

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W LUBLINIE

WYDZIAŁ NAUK O ZWIERZĘTACH I BIOGOSPODARKI

**Polimorfizm molekularny wirusa choroby aleuckiej w
populacji norki amerykańskiej (*Neovison vison*) oraz w jej
środowisku hodowlanym w Polsce**

**Molecular polymorphism of Aleutian Mink Disease Virus in the mink
(*Neovison vison*) population and in its breeding environment in Poland**

Mgr inż. Marek Kowalczyk

Autoreferat pracy doktorskiej

Doctoral thesis

Promotor

Dr hab. Andrzej Jakubczak, Prof. Uczelni
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Promotor pomocniczy

Dr Beata Horecka
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Recenzenci

Prof. dr hab. lek wet. Olga Szeleszczuk
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Prof. dr hab. n. farm. Anna Bogucka-Kocka
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Lublin, 2020

Spis treści

Wykaz publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej:	3
Streszczenie	5
Abstract	7
Wstęp	9
Cel i hipotezy badawcze	11
1. Materiał i metody	12
1.1 Badania pilotażowe - wstępna ocena zmienności wirusa AMDV pomiędzy fermami z różnych części Polski	12
1.2 Ocena zróżnicowania wirusa AMDV pomiędzy populacją wolno żyjącą i hodowlaną.....	12
1.3 Analiza epidemiologii molekularnej wirusa AMDV w populacji fermowej.....	13
1.4 Ocena ładunku wirusowego w tkankach i środowisku hodowlanym.....	13
1.5 Charakterystyka molekularna wirusa AMD u zwierząt z klinicznym i subklinicznym przebiegiem choroby aleuckiej.....	14
1.6 Optymalizacja reakcji duplex PCR	14
1.7 Badanie wpływu suplementacji methisoprinolem na parametry hodowlane w fermie nerek trwale zakażonych wirusem AMD	15
2. Wyniki	16
2.1 Ocena zmienności molekularnej wirusa AMDV w populacji nerek w Polsce.....	16
2.1.1 Wstępna ocena zmienności wirusa AMDV pomiędzy fermami z różnych części Polski .	16
2.1.2 Ocena zróżnicowania wirusa AMDV pomiędzy populacją wolno żyjącą i hodowlaną....	17
2.1.3 Analiza epidemiologii molekularnej wirusa AMDV w populacji fermowej.....	18
2.2 Ocena ładunku wirusowego w tkankach i środowisku hodowlanym.....	20
2.3 Charakterystyka molekularna wirusa AMD u osobników z przebiegiem klinicznym i subklinicznym choroby aleuckiej	21
2.4 Optymalizacja reakcji duplex PCR	22
2.5 Badanie wpływu suplementacji methisoprinolem na parametry hodowlane.....	23
3 Dyskusja	24
4. Podsumowanie i wnioski	29
Piśmiennictwo:	30

Wykaz publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej:

1. **Kowalczyk M.**, Jakubczak A. 2015. Możliwość wykorzystania technik biologii molekularnej w diagnostyce choroby aleuckiej norek, *Wiadomości Zootechniczne*, 53(3), 70-77

Liczba punktów w roku publikacji: **MNISW = 6**

Indywidualny wkład pracy w publikację (80%): koncepcja pracy, gromadzenie danych, sformułowanie wniosków, redagowanie manuskryptu, korekta po recenzjach

2. Jakubczak A., **Kowalczyk M.**, Kostro K., Horecka B., Jeżewska-Witkowska G. 2016. High molecular polymorphism of the hypervariable region in the VP2 gene of Aleutian mink disease virus. *Acta Virologica*, 60(4), 354-360, doi: 10.4149/av_2016_04_354

Liczba punktów w roku publikacji: **MNISW = 15; IF`2016= 0,673**

Indywidualny wkład pracy w publikację (37%): koncepcja pracy, opracowanie założeń metodycznych, realizacja badań laboratoryjnych, gromadzenie danych, analiza i opracowanie wyników, sformułowanie wniosków, redagowanie manuskryptu, korekta po recenzjach

3. Jakubczak A., **Kowalczyk M.**, Kostro K., Jeżewska-Witkowska G. 2017. Comparative molecular analysis of strains of the Aleutian Disease Virus isolated from farmed and wild mink. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 24 (3), 366-371, doi: 10.26444/aaem/75688

Liczba punktów w roku publikacji: **MNISW = 30; IF`2017 = 1,116**

Indywidualny wkład pracy w publikację (43%): koncepcja pracy, opracowanie założeń metodycznych, realizacja badań laboratoryjnych, gromadzenie danych, analiza i opracowanie wyników, sformułowanie wniosków, redagowanie manuskryptu, korekta po recenzjach

4. **Kowalczyk M.**, Jakubczak A., Horecka B., Kostro K. 2018. A comparative molecular characterization of AMDV strains isolated from cases of clinical and subclinical infection. *Virus Genes*, 54(4), 561-569, doi.org/10.1007/s11262-018-1576-x

Liczba punktów w roku publikacji: **MNISW = 20; IF`2018 = 1,616**

Indywidualny wkład pracy w publikację (60%): koncepcja pracy, opracowanie założeń metodycznych, realizacja badań laboratoryjnych, gromadzenie danych, analiza i opracowanie wyników, sformułowanie wniosków, redagowanie manuskryptu, korekta po recenzjach

5. **Kowalczyk M.**, Jakubczak A., Gryzińska M. 2019. Duplex PCR for detection of Aleutian Disease Virus from biological and environmental samples. *Acta Veterinaria-Beograd*, 69 (4), 402-413, doi: 10.2478/acve-2019-0034

Liczba punktów w roku publikacji: **MNISW = 15 (40*); IF`2018 = 0,656**

Indywidualny wkład pracy w publikację (60%): koncepcja pracy, opracowanie założeń metodycznych, realizacja badań laboratoryjnych, gromadzenie danych, analiza i opracowanie wyników, sformułowanie wniosków, redagowanie manuskryptu, korekta po recenzjach

6. **Kowalczyk M.**, Horecka B., Jakubczak A. 2019, Aleutian Mink Disease Virus in the breeding environment in Poland and its place in the global epidemiology of AMDV, *Virus Research*, 270, 197665, doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197665

Liczba punktów w roku publikacji: **MNISW = 25 (70*)**; **IF²⁰¹⁸ = 2,736**

Indywidualny wkład pracy w publikację (60%): koncepcja pracy, opracowanie założeń metodycznych, realizacja badań laboratoryjnych, gromadzenie danych, analiza i opracowanie wyników, sformułowanie wniosków, redagowanie manuskryptu, korekta po recenzjach

7. **Kowalczyk M.**, Gąsiorek B., Kostro K., Borzym E., Jakubczak A. 2019. Breeding parameters on a mink farm infected with the AMD virus following the use of methisoprinol, *Archives of Virology*, 164 (11), 2691-2698, doi.org/10.1007/s00705-019-04375-x

Liczba punktów w roku publikacji: **MNISW = 20 (70*)**; **IF²⁰¹⁸ = 2,261**

Indywidualny wkład pracy w publikację (45%): współautor koncepcji pracy, udział w opracowaniu założeń metodycznych, realizacja badań laboratoryjnych, gromadzenie danych, analiza i opracowanie wyników, sformułowanie wniosków, redagowanie manuskryptu, korekta po recenzjach

Łączna liczba punktów MNiSW* = 251

IF (Impact factor) = 9,058**

Udział w publikacjach = 55%

* Punktacja prac opublikowanych w roku 2019 zgodna z listą czasopism z lipca 2019, wydaną przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

** Web of Science – Journal Citation Report

Streszczenie

Wirus choroby aleuckiej (Aleutian Mink Disease Virus – AMDV) stanowi przyczynę istotnych strat ekonomicznych w hodowli nerek. Patogen powoduje padnięcia (zwłaszcza wśród młodych nerek), obniżenie plenności samic oraz pogorszenie jakości futra. Wysoka trwałość wirusa w środowisku, brak metod leczenia oraz skala problemu AMDV w krajach, w których prowadzona jest hodowla nerek, skłaniają do poszukiwania skutecznych metod pozwalających na zamykanie dróg krążenia wirusa oraz usuwanie go z ferm.

Celami pracy było: określenie skali epidemiologii wirusa AMD w populacji nerek oraz w ich środowisku hodowlanym w Polsce, przygotowanie charakterystyki molekularnej izolatów wirusa powodujących przebieg kliniczny i subkliniczny choroby oraz zbadanie wpływu immunostymulacji methisopriolem na parametry hodowlane na fermie trwale zakażonej wirusem AMD.

W celu wstępnej analizy zróżnicowania wirusa AMD, badano polimorfizm w sekwencji kodującej białko strukturalne VP2 w próbach pochodzących od 33 osobników fermowych i 20 wolno żyjących nerek. Do określenia epidemiologii molekularnej AMDV oraz zbadania ładunku wirusowego w tkankach i środowisku, pobrano 55 śledzion, 35 prób krwi i 125 wymazów ze środowiska fermowego, pochodzących z łącznie 27 ferm. Z badanych prób izolowano DNA, a następnie prowadzono detekcję wirusa metodą PCR. Produkty reakcji PCR sekwencjonowano a następnie poddano analizie bioinformatycznej. Ładunek wirusowy w badanych próbach oznaczono metodą qPCR.

W celu sporządzenia charakterystyki molekularnej wirusa AMD na fermach o zróżnicowanym obrazie klinicznym choroby, do badań wytypowano po 10 osobników z fermy na której występowały infekcje przebiegu klinicznym i 10 z fermy gdzie diagnozowano infekcje o przebiegu subklinicznym. Z krwi badanych zwierząt izolowano DNA, metodą qPCR określono ładunek wirusowy, amplifikowano i sekwencjonowano fragment kodujący białko VP2. Uzyskane sekwencje poddano analizie bioinformatycznej.

Biorąc pod uwagę wysoką zmienność wirusa AMD zaprojektowano reakcję duplex PCR, w której amplifikowano sekwencje kodujące fragmenty białka niestrukturalnego - NS1 i strukturalnego - VP2. Oceniono przydatność reakcji do amplifikacji wirusowego materiału genetycznego z prób biologicznych (krew - n=40 i śledziona – n=40) oraz prób środowiskowych (n=20). Czulość reakcji potwierdzono metodą qPCR, a specyficzność poprzez sekwencjonowanie wybranych prób.

Badania wpływu suplementacji methisoprinolem, przeprowadzono na grupie 300 osobników, które podzielono na trzy grupy doświadczalne i trzy grupy kontrolne, w zależności od miana przeciwciał uzyskanych w teście ELISA. Do aktywnej immunostymulacji nieswoistej u nerek użyto methisoprinolu. W pierwszym etapie preparat otrzymywały samice stada podstawowego grup doświadczalnych a w drugim etapie doświadczenia, po wykocie, suplementację otrzymywało także potomstwo. W grupach samic doświadczalnych oraz kontrolnych oceniono wskaźniki rozrodu, masy ciała przychówka oraz ładunek wirusowy w śledzionie i węzłach chłonnych.

