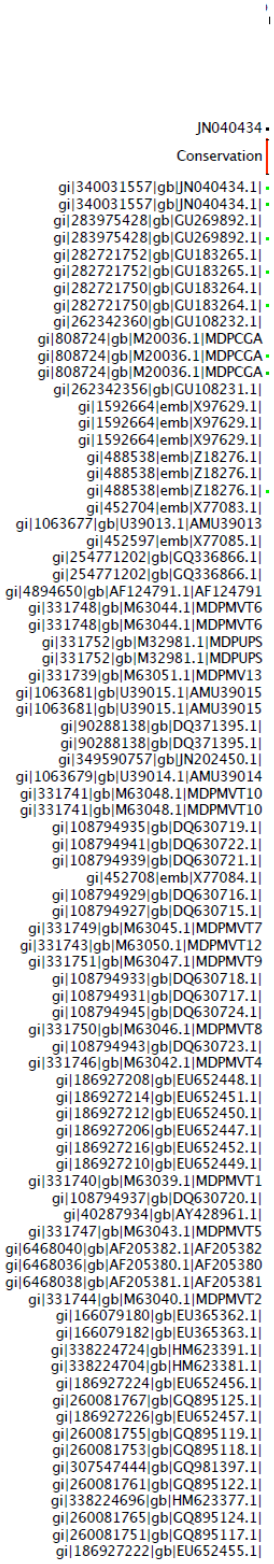
Skład mieszaniny reakcyjnej	
Składnik	Ilość w µl
Badane DNA	1
Real Time 2x PCR Mix MAb Probe	10
Starter 165Fx	0,4
Starter 165R2x	0,4
Sonda 165xProbe	0,4
woda dejonizowana	7,8

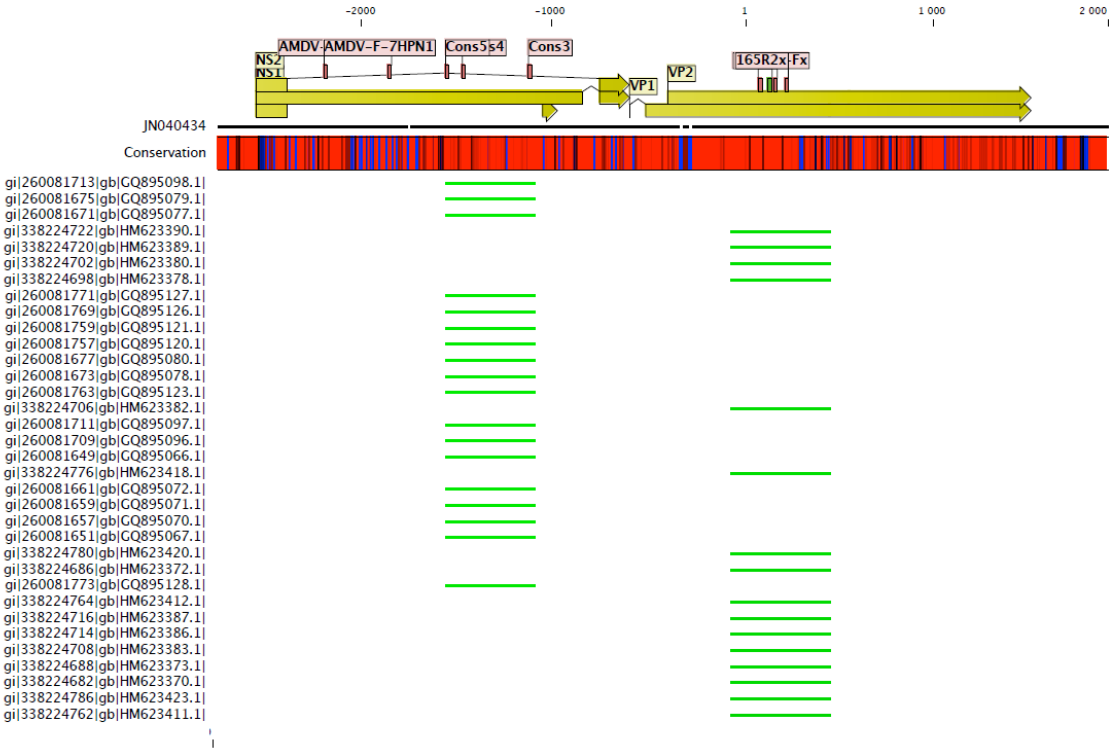
Tab. 9. Profil temperaturowy w real-time PCR

Etap real-time PCR	**Czas trwania**	**Temp.**	**Ilość powtórzeń**
Wstępna inkubacja	3 min	95°C	1
Denaturacja	15 s	95°C	45
Hartowanie	1 min	60°C	

Ryc. 3. Schematu genomu AMDV z określeniem miejsc konserwatywnych

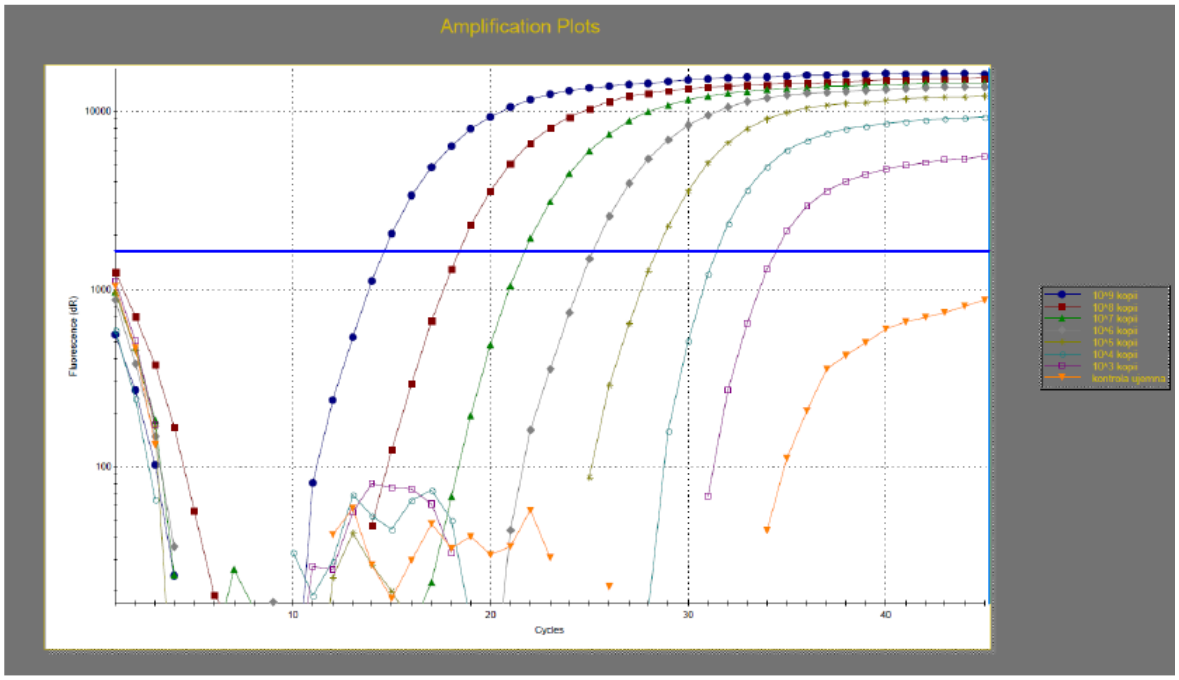



JN040434
Conservation
gi|340031557|gb|JN040434.1|
gi|340031557|gb|JN040434.1|
gi|283975428|gb|GU269892.1|
gi|283975428|gb|GU269892.1|
gi|282721752|gb|GU183265.1|
gi|282721752|gb|GU183265.1|
gi|282721750|gb|GU183264.1|
gi|282721750|gb|GU183264.1|
gi|262342360|gb|GU108232.1|
gi|808724|gb|M20036.1|MDPCGA
gi|808724|gb|M20036.1|MDPCGA
gi|808724|gb|M20036.1|MDPCGA
gi|262342356|gb|GU108231.1|
gi|1592664|emb|X97629.1|
gi|1592664|emb|X97629.1|
gi|1592664|emb|X97629.1|
gi|488538|emb|Z18276.1|
gi|488538|emb|Z18276.1|
gi|488538|emb|Z18276.1|
gi|452704|emb|X77083.1|
gi|1063677|gb|U39013.1|AMU39013
gi|452597|emb|X77085.1|
gi|254771202|gb|GQ336866.1|
gi|254771202|gb|GQ336866.1|
gi|4894650|gb|AF124791.1|AF124791
gi|331748|gb|M63044.1|MDPMVT6
gi|331748|gb|M63044.1|MDPMVT6
gi|331752|gb|M32981.1|MDPUPS
gi|331752|gb|M32981.1|MDPUPS
gi|331739|gb|M63051.1|MDPMV13
gi|1063681|gb|U39015.1|AMU39015
gi|1063681|gb|U39015.1|AMU39015
gi|90288138|gb|DQ371395.1|
gi|90288138|gb|DQ371395.1|
gi|349590757|gb|JN202450.1|
gi|1063679|gb|U39014.1|AMU39014
gi|331741|gb|M63048.1|MDPMVT10
gi|331741|gb|M63048.1|MDPMVT10
gi|108794935|gb|DQ630719.1|
gi|108794941|gb|DQ630722.1|
gi|108794939|gb|DQ630721.1|
gi|452708|emb|X77084.1|
gi|108794929|gb|DQ630716.1|
gi|108794927|gb|DQ630715.1|
gi|331749|gb|M63045.1|MDPMVT7
gi|331743|gb|M63050.1|MDPMVT12
gi|331751|gb|M63047.1|MDPMVT9
gi|108794933|gb|DQ630718.1|
gi|108794931|gb|DQ630717.1|
gi|108794945|gb|DQ630724.1|
gi|331750|gb|M63046.1|MDPMVT8
gi|108794943|gb|DQ630723.1|
gi|331746|gb|M63042.1|MDPMVT4
gi|186927208|gb|EU652448.1|
gi|186927214|gb|EU652451.1|
gi|186927212|gb|EU652450.1|
gi|186927206|gb|EU652447.1|
gi|186927216|gb|EU652452.1|
gi|186927210|gb|EU652449.1|
gi|331740|gb|M63039.1|MDPMVT1
gi|108794937|gb|DQ630720.1|
gi|40287934|gb|AY428961.1|
gi|331747|gb|M63043.1|MDPMVT5
gi|6468040|gb|AF205382.1|AF205382
gi|6468036|gb|AF205380.1|AF205380
gi|6468038|gb|AF205381.1|AF205381
gi|331744|gb|M63040.1|MDPMVT2
gi|166079180|gb|EU365362.1|
gi|166079182|gb|EU365363.1|
gi|338224724|gb|HM623391.1|
gi|338224704|gb|HM623381.1|
gi|186927224|gb|EU652456.1|
gi|260081767|gb|GQ895125.1|
gi|186927226|gb|EU652457.1|
gi|260081755|gb|GQ895119.1|
gi|260081753|gb|GQ895118.1|
gi|307547444|gb|GQ981397.1|
gi|260081761|gb|GQ895122.1|
gi|338224696|gb|HM623377.1|
gi|260081765|gb|GQ895124.1|
gi|260081751|gb|GQ895117.1|
gi|186927222|gb|EU652455.1|



JN040434
Conservation
gi|260081713|gb|GQ895098.1|
gi|260081675|gb|GQ895079.1|
gi|260081671|gb|GQ895077.1|
gi|338224722|gb|HM623390.1|
gi|338224720|gb|HM623389.1|
gi|338224702|gb|HM623380.1|
gi|338224698|gb|HM623378.1|
gi|260081771|gb|GQ895127.1|
gi|260081769|gb|GQ895126.1|
gi|260081759|gb|GQ895121.1|
gi|260081757|gb|GQ895120.1|
gi|260081677|gb|GQ895080.1|
gi|260081673|gb|GQ895078.1|
gi|260081763|gb|GQ895123.1|
gi|338224706|gb|HM623382.1|
gi|260081711|gb|GQ895097.1|
gi|260081709|gb|GQ895096.1|
gi|260081649|gb|GQ895066.1|
gi|338224776|gb|HM623418.1|
gi|260081661|gb|GQ895072.1|
gi|260081659|gb|GQ895071.1|
gi|260081657|gb|GQ895070.1|
gi|260081651|gb|GQ895067.1|
gi|338224780|gb|HM623420.1|
gi|338224686|gb|HM623372.1|
gi|260081773|gb|GQ895128.1|
gi|338224764|gb|HM623412.1|
gi|338224716|gb|HM623387.1|
gi|338224714|gb|HM623386.1|
gi|338224708|gb|HM623383.1|
gi|338224688|gb|HM623373.1|
gi|338224682|gb|HM623370.1|
gi|338224786|gb|HM623423.1|
gi|338224762|gb|HM623411.1|

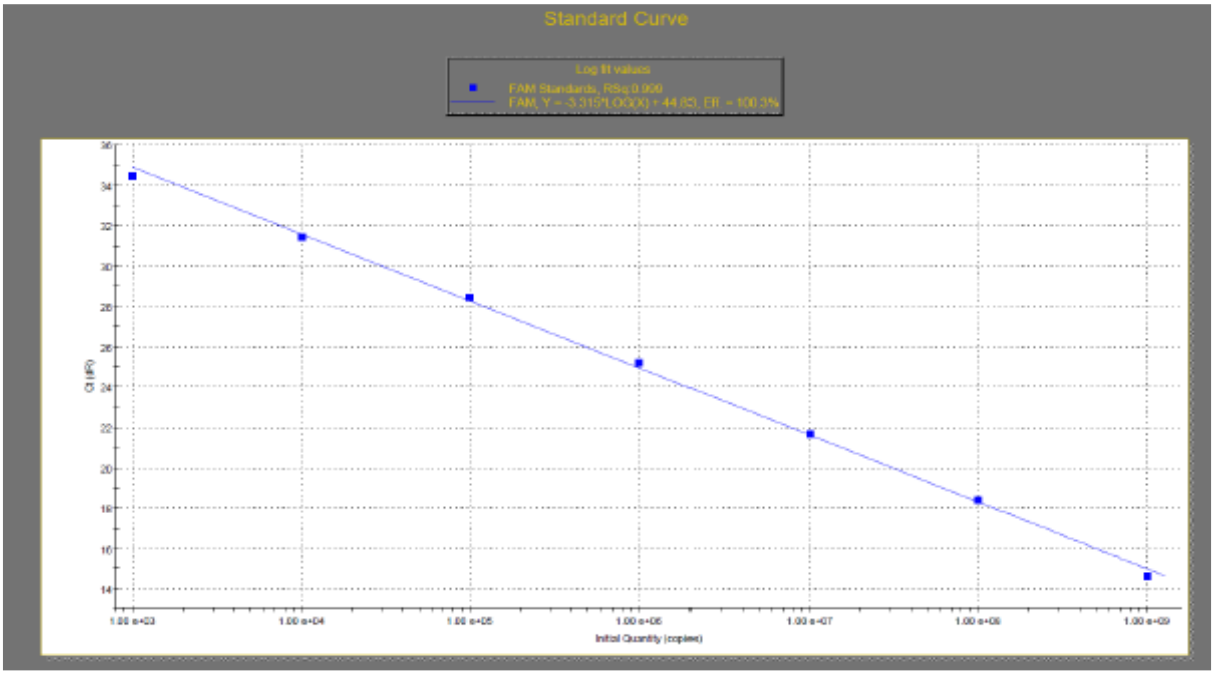
Ryc. 4. Przebieg reakcji w real-time PCR



Tab. 10. Krzywa standardowa w real-time PCR

Krzywa standardowa	
Ilość kopii	Ct (dR) (treshold: 1639,114)
10^9	14,64
10^8	18,42
10^7	21,74
10^6	25,20
10^5	28,45
10^4	31,46
10^3	31,49
Kontrola ujemna	brak

Ryc. 5. Krzywa standardowa



Przebieg reakcji ilustruje ryc. 4. Wartości krzywej standardowej dla tej reakcji przedstawiono w tabeli 10 oraz na ryc. 5.

Uzyskane wyniki uznaje się za prawidłowe jeżeli: uzyskano sygnały dla wszystkich rozcieńczeń standardu (w zakresie 103 109 kopii), wydajność reakcji dla standardu DNA (w zakresie 103 1010 kopii) jest w przedziale 90- 110%, nie uzyskano sygnału w kontroli ujemnej (brak Ct).

Reakcję należy powtórzyć w przypadku gdy: nie uzyskano sygnału dla wszystkich analizowanych stężeń standardu DNA (w zakresie 103 1010 kopii), wydajność reakcji wyznaczona dla standardu DNA (w zakresie 103 1010 kopii) jest poniżej 90% lub wyższa od 110%, uzyskano sygnał w kontroli ujemnej reakcji.

Zestaw umożliwia wykrycie i analizę ilościową nie mniej niż 103 kopii amplifikowanego fragmentu specyficznego DNA AMDV.

Układ testowano w aparacie do Real Time PCR Mx3000P (Stratagene)

3.4.7. Przygotowanie produktów uzyskanych w PCR do sekwencjonowania

Produkty amplifikacji DNA AMDV otrzymane w PCR poddano oczyszczaniu przy pomocy zestawu Clean-up firmy A&A Biotechnology, Gdynia, Polska, wg zaleceń producenta. Zestaw był przeznaczony do oczyszczania DNA otrzymanego w reakcjach enzymatycznych.

Skuteczność działania zestawu opierała się na obecności soli chalotropowych i złóż krzemionkowych wiążących DNA. W probówce typu eppendorf umieszczono 40 µl uzyskanego produktu i dodano 200 µl roztworu G, całość intensywnie mieszano a następnie odwirowano w celu usunięcia resztek roztworu z wieczka i ścianek probówki. Potem mieszaninę nanoszono na minikolumnę do oczyszczania DNA i wirowano przez 30 sek. przy 14,5 tys. RPM. Minikolumnę płukano 600 µl roztworu płuczącego A1 i wirowano 30 sek.

Zgodnie z procedurą po wirowaniu usunięto przesącz i czynność powtórzono. Po ostatnim wirowaniu minikolumnę umieszczono w nowej probówce i dodano 50 µl bufor TE w ilości i inkubowano w temp. pokojowej przez 3 min. Następnie probówkę z złożem wirowano przez 1 min przy 14,5 tys. RPM po czym usunięto złoże a uzyskany oczyszczony DNA przekazano do dalszych analiz

3.4.8. Sekwencjonowanie

Oczyszczone produkty otrzymane metodą PCR poddano sekwencjonowaniu w Serwisie Sekwencjonowania i Syntezy DNA Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk.

Do analizy filogenetycznej wyników sekwencjonowania uzyskanych izolatów AMDV użyto metody „Neighbor-Joining" (SAITOU i NEI 1987). Diagram w postaci drzewa filogenetycznego posiadał gałęzi długość 0.99212438. Przedstawiał on dystans ewolucyjny analizowanych izolatów oraz odległości pomiędzy nimi, w odpowiedniej skali.

Dystans różnic ewolucyjnych obliczano na podstawie metody Maximum Composite Likelihood Figure (TAMURA i in. 2004).

4. WYNIKI

4.1. Wyniki badania serologicznego

W celu wstępnej oceny sytuacji epizootycznej AMD, w krajowych stadach fermowych norek amerykańskich wykonano badania serologiczne metodą CIEP. W pobranej surowicy norek poszukiwano przeciwciał swoistych dla AMDV. W przypadku ich obecności, w żelu agarowym stwierdza się precypitację, jako wyraźny opalizującym biały łuk. Jej natężenie zależy m.in. od stężenia antygenów, mian przeciwciał, temperatury, czasu reakcji i stężenia elektrolitów. Brak precypitacji świadczy o braku swoistych przeciwciał tj. wyniku ujemnym.

Metodą CIEP zbadano 1017 norek z w/w stad norek. Wyniki były zróżnicowane i wyraźnie pozostawały w korelacji z prowadzonym wcześniej programem monitorowania lub zwalczania AMDV.

