

## Możliwość wykorzystania technik biologii molekularnej w diagnostyce choroby aleuckiej norek

Marek Kowalczyk, Andrzej Jakubczak

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Katedra Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej,  
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

Norka amerykańska (*Neovison vison*) należy do najpopularniejszych zwierząt futerkowych hodowanych w Polsce, zarówno pod względem skali hodowli, jak i jakości futra (Felska-Błaszczak i in., 2010). Pod względem produkcji skór Polska znajduje się w czołówce producentów europejskich, a jej udział w ogólnej podaży skór futrzarskich w 2012 r. wynosił ponad 11%, plasując nasz kraj na czwartej pozycji wśród krajów europejskich. W 2013 r. Polska dostarczyła na rynek 6,7 mln skór, z czego ponad 90% stanowiły skóry norek. Przemysł futrzarski w roku 2013 wygenerował dochód w wysokości ponad 580 mln złotych (dane z raportu PWC z maja 2014). Istotnym czynnikiem, zmniejszającym dochody hodowców, jest choroba aleucka norek (AMD), wywoływana przez parwowirusa, należącego do rodzaju *Amdovirus* (Huang i in., 2014). Choroba może przybierać zarówno postać nietrwałych zakażeń, jak i mieć przebieg śmiertelny (Li i in., 2012). Najważniejszy dla hodowców jest fakt, że cechuje się ona znacznym obniżeniem parametrów rozrodczych, takich jak plenność i przeżywalność potomstwa; dodatkowo mogą występować spontaniczne ronienia (Reichert i Kostro, 2014 a). Mimo podjętych prób wprowadzania szczepionek (Aasted i in., 1998; Castelruiz i in., 2005), nadal najskuteczniejszymi rozwiązaniami są: profilaktyka, wczesna diagnostyka oraz kontrola materiału hodowlanego pochodzącego z zakupu.

### Klasyczne metody diagnostyki AMDV

Istnieje wiele metod, umożliwiających

diagnostykę i detekcję wirusa, począwszy od prostych metod serologicznych, poprzez testy immunoenzymatyczne, aż po dynamicznie rozwijające się narzędzia biologii molekularnej. Technikami stosowanymi pierwotnie były: próba jodowa, która pozwala na wykrycie gammaglobulinemii (Cho i Greenfield, 1978) oraz elektroforeza surowicy krwi (Knuutila i in., 2009 b). Niespecyficzna metoda jodowa była stosowana już na początku lat 60. XX w. (Henson i in., 1962). Warto wspomnieć istotną rolę, jaką odegrali naukowcy z Instytutu Zootechniki we wprowadzaniu metody jodowej w naszym kraju. Zespół pod kierownictwem profesor Ocetkiewicz (Ocetkiewicz i in., 1972) popularyzował technikę, która ze względu na koszt, prostotę i czas również obecnie może być wykorzystywana jako dodatkowy etap diagnostyczny.

Zarówno próba jodowa, jak i elektroforeza surowicy, ze względu na swoją niską specyficzność, w rutynowej diagnostyce zostały zastąpione bardziej precyzyjnymi technikami. Obecnie najpowszechniej stosowanymi metodami są immunoelektroforeza przeciwpądowa (CIEP) oraz test ELISA (Andersson i Wallgren, 2013; Cepica i Iwamoto, 2012; Farid i in., 2012). Obydwie metody są oparte na reakcji antygen-przeciwciała. Metoda CIEP wykrywa przeciwciała skierowane przeciw wirusowi, detekcja materiału zakaźnego jest możliwa po 5–7 dniach od zakażenia (Bloom i in., 1994; Knuutila i in., 2014). Istotną wadą jest fakt, że metoda wykrywa wyłącznie nadmiar przeciwciał, które pozostają we krwi po utworzeniu kompleksów immunolo-

gicznych (Cepica i Iwamoto, 2012), dlatego niemożliwa jest detekcja zakażeń przejściowych i nietrwałych (Andersson i Wallgren, 2013). Ponadto, immunoelektroforeza przeciwapadowa może dawać wyniki fałszywie dodatnie w przypadku obecności kompleksów przeciwciał, co wskazuje na kontakt z patogenem, a nie musi oznaczać obecności wirusa, który mógł zostać zwalczony (Jensen i in., 2011). Możliwe są również wyniki fałszywie ujemne w przypadku wczesnych etapów choroby, gdy przeciwciała nie osiągają wykrywalnego poziomu (Farid i in., 2012).