Wirus AMD został wykryty zarówno w tkankach (10^8 kopii w śledzionie i 10^4 kopii we krwi), jak i środowisku hodowlanym (średnio 10^2 kopii). Uzyskane w trakcie badań wyniki wskazują na wysokie zróżnicowanie AMDV i co najmniej czterokrotne wprowadzenie patogenu do Polski. Na fermie, na której występuje przebieg subkliniczny, infekcja przyjmowała łagodniejszą formę, z niższym o dwa rzędy wielkości ładunkiem wirusowym we krwi zakażonych osobników. W związku ze stwierdzonymi w badaniach własnych wynikami fałszywie ujemnymi, zaprojektowano reakcję duplex PCR, która wykazała przydatność do detekcji i molekularnej charakterystyki wirusa AMD, zwłaszcza w przypadku prób izolowanych z krwi i śledziony. Zastosowanie methisoprinolu jako immunostymulatora, może zmniejszyć replikację wirusa i poprawić wyniki hodowlane na fermach trwale zakażonych wirusem poprzez zwiększenie liczebności miotu (średnio o jedną szczenię), jak i masę szczeniąt (średnio o 12%).

Słowa kluczowe: Choroba Aleucka, Diagnostyka Molekularna, Polimorfizm, Epidemiologia Molekularna, Immunostymulacja

Abstract

Aleutian Mink Disease Virus (AMDV) results in breeding losses due to frequent abortion, low fecundity and high juvenile mortality. Due to the high persistence of pathogen in the environment, lack of causative treatment as well as the growing problem of AMDV infections, there is a need for research on alternative methods to eliminate the pathways of the spread of the virus and extinguish current outbreaks.

The aims of the study were: the evaluation of AMDV epidemiology in the population of the Polish minks and in their breeding environment, molecular characterization of pathogen on the farms with clinical and subclinical course of disease and examination of the effect of immunostimulation on the breeding parameters of the minks from persistently infected farms.

The initial analysis of molecular diversity was developed on the basis of the polymorphisms in the sequence coding structural protein - VP2. The samples derived from 33 individuals from farmed population and 20 from free-living minks. To prepare an extended analysis of molecular epidemiology and to estimate viral load in the tissues and environmental samples, 55 spleen, 35 blood samples and 125 environmental swabs from 27 farms were tested. DNA was extracted from the tested samples and the detection of viral genetic material was carried out by PCR. The products of amplification were sequenced and undergone bioinformatic analysis. A qualitative assessment of AMDV was performed by qPCR.

In order to prepare a molecular characterization of AMD virus in the farms with a clinical and subclinical course of disease, a group of 20 animals were examined (10 from farm with clinical and 10 from farm with the subclinical course). DNA was extracted from blood of tested animals, viral load was estimated via qPCR method, sequence coding part of VP2 protein was amplified, sequenced and undergone bioinformatic analysis.

Taking into account a high molecular diversity of AMD virus, duplex PCR was developed and optimized. The reaction was designed to enable simultaneous amplification of sequences coding parts of the non-structural protein - NS1 and structural protein - VP2. The effectiveness of the method was assessed in detecting AMDV from biological (blood n=40; spleen n=40) and environmental samples (n=20). The quantitative determination of the number of copies of viral genetic material was carried out by the qPCR. To confirm the specificity of the reaction, selected PCR products were sequenced.

To evaluate the effectiveness of methisoprinol in counteracting the effects of Aleutian disease, 300 individuals with confirmed infection were included. The Minks were divided according to antibody titers into three experimental groups, which received a methisoprinol

solution, and three control groups, which did not receive the immunostimulant. DNA was extracted from spleens and lymph nodes and viral load was evaluated. The reproductive parameters of females and the body weight of the offspring were assessed in the groups of experimental and control females.

AMDV was detected in the tissues (10^8 copies in the spleen, 10^4 copies in the blood) as well as in the environment (average viral load 10^2 copies per reaction). A high molecular diversity indicates that virus was introduced at least four times to Poland. Animals from farms with subclinical course displays milder symptoms and the viral load was two order of magnitude lower. Duplex PCR enables successful detection and molecular characterization of AMDV especially from spleen and blood. Immunostimulation with methisoprinol solution may inhibit the replication of the virus and improve the breeding parameters due to the bigger litter size (average one kit more in experimental group) and the higher weight of kits (average 12%).

Keywords: Aleutian Disease, Molecular Diagnostics, Polymorphism, Molecular Epidemiology, Immunostimulation

Wstęp

Polska jest krajem, który odgrywa istotną rolę na światowym rynku zwierząt futerkowych, co znajduje potwierdzenie w ilości skór dostarczanych do domów aukcyjnych. Najpopularniejszym zwierzęciem futerkowym hodowanym w naszym kraju jest norka amerykańska (*Neovison vison*). Według danych Fur Europe za rok 2016, w Polsce uzyskano ponad osiem milionów skór norczych (<http://www.fureurope.eu/>).

Jedną z istotnych przyczyn strat dla hodowców, jest wirus choroby aleuckiej (Aleutian Mink Disease Virus – AMDV). Jednostka chorobowa, po raz pierwszy opisana w latach 50. (Helmboldt i Jungherr, 1958), stanowi obecnie globalny problem w hodowli norek. Infekcje wirusem AMD są wykrywane zarówno w krajach europejskich (m. in. Dania, Finlandia, Estonia, Polska), jak i Stanach Zjednoczonych, Kanadzie, czy Chinach (Bloom i wsp., 2001; Farid, 2013; Knuutila i wsp., 2015; Knuutila i wsp., 2009; Leimann i wsp., 2015; Li i wsp., 2012; Reichert and Kostro, 2014b; Themudo i wsp., 2015; Wang i wsp., 2014). Patogen może być przenoszony drogą pionową z zakażonych samic na potomstwo, lub horyzontalnie poprzez ślinę, czy odchody. Depozycja wirusa w środowisku prowadzi do powstawania pośrednich dróg szerzenia choroby, którym sprzyjają czynniki biologiczne, w tym antropogeniczne (Prieto i wsp., 2014).

Wirus wykazuje powinowactwo do limfocytów B, które na skutek infekcji są indukowane do nadmiernej odpowiedzi immunologicznej, wskutek czego rozwija się gammaglobulinemia. Objawy kliniczne choroby są efektem depozycji kompleksów antygen-przeciwciało w tkankach, co prowadzi do rozwoju stanów zapalnych między innymi kłębuszków nerkowych, czy płuc, zwłaszcza u młodych norek (Leimann i wsp., 2015). AMDV wywołuje chorobę o zróżnicowanym przebiegu, która może przyjmować postać trwałych bezobjawowych zakażeń, infekcji przejściowych, infekcji subklinicznych, aż po infekcje postępujące, często kończące się zejściem śmiertelnym. Charakter i przebieg choroby w dużej mierze zależy od genotypu gospodarza, oraz szczepu wirusa (Leimann i wsp., 2015, Persson i wsp., 2015, Wang i wsp., 2014).

Genom wirusa AMD jest zbudowany z ssDNA (jednoniciowego DNA) o długości około 4,8 kb, które koduje sekwencję aminokwasową trzech białek niestrukturalnych (NS1, NS2 i NS3), oraz dwóch białek strukturalnych (VP1 i VP2). Białka niestrukturalne są zaangażowane w proces replikacji i regulacji transkrypcji materiału genetycznego wirusa, natomiast białka strukturalne determinują właściwości antygenowe i w dużej mierze decydują o patogenności wirusa (Ryt-Hansen i wsp., 2017a).

Niezależnie od postaci choroby, patogen przynosi straty ekonomiczne wynikające zarówno z padnięć, głównie młodych osobników, jak i obniżenia plenności samic (Reichert and Kostro, 2014a). W chwili obecnej brak jest skutecznych metod leczenia AMD, a jedynym sposobem, pozwalającymi na minimalizowanie efektów infekcji pozostają działania profilaktyczne, w dużej mierze oparte na diagnostyce, jak i odpowiednich zabiegach zoohigienicznych, obejmujących dezynfekcje.

Stosowane rutynowo metody diagnostyczne takie jak test jodowy, czy immunoelektroforeza przeciwprądowa (CIEP), dostarczają często ograniczonych informacji na temat infekcji (Dam-Tuxen i wsp., 2014; Farid i Rupasinghe, 2016). Wykrycie wirusowego materiału genetycznego w badanych tkankach jednoznacznie wskazuje na infekcję, podczas gdy pojawienie się przeciwciał przeciw wirusowi, może oznaczać bezobjawowy kontakt z patogenem. Metody serologiczne są dodatkowo ograniczone przez okienko serologiczne, tj. okres, który mija od zakażenia do pojawienia się przeciwciał, podczas którego zwierzę może zakażać inne osobniki, samemu dając wynik ujemny w testach serologicznych. Wreszcie, metody serologiczne często nie uwzględniają analizy stanu sanitarnego środowiska, które również może być rezerwuarem wirusa.

Techniki molekularne wykazują wyższą czułość, pozwalając na detekcję materiału genetycznego wirusa już na wczesnych etapach choroby. Ponadto, zastosowanie metod takich jak qPCR pozwala na wykrycie AMDV w środowisku hodowlanym oraz badanie skuteczności działań dezynfekcyjnych (Prieto i wsp., 2017; Prieto i wsp., 2014). Sekwencjonowanie zamplifikowanego materiału genetycznego wirusa, w połączeniu z analizami bioinformatycznymi, umożliwia ocenę zmienności patogenu a także wnioskowanie o krążeniu wirusa pomiędzy ogniskami choroby (Ryt-Hansen i wsp., 2017a; Ryt-Hansen i wsp., 2017b). Za celowością wdrażania metod molekularnych przemawiają trendy badań w krajach odgrywających istotną rolę w hodowli zwierząt futerkowych, a więc w Danii, Finlandii, czy Chinach, w których oprócz samej oceny stanu sanitarnego ferm pod względem AMDV, przeprowadza się charakterystykę molekularną patogenu.

Włączenie metod molekularnych i badań epidemiologii molekularnej opartych o analizy bioinformatyczne, do rutynowej diagnostyki AMDV, może przyczynić się do eliminacji wirusa z ferm, nie tylko poprzez wczesną i czułą detekcję patogenu w materiale biologicznym pochodzącym od zwierząt, ale także poprzez monitorowanie skuteczności działań dezynfekcyjnych, czy też identyfikację i zamykanie dróg krążenia wirusa.

Cel i hipotezy badawcze

Amdowirusy są stosunkowo nowym i słabo poznanym zagadnieniem. Duża ilość sekwencji wirusa AMD deponowana w bazach danych, jak też rosnąca ilość badań nad epidemiologią molekularną wirusa AMD, podkreśla duże zainteresowanie problemem. Dlatego też zasadne wydaje się przeprowadzenie analizy zróżnicowania molekularnego AMDV także w Polsce, która stanowi istotny segment rynku futrzarskiego.

W celu zbadania epidemiologii AMDV w populacji norki amerykańskiej (*Neovison vison*) sformułowano następujące hipotezy badawcze:

- Wirus AMD może być obecny nie tylko w organizmach zwierząt, ale także w środowisku hodowlanym zakażonych ferm, które może stanowić rezerwuuar wirusa.
- Zasilanie polskiej hodowli nerek, zwierzętami z różnych źródeł mogło spowodować wysokie zróżnicowanie molekularne wirusa w populacji hodowlanej.
- Pula wirusa AMD w Polsce składa się zarówno z wariantów endemicznych, jak i wariantów biorących udział w globalnym krążeniu patogenu.
- Zmienność molekularna wirusa może wpływać na obraz kliniczny choroby.
- Immunostymulacja może poprawić parametry hodowlane na fermie trwale zakażonej AMDV.