Do grupy I zaliczono stada amerykańskich norek z fermy H w której zbadano 250, J- 24 , I- 120 norek. W stadzie norek z fermy H nie stwierdzono żadnej norki serologicznie dodatniej, co prawdopodobnie miało związek z realizowanym programem zwalczania choroby aleuckiej norek. W stadach norek z fermy J i I także nie wykryto seroreagentów, bowiem norki zakupiono ze stada fermowych norek amerykańskich z Danii, gdzie był realizowany stale program zwalczania AMDV.

Do grupy II zaliczono stado amerykańskich norek z fermy B, w której program zwalczania AMDV został wdrożony niedawno, a badania serologiczne stanowiły jeden z elementów programu. Pobrano krew od 229 norek (138 samic i 91 samców) , u których wykazano obecność swoistych przeciwciał u 104 samic (75,4%) i 56 samców (61,5%).

Grupę III stanowiły dwa stada amerykańskich norek z ferm nie realizujących żadnego programu zwalczania AMDV. W fermie G badano serologicznie 264 norki (219 samic i 45 samców) a w fermie E 120 samic.

Obecność swoistych przeciwciał stwierdzono u 92,8% (92%samic i 98% samców) oraz u 33,3% samic, odpowiednio (Tab. 11).

Tab. 11. Wyniki badań serologicznych fermowych norek amerykańskich metodą CIEP, ze stad fermowych (H, J, I, B, G, E) uszeregowanych w 3 grupy (Gr)

Gr	Stada fermowe	Liczba norek	Liczba pobranych próbek od norek	Wyniki pozytywne	Wyniki pozytywne (%)
I	H	5000	250	0	0
	J	4800	24	0	0
	I	2400	120	0	0
II	B	4580	229: 138 samic 91 samców	160: 104 samic 56 samców	69,8%: 75,4% samic 61,5% samców
III	G	5280	264: 219 samic 45 samców	245: 201 samic 44 samców	92,8%: 92% samic 98% samców
	E	2400	120 samic	40 samic	33,3% samic
Suma		24460	1007	445	43,75%

4.2. Wyniki amplifikacji fragmentu genu VP2 AMDV z narządów w PCR i nested PCR

W celu wykrycia DNA AMDV przebadano 174 próbki z narządów amerykańskich norek. Pochodziły one ze stad fermowych norek z okolic Olsztyna-A, Ełku -B, Działdowa –C, Suwałk - E, F, Gdańska -G, Malborka - H, Lipna – I, Kalisza – J.

W wyborze próbek planowano pobierać próbki z narządów bogatych w tkankę łączną, wymagające długiego macerowania i poddawane działaniu czynników fizycznych tj. nerka lub charakteryzujące się wysoką zawartością enzymów tj. wątroba, śledziona, w których najczęściej stwierdza się obecność AMDV (FARID 2013, JENSEN i in. 2014, KNUUTTILA i in. 2009 b).

Uwzględniając jednak wyniki badań JENSEN i in. (2011) oraz wstępne wyniki badań własnych pobierano próbki ze śledziony, z której w/w badacze izolowali największej ilości materiału genetycznego AMDV.

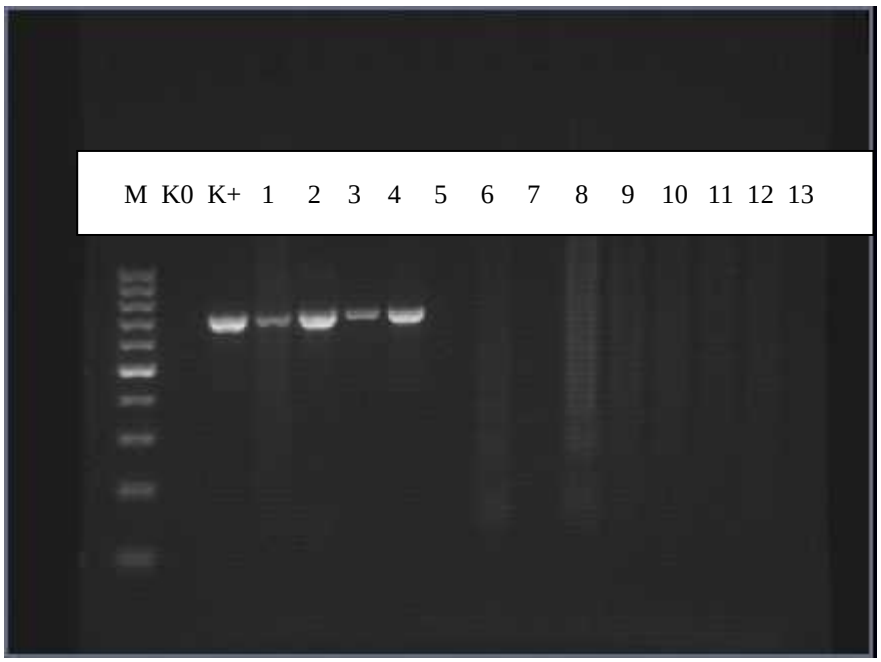
Izolację materiału genetycznego wykonano zgodnie z opisem w rozdziale 3.5.1.1

Do wykrywania w 37 próbkach fragmentu genu AMDV VP2 zastosowano PCR (Ryc. 6).

Następnie wybrane losowo próbki z w/w badano stosując nested PCR.

W badaniu w PCR wykryto obecność fragmentu genu AMDV w 4 z 37 narządów norek.

Ryc. 6. Wizualizacja produktów PCR na żelu agarozowym. Ścieżki: M - marker wielkości GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas), K0 - kontrola zerowa, K+ - kontrola dodatnia, 1 – 13 - badane próbki, część z 37 badanych próbek narządów



Ścieżki: M - marker wielkości GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas), K0 - kontrola ujemna, K+ - kontrola dodatnia, nr 1 – 13 (nr badanych próbek narządów norek)

Tab. 12. Wyniki amplifikacji genu AMDV z narządów, w PCR, nested-PCR i real-time PCR (pozytywny- wynik dodatni, negatywny- wynik ujemny, nb- nie badano, b-brak materiału)

Lp	Rodzaj próbki/ narząd	Stado fermy/miejsce	Wynik PCR	Wyniki real-time PCR	Wynik nested PCR
1	Śledziona	A	pozytywny	nb	pozytywny
2	Wątroba	A	pozytywny	nb	nb
3	Nerka	A	pozytywny	nb	pozytywny
4	Płuca	A	pozytywny	nb	pozytywny
5	Śledziona	B	ujemny	nb	nb
6	Wątroba	B	ujemny	nb	nb
7	Nerka	B	ujemny	nb	b
8	Płuco	B	ujemny	nb	nb
9	Śledziona	B	ujemny	nb	nb
10	Wątroba	B	ujemny	nb	nb
11	Nerka	B	ujemny	nb	nb
12	Płuca	B	ujemny	nb	nb
13	Śledziona	B	ujemny	nb	nb
14	Wątroba	B	ujemny	nb	b
15	Nerka	B	ujemny	nb	b
16	Płuca	B	ujemny	nb	nb
17	Śledziona	A	pozytywny	nb	nb

18	Wątroba	A	pozytywny	nb	nb
19	Nerka	A	pozytywny	nb	b
20	Płuca	A	pozytywny	nb	b
21	Wątroba	C	ujemny	nb	nb
22	Śledziona	C	ujemny	nb	nb
23	Nerka	C	ujemny	nb	nb
24	Śledziona	C	ujemny	nb	nb
25	Wątroba	C	ujemny	nb	nb
26	Nerka	C	ujemny	nb	nb
27	Wątroba	C	ujemny	nb	nb
28	Nerka	C	ujemny	nb	nb
29	Śledziona	C	ujemny	nb	nb
30	Nerka	C	ujemny	nb	nb
31	Wątroba	C	ujemny	nb	nb
32	Śledziona	C	ujemny	nb	nb
33	Śledziona	C	ujemny	nb	nb
34	Śledziona	C	ujemny	nb	nb
35	Śledziona	C	ujemny	nb	nb
36	Śledziona	C	ujemny	nb	nb
37	Śledziona	C	ujemny	nb	nb
38	Śledziona	C	ujemny	nb	nb
39	Śledziona	C	ujemny	nb	nb

40	Śledziona	C	ujemny	nb	nb
41	Śledziona	C	ujemny	nb	nb
42	Śledziona	C	ujemny	nb	nb
43	Śledziona	C	ujemny	nb	nb
44	Śledziona	C	ujemny	nb	nb
45	Śledziona	C	ujemny	nb	nb
46	Śledziona	C	ujemny	nb	nb
47	Śledziona	C	ujemny	nb	nb
48	Śledziona	C	ujemny	nb	nb
49	Śledziona	C	ujemny	nb	nb
50	Śledziona	C	ujemny	nb	nb
51	Śledziona	C	ujemny	nb	nb
52	Śledziona	C	ujemny	nb	nb
53	Śledziona	C	ujemny	nb	nb
54	Śledziona	C	ujemny	nb	nb
55	Śledziona	C	ujemny	nb	nb
56	Śledziona	C	ujemny	nb	nb
57	Śledziona	C	ujemny	nb	nb
58	Śledziona	C	ujemny	nb	nb
59	Śledziona	F	ujemny	ujemny	nb
60	Śledziona	F	ujemny	ujemny	nb
61	Śledziona	F	ujemny	ujemny	nb

62	Śledziona	F	ujemny	ujemny	nb
63	Śledziona	F	pozytywny	nb	pozytywny
64	Śledziona	F	ujemny	ujemny	nb
65	Śledziona	F	pozytywny	nb	pozytywny
66	Śledziona	F	ujemny	ujemny	nb
67	Śledziona	F	pozytywny	nb	pozytywny
68	Śledziona	F	ujemny	ujemny	nb
69	Śledziona	F	ujemny	ujemny	nb
70	Śledziona	F	ujemny	ujemny	nb
71	Śledziona	G	ujemny	ujemny	nb
72	Śledziona	G	ujemny	ujemny	nb
73	Śledziona	G	ujemny	ujemny	nb
74	Śledziona	G	ujemny	ujemny	nb
75	Śledziona	G	ujemny	ujemny	nb
76	Śledziona	G	ujemny	ujemny	nb
77	Śledziona	G	ujemny	ujemny	nb
78	Śledziona	G	ujemny	ujemny	nb
79	Śledziona	G	ujemny	ujemny	nb
80	Śledziona	G	ujemny	ujemny	nb
81	Śledziona	G	ujemny	ujemny	nb
82	Śledziona	E	pozytywny	nb	pozytywny
83	Śledziona	E	pozytywny	nb	pozytywny

84	Śledziona	E	ujemny	pozytywny	pozytywny
85	Śledziona	E	pozytywny	nb	pozytywny
86	Śledziona	E	pozytywny	nb	pozytywny
87	Śledziona	E	ujemny	pozytywny	pozytywny
88	Śledziona	E	ujemny	pozytywny	pozytywny
89	Śledziona	E	ujemny	ujemny	pozytywny
90	Śledziona	E	ujemny	pozytywny	pozytywny
91	Śledziona	E	ujemny	pozytywny	pozytywny
92	Śledziona	E	pozytywny	nb	pozytywny
93	Śledziona	E	pozytywny	nb	pozytywny
94	Śledziona	E	ujemny	pozytywny	pozytywny
95	Śledziona	E	pozytywny	nb	pozytywny
96	Śledziona	E	pozytywny	nb	pozytywny
97	Śledziona	E	pozytywny	nb	pozytywny
98	Śledziona	E	ujemny	pozytywny	pozytywny
99	Śledziona	E	pozytywny	nb	pozytywny
100	Śledziona	E	pozytywny	nb	pozytywny
101	Śledziona	E	pozytywny	nb	pozytywny
102	Śledziona	D	pozytywny	nb	pozytywny
103	Śledziona	D	pozytywny	nb	pozytywny
104	Śledziona	D	pozytywny	nb	pozytywny
105	Śledziona	D	nb	pozytywny	pozytywny

106	Śledziona	D	nb	nb	pozytywny
107	Śledziona	D	nb	pozytywny	pozytywny
108	Śledziona	D	pozytywny	nb	pozytywny
109	Śledziona	D	pozytywny	nb	b
110	Śledziona	D	pozytywny	nb	b
111	Śledziona	D	ujemny	nb	nb
112	Śledziona	D	ujemny	nb	nb
113	Śledziona	D	ujemny	nb	nb
114	Śledziona	D	pozytywny	nb	b
115	Śledziona	D	pozytywny	nb	b
116	Śledziona	D	pozytywny	nb	b
117	Śledziona	D	nb	pozytywny	pozytywny
118	Śledziona	D	pozytywny	nb	b
119	Śledziona	D	nb	pozytywny	pozytywny
120	Śledziona	D	pozytywny	nb	b
121	Śledziona	D	nb	pozytywny	nb
122	Śledziona	D	pozytywny	nb	b
123	Śledziona	D	nb	pozytywny	pozytywny
124	Śledziona	D	pozytywny	nb	b
125	Śledziona	D	pozytywny	nb	b
126	Śledziona	D	nb	pozytywny	b
127	Śledziona	D	nb	pozytywny	b

128	Śledziona	D	nb	pozytywny	b
129	Śledziona	D	nb	pozytywny	b
130	Śledziona	D	nb	pozytywny	b
131	Śledziona	D	nb	pozytywny	b
132	Śledziona	D	nb	pozytywny	b
133	Śledziona	D	nb	pozytywny	b
134	Śledziona	D	nb	pozytywny	b
135	Śledziona	D	nb	pozytywny	b
136	Śledziona	D	nb	pozytywny	nb
137	Śledziona	D	nb	pozytywny	nb
138	Śledziona	D	nb	pozytywny	nb
139	Śledziona	D	nb	pozytywny	nb
140	Śledziona	D	nb	pozytywny	nb
141	Śledziona	D	nb	pozytywny	nb
142	Śledziona	D	nb	pozytywny	nb
143	Śledziona	D	nb	pozytywny	nb
144	Śledziona	D	nb	pozytywny	nb
145	Śledziona	D	nb	pozytywny	nb
146	Śledziona	D	nb	pozytywny	nb
147	Śledziona	D	nb	pozytywny	nb
148	Śledziona	D	nb	pozytywny	nb
149	Śledziona	D	nb	pozytywny	nb

150	Śledziona	D	nb	ujemny	nb
151	Śledziona	D	nb	ujemny	nb
152	Śledziona	D	nb	ujemny	nb
153	Śledziona	D	nb	ujemny	nb
154	Śledziona	H	nb	nb	nb
155	Śledziona	H	nb	nb	nb
156	Śledziona	H	nb	nb	nb
157	Śledziona	H	nb	nb	nb
158	Śledziona	H	nb	nb	nb
159	Śledziona	H	nb	nb	nb
160	Śledziona	H	nb	nb	nb
161	Śledziona	H	nb	nb	nb
162	Śledziona	H	nb	nb	nb
163	Śledziona	H	nb	nb	nb
164	Śledziona	H	nb	nb	nb
165	Śledziona	I	nb	nb	nb
166	Śledziona	I	nb	nb	nb
167	Śledziona	J	nb	nb	nb
168	Śledziona	J	nb	nb	nb
169	Śledziona	J	nb	nb	nb
170	Śledziona	J	nb	nb	nb
171	Śledziona	J	nb	nb	nb

172	Śledziona	J	nb	nb	nb
173	Śledziona	J	nb	nb	nb
174	Śledziona	J	nb	nb	nb

4.3. Wyniki amplifikacji fragmentu genu VP2 AMDV ze środowiska w PCR

W tab. 13 wyszczególniono miejsca w środowisku fermy norek tj. sprzęt, klatki, konstrukcje pawilonów, chłodnie, budynek obsługi, ziemię itp., z których pobierano wymazy. Środowisko fermy było po 2 letniej kontaminacji i kilkakrotnym odkażaniu całego środowiska fermy przez profesjonalną zagraniczną firmę.

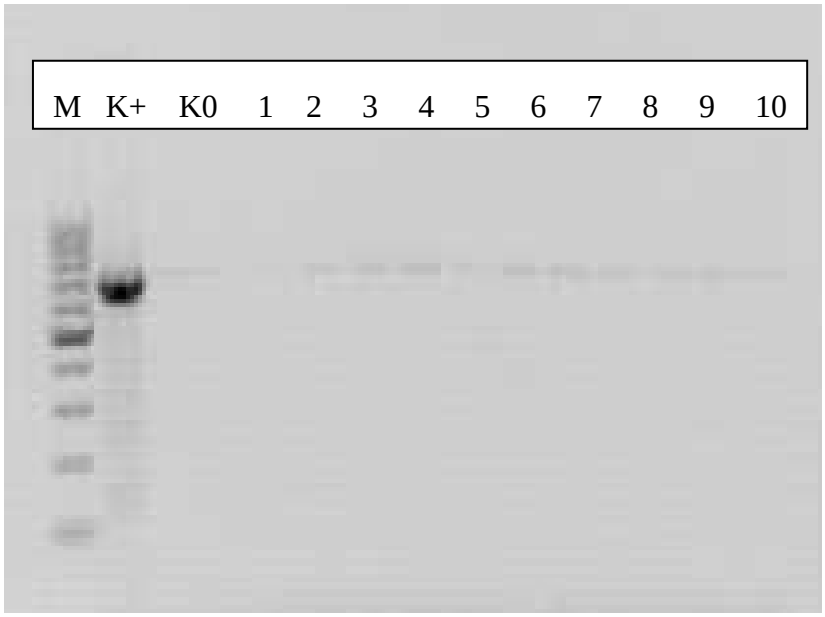
W badanych wymazach nie wykryto materiału genetycznego AMDV (ryc. 7, 8).

Tab. 13. Wyniki amplifikacji fragmentu genu VP2 AMDV z wymazów środowiska w PCR

nr	Oznaczenie próbki	Wynik badania wymazów metodą PCR
1	F1 - Klatka 1	ujemny
2	F1 - Klatka 2	ujemny
3	F1 - Klatka 3	ujemny
4	F1 - Klatka 4	ujemny
5	F1 - Wkład 1	ujemny
6	F1 - Wkład 2	ujemny
7	F1 - Wkład 3	ujemny
8	F1 - Wykotnik 3	ujemny

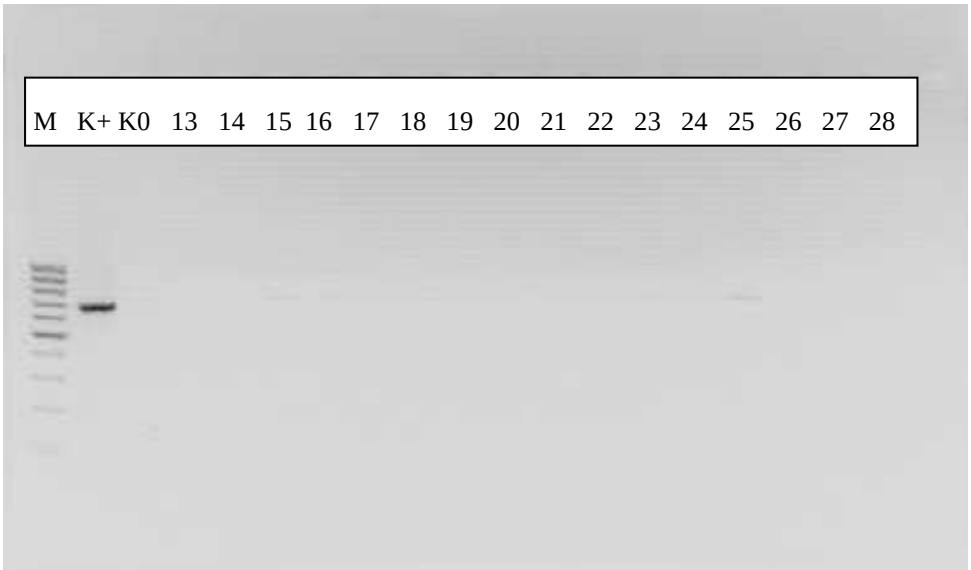
9	F1- Pawilon 2, betonowa droga	ujemny
10	F1- Wykotnik 4	ujemny
11	F1 - Ziemia P3	ujemny
12	F1 - Ziemia P4	ujemny
13	F1 - Pawilon 3, Konstrukcja	ujemny
14	F2 - Klatka 1	ujemny
15	F2 - Klatka 2	ujemny
16	F2 Klatka 3	ujemny
17	F2 -Wykotnik 2	ujemny
18	F2 -Wykotnik 3	ujemny
19	Traktor 1	ujemny
20	Traktor 2	ujemny
21	F1 -Pawilon 2, konstrukcja	ujemny
22	Budynek	ujemny
23	Widlak	ujemny
24	Chłodnia	ujemny
25	Karmiarka 1	ujemny
26	Karmiarka 2	ujemny
27	F2 - Wykotnik 1	ujemny
28	Wkład Plastikowy 1	ujemny
29	Wkład Plastikowy 2	ujemny

Ryc. 7. Rozdział elektroforetyczny w 2% żelu agarowym produktów amplifikacji w PCR



Ścieżki: M - marker wielkości GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas), K0 - kontrola ujemna, K+ - kontrola dodatnia nr1 – 12 - badane próbki.