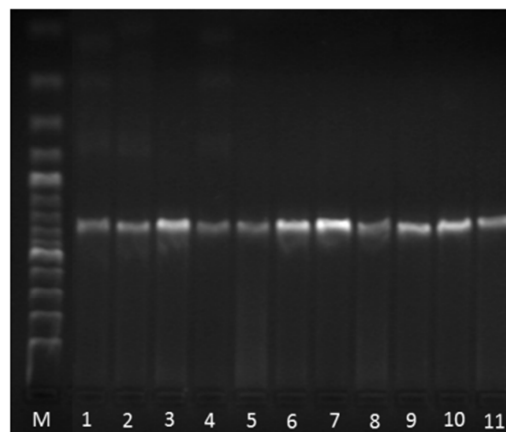
Brak możliwości automatyzacji metody CIEP prowadził do dalszych poszukiwań skutecznych metod diagnostycznych. Efektem tych prób było powstanie testu immunoenzymatycznego (ELISA, EIA), metody również opartej na reakcji antygen-przeciwciała. Niewątpliwymi zaletami tej techniki w stosunku do CIEP są: mniejsza liczba etapów, prowadzących do uzyskania wyniku końcowego, mniejsza szansa uzyskania wyniku fałszywie dodatniego oraz możliwość automatyzacji (Knuutila i in., 2009 b). W przypadku testu immunoenzymatycznego istotny jest wybór antygeny, który reaguje z przeciwciałami obecnymi w surowicy. Dostępne zestawy używają jako antygeny wyhodowanego *in vitro* wirusa AMDV lub samego rekombinowanego białka kasydu – VP2 (Farid i in., 2012). Testy oparte na cząsteczce wirusa wykazują niższą specyficzność zarówno w stosunku do testu opartego na białku strukturalnym, jak i do metody CIEP (Andersson i Wallgren, 2013). Wybór białka VP2 jako antygeny jest uzasadniony m.in. faktem, że decyduje ono w dużej mierze o patogenności wirusa (Li i in., 2012; Sang i in., 2012; Wang i in., 2014 b).

Zautomatyzowane aparaty do przeprowadzania testu ELISA charakteryzują się wysoką czułością i specyficznością, przy jednoczesnym obniżeniu kosztów i pracochłonności (Knuutila i in., 2014). Metoda, pomimo niewątpliwych zalet, wydaje się niewystarczająca, aby uwolnić fermę od wirusa AMD. Metody immunologiczne badają poziom przeciwciał, dlatego ich zasięg diagnostyczny jest ograniczony do krwi. Wirus może występować zarówno w wydalinach, jak i wydzielinach nerek, a przez to zanieczyszczać środowisko (Cepica i Iwamoto, 2012), co w połączeniu z jego wysoką trwałością (Hussain i in., 2014) może powodować zakaże-

nia, mimo pozbycia się chorych zwierząt. Obecność wirusa w środowisku może skutkować również przenoszeniem go przez personel wraz ze sprzętem i odzieżą (Prieto i in., 2014).

### Molekularne metody diagnostyki AMDV

Znaczny postęp w diagnostyce mogą stanowić metody molekularne, pozwalające nie tylko na potwierdzenie bądź wykluczenie zakażenia, ale także, dzięki narzędziom bioinformatycznym i bazom danych, na precyzyjną identyfikację szczepu, a nawet śledzenie źródła zakażenia i kierunku rozprzestrzeniania się wirusa pomiędzy fermami. Podstawową techniką, używaną w pracy z kwasami nukleinowymi, jest odkryta w latach 80. XX w. amplifikacja materiału metodą łańcuchowej reakcji polimerazy – PCR (*polymerase chain reaction*) (Mullis, 1990). Obecnie ta metoda jest używana jako etap wstępny dla bardziej wysublimowanych i precyzyjnych technik, ale sama w sobie również może być wykorzystywana w diagnostyce. Głównym celem PCR jest namnożenie specyficznego fragmentu DNA, jednak stosując rozdział elektroforetyczny na żelu oraz późniejszą wizualizację możliwe jest także stwierdzenie bądź wykluczenie obecności materiału wirusowego (rys. 1).