W celu weryfikacji hipotez założono szczegółowe cele badawcze:

- Optymalizacja metod opartych na reakcji PCR, duplex PCR i qPCR pozwalających na detekcję materiału genetycznego wirusa AMD w próbach biologicznych i środowiskowych oraz jego późniejszą charakterystykę molekularną.
- Ocena częstości występowania AMDV na polskich fermach oraz określenie ładunku wirusowego w tkankach i środowisku hodowlanym norki amerykańskiej.
- Analiza epidemiologii molekularnej patogenu na badanych fermach oraz określenie relacji polskich izolatów z zasobami baz bioinformatycznych w oparciu o polimorfizm w sekwencji kodującej białko NS1.
- Charakterystyka molekularna wirusa na fermach, na których choroba przyjmuje przebieg kliniczny i subkliniczny.
- Ocena czułości i specyficzności metody duplex PCR, jako techniki ograniczającej występowanie wyników fałszywie ujemnych.
- Zbadanie wpływu preparatu immunostymulującego – methisoprinolu na parametry hodowlane na fermie trwale zakażonej wirusem AMD.

1. Materiał i metody

Wszystkie badania były prowadzone za zgodą i zgodnie z zaleceniami Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach (numer pozwolenia - 30/2010).

1.1 Badania pilotażowe - wstępna ocena zmienności wirusa AMDV pomiędzy fermami z różnych części Polski

Badania przeprowadzono na dwóch fermach hodowlanych norek. W analizowanych fermach od trzech sezonów hodowlanych u około 60% zwierząt stada podstawowego notowano trwale zakażenia wirusem AMD o przebiegu subklinicznym, potwierdzone metodą immunoelektroforezy przeciwaprądowej. Do badań zakwalifikowano 16 osobników, w tym 6 z fermy położonej w północno-wschodniej Polsce (Ferma A) i 10 z fermy w zachodniej Polsce (Ferma B). Materiał do badań w zakresie genotypowania wirusa AMD w fermach objętych doświadczeniem stanowiły próbki narządów wewnętrznych (śledziony i węzłów chłonnych zagardłowych).

Izolację DNA prowadzono zestawem DNeasy Blood and Tissue (Qiagen). W celu amplifikacji materiału genetycznego wirusa, przeprowadzono reakcję PCR ze starterami specyficznymi do sekwencji kodującej fragment białka VP2 (Costello i wsp. 1999). Specyficzność reakcji określono poprzez rozdział produktów reakcji w 2% żelu agarozowym. Produkty amplifikacji oczyszczano, a następnie poddano reakcji PCR sekwencyjnego i rozdzielano na analizatorze genetycznym – Avant 3100 Genetic Analyser. Otrzymane sekwencje poddano analizie bioinformatycznej w programach DNA Baser i MEGA 6.

1.2 Ocena zróżnicowania wirusa AMDV pomiędzy populacją wolno żyjącą i hodowlaną

Norki hodowlane pozyskano z dwóch gospodarstw, na których potwierdzono przy pomocy elektroforezy przeciwaprądowej występowanie trwałej subklinicznej postaci choroby aleuckiej. Przeciwciała przeciw AMDV wykryto u 60% badanych zwierząt. Do analiz wybrano 11 osobników z potwierdzonym zakażeniem. Norki wolno żyjące (n=20) pozyskano od myśliwych, prowadzących legalny odłów zwierząt. Izolację DNA prowadzono ze śledzion, przy pomocy zestawu DNeasy Blood and Tissue (Qiagen). W celu amplifikacji materiału genetycznego wirusa, przeprowadzono reakcję PCR ze starterami specyficznymi do sekwencji kodującej fragment białka VP2 (Costello i wsp. 1999). Specyficzność reakcji określono poprzez rozdział produktów reakcji w 2% żelu agarozowym. Produkty amplifikacji oczyszczano, a następnie poddano reakcji PCR sekwencyjnego i rozdzielano na analizatorze

genetycznym – Avant 3100 Genetic Analyser. Otrzymane sekwencje poddano analizie bioinformatycznej w programach DNA Baser i MEGA 6. Regiony epitopowe identyfikowano w oparciu o bazę Epitope Database and Analysis Resource oraz wyniki badań Costello i wsp. (1999)

1.3 Analiza epidemiologii molekularnej wirusa AMDV w populacji fermowej

Do badania wybrano 14 ferm z województwa Zachodniopomorskiego, 7 ferm z województwa Wielkopolskiego, 2 fermy z Podkarpackiego i po jednej z ferm z województw: Lubelskiego, Małopolskiego, Podlaskiego i Pomorskiego. Do analiz wytypowano fermy, które wykazywały dodatnie wyniki w testach CIEP (26 ferm). Jako kontrolę ujemną wykorzystano próby (n=25) z fermy z województwa Wielkopolskiego wolnej od wirusa AMD, na której notowano wyniki ujemne w testach CIEP od początku istnienia fermy. Materiał do badań stanowiły śledziony, krew i wymazy ze środowiska, w którym przebywały zwierzęta (n=250).

Izolację DNA przeprowadzono zestawem DNeasy Blood and Tissue (Qiagen). Reakcję PCR ze starterami flankującymi fragment kodujący białko NS1 (Jensen i wsp. 2011), przeprowadzono dla prób DNA wyizolowanego ze wszystkich śledzion i próbek krwi oraz dla wymazów, w których ładunek wirusowy wynosił co najmniej 10^2 kopii (n=183). Specyficzność reakcji określono poprzez rozdział produktów reakcji w 1% żelu agarozowym. Do sekwencjonowania wybrano próbki po reakcji PCR wykazujące wynik dodatni i dające wyraźne produkty amplifikacji (n= 86, po 3-5 próbek z każdej z badanych ferm ma których wykryto zakażone zwierzęta). Produkty amplifikacji oczyszczano, a następnie poddano reakcji PCR sekwencyjnego i rozdzielano na analizatorze genetycznym – Avant 3100 Genetic Analyser. Otrzymane sekwencje poddano analizie bioinformatycznej w programach DNA Baser, Bioedit, MEGA 6, Figtree.

1.4 Ocena ładunku wirusowego w tkankach i środowisku hodowlanym

Oceniano ilość materiału genetycznego w śledzionie (n=55), krwi (n=35), próbach krwi pulowanej (n=35 prób zbiorczych, uzyskanych poprzez pulowanie 10 prób jednostkowych) i środowisku hodowlanym (n=100). Jako kontrolę ujemną wykorzystano wymazy z fermy, na której notowano wyniki ujemne w testach CIEP od początku istnienia fermy (n=25). Ze wszystkich prób przeprowadzono izolację DNA zestawem DNeasy Blood and Tissue (Qiagen). Ocenę ładunku wirusowego w badanych próbach przeprowadzono metodą Real-Time PCR, zestawem Genesig AIDV Advanced Kit, w odniesieniu do krzywej wzorcowej.

1.5 Charakterystyka molekularna wirusa AMD u zwierząt z klinicznym i subklinicznym przebiegiem choroby aleuckiej

Badania przeprowadzono w dwóch fermach hodowlanych nerek, z których pierwsza zlokalizowana była w północno-zachodniej (Ferma A), zaś druga w północno-wschodniej Polsce (Ferma B). W fermie A liczącej 10000 samic nerek stada podstawowego u 40% nerek występowało trwale zakażenia wirusem AMD o przebiegu klinicznym potwierdzone metodą elektroforezy przeciwprądowej. Natomiast w fermie B liczącej 5000 samic stada podstawowego u około 60% zwierząt występowało trwale zakażenia AMDV o przebiegu subklinicznym również potwierdzone metodą elektroforezy przeciwprądowej.

Badaniem właściwym objęto 20 samic nerek odmiany brązowej w wieku 1 roku, po 10 sztuk z każdej ferm. Materiał biologiczny do badań genetycznych stanowiły próbki krwi. Genomowy DNA wirusa izolowano przy użyciu zestawu do izolacji DNA z krwi QIAamp DNA Investigator Kit (Qiagen). Detekcję wirusowego DNA prowadzono metodą PCR z trzema parami starterów (Canuti i wsp. 2016; Costello i wsp. 1999). Specyficzność reakcji sprawdzano poprzez rozdział elektroforetyczny w 2% żelu agarozowym. Czulość reakcji PCR zweryfikowano metodą qPCR. Produkty reakcji PCR oczyszczono, poddano reakcji PCR sekwencyjnego i rozdzielano na analizatorze genetycznym Avant 3100 Genetic Analyser. Analizę bioinformatyczną prowadzono w programach DNA Baser, MEGA7, Bioedit, Figtree, SNAP2.

1.6 Optymalizacja reakcji duplex PCR

Ferma i zwierzęta do badań zostały wytypowane w oparciu o dodatnie wyniki immunoelektroforezy przeciwprądowej (CIEP). Do analiz wykorzystano krew (n=40) i śledziony (n=40) oraz wymazy z klatek w których przebywały zainfekowane zwierzęta (n=20). Dla próbek krwi, oprócz diagnostyki indywidualnej, zbadano możliwość analizy próbek zbiorczych (wymieszano po 40 µl krwi od 10 zwierząt badanych, otrzymane w ten sposób próbki zbiorcze traktowano w trakcie izolacji i dalszej analizy jako pojedyncze próbki). DNA izolowano zestawem DNeasy Blood and Tissue (Qiagen). Do reakcji PCR wykorzystano parę starterów amplifikujących fragment białka strukturalnego VP2 (Costello i wsp. 1999) oraz parę amplifikującą fragment białka NS1 (Jensen i wsp. 2011). Reakcje optymalizowano w gradiencie magnezu i temperatury. Specyficzność amplifikacji określono poprzez rozdział produktów reakcji w 1% żelu agarozowym. Stosując metodę qPCR określono czulość reakcji oraz średnią ilość kopii wirusa w badanych próbach. Specyficzność reakcji oceniono poprzez sekwencjonowanie wybranych próbek i porównanie ich z zasobami bazy NCBI.

1.7 Badanie wpływu suplementacji methisoprinolem na parametry hodowlane w fermie nerek trwale zakażonych wirusem AMD

Badania przeprowadzono na fermie hodowlanej nerek, której obsadę stanowiło 10000 samic stada podstawowego. Stan sanitarny fermy oceniono jako dobry, a norki żywione były systemem tradycyjnym według norm zalecanych dla tego gatunku w poszczególnych okresach hodowlanych, z uwzględnieniem dodatków mineralno-witaminowych oraz stałego dostępu do wody. W fermie nerek objętej doświadczeniem występują endemiczne zakażenia AMDV potwierdzone metodą elektroforezy przeciwpądowej, testem ELISA oraz techniką PCR. Specyficzność potwierdzono poprzez sekwencjonowanie wybranych prób, ładunek wirusowy w badanych tkankach określono metodą qPCR.

W analizach uwzględniono łącznie 300 samic nerek hodowlanych odmiany brązowej, które zostały wyselekcjonowane do doświadczenia na podstawie dodatnich wyników testu ELISA. Na podstawie uzyskanych mian przeciwciał w teście ELISA zwierzęta wyjściowo podzielono na 3 grupy doświadczalne (grupa I, II, III) oraz 3 grupy kontrolne (grupa CI, CII, CIII) po 50 sztuk w każdej. Do aktywnej immunostymulacji nieswoistej u nerek użyto 20% r-r methisoprinolu. W pierwszym etapie methisoprinol otrzymywały tylko samice stada podstawowego grup doświadczalnych. Natomiast norki z grup kontrolnych otrzymywały tę samą karmę co zwierzęta doświadczalne lecz bez dodatku preparatu.

W drugim etapie doświadczenia (po zakończonych wykotach) pierwszą dawkę methisoprinolu otrzymały samice stada podstawowego z grup doświadczalnych wraz z ich potomstwem. W grupach samic doświadczalnych oraz kontrolnych oceniono wskaźniki rozrodu, masy ciała przychówka oraz ładunek wirusowy w śledzionie i węzłach chłonnych.