Ryc. 8. Rozdział elektroforetyczny w 2% żelu agarowym produktów amplifikacji w PCR



Ścieżki: M - marker wielkości GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas), , K0 - kontrola ujemna, K+ - kontrola dodatnia, , nr 13 – 29 - badane próbki.

4.4. Wyniki amplifikacji fragmentu genu NS1 AMDV z narządów w real-time PCR

Real-time PCR przeprowadzono w termocyklerze Mx3000P (Stratagene) z wykorzystaniem sondy TaqMan znakowanej FAM. Kontrolę pozytywną stanowiło DNA plazmidowe z wklonowanym amplifikowanym fragmentem o stężeniu $1x10^{11}$ kopii/µl. Wielkość DNA plazmidowego wynosiła ok. 3 kpz. Rozcieńczenia DNA wykonano w 0,1% BSA. Wszystkie oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach. Poziom oznaczalności na podstawie rozcieńczeń standardu wynosił przynajmniej 1 x 10^3 kopii amplifikowanego genu. Wydajność reakcji wyznaczona dla kontroli pozytywnej, dla wyników uśrednionych z trzech powtórzeń, w zakresie stężeń 1 x 10^9 – 1 x 10^3 kopii/µl wyniosła 91,3%.

Wyniki badań w real-time PCR były bardzo interesujące. Zbadano tą metodą 61 próbek śledziony norek fermowych, uprzednio badanych metodą PCR. DNA AMDV wykryto w 40 próbkach, w tym w 7 śledzionach wynik w klasycznym PCR był ujemny (Tab14).

Tab. 14. Wyniki wykrywania DNA AMDV w narządach norek fermowych w real-time PCR

Lp.	Nr próbki	Rodzaj badanego materiału	Ct (dR) Cykl progowy	Quantity (copies) Ilość kopii
1.	---	Standard	No Ct	No Ct
2	---	Standard	33,59	1,00E+003
3	---	Standard	30,09	1,00E+004
4	---	Standard	26,87	1,00E+005
5	---	Standard	23,31	1,00E+006
6	---	Standard	19,84	1,00E+007
7	---	Standard	16,1	1,00E+008
8	---	FAM Negative Control	No Ct	No Ct
9	**59**	śledziona	No Ct	No Ct
10	**60**	śledziona	No Ct	No Ct
11	**61**	śledziona	No Ct	No Ct

12	**62**	śledziona	No Ct	No Ct
13	**64**	śledziona	No Ct	No Ct
14	**66**	śledziona	No Ct	No Ct
15	**68**	śledziona	No Ct	No Ct
16	**69**	śledziona	No Ct	No Ct
17	**70**	śledziona	No Ct	No Ct
18	**71**	śledziona	No Ct	No Ct
19	**72**	śledziona	No Ct	No Ct
20	**73**	śledziona	No Ct	No Ct
21	**74**	śledziona	No Ct	No Ct
22	**75**	śledziona	No Ct	No Ct
23	**76**	śledziona	No Ct	No Ct
24	**77**	śledziona	No Ct	No Ct
25	**78**	śledziona	No Ct	No Ct
26	**79**	śledziona	No Ct	No Ct
27	**80**	śledziona	No Ct	No Ct
28	**81**	śledziona	No Ct	No Ct
29	**84**	śledziona	32,99	1,56E+003
30	**87**	śledziona	33,31	1,27E+003
31	**88**	śledziona	29,87	1,24E+004
32	**89**	śledziona	No Ct	No Ct
33	**90**	śledziona	29,25	1,86E+004
34	**91**	śledziona	28,97	2,24E+004
35	**94**	śledziona	26,96	8,45E+004
36	**98**	śledziona	31,76	3,53E+003
37	**105**	śledziona	30,2	9,93E+003
38	**107**	śledziona	26,32	1,29E+005

39	**117**	śledziona	34,23	6,90E+002
40	**119**	śledziona	32,75	1,83E+003
41	**121**	śledziona	29,03	2,15E+004
42	**123**	śledziona	26,3	1,30E+005
43	**150**	śledziona	No Ct	No Ct
44	**151**	śledziona	No Ct	No Ct
45	**152**	śledziona	No Ct	No Ct
46	**153**	śledziona	No Ct	No Ct
47	**126**	śledziona	33,86	8,82E+002
48	**127**	śledziona	22,34	1,80E+006
49	**128**	śledziona	35,01	4,11E+002
50	**129**	śledziona	32,29	2,49E+003
51	**130**	śledziona	26,37	1,25E+005
52	**131**	śledziona	23,13	1,07E+006
53	**132**	śledziona	21,36	3,43E+006
54	**133**	śledziona	21,21	3,80E+006
55	**134**	śledziona	21,83	2,51E+006
56	**135**	śledziona	34,94	4,29E+002
57	**136**	śledziona	32,1	2,81E+003
58	**137**	śledziona	33,76	9,41E+002
59	**138**	śledziona	23,18	1,03E+006
60	**139**	śledziona	24,88	3,36E+005
61	**140**	śledziona	32,74	1,85E+003
62	**141**	śledziona	23,2	1,02E+006
63	**142**	śledziona	25,79	1,83E+005
64	**143**	śledziona	32,39	2,33E+003
65	**144**	śledziona	27,04	8,04E+004

66	**145**	śledziona	31,37	4,56E+003
67	**146**	śledziona	25,35	2,45E+005
68	**147**	śledziona	22,48	1,64E+006
69	**148**	śledziona	29,47	1,61E+004
70	**149**	śledziona	31,05	5,65E+003

4.5. Wyniki sekwencjonowania fragmentu genu VP2 AMDV w PCR

Do analizy wyników sekwencjonowania wykorzystano oprogramowanie BLASTN, przeszukano bazy sekwencji GenBank + EMBL + DDBJ + PDB. Do analizy sekwencji nukleotydowych wykorzystano oprogramowanie BioEdit 7.1.9 i MEGA5 5.2.1. Obliczenia wykonano metodą Clustal W (TAMURA i in. 2011).

W PCR z badaniach narządów krajowych stad fermowych norek amerykańskich uzyskano 11 sekwencji nukleotydowych genu VP2, kodującego białko kapsydu AMDV o długości 672 par zasad. Wszystkie wykryte 11 izolaty to nowe sekwencje genu VP2 AMDV.

Aby określić stopień podobieństwa filogenetycznego uzyskanych w PCR izolatów fragmentu genu VP2 AMDV porównano je z wybranymi sekwencjami genów AMDV pobranymi z wcześniej opublikowanych w GenBanku.

Analizowano 18 sekwencji o długości 643 par zasad o największym stopniu podobieństwa. Analizowano ponadto izolaty: ADV-Utah 1 VP2 gene USA, ADV-TR VP2 gene USA, ADV-AMDVD-G cg USA, ADV-Pullman VP2 gene USA, ADV-Far East VP 2 gene Russia, ADV-LN2 VP2 gene China oraz Minute virus of mice cg. Pominięto istniejące w sekwencji luki.

Na ryc. 9 przedstawiono drzewo filogenetyczne wykrytych izolatów fragmentu genu VP2 AMDV, w krajowych stadach amerykańskich norek fermowych, w stosunku do wygenerowanych izolatów z bazy GenBanku

Procentowe podobieństwo sekwencji nukleotydowych poszczególnych izolatów do sekwencji wygenerowanych z GenBanku przedstawiono w tab. 15.

Wykazano największy tj. 97,9 % stopień podobieństwa izolatów AMDV ADV 99, 101, 97, 96, 86, 82, 93, 100, 63, 65 w stosunku do ADV-Utah 1 VP2 gene USA.

Równie wysokie 97,1% oraz 96,72% ich podobieństwo wykazano wobec Far East VP 2 gene Russia oraz ADV-LN2 VP2 gene China.

Mniejsze podobieństwo wykazywał izolat AMDV ADV 67 w stosunku do wszystkich wygenerowanych izolatów. W stosunku do ADV-Utah 1 VP2 gene USA, Far East VP 2 gene Russia oraz ADV-LN2 VP2 gene China wynosiło ono odpowiednio 96,4; 95; 38; 95; 23%.

Na ryc. 10, 11 porównano wykryte sekwencje fragmentów genu VP2 ADV (AMDV), w krajowych stadach fermowych norek amerykańskich, w stosunku do wzorcowego wirusa ADV cg.

Nazwy wykrytych izolatów oraz numery ich zgłoszenia do GenBank przedstawiono w tab. 16.

Sekwencje nukleotydowe izolatów ADV zgłoszonych i umieszczonych w GenBanku ilustruje tab. 17.

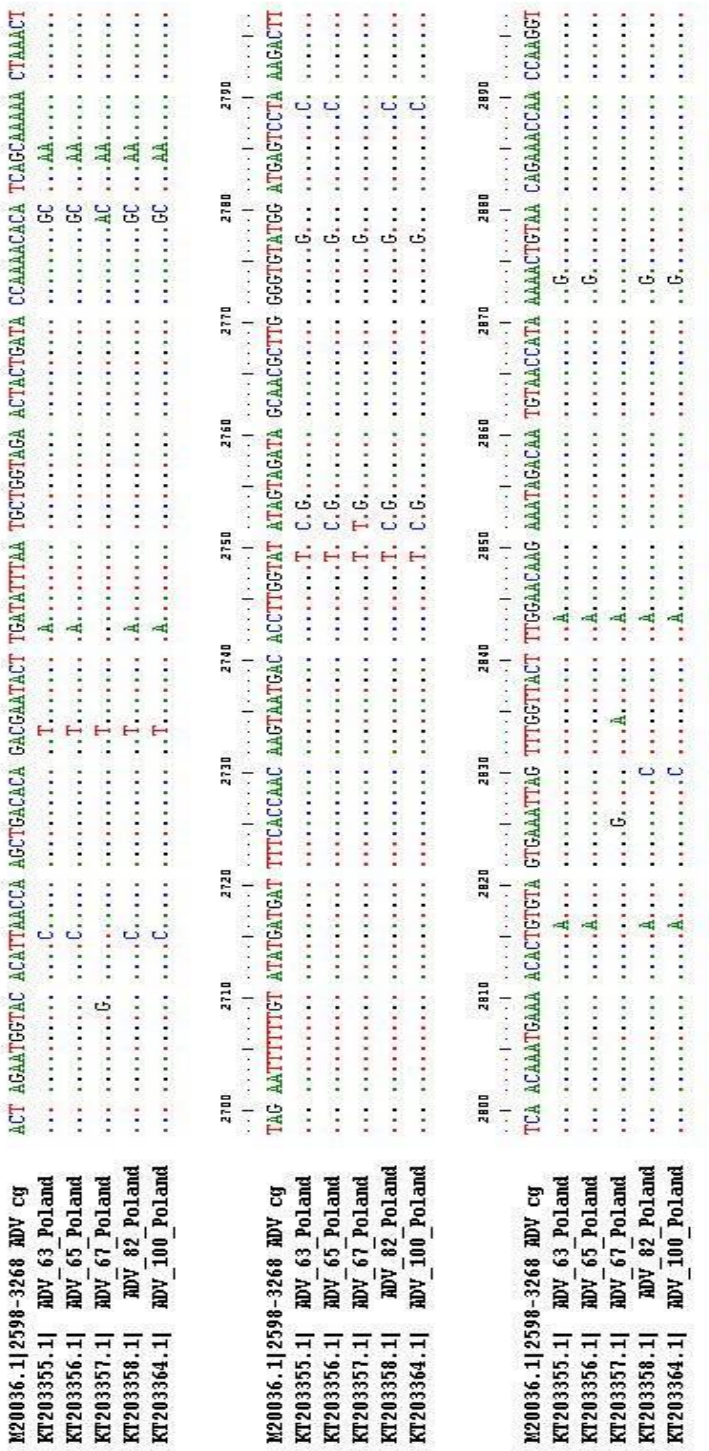
Ryc. 9. Drzewo filogenetyczne, wykrytych izolatów fragmentu genu VP2 AMDV (ADV) w krajowych stadach fermowych norek amerykańskich, wobec izolatów z GenBanku



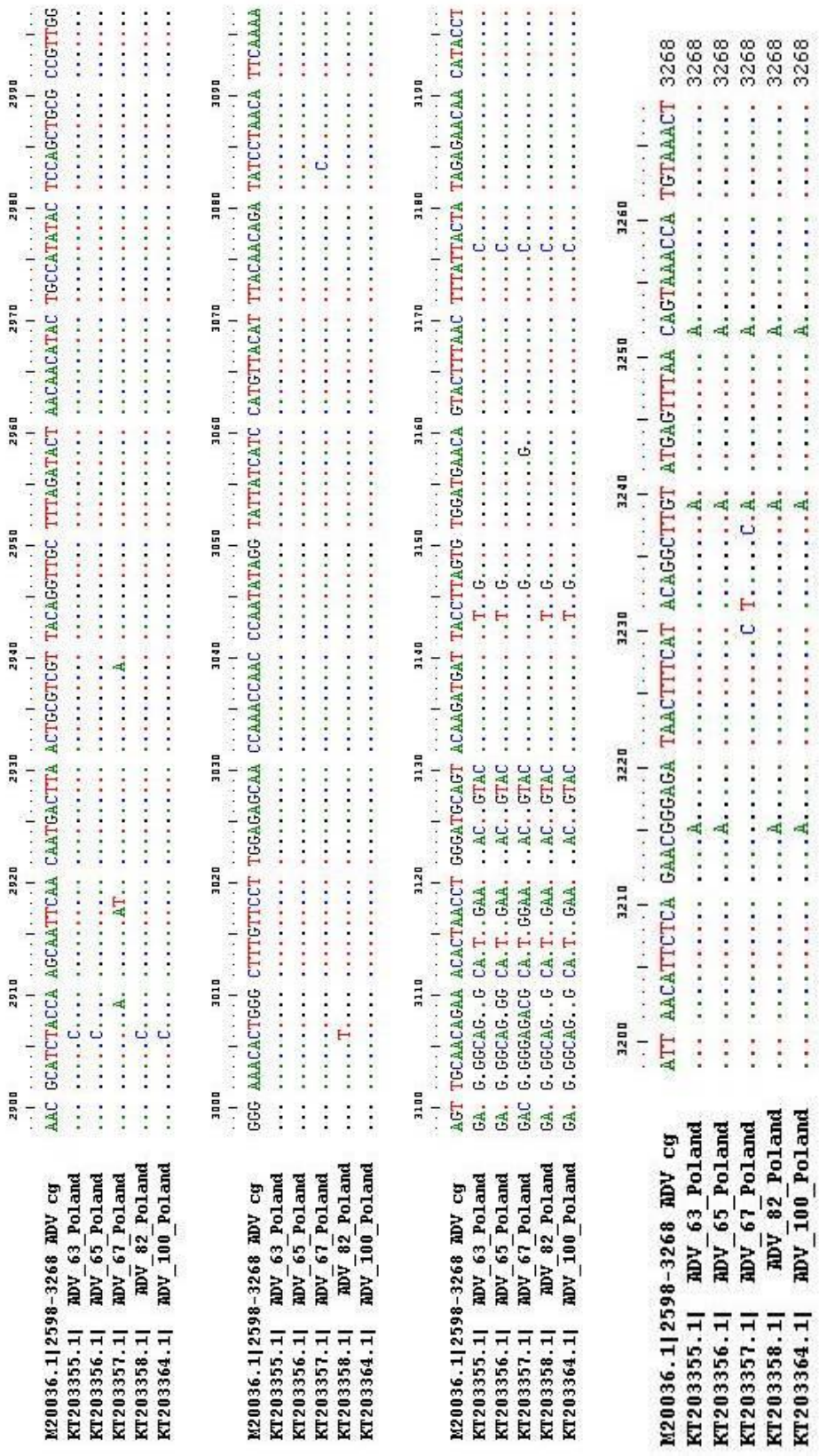
Tab.15. Procentowe podobieństwo wykrytych sekwencji nukleotydowych AMDV ADV w krajowych stadach fermowych norek amerykańskich, w stosunku do sekwencji AMDV wygenerowanych z GenBanku

	AMDV-ADV 99,101,97, 86,82,93, 100,63,65	Izolat AMDV ADV 67	ADV-Utah 1 VP2 gene USA	ADV-TR VP2 gene USA	ADV-AMDV D-Gcg USA	ADV-Pullman VP2 gene USA	ADV-Far East VP 2 gene Russia	ADV-LN2 VP2 gene China
AMDV-ADV 99,101,97,86,82,93,100,63,65	100	95,7	97,9	94,19	94,04	94,5	97,1	96,72
Izolat AMDV ADV 67	95,7	100	96,4	93,63	93,19	93,19	95,38	95,23

Ryc. 10. Porównanie wykrytych sekwencji nukleotydowych ADV(AMDV), w krajowych stadach fermowych norek amerykańskich , w stosunku do wzorcowego wirusa ADV cg



Ryc. 11. Porównanie wykrytych sekwencji nukleotydowych ADV (AMDV), w krajowych stadach fermowych norek amerykańskich, w stosunku do wzorcowego wirusa ADV cg



Tab. 16. Opis izolatów ADV (AMDV) wykrytych w krajowych stadach fermowych norek amerykańskich, które zgłoszono i umieszczono w GenBanku

Lp.	Szczep wirusa	Data sekwencjo-nowania	Pochodzenie	Locus GenBank	Autorzy
1	ADV_63_Poland	24/07/2015	Polska	KT203355	Siemionek J., Wawro M., Szczerba-Turek A.
2	ADV_65_Poland	24/07/2015	Polska	KT203356	Siemionek J., Wawro M., Szczerba-Turek A.
3	ADV_67_Poland	24/07/2015	Polska	KT203357	Siemionek J., Wawro M., Szczerba-Turek A.
4	ADV_82_Poland	24/07/2015	Polska	KT203358	Siemionek J., Wawro M., Szczerba-Turek A.
5	ADV_86_Poland	24/07/2015	Polska	KT203359	Siemionek J., Wawro M., Szczerba-Turek A.
6	ADV_93_Poland	24/07/2015	Polska	KT203360	Siemionek J., Wawro M., Szczerba-Turek A.
7	ADV_96_Poland	24/07/2015	Polska	KT203361	Siemionek J., Wawro M., Szczerba-Turek A.
8	ADV_97_Poland	24/07/2015	Polska	KT203362	Siemionek J., Wawro M., Szczerba-Turek A.
9	ADV_99_Poland	24/07/2015	Polska	KT203363	Siemionek J., Wawro M., Szczerba-Turek A.
10	ADV_100_Poland	24/07/2015	Polska	KT203364 unverified	Siemionek J., Wawro M., Szczerba-Turek A.
11	ADV_101_Poland	24/07/2015	Polska	KT203365	Siemionek J., Wawro M., Szczerba-Turek A.