Rys. 1. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji amplifikacji sekwencji kodującej fragment białka VP2 o długości 611 pz, M – marker wielkości, ścieżki 1–11 – izolaty pochodzące z zainfekowanych ferm (badania własne)

Fig. 1. Electrophoretic separation of amplification products of sequence coding fragment of VP2 protein of 611 bp, M – size marker, lanes 1–11 – isolates originating from infected farms (own research)

Z wprowadzeniem metody PCR do diagnostyki wiązano ogromne nadzieje, jednak Cepica i Iwamoto (2012) stwierdzili, że entuzjazm wywołany próbami zastosowania metody do rutynowej diagnostyki był przedwczesny. PCR, mimo znacznej czułości i specyficzności, nie był w stanie oddać faktycznego stanu sanitarnego ferm. Duża czułość sprawia, że metoda jest również podatna na nawet niewielką kontaminację. Argument ten nie może jednak w sposób jednoznaczny dyskwalifikować PCR jako metody diagnostycznej, tym bardziej, że jest ona z powodzeniem stosowana do wykrywania materiału wirusowego we krwi, tkankach czy wydzielinach zwierząt zakażonych (Jensen i in., 2011; Jensen i in., 2014; Pennick i in., 2005). Reakcja łańcuchowa polimerazy w stosunku do elektroforezy przeciwwądrowej charakteryzuje się czułością na poziomie prawie 95% oraz specyficznością bliską 98%. Różnice w czułości najprawdopodobniej wynikają ze zbyt niskiej ilości materiału wirusowego lub nietrwałego charakteru infekcji. Istnieją prace, stwierdzające podwyższony poziom przeciwciał pomimo usunięcia materiału wirusowego (Jensen i in., 2011). Dokonywano także prób monitorowania przebiegu choroby poprzez cykliczne badanie materiału biologicznego od zakażonych zwierząt (wymaz z okolic nosa, krew, odchody i ślina). Również w tym przypadku metoda PCR okazała się skuteczna (Jensen i in., 2014). Produkty zoptymalizowanej reakcji PCR stanowią dobre źródło informacji we wczesnych etapach pracy diagnostycznej oraz doskonały materiał do dalszych analiz.

Ciekawym rozwiązaniem wydaje się stosunkowo niedawno wprowadzony do diagnostyki nanoPCR (Li i in., 2005). W tej modyfikacji w reakcję są zaangażowane nanocząsteczki, które w buforze wykazują lepszą przewodność cieplną, dzięki czemu umożliwiają szybsze osiągnięcie temperatury docelowej. Efektem takiego działania jest wzrost czułości (około 100 razy w porównaniu do klasycznego PCR) i specyficzności (Cui i in., 2014). Metoda ta dała pozytywne efekty m.in. przy wykrywaniu wirusów atakujących świnie (Cui i in., 2014; Wang i in., 2014 a) czy wirusa wścieklizny rzekomej u prosiąt (Ma i in., 2013), a także przy detekcji parwowirusa, wywołującego zapalenie jelit u norek (Wang i in., 2015). NanoPCR może pomóc w zwiększeniu wykrywalności choroby aleuc-

kiej. Wykrywalność na poziomie niemal 60 kopii wirusa (Cui i in., 2014) pozwala na znacznie czulszą detekcję z trudnego materiału, jakim są przypadki AMDV krew czy ślina.

Techniką molekularną, użyteczną przy detekcji wirusa choroby aleuckiej, jest klasyczne sekwencjonowanie metodą Sanger (Sanger i in., 1977). Mimo że zasada techniki jest niezmienna od przeszło 40 lat, to jest ona nadal aktualna i powszechnie stosowana. Wynikiem sekwencjonowania produktów PCR jest sekwencja nukleotydów (rys. 2), pozwalająca na jednoznaczny identyfikację nie tylko jednostki chorobowej, ale też szczepu. Genom parwowirusa choroby aleuckiej składa się z około 4,7 kbp (Cheng i in., 2009; Jensen i in., 2011), jednak do celów diagnostycznych nie jest konieczne sekwencjonowanie całego genomu. Szczególnie istotne znaczenie ma białko kapsydu – VP2, które w dużym stopniu decyduje o antygenowości oraz patogenności wirusa (Li i in., 2012; Sang i in., 2012; Wang i in., 2014 b). Dodatkowo, w sekwencji kodującej to białko znajduje się region hipermienny, który pozwala na rozróżnienie szczepów patogennych od niepatogennych oraz badanie relacji filogenetycznych (Jahns i in., 2010).