2. Wyniki

2.1 Ocena zmienności molekularnej wirusa AMDV w populacji nerek w Polsce

2.1.1 Wstępna ocena zmienności wirusa AMDV pomiędzy fermami z różnych części Polski

Wyniki wskazywały na wysokie zróżnicowanie wirusa AMDV w obrębie badanych ferm. Po sekwencjonowaniu, przeprowadzono analizę *in silico*, w trakcie której analizowano wpływ zmian w sekwencji nukleotydowej na sekwencje aminokwasów w białku VP2. Izolaty wirusa pochodzące z fermy A należały do 4 genotypów. W oparciu o polimorfizmy w sekwencji aminokwasowej, wśród osobników z fermy B wyróżniono 5 genotypów. Porównanie otrzymanych wyników z zasobami dostępnymi w bazie NCBI, wykazało istnienie czterech zmian, które nie występowały w zdeponowanych dotąd sekwencjach (Tabela 1). W przypadku osobników z fermy B zanotowano zamianę izoleucyny na leucynę w pozycji 325 (325I>L), zamianę asparaginy na histydynę w pozycji 332 (332N>H), zamianę kwasu glutaminowego na lizynę w pozycji 349 (349E>K). Jeden izolat wirusa z fermy A charakteryzował się dwiema zmianami (241D>I oraz 349E>K), które również nie występują w sekwencjach zdeponowanych dotąd w dostępnych bazach bioinformatycznych.

Pomiędzy uzyskanymi genotypami, a sekwencją szczepu referencyjnego (NC_001662.1 - AMDV-G w bazie NCBI) zanotowano 21 zmian, z czego 8 dotyczyło regionu hiperzmiennego. Dla izolatów z fermy B charakterystyczne były zmiany 172F>Y, 324L>I, 328Q>E, 332N>H. W przypadku prób z fermy A zmianą występującą w każdym izolacie, różniącą od izolatów z fermy B była 325I>V.

Tabela 1. Polimorfizm sekwencji aminokwasowej białka VP2, z uwzględnieniem regionu hiperzmiennego. Kolor szary wskazuje aminokwasy wchodzące w skład regionu hiperzmiennego, Litery pogrubione – warianty nienotowane dotychczas w bioinformatycznych bazach danych.

Numer akcesyjny	Farma	Pozycja aminokwasowa																				
		172	233	234	235	237	239	241	242	243	283	306	309	311	318	319	324	325	328	332	349	353
NC_001662.1	USA	F	V	A	T	T	T	D	A	V	N	K	T	T	K	E	L	I	Q	N	E	I
KR080140	farm B_1	Y	T	G	-	Q	E	T	G	T	K	T	S	.	L	Q	I	.	E	H	.	V
KR080141	farm B_2	Y	T	G	-	Q	E	T	G	T	K	T	S	.	L	.	I	.	E	H	K	V
KR080142	farm B_3	Y	T	G	-	Q	E	T	G	T	K	T	S	.	L	.	I	.	E	H	.	V
KR080143	farm B_4	Y	M	G	Q	Q	E	T	G	T	K	T	S	R	L	.	I	L	E	H	.	V
KR080144	farm B_5	Y	T	G	-	Q	E	T	G	T	K	T	S	A	L	.	I	.	E	H	.	V
KR080136	farm A_1	.	T	G	Q	Q	E	I	G	T	K	T	S	K	L	.	.	V	.	.	K	V
KR080137	farm A_2	.	T	G	Q	Q	E	T	G	T	K	T	S	R	L	.	.	V	.	.	.	V
KR080138	farm A_3	.	T	G	Q	Q	E	T	G	T	K	T	S	A	L	.	.	V	.	.	.	V
KR080139	farm A_4	.	T	G	Q	Q	E	T	G	T	K	T	S	K	L	.	.	V	.	.	.	V

2.1.2 Ocena zróżnicowania wirusa AMDV pomiędzy populacją wolno żyjącą i hodowlaną

W badanej populacji fermowej wyróżniono pięć, natomiast u osobników dzikich cztery warianty genetyczne wirusa. Podobieństwo pomiędzy izolatami wirusa z grup zawierających norki dzikie i hodowlane wynosiło 94% (Tabela 2).

Tabela 2. Ocena podobieństwa w sekwencji kodującej białko VP2, pomiędzy izolatami wirusa AMD, pochodzącego od nerek fermowych (farm) i wolno żyjących (wild). Kursywa – podobieństwo w obrębie badanych grup- hodowlanych i wolno żyjących. Pogrubiona czcionka – podobieństwo pomiędzy grupą fermową i wolno żyjącą.

AMDV-G											
AMDV-G	ID	wild_1									
wild_1	0,944	ID	wild_2								
wild_2	0,947	<i>0,997</i>	ID	wild_3							
wild_3	0,942	<i>0,991</i>	<i>0,993</i>	ID	wild_4						
wild_4	0,944	<i>0,995</i>	<i>0,997</i>	<i>0,995</i>	ID	farm_1					
farm_1	0,949	0,938	0,94	0,944	0,942	ID	farm_2				
farm_2	0,951	0,94	0,942	0,947	0,944	<i>0,997</i>	ID	farm_3			
farm_3	0,953	0,942	0,944	0,949	0,947	<i>0,995</i>	<i>0,997</i>	ID	farm_4		
farm_4	0,944	0,933	0,935	0,94	0,938	<i>0,995</i>	<i>0,993</i>	<i>0,991</i>	ID		
farm_5	0,942	0,931	0,933	0,938	0,935	<i>0,988</i>	<i>0,991</i>	<i>0,988</i>	<i>0,984</i>		

Pomiędzy izolatami od zwierząt dzikich i hodowlanych wystąpiło 35 różnic w sekwencji nukleotydowej, spośród których 20 dotyczyło pojedynczych zmian w kodonie, 6 powodowało zmianę dwóch nukleotydów w kodonie, a 9 prowadziło do zmian sekwencji całych kodonów. Zmiany w sekwencji nukleotydowej powodowały powstanie 9 zmian w sekwencji aminokwasowej. Warianty N331H, Y359M były charakterystyczne dla wariantów wirusa występującego u zwierząt fermowych, natomiast polimorfizm I451V występował wyłącznie u zwierząt dzikich.

Porównanie sekwencji epitopowych wskazuje na wysoką zmienność w regionach oddziałujących z przeciwciałami, w obu grupach występują specyficzne zmiany. W obszarze epitopu pierwszego występuje pięć zmian (tranzycji) charakterystycznych dla izolatów pochodzących od osobników wolno żyjących: C3704T, G3710A, T3722C, T3746C, A3749G. W sekwencji epitopu drugiego występował wariant G3779A, pojawiający się wyłącznie u osobników dzikich. W przypadku obu grup wystąpiły zmiany różnicujące je od szczepu niepatogennego A3705C (transwersja wiązała się ze zmianą aminokwasu N434H), A3747T (transwersja powodowała zmianę aminokwasu T448S), oraz A3770G, która miała charakter synonimiczny.

Wyniki analizy filogenetycznej wskazują, że warianty infekujące osobniki dzikie, zajmują osobną gałąź w obrębie tego samego kladu co warianty infekujące zwierzęta hodowlane.

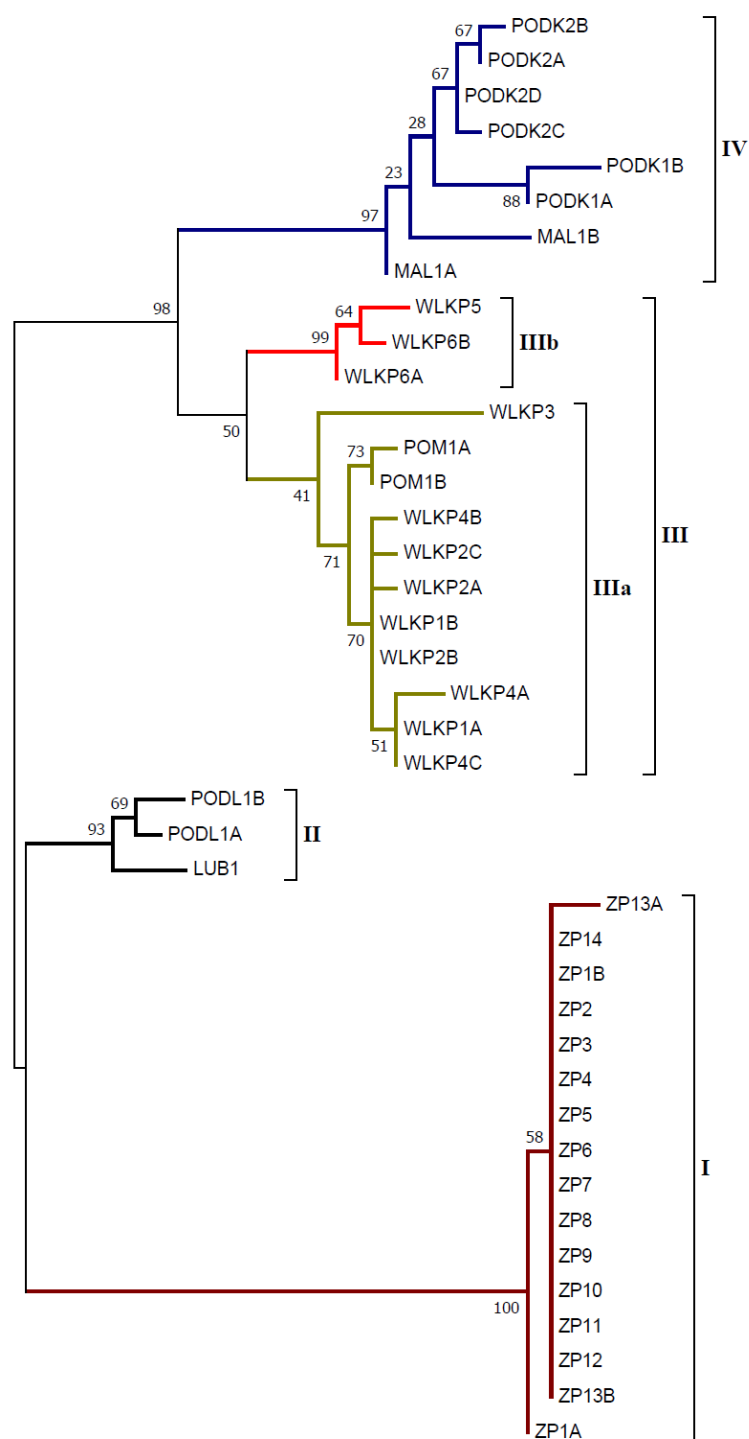
2.1.3 Analiza epidemiologii molekularnej wirusa AMDV w populacji fermowej

Wyniki reakcji PCR z parą starterów flankujących fragment kodujący białko NS1, wskazywały na obecność materiału genetycznego wirusa AMD w każdej ze 183 prób wytypowanych w czasie wstępnej analizy. W przypadku fermy stanowiącej kontrolę negatywną, w każdej z badanych prób uzyskano wynik ujemny. Porównanie izolatów z ferm z województwa zachodnio-pomorskiego, wskazywało na wysoką homogenność puli wirusowej, sekwencje uzyskane ze wszystkich ferm z tej grupy były podobne do siebie w ponad 99,5%, a 14 z 16 uzyskanych izolatów było do siebie w 100% podobnych. Warianty z tej grupy, różniły się znacząco w stosunku do izolatów wirusa z innych części kraju (różnice od 8,7% do 12,7%). Warianty z województwa wielkopolskiego wykazywały większe zróżnicowanie w obrębie badanej grupy. Na sześciu badanych fermach z tego obszaru, wyróżniono 12 wariantów wirusa. Występujące między izolatami polimorfizmy pozwoliły na wyróżnienie dwóch głównych grup wirusa krążących na tym obszarze, między którymi podobieństwo wynosiło 96%.