Tab. 17. Stwierdzone sekwencje nukleotydowe izolatów ADV (AMDV), wykryte w krajowych stadach fermowych norek amerykańskich, umieszczone w GenBanku

Izolat ADV-63
TACTAGAATGGTACACATCAACCAAG--CTGACACAGATGAATACTTAATATTTAATGCT
GGTAGAACTACTGATACCAAAACAGCTCAAAAAAAACTAAACTTAGAATTTTTTGTATAT
GATGATTTTCACCAACAAGTAATGACACCTTGGTTTCTGGTAGATAGCAACGCTTGGGGT
GTGTGGATGAGTCCCAAAGACTTTCAACAAATGAAAACACTATGTAGTGAAATTAGTTTG
GTTACTTTAGAACAAGAAATAGACAATGTAACCATAAAGACTGTAACAGAAACCAACCAA
GGTAACGCATCCACCAAGCAATTCAACAATGACTTAACTGCGTCGTTACAGGTTGCTTTA
GATACTAACAACATACTGCCATATACTCCAGCTGCGCCGTTGGGGGAAACACTGGGCTTT
GTTCCTTGGAGAGCAACCAAACCAACCCAATATAGGTATTATCATCCATGTTACATTTAC
AACAGATATCCTAACATTCAAAAGATGGGGCAGGAGCAATTAGAATGGACTGGTACACAA
GATGATTATCTGAGTGTGGATGAACAGTACTTTAACTTTATCACTATAGAGAACAACATA
CCTATTAACATTCTCAGAACAGGAGATAACTTTCATACAGGCT-TATATGAGTTTAAAAG
TAAACCATGTAAACT
Izolat ADV-65
TACTAGAATGGTACACATCAACCAAG--CTGACACAGATGAATACTTAATATTTAATGCT
GGTAGAACTACTGATACCAAAACAGCTCAAAAAAAACTAAACTTAGAATTTTTTGTATAT
GATGATTTTCACCAACAAGTAATGACACCTTGGTTTCTGGTAGATAGCAACGCTTGGGGT
GTGTGGATGAGTCCCAAAGACTTTCAACAAATGAAAACACTATGTAGTGAAATTAGTTTG
GTTACTTTAGAACAAGAAATAGACAATGTAACCATAAAGACTGTAACAGAAACCAACCAA
GGTAACGCATCCACCAAGCAATTCAACAATGACTTAACTGCGTCGTTACAGGTTGCTTTA
GATACTAACAACATACTGCCATATACTCCAGCTGCGCCGTTGGGGGAAACACTGGGCTTT
GTTCCTTGGAGAGCAACCAAACCAACCCAATATAGGTATTATCATCCATGTTACATTTAC
AACAGATATCCTAACATTCAAAAGATGGGGCAGGGGCAATTAGAATGGACTGGTACACAA
GATGATTATCTGAGTGTGGATGAACAGTACTTTAACTTTATCACTATAGAGAACAACATA
CCTATTAACATTCTCAGAACAGGAGATAACTTTCATACAGGCT-TATATGAGTTTAAAAG
TAAACCATGTAAACT

Izolat ADV-67

TACTAGAATGGTGCACATTAACCAAG--CTGACACAGATGAATACTTGATATTTAATGCT

GGTAGAACTACTGATACCAAAACAACTCAAAAAAAACTAAACTTAGAATTTTTTGTATAT

GATGATTTTCACCAACAAGTAATGACACCTTGGTTTTTGGTAGATAGCAACGCTTGGGGT

GTGTGGATGAGTCCTAAAGACTTTCAACAAATGAAAACACTGTGTAGTGAGATTAGTTTA

GTTACTTTAGAACAAGAAATAGACAATGTAACCATAAAAACTGTAACAGAAACCAACCAA

GGTAACGCATCTACAAAGCAATATAACAATGACTTAACTGCGTCATTACAGGTTGCTTTA

GATACTAACAACATACTGCCATATACTCCAGCTGCGCCGTTGGGGGAAACACTGGGCTTT

GTTCCTTGGAGAGCAACCAAACCAACCCAATATAGGTATTATCATCCATGTTACATTTAC

AACAGATACCCTAACATTCAAAAGACGGGGGAGACGCAATTGGAATGGACTGGTACACAA

GATGATTACCTGAGTGTGGATGAGCAGTACTTTAACTTTATCACTATAGAGAACAACATA

CCTATTAACATTCTCAGAACGGGAGATAACTTTCACTCAGGCC-TATATGAGTTTAAAAG

TAAACCATGTAAACT

Izolat ADV-82

TACTAGAATGGTACACATCAACCAAG--CTGACACAGATGAATACTTAATATTTAATGCT

GGTAGAACTACTGATACCAAAACAGCTCAAAAAAAACTAAACTTAGAATTTTTTGTATAT

GATGATTTTCACCAACAAGTAATGACACCTTGGTTTCTGGTAGATAGCAACGCTTGGGGT

GTGTGGATGAGTCCCAAAGACTTTCAACAAATGAAAACACTATGTAGTGAAATTACTTTG

GTTACTTTAGAACAAGAAATAGACAATGTAACCATAAAGACTGTAACAGAAACCAACCAA

GGTAACGCATCCACCAAGCAATTCAACAATGACTTAACTGCGTCGTTACAGGTTGCTTTA

GATACTAACAACATACTGCCATATACTCCAGCTGCGCCGTTGGGGGAAACATTGGGCTTT

GTTCCTTGGAGAGCAACCAAACCAACCCAATATAGGTATTATCATCCATGTTACATTTAC

AACAGATATCCTAACATTCAAAAGATGGGGCAGGAGCAATTAGAATGGACTGGTACACAA

GATGATTATCTGAGTGTGGATGAACAGTACTTTAACTTTATCACTATAGAGAACAACATA

CCTATTAACATTCTCAGAACAGGAGATAACTTTCATACAGGCT-TATATGAGTTTAAAAG

TAAACCATGTAAACT

Izolat ADV-86

TACTAGAATGGTACACATCAACCAAG--CTGACACAGATGAATACTTAATATTTAATGCT

GGTAGAACTACTGATACCAAAACAGCTCAAAAAAAACTAAACTTAGAATTTTTTGTATAT

GATGATTTTCACCAACAAGTAATGACACCTTGGTTTCTGGTAGATAGCAACGCTTGGGGT

GTGTGGATGAGTCCCAAAGACTTTCAACAAATGAAAACACTATGTAGTGAAATTACTTTG

GTTACTTTAGAACAAGAAATAGACAATGTAACCATAAAGACTGTAACAGAAACCAACCAA

GGTAACGCATCCACCAAGCAATTCAACAATGACTTAACTGCGTCGTTACAGGTTGCTTTA

GATACTAACAACATACTGCCATATACTCCAGCTGCGCCGTTGGGGGAAACATTGGGCTTT

GTTCCTTGGAGAGCAACCAAACCAACCCAATATAGGTATTATCATCCATGTTACATTTAC

AACAGATATCCTAACATTCAAAAGATGGGGCAGGAGCAATTAGAATGGACTGGTACACAA

GATGATTATCTGAGTGTGGATGAACAGTACTTTAACTTTATCACTATAGAGAACAACATA

CCTATTAACATTCTCAGAACAGGAGATAACTTTCATACAGGCT-TATATGAGTTTAAAAG

TAAACCATGTAAACT

Izolat ADV-93

TACTAGAATGGTACACATCAACCAAG--CTGACACAGATGAATACTTAATATTTAATGCT

GGTAGAACTACTGATACCAAAACAGCTCAAAAAAAACTAAACTTAGAATTTTTTGTATAT

GATGATTTTCACCAACAAGTAATGACACCTTGGTTTCTGGTAGATAGCAACGCTTGGGGT

GTGTGGATGAGTCCCAAAGACTTTCAACAAATGAAAACACTATGTAGTGAAATTACTTTG

GTTACTTTAGAACAAGAAATAGACAATGTAACCATAAAGACTGTAACAGAAACCAACCAA

GGTAACGCATCCACCAAGCAATTCAACAATGACTTAACTGCGTCGTTACAGGTTGCTTTA

GATACTAACAACATACTGCCATATACTCCAGCTGCGCCGTTGGGGGAAACATTGGGCTTT

GTTCCTTGGAGAGCAACCAAACCAACCCAATATAGGTATTATCATCCATGTTACATTTAC

AACAGATATCCTAACATTCAAAAGATGGGGCARGAGCAATTAGAATGGACTGGTACACAA

GATGATTATCTGAGTGTGGATGAACAGTACTTTAACTTTATCACTATAGAGAACAACATA

CCTATTAACATTCTCAGAACAGGAGATAACTTTCATACAGGCT-TATATGAGTTTAAAAG

TAAACCATGTAAACT

Izolat ADV-96

TACTAGAATGGTACACATCAACCAAG--CTGACACAGATGAATACTTAATATTTAATGCT

GGTAGAACTACTGATACCAAAACAGCTCAAAAAAAACTAAACTTAGAATTTTTTGTATAT

GATGATTTTCACCAACAAGTAATGACACCTTGGTTTCTGGTAGATAGCAACGCTTGGGGT

GTGTGGATGAGTCCCAAAGACTTTCAACAAATGAAAACACTATGTAGTGAAATTACTTTG

GTTACTTTAGAACAAGAAATAGACAATGTAACCATAAAGACTGTAACAGAAACCAACCAA

GGTAACGCATCCACCAAGCAATTCAACAATGACTTAACTGCGTCGTTACAGGTTGCTTTA

GATACTAACAACATACTGCCATATACTCCAGCTGCGCCGTTGGGGGAAACATTGGGCTTT

GTTCCTTGGAGAGCAACCAAACCAACCCAATATAGGTATTATCATCCATGTTACATTTAC

AACAGATATCCTAACATTCAAAAGATGGGGCAGGAGCAATTAGAATGGACTGGTACACAA

GATGATTATCTGAGTGTGGATGAACAGTACTTTAACTTTATCACTATAGAGAACAACATA

CCTATTAACATTCTCAGAACAGGAGATAACTTTCATACAGGCT-TATATGAGTTTAAAAG

TAAACCATGTAAACT

Izolat ADV-97

TACTAGAATGGTACACATCAACCAAG--CTGACACAGATGAATACTTAATATTTAATGCT

GGTAGAACTACTGATACCAAAACAGCTCAAAAAAAACTAAACTTAGAATTTTTTGTATAT

GATGATTTTCACCAACAAGTAATGACACCTTGGTTTCTGGTAGATAGCAACGCTTGGGGT

GTGTGGATGAGTCCCAAAGACTTTCAACAAATGAAAACACTATGTAGTGAAATTACTTTG

GTTACTTTAGAACAAGAAATAGACAATGTAACCATAAAGACTGTAACAGAAACCAACCAA

GGTAACGCATCCACCAAGCAATTCAACAATGACTTAACTGCGTCGTTACAGGTTGCTTTA

GATACTAACAACATACTGCCATATACTCCAGCTGCGCCGTTGGGGGAAACATTGGGCTTT

GTTCCTTGGAGAGCAACCAAACCAACCCAATATAGGTATTATCATCCATGTTACATTTAC

AACAGATATCCTAACATTCAAAAGATGGGGCAGGAGCAATTAGAATGGACTGGTACACAA

GATGATTATCTGAGTGTGGATGAACAGTACTTTAACTTTATCACTATAGAGAACAACATA

CCTATTAACATTCTCAGAACAGGAGATAACTTTCATACAGGCT-TATATGAGTTTAAAAG

TAAACCATGTAAACT

Izolat ADV-99

TACTAGAATGGTACACATCAACCAAG--CTGACACAGATGAATACTTAATATTTAATGCT

GGTAGAACTACTGATACCAAAACAGCTCAAAAAAAACTAAACTTAGAATTTTTTGTATAT

GATGATTTTCACCAACAAGTAATGACACCTTGGTTTCTGGTAGATAGCAACGCTTGGGGT

GTGTGGATGAGTCCCAAAGACTTTCAACAAATGAAAACACTATGTAGTGAAATTACTTTG

GTTACTTTAGAACAAGAAATAGACAATGTAACCATAAAGACTGTAACAGAAACCAACCAA

GGTAACGCATCCACCAAGCAATTCAACAATGACTTAACTGCGTCGTTACAGGTTGCTTTA

GATACTAACAACATACTGCCATATACTCCAGCTGCGCCGTTGGGGGAAACATTGGGCTTT

GTTCCTTGGAGAGCAACCAAACCAACCCAATATAGGTATTATCATCCATGTTACATTTAC

AACAGATATCCTAACATTCAAAAGATGGGGCAGGAGCAATTAGAATGGACTGGTACACAA

GATGATTATCTGAGTGTGGATGAACAGTACTTTAACTTTATCACTATAGAGAACAACATA

CCTATTAACATTCTCAGAACAGGAGATAACTTTCATACAGGCT-TATATGAGTTTAAAAG

TAAACCATGTAAACT

Izolat ADV-100

TACTAGAATGGTACACATCAACCAAG--CTGACACAGATGAATACTTAATATTTAATGCT

GGTAGAACTACTGATACCAAAACAGCTCAAAAAAAACTAAACTTAGAATTTTTTGTATAT

GATGATTTTCACCAACAA-TAATGACACCTTGGTTTCTGGTAGATAGCAACGCTTGGGGT

GTGTGGATGAGTCCCAAAGACTTTCAACAAATGAAAACACTATGTAGTGAAATTACTTTG

GTTACTTTAGAACAAGAAATAGACAATGTAACCATAAAGACTGTAACAGAAACCAACCAA

GGTAACGCATCCACCAAGCAATTCAACAATGACTTAACTGCGTCGTTACAGGTTGCTTTA

GATACTAACAACATACTGCCATATACTCCAGCTGCGCCGTTGGGGGAAACACTGGGCTTT

GTTCCTTGGAGAGCAACCAAACCAACCCAATATAGGTATTATCATCCATGTTACATTTAC

AACAGATATCCTAACATTCAAAAGATGGGGCAGGAGCAATTAGAATGGACTGGTACACAA

GATGATTATCTGAGTGTGGATGAACAGTACTTTAACTTTATCACTATAGAGAACAACATA

CCTATTAACATTCTCAGAACAGGAGATAACTTTCATACAGGCT-TATATGAGTTTAAAAG

TAAACCATGTAAACT

Izolat ADV-101

TACTAGAATGGTACACATCAACCAAG--CTGACACAGATGAATACTTAATATTTAATGCT

GGTAGAACTACTGATACCAAAACAGCTCAAAAAAAACTAAACTTAGAATTTTTTGTATAT

GATGATTTTCACCAACAAGTAATGACACCTTGGTTTCTGGTAGATAGCAACGCTTGGGGT

GTGTGGATGAGTCCCAAAGACTTTCAACAAATGAAAACACTATGTAGTGAAATTACTTTG

GTTACTTTAGAACAAGAAATAGACAATGTAACCATAAAGACTGTAACAGAAACCAACCAA

GGTAACGCATCCACCAAGCAATTCAACAATGACTTAACTGCGTCGTTACAGGTTGCTTTA

GATACTAACAACATACTGCCATATACTCCAGCTGCGCCGTTGGGGGAAACATTGGGCTTT

GTTCCTTGGAGAGCAACCAAACCAACCCAATATAGGTATTATCATCCATGTTACATTTAC

AACAGATATCCTAACATTCAAAAGATGGGGCAGGAGCAATTAGAATGGACTGGTACACAA

GATGATTATCTGAGTGTGGATGAACAGTACTTTAACTTTATCACTATAGAGAACAACATA

CCTATTAACATTCTCAGAACAGGAGATAACTTTCATACAGGCT-TATATGAGTTTAAAAG

TAAACCATGTAAACT

5.OMÓWIENIE

Dotychczasowe metody zapobiegania nieuleczalnej, przewlekłej chorobie aleuckiej norek nie spowodowały spektakularnego przełomu w sytuacji epizootycznej tej choroby na świecie. Ze względu na niezadowalające wyniki prób zastosowania immunoprofilaktyki swoistej w zapobieganiu tej chorobie obecnie jedynym kierunkiem postępowania jest profilaktyka nieswoista. Stosowane badania serologiczne mają na celu eliminację norek zakażonych ze stad fermowych norek amerykańskich. Podstawowym badaniem powszechnie stosowanym w są różne warianty elektroforezy przeciwprądowej.

W Europie najczęściej są stosowane metody immunoelektroforezy przeciwprądowej (CIEP). Mimo stosowania tej metody od kilkudziesięciu lat, w zapobieganiu AMDV w krajach o intensywnej hodowli norek, choroba nie została zwalczona. Na przeszkodzie do realizacji tego celu stoi przede wszystkim brak odpowiednich regulacji prawnych koniecznych do zwalczania choroby aleuckiej norek w większości krajów. W Polsce będącej jednym z głównych producentów norek na świecie, choroba znajduje się w wykazie chorób podlegających tylko obowiązkowi rejestracji w załączniku 3 ustawy (Ustawa z dnia 11 marca 2004 r. o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt). W takiej sytuacji prawnej jej systematyczne zwalczanie zależy tylko od dobrowolnego udziału właścicieli norek w regionalnych programach zwalczania AMD. Polski Związek Hodowców i Producentów Zwierząt Futerkowych utworzył nawet własne laboratorium diagnostyki serologicznej AMDV, w celu zachęcenia własnych członków do okresowego badania norek w kierunku AMDV.

Odpowiednie regulacje prawne obowiązują w Danii będącej światowym liderem w produkcji norek. W kraju tym, choroba aleucka norek podlega obowiązkowi zwalczania. Jak podkreśla CHRISTENSEN i in. (2011) od roku 1999 wprowadzono urzędowy nakaz zgłaszania wystąpienia AMD, co znacznie usprawniło zwalczanie tej choroby. Okresowe badania norek w stadach fermowych, kontrola ich obrotu oraz przestrzeganie zasad bioasekuracji przyczyniły się do obniżenia liczby stad zakażonych AMDV do 5% w 2005 roku. Badania diagnostyczne do niedawna stosowały serologiczną metodę immunoelektroforezy przeciwprądowej (CIEP).

Na podstawie badań serologicznych norek fermowych przeprowadzonych w Danii potwierdzono występowanie endemiczne AMDV na terenie Jutlandii (CHRISTENSEN i in. 2011, RYT-HANSEN i in. 2017a). Występujące w innych częściach kraju tylko sporadyczne

ogniska choroby były efektem długotrwałego, prowadzonego od 1976 roku, programu zwalczania choroby aleuckiej norek. W celu ustalenia źródła pochodzenia szczepów AMDV, które wywołały nowe ogniska pobrano próbki od norek z 73 stad fermowych. Otrzymane nowe szczepy AMDV poddano analizie filologenetycznej. Uzyskane wyniki badań molekularnych wskazują na wyraźne zróżnicowanie geograficzne ich pochodzenia. Okazało się, że pewne szczepy stale są obecne tylko w określonych regionach Danii.

Wirusy zawierające DNA najczęściej nie wykazują tak wielkiego zróżnicowania genetycznego. Jednakże jest to typowe zjawisko dla AMDV. Transmisji tego wirusa sprzyja jego oporność na czynniki zewnętrzne i specyfika pracy na fermie norek i możliwość transmisji jatrogennej pomiędzy stadami norek fermowych. Stwierdzono wystąpienie ognisk choroby wywołanych przez AMDV pochodzącego z tego samego źródła. Ten sam szczep wirusa może został przeniesiony w czasie jednej kontaminacji na wiele stad fermowych lub w wyniku kilku pojedynczych kontaminacji. Sekwencja tego szczepu AMDV wskazuje na jego podobieństwo do szczepu który jest obecny w tym regionie od przynajmniej czterech dekad oraz do szczepów AMDV, które nie były podobne do żadnej sekwencji umieszczonych w bazach GenBanku.

Inne szeroko zakrojone badania nad występowaniem AMDV w fermowych stadach norek amerykańskich z terenu Europy (z Grecji, Włoszech, Hiszpanii, Finlandii, Holandii, Danii, Szwecji, Polski, Litwy, Łotwy i Islandii) oraz z Kanady i USA przeprowadzili RYT-HANSEN i in. (2017b). Pozyskano 525 norek, od których pobrano próbki śledziony i krwi. Zbadano je metodą PCR, ELISA i CIEP. Uzyskane w PCR szczepy AMDV poddano analizie filogenetycznej w kierunku genu NS1. Izolaty z tego samego stada fermowego wykazywały do siebie wysokie 96 -100% podobieństwo. Szczepy występujące w określonym kraju wykazywały duże różnice w sekwencji. Stwierdzono ponadto, że szczepy pochodzące z jednego stada fermowego norek wykazywały dużo mniejsze podobieństwo. Niektóre szczepy z różnych krajów wykazywały znaczne podobieństwo np. szczepy litewskie i szwedzkie oraz greckie i holenderskie. Szczepy AMDV z Holandii, Polski, Szwecji i Włoszech były bardziej różnorodne filogenetycznie.

Pojawiające się doniesienia o występowaniu zakażeń u ludzi pracujących na fermach wskazują na epidemiologiczne znaczenie choroby aleuckiej norek u ludzi. JEPSEN i in 2009 opisali zakażenie dwóch mężczyzn, pracowników ferm norek amerykańskich. Pacjent lat 22 zaobserwował u siebie zmianę na palcach stopy, uniemożliwiającą poruszanie się. Badanie naczyń krwionośnych kończyny uwidoczniło owrzodzenia utrudniające przepływ krwi w

naczyniach kończyn oraz powstanie krążenia obocznego. Pacjent przeszedł zabieg usunięcia zatoru.

W badaniu histopatologicznym stwierdzono zmiany zapalne. W ciągu kolejnych lat, pomimo interwencji chirurgicznych, stan pacjenta pogarszał się ze względu na rozwijające się zwężenia naczyń nerkowych, krezkowych oraz żył w nodze prowadzące do jej amputowana. W surowicy wykryto swoiste przeciwciała dla AMDV. W aorcie brzusznej stwierdzono nacieki komórek plazmatycznych i zmiany charakterystyczne dla arteriosklerozy. Badanie molekularne próbek pobranych z węzłów chłonnych wykazały obecność DNA AMDV. Pacjent zmarł w wieku 40 lat wśród objawów obustronnego zapalenia płuc (JEPSEN i in. 2009).

Drugi pacjent był hospitalizowany z powodu kłębuszkowego zapalenia nerek. W wywiadzie stwierdzono, że 2 lata wcześniej pracował w stadzie fermowym norek amerykańskich, w której stwierdzono ognisko AMD. Pacjent był leczony przy użyciu substancji immunosupresyjnych, co przyniosło poprawę w funkcjonowaniu nerek. Osiem lat później u pacjenta wystąpiła biegunka, wymioty, gorączka, astenia.

Stwierdzono wysoki poziom białek w płynie mózgowo-rdzeniowym a w surowicy bowiem obecność przeciwciał swoistych dla AMDV. Pacjent zmarł w wieku 63 lat. Zdaniem autorów oba przypadki kliniczne oraz zmiany patologiczne nasuwały podejrzenie zakażenia AMDV bowiem były zbliżone do zmian stwierdzanych w stadach fermowych norek amerykańskich zakażonych AMDV (JEPSEN i in. 2009).

Parvowirusy mogą ewoluować i powodować zakażenia także u innych gatunków, dlatego generuje to konieczność opracowania doskonalszych i czulszych metod ich wykrywania. U ludzi przykładem jest parvowirus określany jako b19 wywołujący ogólnoustrojową chorobę, manifestującą się występowaniem tego wirusa w erytrocytach, szpiku kostnym oraz innych tkankach (BEST I BLOOM 2005). Może on jako jedyny z parvowirusów, poza AMDV, wywoływać zakażenie przewlekłe. AMDV stanowi także potencjalne zagrożenia dla innych gatunków zwierząt. Potwierdzono izolację AMDV u innych gatunków z rodziny *Mustelidae* tj. jak łasica, skunks, szop, a także spoza tej rodziny u rysia rudego (*Lynx rufus*).

Zdaniem niektórych AMDV może przyczyniać się do spadku populacji norki europejskiej (FOURNIER-CHAMBRILLON i in. 2004, KNUUTTILA i in. 2009b). Zdaniem innych jest to niemożliwe ponieważ populacja norki europejskiej w naturalnym środowisku nie występuję od dawna. Jej wyginięcie było związane prawdopodobnie z degradacją środowiska naturalnego (KOWALSKA i in. 2016).

AMDV wraz z norkami amerykańskim został przeniesiony do stad fermowych norek amerykańskich w Europie i Azji. Ponadto norki amerykańskie pochodzące z Ameryki Północnej były introdukowane do środowiska naturalnego dla myśliwych w ZSRR (MAÑAS i in. 2001). Obecność norek amerykańskich w środowisku naturalnym związana jest także z niszczeniem ferm norek amerykańskich w wyniku działań II Wojny Światowej lub wypuszczaniem zwierząt przed wkroczeniem wojsk przeciwnika lub przez działaczy organizacji walczących o prawa zwierząt. W innych regionach Europy w czasie klęsk żywiołowych np. huraganów, pożarów doprowadzono do uwolnienia wielu stad norek fermowych hodowlanych do środowiska naturalnego (KOWALSKA i in. 2016).

Występowanie AMDV powoduje duże straty finansowe w państwach w których hodowla norek stanowi ważną gałąź gospodarki rolnej tj. Kanada, Dania, Finlandia. Jedynym skutecznym do tej pory sposobem zwalczenia AMD jest wykrywanie i eliminacja norek seropozytywnych z badanego stada. Szczególnie istotne jest wdrażanie krajowych oraz fermowych programów zwalczania AMDV, zależnych od sytuacji epizootycznej.

Stosowane programy zwalczania opierają się najczęściej na znanej od dawna i powszechnie stosowanej metodzie immunoelektroforezy przeciwprądowej (CIEP) wykrywającej obecność swoistych przeciwciał. Niestety metoda ta ma także pewne ograniczenia. Rozwój nowoczesnych technik wykrywania wirusa wskazuje na przypadki, kiedy stwierdzane są ujemne wyniki badań pomimo obecności AMDV.

Inne metody pozwalają na określenie rzeczywistej obecności materiału genetycznego wirusa oraz określenie filogenetycznej przynależności danego szczepu Umożliwiają one wykrycie dróg transmisji zakażenia AMDV szczególnie przy międzynarodowym lub krajowym obrocie fermowych norek amerykańskich.

Zakup wyselekcjonowanych, wysoce wartościowych zwierząt jest pożądany i konieczny m.in. w celu uzyskania lepszych wyników w hodowli, uzyskania pożądanej przez kupców okrywy włosowej o określonej barwie. Brak przestrzegania zasad biosaekuracji m.in. skutecznego odkażania klatek amerykańskich norek fermowych w czasie ich obrotu np. transportu z fermy do fermy, szczególnie sprzyja transmisji AMDV.

Najnowszymi stosowanymi metodami molekularnymi w diagnostyce choroby aleuckiej norek jest łańcuchowa reakcja polimerazy oraz jej odmiany. W pracy przedstawiono wyniki szerokich badań metodą serologiczną CIEP, jej przydatność w zwalczaniu AMDV dla poszczególnych stad fermowych norek, w programach zwalczania choroby z uwzględnieniem wybranych metod biologii molekularnej.

FARID i in. (2010) wykazali przeciwciała swoiste w próbkach badanych metodą CIEP lub PCR u 93,3% norek amerykańskich, 40,5% łasic, 25,9% skunksów i 10,0% rysi. AMDV nie wykryto u kojotów (*Canis latrans*), lisów (*Vulpes vulpes*), bobrów (*Castor fiber*), wiewiórek (*Sciurus vulgaris*) i piżmaków (*Ondatra zibethicus*).

Przeciwciała swoiste dla AMDV wykryto metodą CIEP u 28,6 % z 16 badanych norek, przy tym 81,3% norek było dodatnich w CIEP i PCR, natomiast 18,7 % było dodatnie w CIEP ale negatywne w PCR. Uzyskane wyniki wskazują na ważną rolę epidemiologiczną w/w gatunków, w zakażeniach AMDV dla fermowych norek amerykańskich oraz innych gatunków wolnożyjących. Transmisje wirusa pomiędzy zwierzętami dzikimi i hodowlanymi norkami wrażliwymi na zakażenie AMDV wymagają dalszych badań, na co wskazują także badania ALEXANDERSEN i in. (1994), ZALEWSKI i in.(2021).

Występowanie AMDV w Europie jest zróżnicowane w badaniach różnych autorów. We Francji określono je na poziomie 23% (FOURNIER-CHAMBRILLON i in. 2004), w Anglii - 59%, w Danii - 3,1% , chociaż na terenie Bornholmu stwierdzono występowanie AMDV w 41,5% badanych próbek (RYT-HANSEN i in. 2017a).

W Hiszpanii przeprowadzono badania metodą CIEP, nie wykazując obecności swoistych przeciwciał w surowicy, ale w zbiorczych próbkach badanych PCR wykryto DNA AMDV (MAÑAS i in. 2001). Wysoką wrażliwość łasic na zakażenie AMDV potwierdzono po ich inokulowaniu. Wykazano obecność swoistych przeciwciał, chociaż nie stwierdzono objawów klinicznych oraz wzrostu poziomu gammaglobulin. Wrażliwość tych łasic na zakażenie jest czynnikiem niepokojącym, przy braku zagrożenia epizootycznego AMDV norek dzikich i hodowlanych, w zbliżonych ekosystemach.

W Hiszpanii ponadto metodą PCR wykryto obecność DNA AMDV u wydry (*Lutra lutra*). Może to wskazywać na wydrę jako potencjalny rezerwuar AMDV.

Nie wszystkie badania potwierdzają jednak tę tezę. Badania metodą CIEP 84 próbek krwi uzyskanych od norek europejskich SÁNCHEZ-MIGALLÓN i in. (2008) nie wykazały obecności przeciwciał swoistych dla AMDV, w żadnej z badanych surowic norek europejskich.

Łańcuchowa reakcja polimerazy (Polymerase Chain Reaction - PCR) miała na celu powielenie w warunkach laboratoryjnych matrycowego DNA wirusa izolowanego z badanych narządów przy odpowiednio dobranej sekwencji starterów. Zastosowano kilka wariantów PCR. Stosowane warianty PCR wykrywały fragment genu VP2 lub NS1 AMDV.

Celem badań własnych było także zoptymalizowanie metody real-time zwanej także qPCR dla udoskonalenia diagnostyki AMD. Metoda ta umożliwia bowiem wykrycie nawet

bardzo małej liczby kopii AMDV, niewykrywalnej w innych wariantach PCR. Pozwala to na skuteczniejszą kontrolę transmisji AMDV oraz lepsze poznawanie dróg zakażenia. Dotychczas za główną drogę zakażenia uważano drogę erogenną, chociaż sugerowana jest także droga jatrogenna (PRIETO i in. 2014). Zbadano izolaty genu VP2 w PCR oraz w real-time PCR, przy użyciu wygenerowanej sekwencji starterów oraz autorskiej sondy TaqMan znakowanej FAM.

Ogółem w badaniach porównawczych przebadano 28 tych próbek w klasycznym PCR oraz w real-time PCR. Wykazano, że real-time PCR w 7 próbkach był dodatni dla AMDV, przy ujemnych wynikach w klasycznym PCR. Wyniki tych badań upoważniają do stwierdzenia, że real-time PCR w porównaniu do klasycznego PCR jest bardziej czuły przy diagnozowaniu AMDV.

Równie interesujące wyniki otrzymano po porównaniu obu metod PCR i nested PCR wykrywających sekwencje fragmentu genu VP2 AMDV. W niektórych próbkach badanych klasycznym PCR nie wykazano obecności DNA AMDV natomiast wykryto go w nested PCR. Uzyskane wyniki wykazały lepszą przydatność nested PCR. Każdy wariant PCR użyty w tych badaniach wymagał optymalizacji reakcji oraz odpowiedniego wyposażenia laboratorium diagnostycznego i wiedzy specjalistów z zakresu diagnostyki molekularnej.

Wyniki badań AMDV metodą real-time PCR (qPCR) porównano z wynikami badań KOWALCZYK i in. (2018) wykonanych w dwóch stadach krajowych norek fermowych mających dobre warunki sanitarne. Porównali oni wyniki badań krwi w qPCR do klasycznego PCR. W pierwszym stadzie podstawowym liczącym 10000 samic norek u 40% stwierdzono objawy kliniczne AMD. Obserwowano liczne padnięcia, objawy zmniejszonego apetytu, spadki masy ciała, odwodnienia, krwawienia z naturalnych otworów ciała i anemię. Stwierdzono także charakterystyczne zaburzenia rozrodu. W drugim stadzie podstawowym liczącym 5000 norek, na drugiej fermie, stwierdzono objawy kliniczne u 60% norek. Wystąpiły poronienia, zamieranie zarodków i zmniejszona liczba odsadzonych szczeniąt. Na obu fermach stosowano początkowo badanie metodą CIEP, która potwierdziła obecność przeciwciał swoistych dla AMDV. Z pierwszej fermy wybrano 20 seropozytywnych samic, do badań metodą PCR oraz real-time PCR. Wykazano, że metoda real-time była bardziej czuła, bowiem badanie jednej próbki metodą PCR dało wynik ujemny, natomiast było dodatnie w real-time PCR. W fermie drugiej uzyskano zbieżne wyniki dodatnie i ujemne w metodzie PCR i real-time PCR. Średnia liczba kopii materiału genetycznego utrzymywała się na poziomie 10^5 w pierwszej fermie i 10^3 w drugiej fermie. Autorzy zwracają uwagę na wysoką

zmienność występującą w określonych fragmentach genomu AMDV, co ich zdaniem może sprzyjać otrzymywaniu wyników fałszywie ujemnych oraz utrudnia diagnostykę tej choroby.

KOWALCZYK i in. (2018) potwierdzili więc, że te same próbki w różnych metodach mogą dawać różne wyniki, co zaobserwowano w badaniach własnych. Metoda real-time PCR była przydatna nie tylko dla potwierdzeniu obecności materiału genetycznego wirusa lub weryfikacji wyników ujemnych w PCR, ale także określenia przebiegu choroby aleuckiej norek. Mniejsza liczba kopii wirusa oznacza większe trudności w diagnostyce i jest zapewne wynikiem odpowiedzi organizmu norki zakażonej AMDV. Wysoka liczba kopii wirusa w narządach może wskazywać na powstanie nowego ogniska choroby w populacji, co może sprzyjać szybkiemu rozprzestrzenianiu się wirus prowadząc do nagłego pojawienia się ogniska AMD. Uzyskane wyniki analizowano statystycznie metodą opisaną przez WEINER i in. (2018). Próbowano porównać uzyskane wyniki metodą wg BUSTIN (2000, 2009)

Na uwagę zasługują także następne badania KOWALCZYKA i in. (2019) mające na celu użycie metody real-time PCR, do wykrywania materiału genetycznego wirusa, w próbkach pobranych od norek oraz w próbkach pochodzących ze środowiska fermy.

Wykazano pozytywne wyniki badań wszystkich próbek pochodzących ze śledziony i krwi oraz 69% pozytywnych próbek ze środowiska fermowego. Najwięcej kopii materiału genetycznego wirusa stwierdzono w próbkach pochodzących ze śledziony (10^8) co potwierdza tropizm wirusa do tkanki limfatyczne. Potwierdzają to wyniki badań BEST I BLOOM (2005). We krwi średnia liczba kopii DNA wynosiła 10^5.

Najmniej materiału genetycznego była w próbkach z otoczenia fermowego. Najwięcej wirusa wykazano w próbkach z kotników, z elementów konstrukcyjnych domków norek oraz innego wyposażenia klatek. Mniejszą zawartość AMDV wykryto w próbkach z podłóg lub pomieszczeń dla pracowników obsługi. Uzyskane wyniki badań ze środowiska mogą sugerować, że wirus szerzy się drogą aerogenną. Może się przenosić na sprzętach, oponach samochodów nie tylko w obrębie jednej fermy, ale także pomiędzy odległymi fermami, co wcześniej sugerował PRIETO i in. (2014). Zdaniem autorów mniejsza liczba kopii wirusa w materiale pobranym z powierzchni, wynikała z poddawania jej częstym zabiegom dezynfekcyjnym.

Własne badania metodą PCR wymazów ze środowiska fermowego były we wszystkich próbkach ujemne, co może wskazywać na brak materiału genetycznego AMDV w badanych wymazach. Środowisko fermowe badanej fermy na powierzchni 3 ha poddano 2 letniej

kontumacji. Wszystkie pawilony i klatki odkażano przy użyciu specjalistycznych agregatów pianotwórczych ze środkiem odkażającym. Zabiegi wykonała firma dezynfekcyjna

Badania molekularne są konieczne dla oceny transmisji AMDV oraz w celu pogłębienia wiedzy na temat patogenezy choroby, doskonalenia metod jej zwalczania lub eradykacji oraz opracowania skutecznych metod profilaktyki nieswoistej lub ewentualnie skuteczności szczepień.

Obecnie nie wiadomo, czy źródłem AMDV była endemiczna populacja amerykańskiej norki dzikiej i dalsza transmisja wirusa na fermowe norki, czy był to swoisty AMDV norek hodowlanych szerzący się w wyniku przypadkowych ucieczek lub umyślnego uwalniania zakażonych AMDV norek.

Dla ustalenia geograficznego pochodzenia wirusa, który spowodował rozprzestrzenienie się choroby konieczne są dalsze badania nowych wariantów AMDV oraz izolatów występujących w danym regionie (NITUCH i in. 2012). Wyniki długotrwałych badań wskazują na wieloletnią transmisja AMDV, przez globalny obrót zwierząt co sprzyja rozprzestrzenianiu się wirusa w populacji norek fermowych oraz dzikich.

Badania monitoringowe AMDV w gospodarstwach norek są szczególnie konieczne, aby zapewnić w przyszłości zdrowe populacje norek. Jest to korzystne zarówno dla norek fermowych oraz norek dzikich w Ameryce Północnej, ponieważ nadal brak jest danych na temat innych kierunków dalszej transmisji AMDV (NITUCH i in. 2012).

OIE i in. (1996) badali wpływem sekwencji białka VP2 na patogenność AMDV oraz jego rolę w transmisji AMDV u szopów. Funkcja regionu „hiperzmiennego" pozostała niewyjaśniona, chociaż jej zdaniem może on odgrywać pewna rolę w stopniu patogenności i zakresie gatunkowym. Wyniki badania chimery AMDV sugerują, że region ten nie decyduje o patogenności szczepu. Przemawiać za tym może np. zmiana szczepu ADV-Utah na ADV-G, która nie niesie za sobą zmiany w patogenności lub powinowactwie do określonego zwierzęcia - gospodarza dla AMDV. Zmiany w tak krótkiej sekwencji są typowe dla innych parvowirusów takich jak CPV, FPV czy MEV. Region ten znajduje się pomiędzy jednostkami 64 i 65 kodującymi region białka kapsydu VP2.

Porównano także kompletne sekwencje regionów kodujących VP2 szczepów ADV-G, ADV-TR, dwóch izolatów ADV-Utah i ADV-Pullman. Skorelowano je z chimerami ADV-G/ADV-Utah i wykazano potencjalne determinanty patogenności zarówno dla norek jak i dla hodowli komórek nerki kociej, po zakażeniu in vitro. Wymiana sekwencji nukleotydów od pozycji 50 do pozycji 226 genu VP-2 pomiędzy ADV-G i ADV-Utah skutkowała wadliwą

replikacją wirusa w hodowli komórkowej nerki kota (Crandell Feline Kidney Cells -CRFK). Można wnioskować, że region ten zawiera determinantę pozwalającą wirusowi na replikację w CRFK. ADV-TR i różni się od ADV-G w obrębie tego fragmentu. Wykazano także wiele innych różnic pomiędzy odmiennymi szczepami. Nawet jeśli wirus replikuje się w CRFK niekoniecznie determinuje patogenność.