W przypadku pozostałych regionów Polski, badania dotyczyły mniejszej liczby ferm, jednak mimo to na każdej z nich, oprócz fermy z województwa lubelskiego, wykryto więcej niż jeden wariant wirusa. Szczególnie wysokie zróżnicowanie wystąpiło na fermach z Podkarpacia, gdzie wykryto 4 warianty wirusa, które wykazywały wysokie podobieństwo do wariantów z małopolski. Izolaty z Pomorza wykazywały ponad 98% podobieństwo do wariantów z Wielkopolski.

Analiza filogenetyczna wskazywała na istnienie czterech głównych kładów w polskiej populacji AMDV (Rysunek 1). Warianty z województwa zachodnio-pomorskiego, tworzące grupę I wykazywały podobieństwo przekraczające 99% w stosunku do wariantów izolowanych w Grecji i Holandii. Izolaty z Polski wschodniej, zakwalifikowane do grupy II, różniły się znacząco w stosunku do zasobów bazy NCBI, co może wskazywać na ich lokalny i endemiczny charakter. Niejednorodna grupa III została podzielona na dwie podgrupy. Izolaty z okolic Wielkopolski, włączone do podgrupy IIIA, wykazywały około 99% podobieństwo do wariantów AMDV izolowanych na terenie Polski w roku 2016, oraz do izolatów z Holandii. Warianty z grupy IIIB były najbardziej zbliżone do izolatów z Holandii (ponad 97% podobieństwa). Warianty wirusa ADM izolowane z okolic Podkarpacia i

Małopolski, zaliczone do grupy IV, były podobne w ponad 97% do sekwencji wirusa izolowanego w Polsce i na Litwie w roku 2016.



Rysunek 1. Wynik analizy filogenetycznej wariantów wirusa ADM izolowanego od nerek hodowlanych na badanych fermach. ZP – izolaty z województwa zachodniopomorskiego, LUB – izolaty z województwa lubelskiego, PODL – izolaty z województwa podlaskiego, WLKP – izolaty z województwa wielkopolskiego, POM – izolaty z województwa pomorskiego, MAL – izolaty z województwa wielkopolskiego, PODK – izolaty z województwa podkarpackiego

2.2 Ocena ładunku wirusowego w tkankach i środowisku hodowlanym

W każdej z prób śledziona i krwi oraz w 69% wymazów pochodzących z ferm z dodatnimi wynikami CIEP i wytypowanych do oceny ilościowej potwierdzono obecność materiału genetycznego AMDV. W przypadku prób z fermy wykorzystanej jako kontrola ujemna, metoda qPCR potwierdziła brak materiału genetycznego wirusa w każdej z badanych prób.

Ocena ilościowa ładunku wirusowego w tkankach i środowisku hodowlanym wykazała że największa liczba kopii wirusa została stwierdzona w śledzienie (10^8 kopii na reakcję). W przypadku, krwi, która jest głównym materiałem diagnostycznym w diagnostyce AMDV, średnia liczba kopii wynosiła średnio 10^5 . W próbkach pulowanych wirus występował w liczbie kopii o rząd mniejszej (Tabela 3).

Tabela 3. Ilościowa ocena ładunku wirusowego w tkankach i wymazach ze środowiskahodowlanego badanych zwierząt (ilość kopii w śledzienie był statystycznie wyższy niż w pozostałych badanych tkankach, przy $p \leq 0.05$)

Rodzaj badanego materiału	Liczba prób	Średnia liczba kopii	Minimum	Maximum
Śledziona	55	1.59E+08*	7.35E+02	2.21E+09
Krew	35	1.77E+05	1.41E+01	2.11E+06
Krew pulowana	35	1.45E+04	2.34E+01	1.63E+05
Wymazy ze środowiska	100	2.06E+03	1.10E+01	8.20E+04

Na każdej z ferm, na których przeprowadzono ocenę ilościową wirusa AMD w próbach środowiskowych, potwierdzono obecność materiału genetycznego wirusa. Analiza qPCR, wykazała że średnio ponad 69% badanych wymazów miało wynik dodatni, potwierdzając obecność AMDV w środowisku hodowlanym. Średnia liczba kopii w badanych próbach środowiskowych wynosiła około 2×10^3 kopii na reakcję. Najwyższy ładunek wirusa z tego rodzaju prób, osiągnął rząd wielkości 10^4 , w próbkach z najniższym mianem, zanotowano wielkość ładunku wirusowego na poziomie kilkunastu kopii (Tabela 4).

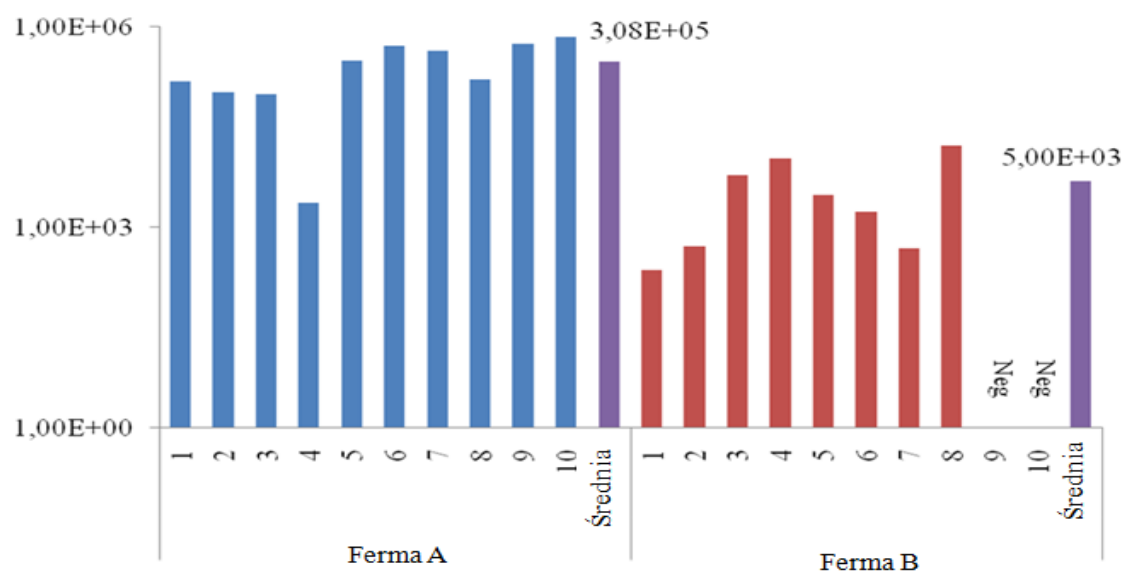
Tabela 4. Określenie ładunku wirusowego w środowisku fermowym (* ładunek wirusowy na fermie numer 10 był statystycznie wyższy niż w przypadku pozostałych ferm $p \leq 0.05$)

Ferma	Liczba prób	Liczba wyników dodatnich (%)	Średnia liczba kopii	Minimum	Maximum
1	8	4 (50%)	3.18E+02	1.87E+02	4.42E+02
2	10	5 (50%)	4.04E+03	1.15E+01	1.80E+04
3	8	4 (50%)	1.75E+03	4.54E+01	4.38E+03
4	20	18 (90%)	8.40E+02	6.50E+01	3.01E+03
5	6	5 (83%)	1.32E+02	2.26E+01	3.51E+02
6	3	2 (67%)	1.07E+02	5.65E+01	1.58E+02
7	10	9 (90%)	2.02E+03	9.95E+01	7.25E+03
8	5	2 (40%)	1.46E+03	2.29E+02	2.69E+03
9	5	3 (60%)	1.92E+02	5.23E+01	4.07E+02
10	10	9 (90%)	1.16E+04*	1.31E+01	8.20E+04
11	15	8 (53%)	1.46E+02	1.10E+01	6.60E+02
Total	100	69 (69%)	2.06E+03	1.10E+01	8.20E+04

2.3 Charakterystyka molekularna wirusa AMD u osobników z przebiegiem klinicznym i subklinicznym choroby aleuckiej

Metoda PCR potwierdziła obecność materiału genetycznego wirusa AMD we wszystkich próbach pochodzących z fermy A oraz 8 próbach z fermy B. Wyniki fałszywie ujemne wystąpiły zarówno w przypadku zastosowania pary starterów amplifikującej fragment kodujący białko VP2, jak i pary specyficznej dla sekwencji NS1. Wyniki ujemne reakcji PCR zostały poddane weryfikacji metodą qPCR.

Ilościowe oznaczenie liczby kopii wirusa metodą qPCR w przypadku nerek z fermy B (przebieg subkliniczny) utrzymywało się na poziomie 10^3 , zaś w przypadku fermy A (przebieg kliniczny) było o dwa rzędy wielkości wyższe i wynosiło 10^5 (Wykres 1).



Wykres 1. Porównanie ładunku wirusowego w próbach pochodzących z ferm A i B.

Sekwencje uzyskane dla obu par starterów flankujących sekwencję kodującą białko VP2 wykazywały wysokie podobieństwo w obrębie badanych ferm, natomiast stwierdzono różnice pomiędzy fermami A i B. Polimorfizm typu SNP stwierdzono dla próby numer 2 z fermy A, co wskazuje na występowanie na fermie co najmniej dwóch wariantów wirusa. Wykazano obecność 47 różnic w sekwencji nukleotydowej pomiędzy izolatami z fermy A i B, w tym 4 w regionie hiperzmiennym. Odpowiadało to zmianom w 12 aminokwasach, przy jednej zmianie występującej w regionie hiperzmiennym.

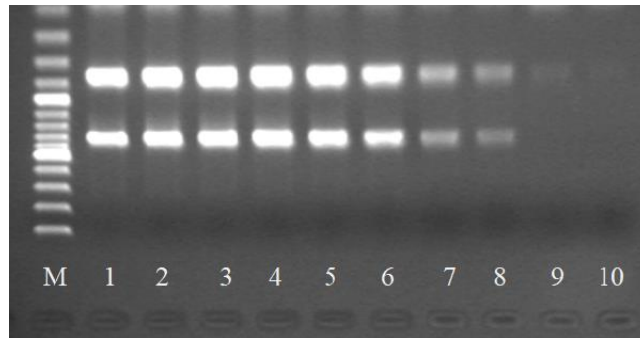
Analiza filogenetyczna pozwoliła na wyróżnienie trzech głównych grup. Wszystkie otrzymane izolaty z fermy A i B zakwalifikowano do grupy pierwszej wraz ze szczepem Pullman. Analiza *in silico* wpływu polimorfizmów w sekwencji aminokwasów na funkcjonalność białka VP2 wskazuje na występowanie szerokiego zakresu zmienności dla AMDV, bez ryzyka utraty jego funkcjonalności. Spośród 31 różnic występujących w sekwencji aminokwasowej białka VP2 izolatów pochodzących z fermy A i B a szczepem niepatogennym - AMDV-G, tylko jedna zmiana wykazuje potencjalny wpływ na funkcjonalność białka - Y350M. W regionie hiperzmiennym zauważono osiem różnic w sekwencji aminokwasowej, jednak żadna z nich nie wpływała na funkcjonalność białka.