OIE i in. (1996) uważają, że porównanie sekwencji nukleotydów od pozycji 359 do 647 sugeruje różnicę pomiędzy ADV-G a szczepami wysoce patogennymi w tylko bardzo niewielkim stopniu. Badana chimera nie zawierała żadnej sekwencji, która występowała w szczepach wysoce patogennych zarówno w pierwszym jak i drugim fragmencie VP2. Planowano skonstruowanie innych chimer, w badaniach porównawczych dla pokrewnych gatunków. Niestety w okresie wybuchu AMD w stanie Utah, USA nie pozyskano żadnych próbek od skunksów, dlatego nie mogli potwierdzić roli tych zwierząt w przebiegu AMDV.

Niewiele wiadomo na temat zakażeń u tych zwierząt, nawet jeśli są one wrażliwe na zakażenia AMDV. Badania serologiczne wykazały obecność przeciwciał swoistych dla AMDV w surowicy 4 z 22 badanych dziko żyjących skunksów z Południowej Dakoty (USA). Wykryto DNA AMDV u jednego z seropozytywnych oraz u dwóch seronegatywnych skunksów. Określone sekwencje „hiperzmiennych" regionów wirusa nie należały do szczepu ADV-TR. Różniły się od wszystkich dotychczas znanych.

Może to oznaczać, że skunksy rzadko ulegają zakażeniu AMDV. Jednakże nie można odrzucić hipotezy, że na terenie Południowej Dakoty występują AMDV różniące się od dotychczas znanych. Autorzy badali określone sekwencje genu VP2, jednak być może inny fragment genu ma wpływ na patogenność wirusa. Przykładowo ADV-Pulmannn jest patogenny tylko dla norek odmian nie aleuckich, chociaż sekwencja genu VP2 jest praktycznie identyczna z sekwencją genu ADV-Utah. Ponadto stwierdzono niezwykłą różnorodność w obrębie sekwencji genów niestrukturalnych.

Badania tych autorów nad skonstruowaną chimerą nie potwierdziły roli genów niestrukturalnych w patogenności i nadal nie ma jasnej odpowiedzi na pytanie co wpływa na stopień patogenności i tropizm AMDV do określonego gatunku zwierząt. Zdaniem autorów nie każdy szczep AMDV może przyczynić się do rozwoju choroby. Potwierdzono także, że „hiperzmienny" region VP2 nie zawsze decyduje o patogenności, a zmiany w sekwencji nukleotydów mogą determinować rodzaj gospodarza.

SANG i in. (2012) przeprowadzili analizę filogenetyczną genów VP2 AMDV izolowanych w Chinach w latach 2009 -2011. Badania nad występowaniem AMDV przeprowadzili przy

użyciu metody serologicznej (CIEP) i molekularnej (PCR). Miały one na celu określenie częstotliwości występowania AMDV u norek, w głównych regionach hodowli w Chinach. Wyjątkowo często odnotowano występowanie AMDV na obszarach objętych badaniem. Czynne metody kontroli AMDV należy zdaniem autorów wdrożyć natychmiast, w celu osiągnięcia prawidłowego rozwoju tej gałęzi gospodarki rolnej. Wskazali oni na przydatność epidemiologii molekularnej w efektywnej kontroli AMDV.

Przeprowadzone badania nad epidemiologią molekularną genu VP2 dziewiętnastu izolowanych szczepów AMDV porównano do szczepów referencyjnych zamieszczonych w bazie GenBanku. Wyniki badania sekwencji nukleotydowych wykazały, że ogromna liczba sekwencji AMDV VP2 wykazuje mutacje. Autorzy badając szczepy stwierdzili 105 mutacji w obrębie genu VP2. Szczególnie zastanawiający jest fakt że stopień mutacji genu VP2 jest wyraźnie większy niż w CPV i MEV. Spośród 105 miejsc mutacji aż 27 stwierdzono tylko w chińskich szczepach, w tym 4 chińskie z 6 ferm norek posiadały tą samą mutację. Miejsca mutacji wykazano nie tylko w wyjątkowo niestabilnym regionie VP2 ale także w immunoreaktywnym regionie VP2. Aż 6 z 27 mutacji ujawniło się w regionie VP2 (nukleotydy 428 - 446).

MCKENNA i in. (1999) uważają, że występujące mutacje odgrywają istotną rolę w patogenezie zakażeń AMDV i determinują zakres działania wirusa. Wykazali również mutację Ser->Thr w pozycji 428 w AMDV-DL3 oraz mutację Asn->Lys w pozycji 429 szczepu AMDV-Far East. Mutacje te zostały stwierdzone w dwóch izolatach. Dodatkowo zostały stwierdzone kolejne 3 mutacje: Asp>Glu oraz Asp>Asn w pozycji 433, Ile>Met w pozycji 436 oraz Ala>Thr w pozycji 441, które ujawniły się tylko w szczepie AMDV-TR2 i AMDV-TR3. Prawie połowa chińskich szczepów miała mutację Ile>Met w pozycji 436 a Ala>Thr w pozycji 436 co może prowadzić do różnic w immunopatogenezie. Stwierdzone mutacje w szczepach mogą prowadzić do zmian zakresu gospodarza.

CHEN i in (2015) określili miejsce kodowania mechanizmu rozpadu kaspazy i mutację pojedynczych aminokwasów. Sugerują, że rozpad białek kapsydu odgrywa rolę w regulacji mechanizmów powstawania przewlekłych postaci AMDV. Żaden z badanych izolatów nie posiadał mutacji w regionie genu VP2. Szczep AMDV-Far East wykazywał 33 miejsca mutacji aminokwasów, co było najwyższym poziomem mutacji występujących wśród 19 szczepów, Tylko 23 z 33 mutacji stwierdzono w tym samym szczepie. Wykazano ponadto, że w 2 chińskich szczepach AMDV-SD1 i AMDV-DL1 występowała delecja 3 nukleotydów w genie VP2. Jej znaczenie wymaga dalszych badań. Uzyskano bardzo wartościowe wyniki na

temat ewolucji genetycznej AMDV w Chinach. Na podstawie wywiadu ustalono że amerykańskie norki fermowe zakażone AMDV-HLJ1 były importowane z Danii, natomiast zakażone AMDV-DL2 i AMDV-JL1 były importowane z USA. Jednakże miejsce pochodzenia izolowanych nie określono ponieważ część norek, u których izolowano szczepy AMDV były potomkami norek importowanych z Finlandii, natomiast ich rodziców krzyżowano z lokalnymi norkami amerykańskimi. AMDV-SD4 był izolowany od nowonarodzonych norek co może wskazywać na jego bardzo dużą patogenność. Ponadto izolowano szczepy AMDV-DL1 i AMDV-DL2 od norek pochodzących z tej samej fermy, tzn. że różne genotypy AMDV mogły równocześnie występować w badanej fermie norek. Wiele różnych szczepów było izolowanych w tej samej prowincji, w tym samym roku. Jednakże nie określono pochodzenia ewolucyjnego tych szczepów AMDV.

Autorzy sugerują, że różne szczepy AMDV stwierdzono u norek, ze stad które kilkakrotnie były importowane, w różnych okresach. Nie wykazano korelacji pomiędzy okresem ich importu a rejonem izolacji, ponieważ izolowane szczepy AMDV zostały umieszczone w drzewie filogenetycznym w odległych lokalizacjach. Norki od których izolowano szczep AMDV-DL2 były importowane z USA, a norki u których izolowano szczep AMDV-DL1 były wyizolowane uprzednio w Chinach. Szczepy te posiadały wspólnego przodka, z wysoce patogennym szczepem AMDV-Utah. Może to znaczyć, że szczep AMDV-DL2 ewoluował w Chinach ze szczepu AMDV-Utah natychmiast po transmisji z USA.

Różne filogenetycznie szczepy AMDV zostały zakwalifikowane do grupy A. Grupa B zawiera 5 szczepów AMDV charakteryzujących się dużym poziomem zjadliwości, które były izolowanych w 4 różnych krajach. Grupa C zawierała jedynie dwa wirusy, które różniły się od wszystkich innych szczepów AMDV opisanych w drzewie filogenetycznym. Grupa D zawierała cztery izolowane szczepy AMDV. Na podstawie dochodzenia epizootycznego wysnuto wniosek, że norki zakażone szczepem AMDV-SD4 były hodowane na tej samej fermie co norki zakażone szczepem AMDV-SD2. Stwierdzono, że izolowane szczepy z grup C i D były wirusami występującymi powszechnie na terenie Chin. Grupa E zawierała nowo izolowane szczepów, które mogły ewoluować uprzednio na terenie ferm norek amerykańskich w USA. Bazując na analizie filogenetycznej odkryto, że prawie 50% chińskich izolowanych szczepów zostało zaklasyfikowanych do grup C lub D i grupy te nie łączyło nic ze szczepami AMDV z innych krajów. Wyniki te wykazują, że szczepy zaimportowane z innych krajów występują tak samo często jak szczepy lokalne. Szczepy te mogły ewoluować nawzajem.

Uzyskane wyniki tych badań dowodzą, że Chiny nabyły szczepy AMDV zaliczające się do zamkniętej podgrupy, które są obecne w różnych regionach kraju. Chińskie szczepy były genetycznie podobne do szczepów z innych krajów, które były patogennymi szczepami AMDV dla populacji ferm norek w tym kraju. Analiza epidemiologii molekularnej szczepów AMDV izolowanych w Chinach w latach 2009 -2011 wykazała szerokie rozpowszechnienie AMDV u krajowych norek fermowych oraz różnorodność szczepów AMDV.

Wzrastająca liczbę ognisk AMD w Chinach (SANG i in. 2012) wskazuje na konieczność jak najszybszego wdrożenie efektywnego zwalczania, w celu kontroli zakażeń AMDV wirusa. Jest to niezbędne dla dalszego rozwoju fermowej hodowli norek, stanowiącej istotny element gospodarki rynkowej w Chinach. Zdaniem autorów wskazane są dalsze badania nad epidemiologią molekularną AMDV, w celu pozyskiwania niezbędnych danych dla realizacji optymalnego programu zwalczania AMDV w Chinach.

W badaniach nad epidemiologią molekularną AMDV w Finlandii KNUUTTILA i in. (2009b) pozyskała od norek z pięciu stad fermowych 14 nowych szczepów AMDV, które poddała analizie filogenetycznej. Porównano uzyskane szczepy z sekwencjami 40 szczepów, wcześniej opublikowanymi w GenBanku, izolowanych Europie i USA. Badane sekwencje AMDV układały się w trzy grupy genetyczne, co także potwierdzili OLOFSSON i in. (1999). Uzyskane przez KNUUTTILA i in. (2009b) szczepy fińskie można było zaliczyć do każdej z trzech grup. Pochodzenie wspólnego przodka wszystkich badanych szczepów nie jest jasne i wymaga zdaniem badaczy dalszych badań.

Fermowe norki pochodzą z Północnej Ameryki, dlatego można przyjąć, że AMDV pochodzi z tego kontynentu. Wirus docierał do Finlandii wielokrotnie, a obecnie izolowane szczepy również można zaliczyć do trzech różnych grup genetycznych. Trudno uzyskać informacje, które mogłyby określić miejsca pochodzenia norek, które była stadem podstawowym w fińskich fermach. Z pewnością były to norki z Ameryki Północnej, Danii lub Szwecji. W obrębie drugiej grupy genetycznej znajdują się głównie szczepy nordyckie, ale podobieństwo sekwencji szczepów AMDV do szczepów z innych regionów geograficznych, pozwalałoby także na umiejscowienie ich w tej grupie genetycznej. W każdej z grup znalazły się także szczepy patogenne np. w pierwszej grupie AMDV-United, w drugiej AMDV-K a w trzeciej AMDV-Utah 1. Nie można więc było określić grupy, która charakteryzowałaby się występowaniem bardziej szczepów patogennych. Badacze sugerują, że pojawianie się szczepów patogennych jest spontaniczne i ewoluują one w kierunku szczepów o mniejszej patogenności, bowiem pojawiają się nowe szczepy o dużo mniejszej zjadliwości. Wśród

analizowanych szczepów pochodzących z Danii i Holandii stwierdzono mniejsze zróżnicowanie genetyczne szczepów AMDV niż wśród szczepów fińskich. Badacze wykazali na jednej z ferm norek amerykańskich szczepy AMDV o bardzo wysokim stopniu podobieństwa, chociaż na innych fermach nie było to potwierdzone. Potwierdzają to wyniki badań OLOFSSON i in. (1999) w których szczepy AMDV pochodzące z jednej fermy przynależały do różnych grup. Stwierdzono ponadto przypadki występowania zakażenia różnymi szczepami AMDV, u tej samej fermowej norki amerykańskiej.

GOTTSCHALCK i in. (1991) stwierdzili że zmienność wirusa jest efektem długiego okresu ewolucji a nie wysokiego stopnia mutacji.

Badania nad epidemiologią AMDV w Estonii prowadzili LEIMANN i in. (2015), na podstawie analizy filogenetycznej wstępujących endemicznie AMDV pozyskanych od dziko żyjących norek amerykańskich, norek europejskich, kuny leśnej, tchórza zwyczajnego, jenota, borsuka europejskiego, wydry europejskiej i kuny domowej. Nie potwierdzono obecności AMDV u badanych zwierząt dziko żyjących gatunków w Estonii, poza występowaniem AMDV u dziko żyjących norek amerykańskich. Nie można jednak jednoznacznie stwierdzić, że u badanych zwierząt nie występują AMDV, ponieważ niewykrycie wirusa mogło wynikać z przebadania niewielkiej stosunkowo liczby dzikich norek amerykańskich. Nie wykazano podobieństwa sekwencji nukleotydowych 4 izolowanych szczepów AMDV z sekwencjami szczepów dziko żyjących norek amerykańskich. Może to świadczyć o tym, że badane dzikie norki amerykańskie nie były uciekinierami z badanych stad amerykańskich norek fermowych. Ponadto złapano je w znacznej odległości od badanych stad amerykańskich norek fermowych.

Tak samo jak w przypadku stad norek fermowych fińskich (KNUUTTILA i in. 2009b) trudno było określić ich pochodzenie, chociaż zapoczątkowały one hodowlę fermowych norek amerykańskich w Estonii. Można jedynie przypuszczać, że początkowo norki pochodziły z ZSSR, do którego zostały zaimportowane z Niemiec. Dwa izolowane szczepy AMDV pochodzące od norek dziko żyjących były podobne do szczepów duńskich, a dwa pozostałe różniły się od pozostałych analizowanych szczepów. Można podejrzewać, że AMDV wykryty u tych norek pochodził pierwotnie ze stad fermowych norek amerykańskich, ale żaden z izolowanych szczepów nie wskazywał na ewentualne pokrewieństwo. Wyniki badań wskazują także na brak korelacji pomiędzy geograficzną izolacją szczepu AMDV a grupą filogenetyczną. W tym względzie szczepy AMDV fińskie i estońskie są podobne do szczepów AMDV izolowanych ze stad amerykańskich norek fermowych w innych krajach. Może to

wskazywać na intensywny obrót norek, pomiędzy fermami różnych krajów oraz możliwość transmisji szczepów AMDV wśród dzikich norek amerykańskich. Nie wykazano korelacji między patogennością a przynależnością do grupy genetycznej.

HAGBERG i in. (2016) opisali nową metodę pozwalającą na szybkie określenie sekwencji całego genomu AMDV. Modelowym szczepem był szczep AMDV-G zadaptowany do hodowli komórkowej. Aby porównać sekwencję markerów zjadliwości użyto szczep AMDV-Utah. Badania potwierdziły obecność wcześniej znanych różnic w sekwencji pomiędzy tymi szczepami, ale nie zaobserwowano zmian w regionach pełniących funkcje regulacyjne. Badacze uważają że za zjadliwość mogą odpowiadać raczej struktury białek niż geny regulatorowe. Wykazano także różnice między sekwencją używanego szczepu, a sekwencją tego samego szczepu opisaną w innych badaniach. Być może mogło to być wynikiem zadapotowania szczepu do hodowli komórkowej lub odmiennej techniki sekwencjonowania. Potwierdzono udział genów VP i NS w tropizmie oraz w patogenności.

Wykazano, że uszkodzenie genu kodującego białko NS1 powoduje zaburzenia w replikacji wirusa. Największe różnice stwierdzono pomiędzy sekwencjami nukleotydów szczepów AMDV-G i AMDV-Utah w rejonie lewej otwartej ramki odczytu. Natomiast w rejonie prawej otwartej ramki odczytu jest więcej sekwencji konserwatywnych zawierających czynniki zjadliwości. Można zatem stwierdzić, że zjadliwość szczepu AMDV-Utah wynika raczej z innych zależności niż z aktywności białek VP, dlatego należy zwrócić większą uwagę na znaczenie białek NS. Odkryto także obecność ośmiu sekwencji TATA, chociaż ich funkcja nie została ustalona dlatego wymagane są dalsze badania.

JENSEN in. (2011) badali patogenezę sztucznego zakażenia norek AMDV metodą PCR. Wykazano obecność wirusa we krwi, płucach, kale oraz w wymazach z nosa i jamy ustnej. Stwierdzono występowanie wiremii w 1-3 tygodnie po zakażeniu. Ze względu na szerzenie się zakażeń pomiędzy fermami norek amerykańskich badacze sugerują na możliwe zakażenie drogą aerogenną. Jest to skorelowane z krótkotrwałą obecnością AMDV w wymazach z jamy nosowej i ustnej. Nie we wszystkich badanych próbkach płuc stwierdzono obecność AMDV. Ich zdaniem, w badaniach diagnostycznych lepszym materiałem od krwi jest ślina lub kał, w którym AMDV występuje dłużej. Najcenniejszym materiałem diagnostycznym jest jednak śledziona, bowiem AMDV stwierdzono przez cały okres badań tj. aż do 4 tygodni po zakażeniu eksperymentalnym.

Przydatność śledziony do diagnostyki potwierdzają także inni badacze (KNUUTTILA I IN. 2009b). Mózg i wątroba nie są tak dobrym materiałem do diagnostyki AMDV, bowiem

rzadziej u fermowych norek amerykańskich stwierdzano obecność AMDV. Nie wykazano obecności AMDV w tych narządach u norek dzikich. Badania potwierdziły występowanie AMDV u większości badanych norek w jelitach w 8, 16 i 24 tygodniu po zakażeniu AMDV. Tylko u kilku norek wykazano obecność wirusa w kale. Może to wskazywać na ograniczoną replikację AMDV w jelitach.

Pierwsze opublikowane badania nad analizą filogenetyczną AMDV w Polsce przeprowadzili REICHERT I KOSTRO (2014). Wykazali oni podobieństwa filogenetyczne wyizolowanych szczepów polskich do szczepów kanadyjskimi, których sekwencje pozyskano z GenBanku. Głównym źródłem importu fermowych norek amerykańskich była Ameryka Północna, skąd AMDV mógł zostać zawleczony wraz z zakażonymi norkami do Polski. Na podstawie sekwencji genów wyizolowanych szczepów AMDV podzielono je 3 podstawowe grupy. Badano gen VP2, ze względu na jego potencjalny udział w patogenezie AMD. Nie udało się sklasyfikować szczepów AMDV na podstawie miejsce lub czas ich izolacji. Nie wykazano związku szczepów AMDV z ich patogennością. Badacze wskazali także na istotny czynnik transmisji jakim są norki amerykański-uciekinierzy, dzikie norki amerykańskie oraz położenie geograficzne Polski. Zwracają uwagę na możliwości przemieszczania się norki amerykańskiej przez granice Polski z Rosją, Litwą i Białorusią. Możliwe są także inne nieznane źródła AMDV. Zdaniem badaczy wskazane są dalsze badania nad analizą filogenetyczną szczepów AMDV pochodzących z krajowych stad fermowych norek amerykańskich oraz dziko żyjących.

JAKUBCZAK i in. (2017) podjęli się oceny występowania wirusa AMDV u fermowych oraz dziko żyjących norek amerykańskich. Do badań pozyskano 11 norek fermowych, u których potwierdzono metodą CIEP obecność swoistych przeciwciał dla AMDV oraz 20 norek dziko żyjących. Wszystkie próbki badano metodą PCR. Materiał genetyczny AMDV potwierdzono we wszystkich próbkach amerykańskich norek fermowych oraz w 7 próbkach amerykańskich norek dziko żyjących. Fragmenty genomu wirusa wyizolowane i poddane analizie sekwencji wykazywały dużo mutacji. Uzyskane izolaty układały się w 2 oddzielne gałęzie drzewa filogenetycznego. W jednej gałęzi znajdowały się izolaty pochodzące od zwierząt dziko żyjących które były wykazywały duże podobieństwo do szczepów irlandzkich. W drugiej gałęzi były izolaty uzyskane od amerykańskich norek fermowych, które wykazywały duże podobieństwo do szczepów rosyjskich i 1 szczepu irlandzkiego. Szczepy AMDV izolowane u norek dziko żyjących wykazywały 100% podobieństwo do szczepu AMDV izolowanego ze stada fermowych norek amerykańskich. Tę samą zależność stwierdzono u fermowych norek

amerykańskich pochodzących z różnych ferm. Wszystkie szczepy były też w takim samym stopniu odmienne od szczepów niepatogennych, tylko wykazywały inne kierunki zmian. Zdaniem badaczy można podejrzewać, że AMDV występujący w środowisku naturalnym u zwierząt wolno żyjących występuje powszechnie, ponieważ jego działanie nie jest tak wysoce patogenne.

CHEN i in. (2015) wskazali na skuteczność użycia metody ELISA w porównaniu do CIEP w diagnostyce AMDV. Badacze stwierdzili, że ELISA jest prostsza w wykonaniu, nie wymaga wielkich nakładów finansowych oraz umożliwia zautomatyzowanie procesu badawczego. Umożliwia to zbadanie olbrzymiej liczby próbek, w krótszym okresie czasu. Do użytego zestawu ELISA opracowano antygen VP2 sklonowany na *Escherichia coli*.

Podobne badania mające na celu porównanie metody CIEP i ELISA, w diagnostyce AMDV, przeprowadzili ANDERSSON I WALLGREN (2013). Opracowali oni 2 zestawy diagnostyczne ELISA. Pierwszy zestaw ELISA bazował na antygenie AMDV-G, a drugi na rekombinowanym antygenie VP2. Zestaw ELISA bazujący na antygenie AMDV był bardziej czuły, przy badaniu fermowych norek amerykańskich chorujących przewlekle. Wykazali, że metoda ELISA jest mniej czuła niż CIEP. Stopień specyficzności obu metod był taki sam. Wskazali oni na duża przydatność metody CIEP ze względu na niskie koszty wykonania. Ich zdaniem CIEP nadal powinien być stosowany, ponieważ jest złotym standardem w diagnostyce AMDV.

CHEN i in. (2015) porównywał metody CIEP, ELISA oraz Western Blotting wykrywające swoiste przeciwciała dla AMDV. Metody były porównywane pod względem czułości i swoistości w stosunku do CIEP. Wykazano, że metoda ELISA ma szansę na zautomatyzowanie procedury oraz obniżyć nakłady pracy przy diagnostyce AMDV. W jednym z opracowanych zestawów ELISA antygenem był rekombinowanym gen VP2 na baculowirusie, natomiast w drugim rekombinowany gen VP2 na *Escherichia coli*. Badania wykazały, ze drugi zestaw ELISA był bardziej czuły, swoisty oraz szybszy co jest niezwykle istotne przy badaniach masowych w kierunku AMDV.

Badania porównujące efektywność CIEP i ELISA wykonali także DAM-TUXEN i in. (2014). Do badań pozyskali oni 3810 amerykańskich norek ze stad fermowych, o różnym statusie epizootycznym. W niektórych stadach AMD nie występowała od wielu lat, a w innych wystąpiła stale lub pojawiła się niedawno. Wykazano wyższą swoistość metody ELISA w porównaniu do CIEP.

FARID I SEGERVALL (2014) wykonali dwa interesujące badania, w których norki amerykańskie zostały sztucznie zakażone AMDV. W ramach pierwszego eksperymentu pozyskali 41 dzikich norek amerykańskich, które zakażano donosowo różnymi stężeniami zmacerowanej śledziony norek, po uprzednim ich zakażonych AMDV. Norki były badane metodą PCR, w celu potwierdzenia obecności DNA AMDV. Po 218 dniach od zakażenia norki poddano eutanazji. W celu przeprowadzenia badań metodą CIEP i PCR pobrano od nich krew do probówek zawierających EDTA, heparynę oraz do probówek bez antykoagulantu.

W drugim eksperymencie zakażono 262 norki, takim samym materiałem. Norki podzielono na 2 grupy w zależności od okresu zakażenia. Do pierwszej grupy należały norki amerykańskie, które zostały poddane eutanazji po 16-19 tygodniach od zakażenia eksperymentalnego. Norki z drugiej grupy poddano eutanazji po 20 tygodniach od zakażenia. Od norek, u których wcześniejsze badania PCR potwierdziły obecność AMDV pobierano krew do badania metodą CIEP. Otrzymane wyniki badań metodą CIEP i ELISA poddano analizie statystycznej. Wykazano różne wysokości poziomów swoistych przeciwciał. ELISA okazał się bardziej czuły.

Wykazano, że kilka próbek dodatnich w PCR były ujemnych w CIEP. Mogło to ich zadaniem wynikać z niskiego poziomu przeciwciał. Metody serologiczne nie zawsze są miarodajne, ponieważ czasami występują wyniki fałszywie dodatnie, wynikające np. z niskiej specyficzności. Wykazano, że kilka próbek ujemnych w badaniu ELISA było dodatnich w badaniu metodą CIEP, ale nigdy było odwrotnie. Wyniki fałszywie ujemne spowodowane są głownie niskim poziomem swoistych przeciwciał. Zdaniem badaczy metody serologiczne nie powinny być jedynym wskaźnikiem do eliminacji norki dodatniej, z badanej populacji fermowych norek amerykańskich.

Zestawy ELISA w których antygenem jest gen VP2, nie zawsze jest jednak rekomendowany przez niektóre laboratoria, bowiem AMDV indukuje swoiste przeciwciała zarówno dla genów VP2, VP1 lub NS1. Zalecane są zestawy ELISA wykrywające wszystkie geny AMDV.

W czasie choroby nie zawsze można wyizolować materiał genetyczny AMDV z tkanek lub wydzielin oraz uzyskać wysokie miana wirusa w próbkach, w celu rozpoznania AMDV. Niskie miana AMDV lub ich brak w badanym materiale nie wyklucza jednak obecności wirusa w organizmach norek, szczególnie w ognisku AMD, dlatego bardziej przydatna jest metoda real-time PCR (CUI I in. 2018, BUSTIN 2000, BUSTIN i in. 2009).

KOWALCZYK I JAKUBCZAK (2015) uważają, że metody immunoenzymatyczne ograniczają metody diagnostyczne, tylko do poziomów przeciwciał swoistych we krwi, a przecież wiremia nie występuje przy AMD przez cały okresie jej przebiegu. Poziom przeciwciał nie zawsze może być wystarczająco wysoki, dlatego mogą występować wyniki fałszywie ujemne. Zdaniem badaczy również metody biologii molekularnej mogą dawać wyniki fałszywie ujemne. Jest to spotykane częściej w badaniu molekularnym krwi, która jest trudnym materiałem badawczym (KOWALCZYK I JAKUBCZAK 2015).

6. WNIOSKI

1. Badania serologiczne metodą CIEP pozwoliły na wykrycie swoistych przeciwciał dla AMDV u norek oraz ocenę sytuacji epizootycznej AMD, w badanych krajowych stadach fermowych norek amerykańskich.
2. Częstotliwość występowania swoistych przeciwciał dla AMDV wynosiła od 0 do 92,8%.
3. Metody biologii molekularnej pozwoliły na weryfikację badań serologicznych CIEP, zwiększając efektywność diagnostyczną AMDV.
4. Metoda nested PCR okazała się bardziej czuła od klasycznego PCR.
5. Najbardziej czułą metodą w diagnostyce AMDV był real-time PCR.
6. U norek amerykańskich, w krajowych stadach fermowych, wykryto nowe sekwencje fragmentu genu AMDV, które umieszczono w bazie GenBanku.
7. Analiza filogenetyczna wykrytych izolatów AMDV, wykazała bardzo wysokie pokrewieństwo filogenetyczne do trzech izolatów amerykańskimi oraz jednego rosyjskiego i chińskiego.

7. PIŚMIENNICTWO

AASTED B., ALEXANDERSEN S., CHRISTENSEN J.: Vaccination with Aleutian mink disease parvowirus (AMDV) capsid proteins enhanced disease, while vaccination with the major non-structural AMDV protein causes partial protection from disease. Vaccine 16, 1158-1165, 1998.

AASTED B., BLOOM M.E.: Sensitive radioimmune assay for measuring Aleutian disease virus antigen and antibody. J Clin Microbiol 18, 637-644, 1983.

ALEXANDERSEN S., BLOOM M.E.: Studies on the sequential development of acute interstitial pneumonia caused by Aleutian disease virus in mink kits. J Virol 61, 81-86, 1986.

ALEXANDERSEN S., BLOOM M.E., WOLFINBARGER J.: Evidence of restricted viral replication in adult mink infected with Aleutian disease of mink parvovirus. J Virol 62, 1495-1507, 1988.

ALEXANDERSEN S., LARSEN S., COHN A., UTTENTHAL A., RACE R.E., AASTED B., HANSEN M., BLOOM M.E.: Passive transfer of antiviral antibodies restricts replication of Aleutian mink disease parvovirus in vivo. J Virol 63, 9-17, 1989.

ALEXANDERSEN S., STORGAARD T., KAMSTRUP N., AASTED B., PORTER D.D.: Pathogenesis of Aleutian mink disease parvovirus infection: effects of suppression of antibody response on viral mRNA levels and on development of acute disease. J Virol 68, 738-749, 1994.

ANDERSSON A.M., WALLGREN P.: Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assays for serodiagnosis of Aleutian mink disease virus infection in mink. Acta Vet Scand 55, 86, 2013.

BEST S.M., BLOOM M.E.: Pathogenesis of Aleutian mink disease parvovirus and similarities to B19 infection. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 52, 331-334, 2005.

BLOOM M.E., KANNO H., MORI S., WOLFINBARGER J.B.: Aleutian mink disease: Puzzles and paradigms. Infect. Agents Dis 3, 279–301, 1994.

BLOOM M.E., BEST S.M., HAYES S.F., WELLS R.D., WOLFINBARGER J.B., MCKENNA R., AGBANDJE-MCKENNA M.: Identification of Aleutian mink disease parvovirus capsid sequences mediating antibody-dependent enhancement of infection, virus neutralization, and immune complex formation. J Virol 75, 11116-11127, 2001.

BLOOM M.E., FOX J.M., BERRY B.D., OIE K.L., WOLFINBARGER J.B.: Construction of pathogenic molecular clones of Aleutian mink disease parvovirus that replicate both *in vivo* and *in vitro*. Virol 251, 288-296, 1998.

BLOOM M.E., MARTIN D.A., OIE K.L., HUHTANEN M.E., COSTELLO F., WOLFINBARGER J.B., HAYES S.F., AGBANDJE-MCKENNA M.: Expression of Aleutian mink disease parvovirus capsid proteins in defined segments: localization of immunoreactive sites and neutralizing epitopes to specific regions. J Virol 71, 705-714, 1997.

BROLL S., ALEXANDERSEN S.: Investigation of the pathogenesis of transplacental transmission of Aleutian mink disease parvovirus in experimentally infected mink. J Virol 70, 1455-1466, 1996.

BUSTIN S.A., BENES V., GARSON J.A., HELLEMANS J., HUGGETT J., KUBISTA M., MUELLER R., NOLAN T., PFAFFL M.W., SHIPLEY G.L., VANDESOMPELE J., WITTWER C.T.: The MIQE Guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem 55, 611- 622, 2009.

BUSTIN S.A.: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J Mol Endocrinol 25, 169-93, 2000.

CANUTI M., WHITNEY H.G., LANG A.S.: Amdoparvoviruses in small mammals: Expanding our understanding of parvovirus diversity, distribution, and pathology. Front. Microbiol 6, 1119, 2015.

CANUTI M., O'LEARY K.E., HUNTER B.D., SPEARMAN G., OJKIC D., WHITNEY H.G., LANG A.S.: Driving forces behind the evolution of the Aleutian mink disease parvovirus in the context of intense farming. Virus Evol 2, 1-17, 2016.

CANUTI M., PÉNZES J. J., LANG A. S.: A new perspective on the evolution and diversity of the genus *Amdoparvovirus* (family *Parvoviridae*) through genetic characterization, structural homology modeling, and phylogenetics. Virus Evol 8, veac056, 2022.

CASTELRUIZ Y., BLIXENKRONE-MØLLER M., AASTED B.: DNA vaccination with the Aleutian mink disease virus NS1 gene confers partial protection against disease. Vaccine 23, 1225-1231, 2005.

CHEN W., AASTED B.: Analyses of leucocytes in blood and lymphoid tissues from mink infected with Aleutian mink disease parvovirus (AMDV). Vet Immunol Immunopathol 63, 317-334, 1998.

CHEN X., SONG C., LIU Y., QU L., LIU D., ZHANG Y., LIU M.: Development of an ELISA based on fusion VP2332-452 antigen for detecting antibodies against Aleutian mink disease virus. J Clin Microbiol 54, 439-442, 2015.

CHO H.J., GREENFIELD J.: Eradications of Aleutian disease of mink by eliminating positive counterimmunoelectrophoresis test reactors. J Clin Microbiol 7, 18-22, 1978.

CHRISTENSEN J., PEDERSEN M., AASTED B., ALEXANDERSEN S.: Purification and characterization of the major nonstructural protein (NS-1) of Aleutian mink disease parvovirus. J Virol 69, 1802-1809, 1995.

CHRISTENSEN J., STORGAARD J., BLOCH B., ALEXANDERSEN S., AASTED B.: Expression of Aleutian mink disease parvovirus in an baculovirus vector system. J Virol 67, 229-238, 1993.

CHRISTENSEN L.S., GRAM-HANSEN L., CHRIÉL M., JENSEN T.H.: Diversity and stability of Aleutian mink disease virus during bottleneck transitions resulting from eradication mink in Denmark. Vet Microbiol 149, 64-71, 2011.

COSTELLO F., STEENFOS N., JENSEN K.T., CHRISTENSEN J., GOTTSCHALCK E., HOLM A., AASTED B.: Epitope mapping of Aleutian mink disease parvovirus virion protein VP1 and 2. Scand J Immunol 49, 347-354, 1998.

COTMORE S.F., AGBANDJE-MCKENNA M., CHIORINI J.A., MUKHA D.V., PINTEL D.J., QIU J., SODERLUND-VENERMO M., TATTERSALL P., TIJSSEN P., GATHERER D., DAVISON A.J.: The family *Parvoviridae*. Arch Virol 159, 1239–1247, 2014.

CUI X., SHI Y., ZHAO L., GU S., WEI C., YANG Y., WEN S., CHEN H., GE J.: Application of real-time quantitative PCR to detect mink circovirus in naturally and experimentally infected minks. Front Microbiol 9, 1-8, 2018.

DAM-TUXEN R., DAHL J., JENSEN T.H., DAM-TUXEN T., STRUVE T., BRUNN L.: Diagnosing Aleutian mink disease infection by a new fully automated ELISA or by counter current immunoelectrophoresis: a comparison of sensitivity and specificity. J Virol Methods 199, 53-60, 2014.

FARID A.H., HUSSAIN I., ARJU I.: Detection of Aleutian mink disease virus DNA and antiviral antibodies in American mink (Neovison vison) 10 days postinoculation. J Vet Diagn Invest 27, 287–294, 2015.

FARID A.H., RUPASINGHE P., MITCHELL J.L., ROUVINEN-WATT K.: A survey of Aleutian mink disease virus infection of feral American mink in Nova Scotia. Can Vet J 51, 75-77, 2010.

FARID A.H., SEGERVALL J.: A Comparison between ELISA and CIEP for measuring antibody titres against Aleutian Mink Disease Virus. Virol Mycol 3, 137, 2014.

FARID A.H., ZILLIG M.L., FINLEY G.G., SMITH G.C.: Prevalence of the Aleutian mink disease virus infection in Nova Scotia, Canada. Prev Vet Med 106, 332-338, 2012.

FARID A.H.: Aleutian mink disease virus in furbearing mammals in Nova Scotia, Canada. Acta Vet Scand 55, 10, 2013.

FOURNIER-CHAMBRILLON C., AASTED B., PERROT A., PONTIER D., SAUVAGE F., ARTOIS M., CASSIÉDE J.-M., CHAUBY X., MOLIN A.D., SIMON C., FOURNIER P.: Antibodies to Aleutian mink disease parvovirus in free-ranging European mink (Mustela lutreola) and other small carnivores from southwestern France. J Wildl Dis 40, 394-402, 2004.

FOX J.M., BLOOM M.E.: Identification of a cell surface protein from Crandell feline kidney cells that specifically binds Aleutian mink disease parvovirus. J Virol 73, 3835-3842, 1999.

GLIŃSKI Z., KOSTRO K.: Podstawy hodowli lisów i norek. Profilaktyka i zapobieganie chorobom lisów i norek. Wyd PWRiL Warszawa, 2002.

GONG Q.L., LI D., DIAO N.C., LIU Y., LI B.Y., TIAN T., GE G.Y., ZHAO B., SONG Y.H., LI D.L., LENG, X., DU R.: Mink Aleutian disease seroprevalence in China during 1981–2017: A systematic review and meta-analysis. Microb Pathog 139, 2020 doi: 10.1016/j.micpath.2019.103908

GOTTSCHALCK E., ALEXANDERSEN S., COHN A., POULSEN L.A., BLOOM M.E., AASTED B.: Nucleotide sequence analysis of Aleutian mink disease parvovirus shows that multiple virus types are present in infected mink. J Virol 65, 4378-4386, 1991.

HADLOW W. J.: Ocular lesions in mink affected with Aleutian disease. Vet Pathol 19, 5-15, 1982.

HAGBERG E.E., KRARUP A., FAHNØE U., LARSEN L.E., DAM-TUXEN R., PEDERSEN A.G.: A fast and robust method for whole genome sequencing of the Aleutian mink disease virus (AMDV) genome. J Virol Methods 234, 43-51, 2016.

HAHN E.C.: Immune complexes in Aleutian disease. Demonstration of antibody on isolated virus (mink). Vet Immunol Immunopathol 5, 313-321, 2002.

HALL S.M., MCCANDLISH A.P.: Human parvovirus (B19) infection. Br J Gen Pract 41, 86, 1991.

HODOWCA ZWIERZĄT FUTERKOWYCH. Wyd PZHiPZF 15, 73, 2017.

HUANG Q., LUO Y., CHENG F., BEST S.M., BLOOM M.E., QIU J.: Molecular characterization of the small nonstructural proteins of parvovirus Aleutian mink disease virus (AMDV) during infection. Virol 452-453, 23-31, 2014.

HUSSAIN I., PRICE G.W., FARID A.H.: Inactivation of Aleutian mink disease virus through high temperature exposure in vivo and under field-based composting conditions. Vet Microbiol 173, 50-58, 2014.

INGRAM D. G., CHO H. J: Aleutian disease in mink: virology, immunology and pathogenesis. Rheumatol 11, 576-577, 1984

JAHNS H., DALY P., MCELROY M.C., SAMMIN D.J., BASSETT H.F., CALLANAN J.J.: Neuropathologic features of Aleutian disease in farmed mink in Ireland and molecular characterization of Aleutian mink disease virus detected in brain tissues. J Vet Diagn Invest 22, 101-105, 2010.

JAKUBCZAK A., KOWALCZYK M., KOSTRO K., JEŻEWSKA-WITKOWSKA G.: Comparative molecular analysis of strains of the Aleutian disease virus isolated from farmed and wild mink. Ann Agric Environ Med 24, 366–371, 2017.

JENSEN K.T., WOLFINBARGER J.B., AASTED B., BLOOM M.E.: Replication of Aleutian mink disease parvovirus in mink lymph node histocultures. J Gen Virol 81, 335-343, 2000.