2.4 Optymalizacja reakcji duplex PCR

Metoda duplex PCR pozwoliła na jednoczesną amplifikację fragmentu kodującego białko strukturalne VP2 i białko niestrukturalne NS1. Amplifikacja rozcieńczonego materiału genetycznego, umożliwiła uzyskanie wyniku dla dwóch par starterów w próbkach, w których materiał genetyczny wirusa znajdował się na poziomie co najmniej 10^2 kopii. Dla prób, w których liczba kopii materiału genetycznego wirusa wynosiła 5×10^1 i 10^1 kopii, otrzymano słaby wynik dodatni dla pary starterów amplifikującej sekwencje kodującą białko niestrukturalne – NS1 (Rysunek 2). W przypadku pary starterów flankującej sekwencję kodującą białko VP2, dla dwóch ostatnich rozcieńczeń wystąpił brak amplifikacji. Wyniki sekwencjonowania i analiza bioinformatyczna potwierdziły specyficzność reakcji dla obu par starterów.

Wyraźny produkt amplifikacji z obydwoma parami starterów uzyskano dla tkanki, w przypadku której średnia liczba kopii wykrywana w śledzienie, oceniona metodą qPCR wynosiła 10^8 kopii na reakcję. Również w przypadku prób krwi, badanych pojedynczo uzyskano wyraźne prążki zarówno dla pary starterów flankującej fragment NS1 jak i VP2. Wyniki reakcji duplex PCR potwierdziły możliwość badania pulowanych prób krwi (średni ładunek wirusowy oceniony metodą qPCR wynosił 10^3 kopii na reakcję). W przypadku

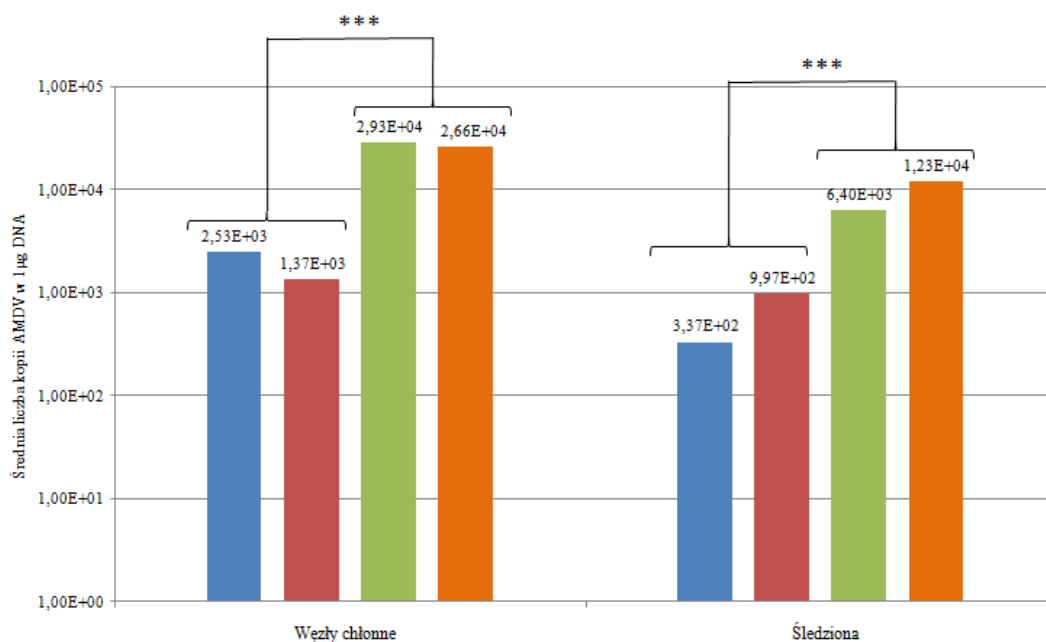
reakcji PCR dla DNA wyizolowanego z próbek środowiskowych, otrzymano wynik dodatni dla pary starterów amplifikującej sekwencje kodującą białko niestrukturalne, dla każdej z badanych prób. W przypadku fragmentu kodującego białko VP2, w dwóch przypadkach otrzymano słaby wynik dodatni, w pozostałych wynik fałszywie ujemny.



Rysunek 2. Ocena czułości reakcji duplex PCR: M-marker wielkości – 100bp, 1 – 1×10^8 , 2 – 5×10^7 , 3 – 1×10^7 , 4 – 1×10^6 , 5 – 1×10^5 , 6 – 1×10^4 , 7 – 1×10^3 , 8 – 1×10^2 , 9 – 5×10^1 , 10 – 1×10^1

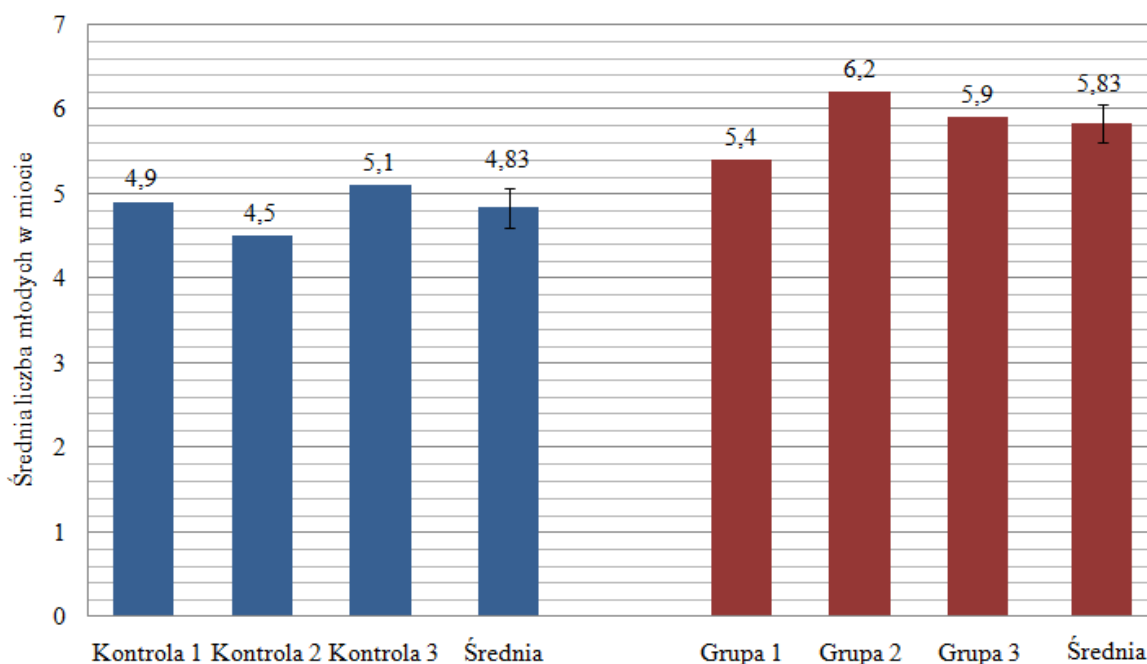
2.5 Badanie wpływu suplementacji methisopriolem na parametry hodowlane

Grupy doświadczalne złożone z młodych i dorosłych samic wykazywały mniejsze o jeden rząd wielkości miano wirusa niż osobniki z grupy kontrolnej, zarówno w śledzionie, jak i węzłach chłonnych. W przypadku śledziony intensywniejsza replikacja wirusa wystąpiła u nerek młodych, niż u samic stada podstawowego, w przypadku węzłów chłonnych tendencja była odwrotna (Wykres 2). Niezależnie od badanej tkanki, po suplementacji methisopriolem zaobserwowano spadek liczby kopii wirusa.



Wykres 2. Średnia liczba kopii DNA wirusa AMDV w śledzionie i węzłach chłonnych nerek z grup kontrolnych i eksperymentalnych. Kolor niebieski – grupa badana osobniki młode, kolor czerwony – grupa badana dorosłe samice, kolor zielony – grupa kontrolna osobniki młode, kolor pomarańczowy - grupa kontrolna dorosłe samice. *** - różnice istotne statystycznie.

W grupie kontrolnej KI na 50 pokrytych prawidłowo samic nerek wykociło się 78%, w grupie KII 80%, a w grupie KIII 82%. Średnia liczba szceniąt w miocie w poszczególnych grupach kontrolnych wynosiła kolejno 4,9; 4,5; 5,1 (średnio $4,83 \pm 0,2$). Natomiast w grupach doświadczalnych, liczących również po 50 samic w każdej, w grupie I prawidłowo wykociło się 86%, w grupie II 94% a w grupie III 90% samic. Średnia liczba szceniąt kształtowała się następująco grupa I - 5,4, grupa II - 6,2 i grupa III - 5,9 (średnio $5,83 \pm 0,26$). Natomiast w dniu 30 października tj. 2 tygodnie przed ubojem sumaryczna średnia liczba szceniąt w miocie w grupach nerek doświadczalnych wynosiła $4,38 \pm 0,31$, natomiast w grupach kontrolnych $3,02 \pm 0,64$. W przypadku grup doświadczalnych masa ciała młodych nerek przed ubojem wynosiła średnio 1896,67 i była wyższa w stosunku do kontroli średnio o 12% (1671,67).



Wykres 3. Średnia liczba młodych w miocie w 10 dniu po wykocie. Kolor niebieski – grupa kontrolna, kolor czerwony – grupa badana. (Kontrola 1 i Grupa 1 złożone ze zwierząt u których miano przeciwciał w teście ELISA oznaczono jako +, Kontrola 2 i Grupa 2 złożone ze zwierząt u których miano przeciwciał w teście ELISA oznaczono jako ++, Kontrola 3 i Grupa 3 złożone ze zwierząt u których miano przeciwciał w teście ELISA oznaczono jako +++)

3 Dyskusja

Wyniki badań, wskazują, że AMDV stanowi istotny i powszechny problem w polskiej jak i światowej hodowli nerek (Farid i wsp., 2010; Farid i wsp., 2012; Jakubczak i wsp., 2016; Knuuttila i wsp., 2009; Kowalczyk i wsp., 2019; Li i wsp., 2012; Manas i wsp., 2001; Persson i wsp., 2015; Reichert i Kostro, 2014a, b; Yamaguchi i Macdonald, 2001). W pracy

potwierdzono skuteczność metod molekularnych opartych na reakcji PCR i qPCR, w detekcji wirusa AMD.

Materiał genetyczny wirusa został wykryty zarówno w tkankach badanych zwierząt, jak i w ich środowisku hodowlanym. Wyniki analizy ilościowej metodą qPCR wskazują na najwyższą ilość materiału genetycznego wirusa w śledzionie (średnio 10^8 kopii na reakcję), co w dużej mierze wynika ze specyfiki patogenu, który wykazuje tropizm do elementów układu limfatycznego (Reichert i Kostro, 2014a). Detekcja wirusa w środowisku fermowym potwierdza konieczność badania nie tylko zwierząt, ale także ich otoczenia, które może być wtórnym rezerwuarem wirusa. Wysoka trwałość AMDV w środowisku, w połączeniu z łatwością rozprzestrzeniania się wirusa, w znaczącym stopniu utrudnia działania dążące do eliminacji patogenu z ferm (Christensen i wsp., 2011). Metoda qPCR, jest szczególnie użyteczna w przypadku identyfikacji dróg przepływu wirusa oraz wykrywania wektorów jego rozprzestrzeniania. Badania przeprowadzone przez Prieto i wsp. (2018) wskazywały na możliwość przenoszenia patogenu przez owady, wraz z odzieżą pracowników ferm, jak i przez pojazdy odwiedzające zakażone fermy (Prieto i wsp., 2014). Analizy przeprowadzone przez Ryt-Hansen i wsp. (2017), w których uwzględniono badania zmienności patogenu między ogniskami choroby, jak i dane epidemiologiczne, wskazywały na potencjalną możliwość przenoszenia wirusa wraz z dostawami paszy, która mogła być zanieczyszczona zainfekowanymi komponentami (Ryt-Hansen i wsp., 2017b). Potwierdzony fakt depozycji wirusa w środowisku polskich ferm wskazuje, że drogi rozprzestrzeniania wirusa, potwierdzone w dostępnym piśmiennictwie, mogą być aktywne również w Polsce.