JENSEN P.V., CASTELRUIZ Y., AASTED B.: Cytokine profiles in adult mink infected with Aleutian mink disease parvovirus. J Virol 77, 7444-7451, 2003.

JENSEN T.H., CHRISTENSEN L.S., CHRIÉL M., HARSLUND J., SALOMONSEN C.M., HAMMER A.S.: High prevalence of Aleutian mink disease virus in free-ranging mink on a remote Danish island. J Wildl Dis 45, 497-502, 2012.

JENSEN T.H., CHRISTENSEN L.S., CHRIÉL M., UTTENTHAL Å., HAMMER A.S.: Implementation and validation of a sensitive PCR detection method in the eradication campaign against Aleutian mink disease virus. J Vet Methods 171, 81-85, 2011.

JENSEN T.H., HAMMER A.S., CHRIÉL M.: Monitoring chronic infection with a field strain of Aleutian mink disease virus. Vet Microbiol 168, 420-427, 2014.

JEPSEN J.R., D'AMORE F., BAANDRUP U., CLAUSEN M.R., GOTTSCHALCK E., AASTED B.: Aleutian Mink Disease Virus and Humans. Emerg Infect Disease 15, 2040-2042, 2009.

JEŻEWSKA-WITKOWSKA G., KUJAWSKI H., KASPEREK K., HORECKA B., ZOŃ A., PIÓRKOWSKA M.: Inwentaryzacja wielkości populacji norek, lisów polarnych, jenotów i tchórzy utrzymywanych na polskich fermach. Wiad Zoot 1, 3-10, 2014.

KARSTAD L., PRIDHAM T.J: Aleutian disease of mink: I. Evidence of its viral etiology. Can J Comp Med Vet Sci 26, 97-102, 1962

KNUUTTILA A., ARONEN P., EEROLA M., GARDNER I.A., VIRTALA A.M.K., VAPALAHTI O.: Validation of an automated ELISA system for detection of antibodies to Aleutian mink disease virus using blood samples collected in filter paper strips. Virol J 11, 141-152, 2014.

KNUUTTILA A., ARONEN P., SAARINEN A., VAPALAHTI O.: Development and evaluation of ELISA based on recombinant VP2 capsids for the detection of antibodies to Aleutian mink disease virus. Clin Vaccine Immunol 16, 1360-1365, 2009a.

KNUUTTILA A., UZCÁTEGUI N., KANKKONEN J., VAPALAHTI O., KINNUNEN P.: Molecular epidemiology of Aleutian mink disease virus in Finland. Vet Microbiol 133, 229-238, 2009b.

KNUUTTILA A., AALTONEN K., VIRTALA A.K., HENTTONEN H., ISOMURSU M., LEIMANN A., MARAN T., SAARMA U., TIMONEN P., VAPALAHTI O.: Aleutian mink disease virus in free-ranging mustelids in Finland—a cross-sectional epidemiological and phylogenetic study. J Gen Virol 96,1423–1435, 2015.

KOPCZEWSKI A., WRÓBLEWSKA M., ZDUNKIEWICZ T.: Ocena przydatności testu jodowego w rozpoznawaniu choroby aleuckiej na podstawie testu immunoelektroforezy przeciwprądowej. Med Weter 47, 252-355, 1991.

KOSTRO K., WOJCICKA-LORENOWICZ K., SIEMIONEK J.: Choroba aleucka norek. Med Weter 55, 423-429, 1999.

KOWALCZYK M., HORECKA B., JAKUBCZAK A.: Aleutian mink disease virus in the breeding environment in Poland and its place in the global epidemiology of AMDV. Virus Res 270, 1-7, 2019.

KOWALCZYK M., JAKUBCZAK A., HORECKA B., KOSTRO K.: A comparative molecular characterization of AMDV strains isolated from cases of clinical and subclinical infection. Virus Genes 2018.

KOWALCZYK M., JAKUBCZAK A.: Możliwości wykorzystania technik biologii molekularnej w diagnostyce choroby aleuckiej norek. Wiad Zoot 3, 70-77, 2015.

KOWALSKA D., PIÓRKOWSKA M., GUGOŁEK A.: Wybrane zagadnienia dobrostanu, żywienia i użytkowania norek hodowlanych (*Neovison vison*). Monografia, Instytut Zootechniki- PIB, Kraków 2016.

KOZERA B., RAPACZ M.: Reference genes in real-time PCR. J Appl Genetics 54, 391-406, 2013.

LARSEN A.E., PORTER D.: Pathogenesis of Aleutian disease of mink: identification of nonpersistent infection. Infect Immun 11, 92-94, 1974.

LEIMANN A., KNUUTTILA A., MARAN T., VAPALAHTI O., SAARMA U.: Molecular epidemiology of Aleutian mink disease virus (AMDV) in Estonia, and a global phylogeny of AMDV. Virus Res 199, 56-61, 2015.

LI Y., HUANG J., JIA Y., DU Y., JIANG P., ZHANG R.: Genetic characterization of Aleutian mink disease viruses isolated in China. Virus Genes 45, 24-30, 2012.

LU T., WANG Y., WU Y., ZHAO L., WU S., CHEN H.: Development of an antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Aleutian mink disease virus. Arch Virol 166, 83–90, 2021.

MA F., ZHANG L., WANG Y., LU R., HU B., LV S., XUE X., LI X., LING M., FAN S:, ZHANG H., YAN X. : Development of a peptide ELISA for the diagnosis of Aleutian mink disease. PLoS ONE 11, e0165793, 2016.

MAÑAS S., CENA J.C., RUIZ-OLMO J., PALAZON S., DOMINGO M., WOLFINBARGER J.B., BLOOM M.E.: Aleutian mink disease parvovirus in wild riparian carnivores in Spain. J Wildl Dis 37, 138-144, 2001.

MCKENNA R., OLSON N.H., CHIPMAN P.R., BAKER T.S., BOOTH T.F., CHRISTENSEN J., AASTED B., FOX J.M., BLOOM M.E., WOLFINBARGER J.B., AGBANDJE-MCKENNA M.: Three-dimensional structure of Aleutian mink disease parvovirus: implications for disease pathogenicity. J Virol 73, 6882-6891, 1999.

MULLIS K., FALOONA F., SCHARF S., SAIKI R., HORN G., ERLICH H.: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 51, 263-273, 1986.

NITUCH L., BOWMAN J., WILSON P., SCHULTE-HOSTEDDE A.I.: Molecular epidemiology of Aleutian disease virus in free-ranging domestic hybrid, and wild mink. Evol Appl 5, 330-340, 2012.

OIE K.L., DURRANT G., WOLFINBARGER J.B., MARTIN D., COSTELLO F., PERRYMAN S., POGAN D., HADLOW W.J., BLOOM M.E.: The Relationship between capsid protein (VP2) sequence and pathogenicity of Aleutian mink disease parvovirus (ADV): a possible role for raccoons in the transmission of adv infections. J Virol 70, 852-861, 1996.

OLEKSIEWICZ M.B., ALEXANDERSEN S.: S-phase-dependent cell cycle disturbances caused by Aleutian mink disease parvovirus. J Virol 71, 1386-1396, 1997.

OLEKSIEWICZ M.B., COSTELLO F., HUHTANEN M., WOLFINBARGER J.B., ALEXANDERSEN S., BLOOM M.E.: Subcellular localization of Aleutian mink disease parvovirus proteins and DNA during permissive infection of Crandell feline kidney cells. J Virol 70, 3242-3247, 1996.

OLOFSSON A., MITTELHOLZER C., BERNDTSSON L.T., LIND L., MEJERLAND T., BELAK S.: Unusual, high genetic diversity of Aleutian mink disease virus. J Clin Microbiol 37, 4145-4149, 1999.

PADGETT G.A., LEADER R. W., GORHAM J. R., O'MARY C. C.: The familial occurrence of the Chediak-Higashi Syndrome in mink and cattle. Genetics 49, 505-512, 1964.

PARK G.S., BEST S.M., BLOOM M.E.: Two mink parvoviruses use different cellular receptors for entry into CRFK cells. Virology 340, 1-9, 2005.

PERSSON S., JENSEN T.H., BLOMSTRÖM A.L., APPELBERG M.T., MAGNUSSON U.: Aleutian mink disease virus in free-ranging mink from Sweden: PLoS ONE 10, e0122194, 2015.

PÕDRA M., GÓMEZ A. Rapid expansion of the American mink poses a serious threat to the European mink in Spain : Mammalia 82, 580–588, 2018.

PRIETO A., DÍAZ-CAO J.M., FERNÁNDEZ-ANTONIO R., PANADERO R., DÍAZ P., LÓPEZ C., MORRONDO P., DÍEZ-BAÑOS, FERNÁNDEZ G.: Application of real-time PCR

to detect Aleutian mink disease virus on environmental farm sources. Vet Microbiol 173, 355-359, 2014.

PRIETO A., DÍAZ-CAO J.M., FERNÁNDEZ-ANTONIO R., PANADERO R., LÓPEZ-LORENZO G., DÍAZ P., PÉREZ-CREO A., MORRONDO M.P., FERNÁNDEZ G.: Lesser housefly (Fannia canicularis) as possible mechanical vector for Aleutian mink disease virus. Vet. Microbiol 221, 90–93, 2018.

PRIETO A., FERNÁNDEZ-ANTONIO R., DÍAZ-CAO J.M., LÓPEZ G., DÍAZ P., ALONSO J.M., MORRONDO P., FERNÁNDEZ G.: Distribution of Aleutian mink disease virus contamination in the environment of infected mink farms. Vet. Microbiol 204:59–63, 2017.

PRIETO A., FERNÁNDEZ-ANTONIO R., LÓPEZ-LORENZO G., DÍAZ-CAO J.M., LÓPEZ-NOVO C., REMESAR S., PANADERO R., DÍAZ P., MORRONDO P., DÍEZ-BAÑOS P. : Molecular epidemiology of Aleutian mink disease virus causing outbreaks in mink farms from Southwestern Europe: A retrospective study from 2012 to 2019. J Vet. Sci 2020;21:e65. doi: 10.4142/jvs.2020.21.e65.

QUI J., CHENG F., BURGER L.R., PINTEL D.: The Transcription profile of Aleutian mink disease virus in CRFK cells is generated by alternative processing of pre-mRNAs produced from a single promoter. J Virol 80, 654-662, 2005.

REICHERT M., KOSTRO K.: Effect of persistent infection of mink with Aleutian mink disease virus on reproductive failure. Bull Vet Inst Pulawy 58, 369-373, 2014a.

REICHERT M., KOSTRO K.: NS1 gene based molecular characteristics of Aleutian mink disease virus circulating in Poland. Bull Vet Inst Pulawy 58, 187-191, 2014b.

RYT-HANSEN P., HAGBERG E.E., CHRIÉ M., STRUVE T., PEDERSEN A.G., LARSEN L.E., HJULSAGER C.K.: Global phylogenetic analysis of contemporary Aleutian mink disease viruses (AMDVs). Virol J 14, 231, 2017b.

RYT-HANSEN P., HJULSAGER C.K., HAGBERG E.E., CHRIÉL M., STRUVE T., PEDERSEN A.G., LARSEN L.E.: Outbreak tracking of Aleutian mink disease virus (AMDV) using partial NS1 gene sequencing. Virol J 14, 119, 2017a.

SAITOU N., NEI M.: The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biol Evol 4, 406-425, 1987.

SÁNCHEZ-MIGALLÓN GUZMÁN D., CARVAJAL A., GARCÍA-MARÍN J.F., FERRERAS M.C., PÉREZ V., MITCHELL M., URRA F., CEÑA J.C.: Aleutian disease serology, protein electrophoresis, and pathology of the European mink (Mustela lutreola) from Navarra, Spain. J Zoo Wildl Med 39, 305-313, 2008.

SANG Y., MA J., HOU Z., ZHANG Y.: Phylogenetic analysis of the VP2 gene of Aleutian mink disease parvovirus isolated from 2009 to 2011 in China. Virus Genes 45, 31-37, 2012.

SCHUIERER S., BLOOM M.E., KAADEN O.R., TRUYEN U.: Sequence analysis of the lymphotropic Aleutian disease parvovirus ADV-SL3. Arch Virol 142, 157-166, 1997.

SHCHELKUNOVA G.A., SHCHELKUNOV S. N.: 40 Years without Smallpox. Acta Naturae. 9, 4-12, 2017.

SHIMIZU Y., INOUE K., TAMURA S., YAMASHITA T., KURIMOTO T.: Simple method for preparation of Aleutian disease antigen. Jpn J Vet 42, 717-723, 1980.

SIEMIONEK J. Choroby mięsożernych zwierząt futerkowych oraz podstawy chowu. UWM Olsztyn, 2001.

SIEMIONEK J., ZAŁĘSKA-WAWRO M., SZWEDA W., PRZYWARA K.: Ewolucja parvowirusów u zwierząt mięsożernych. Med Weter 73, 538-543, 2017a.

SIEMIONEK J., ZAŁĘSKA-WAWRO M., PRZYWARA K., GĄSIOREK B., SZCZERBA-TUREK A., SZWEDA W.: Sytuacja epizootyczna choroby aleuckiej norek w Polsce, w świetle wyników badań serologicznych i molekularnych. Med Weter 73 , 591-594, 2017b.

STEFFEN J. , SANDER-WACHOWICZ R.: Choroba aleucka norek - plazmocytoza. Cz. II. Test jodowy. Med Weter 24, 199-202, 1968.

STEINEL A., PARRISH C R., BLOOM M. E, TRUYEN U: Parvovirus infections in wild carnivores. Wildl Dis 37, 594-607, 2001.

STORGAARD T., OLEKSIEWICZ M., BLOOM M.E., CHING B., ALEXANDERSEN S.: Two parvoviruses that cause different disease in mink have different transcription patterns: transcription analysis of mink enteritis virus and Aleutian min disease parvovirus in the same cell line. J Virol 71, 4990-4996, 1997.

SZWEDA W.: Strategia DIVA w zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt. Med Weter 65, 373-376, 2009.

TABEL H., INGRAM D.G.: The immunoglobulins in aleutian disease (viral plasmacytosis) of mink. different types of hypergammaglobulinemias. Can J Comp Med 34, 329-332, 1970.

TAMURA K., NEI M., KUMAR S.: Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proc Nat Acad Sciences (USA) 101, 11030-11035, 2004.

TAMURA K., PETERSON D., PETERSON N., STECHER G., NEI M., KUMAR S.: MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol 28, 2731-2739, 2011.

THEMUDO G.E., HOUE H., AGGER J.F., ØSTERGAARD J., ERSBØLL A.K.: Identification of biosecurity measures and spatial variables as potential risk factors for Aleutian disease in Danish mink farms. Prev Vet Med 107, 134-141, 2012.

TONG M., SUN N., CAO Z., CHENG Y., ZHANG M., CHENG S., YI L.: Molecular epidemiology of Aleutian mink disease virus from fecal swab of mink in northeast China. BMC Microbiol 20, 234, 2020 doi: 10.1186/s12866-020-01910-8.

TYBURSKI J., STUDZIŃSKA A., DACA P., TRETYN A.: PCR w czasie rzeczywistym. Metody analizy danych. Biotechnologia 1, 86-96, 2008.

UNE Y., WAKIMOTO Y., NAKANO Y., KONISHI M., NOMURA Y.: Spontaneous Aleutian disease in a ferret. J Vet Med Sci 62, 553-555, 2000.

WANG Z., WU W., HU B., ZHANG H., BAI X., ZHAO J., ZHANG L.: Molecular epidemiology of Aleutian mink disease virus in China. Virus Res 184, 14-19, 2014.

WOJCICKA-LORENOWICZ K., KOSTRO K., SIEMIONEK J., KUTRZUBA J.: Postępy w rozpoznawaniu i zwalczaniu choroby aleuckiej norek. Med Weter 55, 595-599, 1999.

WRIGHT P.F., WILKIE B.N. Detection of antibody in Aleutian disease of mink: Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and counterimmunoelectrophoresis. Am J Vet Res 43, 865–868. 1982.

WU W., BLOOM M.E., BERRY B.D., MCGINLEY M.J., PLATT K.B.: Expression of Aleutian mink disease parvovirus capsid proteins in a baculovirus expression system for potential diagnostic use. J Vet Diagn Invest 6, 23-29, 1994.

YAMAGUCHI N., MACDONALD D.W.: Detection of Aleutian disease antibodies in feral american mink in Southern England. Vet Rec 149:485–488, 2001.

ZALEWSKI A., VIRTANEN J.M.E., BRZEZIŃSKI M., KOŁODZIEJ-SOBOCIŃSKA M., JANKOW W., SIRONEN T.: Aleutian mink disease: Spatio-temporal variation of prevalence and influence on the feral American mink. Transbound. Emerg. Dis.68:2556–2570, 2021.

ZAŁĘSKA-WAWRO M., SZCZERBA-TUREK A, SZWEDA W., SIEMIONEK J : Seroprevalence and molecular epidemiology of Aleutian Disease in vrious countries during 1972–2021: A review and Meta-Analysis. Animals 11, 2975, 2021.

ZHANG Z., WANG B., HU S., ZHANG, J., HE X., ZHENG S.: Detection of Aleutian disease virus by loop-mediated isothermal amplification. Virus disease 26, 203–206, 2015.

STRESZCZENIE

Ocena przydatności wybranych metod biologii molekularnej w diagnostyce choroby aleuckiej norek

Choroba aleucką norek (AMD) jest chorobą autoimmunologiczna wywołaną przez parwowirusa choroby aleuckiej norek (AMDV) i objawia się głównie zaburzeniami rozrodu w hodowli norek. W jej diagnostyce stosuje się najczęściej metody serologiczne.

Początkowo badano surowice norek metodą immunoelektroforezy przeciwprądowej (CIEP) 6 krajowych fermach. Częstotliwość swoistych przeciwciał dla AMDV wynosiła od 0 do 92,8%.

Opracowano PCR do amplifikacji fragmentu genu VP2 AMDV warunkującego patogenność AMDV. Otrzymano izolaty genu VP2 AMDV które poddano sekwencjonowaniu. Uzyskane nowe sekwencje nukleotydowe z polskich stad norek które wykazywały bardzo wysoki 97,9% stopień podobieństwa do ADV-Utah 1 VP2 gene USA oraz 96,7% podobieństwo do Far East VP 2 gene Russia i ADV-LN2 VP2 gene China.

Metoda CIEP w badaniach serologicznych była wysoce swoista i bardzo czuła, ale opracowane metody biologii molekularnej tj. PCR, nested PCR oraz real-time PCR były bardziej czułe do oceny rzeczywistej sytuacji epizootycznej AMD w fermie norek, dlatego zalecane jest równoczesne stosowanie metod serologicznych i metod biologii molekularnej.

Słowa kluczowe: choroba aleucka norek , CIEP, PCR, nested-PCR, real-time PCR

SUMMARY

Evaluation of selected methods of molecular biology in the diagnosis of the Aleutian mink disease

Aleutian Mink Disease (AMD) is an autoimmune disease caused by the Aleutian Mink Disease Virus (AMDV) and manifests itself mainly by reproductive disorders in mink farming. Serological methods are most often used in its diagnosis.

Initially, mink sera were tested by countercurrent immunoelectrophoresis (CIEP) in 6 Polish farms. The frequency of specific antibodies for AMDV ranged from 0 to 92.8%.

PCR was developed to amplify the fragment of the AMDV VP2 gene determining the pathogenicity of AMDV. AMDV VP2 gene isolates were obtained and subjected to sequencing. The obtained new nucleotide sequences from Polish mink farm showed a very high 97.9% similarity to ADV-Utah 1 VP2 gene USA and 96.7% similarity to Far East VP 2 gene Russia and ADV-LN2 VP2 gene China.

The CIEP method in serological tests was highly specific and very sensitive, but the developed molecular biology methods, i.e. PCR, nested- PCR and real-time PCR, were more sensitive to assess the actual epizootic situation of AMD on the farm, therefore the simultaneous use of serological and molecular biology methods is recommended.

Key words: Aleutian mink disease, CIEP, PCR, nested-PCR, real-time PCR