Wyniki badań wstępnych, obejmujących fermy z dwóch regionów Polski, wskazywały na zróżnicowanie molekularne w sekwencji kodującej białko VP2 wirusa AMD i potwierdzały zasadność prowadzenia dalszych badań nad epidemiologią molekularną patogenu. W kolejnych analizach uwzględniono populację zwierząt wolno żyjących, która jak podaje wielu autorów, stanowi rezerwuar wirusa (Fournier-Chambrillon i wsp., 2004; Manas i wsp., 2001; Yamaguchi i Macdonald, 2001). Analiza sekwencji kodującej fragment białka VP2 wskazuje na znaczne zróżnicowanie wirusa pomiędzy populacją hodowlaną i wolno żyjącą, co może sugerować, że przepływ wirusa między tymi populacjami jest ograniczony. Polimorfizmy dotyczące regionów epitopowych, zmieniające sekwencje aminokwasowe, mogą przekładać się na zróżnicowaną wirulencję patogenu i częściowo tłumaczyć fakt powszechnego utrzymywania się wirusa w populacjach dzikich. Uzyskane wyniki wskazują na wyraźne różnice między grupą dziką i hodowlaną. Warianty fermowe wirusa, mimo, że pochodziły z ferm znacznie od siebie oddalonych, wykazywały wysokie podobieństwo. Podobna sytuacja

ma miejsce w przypadku nerek dzikich, gdzie pomimo różnych miejsc odłowu zauważono wysoką homogenność wirusa.

Wariant infekujący osobniki fermowe jest znacznie bliżej spokrewniony ze szczepami o wysokiej zjadliwości. Wirus atakujący populację wolno żyjącą jest znacznie mniej agresywny, przez co jego rozprzestrzenianie się w populacji może być ułatwione. Porównanie sekwencji epitopowych wskazuje na wysoką zmienność w regionach oddziałujących z przeciwciałami, w obu grupach występują specyficzne zmiany. Wysoką częstość występowania przeciwciał skierowanych przeciw AMDV u osobników dziko żyjących potwierdzają obserwacje Farida (2013), który zauważa, że wirus infekuje także inne zwierzęta drapieżne takie jak lisy, kojoty, ale też gryzonie np. wiewiórki. Yamaguchi i Macdonald (2001), analizując obecność przeciwciał przeciw AMDV w południowej Anglii, uzyskali wynik wskazujący na kontakt z patogenem dla ponad 50% nerek wolno żyjących.

Wirus powodując łagodniejszy przebieg choroby, może krążyć powszechnie w populacji dzikiej, co potwierdza wysoki procent tych nerek u których potwierdzono zakażenie wirusem. Zróżnicowany obraz kliniczny może być efektem zarówno zróżnicowania molekularnego wirusa, jak i adaptacji gospodarza narażonego na długotrwałą ekspozycję na patogen.

Podobny efekt jest obserwowany na fermach trwale zakażonych wirusem AMDV, gdzie infekcja może przyjmować formę subkliniczną. Duża liczebność zwierząt na fermach, ich intensywny obrót w sektorach hodowlanych oraz wysokie tempo mutacji parwowirusów (Shackelton i wsp., 2005) sprzyja ewolucji patogenu i generowaniu nowych wariantów (Canutti i wsp. 2016) o różnym stopniu dostosowania do zajmowanej niszy. W przypadku fermy gdzie choroba wykazywała agresywny przebieg (ferma A) wirus może być wyeliminowany z populacji gospodarza, zarówno z powodu wysokiej śmiertelności zainfekowanych zwierząt, jak i działań hodowców dążących do jego usunięcia. Na fermie B po okresie kolonizacji patogen utrwalił się w populacji, wywołując infekcje trwałe, niepostępujące o przebiegu subklinicznym choroby. Kolonizacja przez patogen nowej niszy ekologicznej często skutkuje gwałtownym przebiegiem infekcji, który jest niekorzystny nie tylko z perspektywy gospodarza, ale też patogenu. W przypadku pierwotnej infekcji, czynnik infekcyjny nie napotyka oporu ze strony układu odpornościowego gospodarza, gwałtownie się replikuje i rozprzestrzenia, wywołując intensywne, ale szybko wygasające ogniska choroby.

W celu pełniejszej charakterystyki wirusa AMD na polskich fermach, przeprowadzono poszerzoną analizę zmienności, obejmującą 27 ferm. Badania potwierdziły znaczny polimorfizm w populacji wirusa choroby aleuckiej na terenie Polski, który wynika

prawdopodobnie z wielokrotnego wprowadzania wirusa z różnych źródeł. Wysokie zróżnicowanie wirusa zostało potwierdzone także w badaniach prowadzonych w Estonii, Finlandii, Danii, czy Chinach, gdzie oprócz wariantów wirusa sprowadzonych z importowanymi zwierzętami wykrywano również warianty endemiczne.

Wyniki sekwencjonowania i analizy bioinformatycznej wskazują na występowanie zbliżonych wariantów wirusa na wszystkich badanych fermach w województwie Zachodnio-Pomorskim, co może być efektem wspólnego dla wszystkich hodowli pierwotnego źródła zakażenia, lub występowania wspólnych dla wszystkich ferm wektorów, które doprowadziły do rozprzestrzeniania się patogenu z pierwotnego ogniska choroby. Małe zróżnicowanie w obrębie grupy, jak też znaczne zróżnicowanie w stosunku do innych polskich izolatów, może być efektem niedawnego pojawienia się tego wariantu wirusa w Polsce. W przypadku AMDV wysokie tempo mutacji sprzyja powstawaniu nowych wariantów (Shackelton i wsp., 2005), dlatego też homogenność patogenu w obrębie całego województwa, może wskazywać, że krótki okres występowania wirusa, uniemożliwił powstanie większej liczby wariantów.

Warianty należące do grup III (województwo wielkopolskie) i IV (Małopolska i Podkarpacie), wykazywały wysokie podobieństwo do wirusa izolowanego w roku 2016 między innymi w Polsce, na Litwie i w Holandii. Stosunkowo wysokie zróżnicowanie wariantów z grupy II w stosunku do zasobów zdeponowanych w bioinformatycznych bazach danych, może wskazywać, na lokalny i endemiczny charakter izolatów AMDV pochodzących ze wschodniej Polski. Izolaty z grup II, III i IV mogą być utrwalone w polskiej populacji nerek hodowlanych, potwierdza to zarówno wysokie zróżnicowanie genetyczne, jak i często trwały i subkliniczny przebieg zakażeń.

Stała i długotrwała ekspozycja na patogen może prowadzić do wykształcenia się mechanizmów redukujących szkodliwy wpływ patogenu. W ten sposób różnice w przebiegu choroby mogą być nie tylko efektem różnic molekularnych między izolatami, ale także adaptacji gospodarza. W Kanadzie podejmowane były próby selekcji nerek pod względem statusu immunologicznego, w celu uzyskania w kolejnych pokoleniach osobników wykazujących zwiększoną odporność na zakażenia AMDV (Farid i Ferns, 2017). Przeciwdziałanie wirusowi AMD powinno uwzględniać nie tylko bezpośrednie działanie przeciwwirusowe, ale także stymulację układu odpornościowego gospodarza. Dlatego też, w związku z brakiem skutecznego leczenia choroby aleuckiej, poszukiwane są alternatywne sposoby walki z chorobą, w postaci immunostymulatorów. W przeprowadzonych badaniach wykazano pozytywny wpływ methisoprinolu na kompensację efektów infekcji wirusem choroby aleuckiej. Różnice w ilości kopii wirusowego DNA w śledzionie i węzłach chłonnych

u nerek grup doświadczalnych, wskazują na istotnie niższą intensywność replikacji AMDV (mniejsza liczba kopii wirusa) w tkankach limfoidalnych, w stosunku do nerek z grup kontrolnych. Preparat wykazuje bezpośrednie działanie antywirusowe poprzez hamujący wpływ na replikację DNA oraz syntezę RNA patogenu (Issrani i wsp., 2013, Siwicki i wsp., 2002), jak i stymulację układu odpornościowego gospodarza. Wyniki Sawickiego i wsp. (2009) oraz Feily (2010), wskazywały, że preparat indukował wzrost aktywności fagocytów występujących w śledzionie oraz wykazywał działanie normalizacyjne względem proliferacji limfocytów, przez co mógł hamować szkodliwe efekty hipergammaglobulinemii. Badania Ahmeda i wsp., (2017) wskazywały, że preparat oparty na pranobeksie inozyny, powodował wzrost frakcji komórek NK (Natural Killers), a w efekcie wspomagał organizm w odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciw wirusom, także w przypadku jednostek z obniżoną odpornością. Berani i wsp., (2016) potwierdzili nie tylko skuteczność preparatu w terapii zakażeń wirusowych układu oddechowego, ale także fakt, że preparat jest bezpieczny dla osobników zażywających.

Działanie preparatu immunostymulującego potwierdziły także badania prowadzone przez Stenzela i wsp., (2014), którzy wykazali, że methisoprinol podawany po infekcji hamował replikację gołębiego wirusa rzekomego pomoru drobiu (PPMV-1). Badacze przypuszczali, że złagodzenie przebiegu choroby, pomimo obecności czynnika infekcyjnego, jest wynikiem hamowania replikacji wirusa i zmniejszeniem liczby jego kopii w zainfekowanej tkance. Wyniki własne, wskazują, że efektem obniżonej replikacji wirusa i immunostymulacyjnego działania preparatu była kompensacja efektów infekcji objawiająca się większą liczebnością miotu oraz wyższą masą zwierząt z grupy doświadczalnej.

Szczególną rolę w eliminacji AMDV z ferm odgrywa czuła i specyficzna diagnostyka. Wysoka zmienność wirusa, sprawia, że amplifikacja z pojedynczą parą starterów może być niewystarczająca do jednoznacznego potwierdzenia bądź wykluczenia infekcji. Wyniki fałszywie ujemne mogą wynikać z polimorfizmu w miejscach wiązania startera, lub różnej wydajności amplifikacji dla poszczególnych starterów. Wykorzystanie dwóch par starterów zwiększa specyficzność reakcji i minimalizuje ryzyko wystąpienia wyników fałszywie ujemnych. Przedstawiona w pracy metoda wykazuje wysoką przydatność do detekcji wirusa w materiale biologicznym, umożliwiając wykrywanie patogenu na poziomie 10^2 kopii, co wydaje się wystarczającym progiem czułości w przypadku badania prób krwi, w tym także prób pulowanych oraz tkanek zwierząt zakażonych. Zastosowanie reakcji do prób środowiskowych jest ograniczone, co wynika prawdopodobnie z niskiego ładunku wirusowego, jak i obecności inhibitorów polimerazy w tego typu materiale badawczym.

4. Podsumowanie i wnioski

Uzyskane w trakcie analiz wyniki, pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

- Wyniki potwierdziły że wirus AMD jest obecny w środowisku (średni ładunek wirusowy = 10^3), jak i organizmach zwierząt hodowlanych i wolno żyjących w Polsce (średni ładunek w śledzionie 10^8).
- Badania przeprowadzone na dwóch różnych fragmentach genomu wirusa (sekwencja kodująca białko niestrukturalne NS1 i strukturalne VP2), wskazują że na polskich fermach występuje wysokie zróżnicowanie wirusa AMD, co może być spowodowane różnymi źródłami infekcji w poszczególnych regionach kraju.
- Populacja wirusa AMD w Polsce jest podzielona na cztery klady, wśród których można wyróżnić zarówno warianty wpisujące się w globalną epidemiologię AMDV, jak i warianty endemiczne, krążące lokalnie, co może wskazywać na co najmniej czterokrotne wprowadzenie patogenu do Polski.
- Infekcja wirusem AMD, przyjmująca formę subkliniczną, charakteryzuje się niższym ładunkiem wirusowym i łagodniejszym przebiegiem choroby, co prawdopodobnie wynika ze stabilizacji układu gospodarz-patogen.
- Detekcja metodą PCR z pojedynczą parą starterów może prowadzić do wyników fałszywie ujemnych, co potwierdza zasadność przeprowadzania reakcji typu multiplex PCR w badaniach diagnostycznych. Przedstawiona w pracy metoda duplex PCR, pozwoliła na detekcję materiału genetycznego wirusa, w próbach biologicznych i środowiskowych
- Techniki molekularne okazały się wartościowym dopełnieniem metod serologicznych, pozwalającym na czułą i specyficzną detekcję AMDV zarówno w materiale biologicznym jak i próbach środowiskowych oraz na analizę epidemiologii molekularnej wirusa AMD.
- Preparat immunostymulujący – methisoprinol, obniżył miano wirusa w tkankach gospodarza średnio o jeden rząd wielkości. Suplementacja preparatem częściowo kompensowała straty powodowane infekcją, poprzez zwiększenie liczebności miotu (średnio o jedno szczenię) oraz wagi młodych nerek (wzrost masy w grupach doświadczalnych o 12%).

Piśmiennictwo:

1. Ahmed, S.R., Newman, A.S., O'Daly, J., Duffy, S., Grafton, G., Brady, C.A., Curnow, S.J., Barnes, N.M., Gordon, J., 2017. Inosine Acedoben Dimepranol promotes an early and sustained increase in the natural killer cell component of circulating lymphocytes: A clinical trial supporting anti-viral indications. *Int Immunopharmacol* 42:108-114.
2. Beran, J., Salapova, E., Spajdel, M., 2016. Inosine pranobex is safe and effective for the treatment of subjects with confirmed acute respiratory viral infections: analysis and subgroup analysis from a Phase 4, randomised, placebo-controlled, double-blind study. *BMC Infect Dis* 16. doi:10.1186/s12879-016-1965-5
3. Bloom, M.E., Best, S.M., Hayes, S.F., Wells, R.D., Wolfinbarger, J.B., McKenna, R., Agbandje-McKenna, M., 2001. Identification of Aleutian mink disease parvovirus capsid sequences mediating antibody-dependent enhancement of infection, virus neutralization, and immune complex formation. *Journal of Virology* 75, 11116-11127.
4. Costello, F., Steenfos, N, Jensen, K.T., Christensen, J., Gottschalck, E., Holm, A., Aasted, B. 1999. Epitope mapping of Aleutian Mink Disease Parvovirus virion protein VP1 and 2. *Scand. J. Immunol.* 49, 347–354. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.1999.00499.x>
5. Canuti, M., O'Leary, K.E., Hunter, B.D., Spearman, G., Ojkic, D., Whitney, H.G., Lang, A.S., 2016. Driving forces behind the evolution of the Aleutian mink disease parvovirus in the context of intensive farming. *Virus Evolution* 2.
6. Dam-Tuxen, R., Dahl, J., Jensen, T.H., Dam-Tuxen, T., Struve, T., Bruun, L., 2014. Diagnosing Aleutian mink disease infection by a new fully automated ELISA or by counter current immunoelectrophoresis: A comparison of sensitivity and specificity. *Journal of Virological Methods* 199, 53-60.
7. Farid, A.H., Rupasinghe, P., Mitchell, J.L., Rouvinen-Watt, K., 2010. A survey of Aleutian mink disease virus infection of feral American mink in Nova Scotia. *Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne* 51, 75-77.
8. Farid, A.H., Zillig, M.L., Finley, G.G., Smith, G.C., 2012. Prevalence of the Aleutian mink disease virus infection in Nova Scotia, Canada. *Preventive Veterinary Medicine* 106, 332-338.
9. Farid, A.H., 2013. Aleutian mink disease virus in furbearing mammals in Nova Scotia, Canada. *Acta Veterinaria Scandinavica* 55.

10. Farid, A.H., Rupasinghe, P.P., 2016. Accuracy of enzyme-linked immunosorbent assays for quantification of antibodies against Aleutian mink disease virus. *Journal of Virological Methods* 235, 144-151.
11. Feily, A., 2010. Methisoprinol: a novel addition to hyper IgE arsenal. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 32:530-531.
12. Fournier-Chambrillon, C., Aasted, B., Perrot, A., Pontier, D., Sauvage, F., Artois, M., Cassiede, J.M., Chauby, X., Dal Molin, A., Simon, C., Fournier, P., 2004. Antibodies to aleutian mink disease parvovirus in free-ranging European mink (*Mustela lutreola*) and other small carnivores from Southwestern France. *Journal of Wildlife Diseases* 40, 394-402.
13. Helmboldt, C.F., Jungherr, E.L., 1958. The Pathology Of Aleutian Disease In Mink. *American Journal of Veterinary Research* 19, 212-222.
14. Issrani, R., Prabhu, N., Keluskar, V., 2013. Oral proliferative verrucous leukoplakia: A case report with an update. *Contemp Clin Dent* 4:258-262. doi:10.4103/0976-237x.114887
15. Jakubczak, A., Kowalczyk, M., Kostro, K., Horecka, B., Jezewska-Witkowska, G., 2016. High molecular polymorphism of the hypervariable region in the VP2 gene of Aleutian mink disease virus. *Acta Virologica* 60, 354-360.
16. Jakubczak, A., Kowalczyk, M., Kostro, K., Jezewska-Witkowska, G., 2017. Comparative molecular analysis of strains of the Aleutian Disease Virus isolated from farmed and wild mink. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 24, 366-371.
17. Jensen, T.H., Christensen, L.S., Chriel, M., Uttenthal, A., Hammer, A.S., 2011. Implementation and validation of a sensitive PCR detection method in the eradication campaign against Aleutian mink disease virus. *J. Virol. Methods* 171, 81–85. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.10.004>.
18. Knuutila, A., Aaltonen, K., Virtala, A.M.K., Henttonen, H., Isomursu, M., Leimann, A., Maran, T., Saarna, U., Timonen, P., Vapalahti, O., Sironen, T., 2015. Aleutian mink disease virus in free-ranging mustelids in Finland - a cross-sectional epidemiological and phylogenetic study. *Journal of General Virology* 96, 1423-1435.
19. Knuutila, A., Uzcategui, N., Kankkonen, J., Vapalahti, O., Kinnunen, P., 2009. Molecular epidemiology of Aleutian mink disease virus in Finland. *Veterinary Microbiology* 133, 229-238.

20. Kowalczyk, M., Horecka, B., Jakubczak, A., 2019. Aleutian Mink Disease Virus in the breeding environment in Poland and its place in the global epidemiology of AMDV. *Virus Research* 270.
21. Kowalczyk, M., Jakubczak, A., Horecka, B., Kostro, K., 2018. A comparative molecular characterization of AMDV strains isolated from cases of clinical and subclinical infection. *Virus Genes* 54, 561-569.
22. Leimann, A., Knuutila, A., Maran, T., Vapalahti, O., Saarma, U., 2015. Molecular epidemiology of Aleutian mink disease virus (AMDV) in Estonia, and a global phylogeny of AMDV. *Virus research* 199, 56-61.
23. Li, Y., Huang, J., Jia, Y., Du, Y., Jiang, P., Zhang, R., 2012. Genetic characterization of Aleutian mink disease viruses isolated in China. *Virus Genes* 45, 24-30.
24. Manas, S., Cena, J.C., Ruiz-Olmo, J., Palazon, S., Domingo, M., Wolfinbarger, J.B., Bloom, M.E., 2001. Aleutian mink disease parvovirus in wild riparian carnivores in Spain. *Journal of Wildlife Diseases* 37, 138-144.
25. Persson, S., Jensen, T.H., Blomstrom, A.-L., Appelberg, M.T., Magnusson, U., 2015. Aleutian mink disease virus in free-ranging mink from Sweden. *PloS one* 10, e0122194-e0122194.
26. Prieto, A., Fernandez-Antonio, R., Diaz-Cao, J.M., Lopez, G., Diaz, P., Alonso, J.M., Morrondo, P., Fernandez, G., 2017. Distribution of Aleutian mink disease virus contamination in the environment of infected mink farms. *Veterinary Microbiology* 204, 59-63.
27. Prieto, A., Manuel Diaz-Cao, J., Fernandez-Antonio, R., Panadero, R., Diaz, P., Lopez, C., Morrondo, P., Diez-Banos, P., Fernandez, G., 2014. Application of Real-Time PCR to detect Aleutian Mink Disease Virus on environmental farm sources. *Veterinary Microbiology* 173, 355-359.
28. Reichert, M., Kostro, K., 2014a. Effect of persistent infection of mink with Aleutian mink disease virus on reproductive failure. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 58, 369-373.
29. Reichert, M., Kostro, K., 2014b. NS1 gene based molecular characteristics of Aleutian mink disease virus circulating in Poland. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 58, 187-191.
30. Ryt-Hansen, P., Hagberg, E.E., Chriel, M., Struve, T., Pedersen, A.G., Larsen, L.E., Hjulsager, C.K., 2017a. Global phylogenetic analysis of contemporary Aleutian mink disease viruses (AMDVs). *Virology Journal* 14.

31. Ryt-Hansen, P., Hjulsager, C.K., Hagberg, E.E., Chriel, M., Struve, T., Pedersen, A.G., Larsen, L.E., 2017b. Outbreak tracking of Aleutian mink disease virus (AMDV) using partial NS1 gene sequencing. *Virology Journal* 14.
32. Shackelton, L.A., Parrish, C.R., Truyen, U., Holmes, E.C., 2005. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 379-384.
33. Siwicki, A.K., Pozet, F., Morand, M., Kazun, B., Trapkowska, S., 2002. In vitro effect of methisoprinol on salmonid rhabdoviruses replication. *Bull Vet Inst Pulawy* 46:53-58
34. Siwicki, A.K., Jung, L., Malaczewska, J., Wojcik, R., 2009. The influence of methisoprinol on the spleen phagocyte and blood lymphocyte activity in rats - in vitro study. *Cent Eur J Immunol* 34:227-231
35. Themudo, G.E., Houe, H., Agger, J.F., Ostergaard, J., Ersboll, A.K., 2015. Identification of biosecurity measures and spatial variables as potential risk factors for Aleutian disease in Danish mink farms (vol 107, pg 134, 2012). *Preventive Veterinary Medicine* 118, 509-509.
36. Wang, Z., Wu, W., Hu, B., Zhang, H., Bai, X., Zhao, J., Zhang, L., Yan, X., 2014. Molecular epidemiology of Aleutian mink disease virus in China. *Virus Research* 184, 14-19.
37. Yamaguchi, N., Macdonald, D.W., 2001. Detection of Aleutian disease antibodies in feral American mink in southern England. *Veterinary Record* 149, 485-488.
38. <http://www.fureurope.eu/>