Metoda, ze względu na stosunkowo wysokie koszty, nie jest stosowana rutynowo w diagnostyce, jednak ilość informacji przez nią generowana wykracza poza zadania diagnostyki. Wykorzystanie narzędzi bioinformatycznych (m.in. BLAST) umożliwia identyfikację i porównanie otrzymanych sekwencji z izolatami, dostępnymi w publicznych bazach danych sekwencji zarówno nukleotydowych, jak i aminokwasowych (rys. 3).

W wielu krajach prowadzone są badania, które mają na celu określenie sekwencji wariantów genetycznych wirusa atakującego fermy. Tego typu działania podjęto między innymi w Danii (Christensen i in., 2011), Szwecji (Olofsson i in., 1999), Estonii (Leimann i in., 2015), Finlandii (Knuutila i in., 2009 a), Irlandii (Jahns i in., 2010), Chinach (Li i in., 2012; Sang i in., 2012; Wang i in., 2014 b), a także Polsce (Reichert i Kostro, 2014 b). Uzyskane z różnych ferm sekwencje wirusów mogą pomóc przy tworzeniu drzew filogenetycznych oraz map zakażeń. Jest to rozwiązanie korzystne dla hodowców, którzy mogą próbować odnaleźć źródło zakażenia wśród ferm dostarczających materiał hodowlany.



Dalszy rozwój technik sekwencjonowania zaowocował powstaniem metod sekwencjonowania drugiej i trzeciej generacji (NGS), które umożliwiają poznanie sekwencji całych genomów (Marguerat i in., 2008). Technologie NGS są nazywane wysokoprzepustowymi. Jest to zarówno istotna zaleta, gdyż z jednej próbki można otrzymać dużą liczbę informacji, jak i wada, ponieważ tak ogromna liczba danych jest trudna zarówno do późniejszej obróbki, jak i analizy. Technikę NGS zastosowano między innymi do analizy filogenetycznej parwowirusa infekującego psy (Perez i in., 2014). Sekwencjonowanie nowej generacji może być użyteczne zarówno w analizach wirusów atakujących zwierzęta dzikie (analizy metagenomiczne np. mikroflory zawartej w odchodach), jak i analizach środowiskowych (Cantalupo i in., 2011). Analiza taka może dać duży wgląd w stan sanitarny fermy. Uzyskane wyniki zawierają pełny profil potencjalnych czynników chorobotwórczych, znajdujących się w danym środowisku, a w związku z tym pozwalają na poznanie całego wiromu (Mihalov-Kovacs i in., 2014).

W przypadku przedstawicieli dziko żyjących drapieżników, możliwe jest stwierdzenie bioróżnorodności patogenów, infekujących dany gatunek oraz, co szczególnie interesujące, analiza przepływu patogenów między populacjami wolno żyjącymi a hodowlanymi (Bodewes i in., 2014). Należy przyznać, że techniki nowej generacji nie są szczególnie użyteczne jako narzędzie diagnostyczne dla pojedynczego patogenu, jednak dają dobry wgląd w profil mikrobiologiczny fermy. Dodatkowo, są doskonałym źródłem informacji dla badaczy, zajmujących się analizami filogenetycznymi, przepływem oraz zmiennością czynników patogennych. Postępy w dziedzinie biologii molekularnej prowadzą do systematycznego obniżania cen, co daje nadzieję na upowszechnienie tych niezwykle informatywnych technik w rutynowej diagnostyce (Barzon i in., 2011).

Techniką, opartą na łańcuchowej reakcji polimerazy jest Real-Time PCR – PCR w czasie rzeczywistym. Pozwala na śledzenie przebiegu choroby, efektywności leczenia, a także na diagnostykę. Próby użycia tej techniki w diagnostyce chorób wirusowych prowadzono już na początku XXI wieku w przypadku pryszczycy u świń (Alexandersen i in., 2001) oraz później

do detekcji parwowirusów psich i wilczych (Kumar i Nandi, 2010; Mech i in., 2012). Metoda była stosowana także do diagnostyki zwierząt futerkowych; jej użycie umożliwiło wykrycie przyczyny etiologicznej ropnego zapalenia skóry między innymi u norek (Nordgren i in., 2014). Znaczna czułość i specyficzność pozwala na jej zastosowanie do analizy próbek środowiskowych. Badania tego typu były również z sukcesami prowadzone w detekcji parwowirusa choroby aleuckiej; obejmowały analizę powierzchni użytkowych oraz wyposażenia ferm (Prieto i in., 2014). Autorzy przeprowadzili szczegółową analizę możliwości transferu wirusa przez personel, sprzęt czy dostawców paszy i wykrywania patogenu w środowisku hodowlanym na bardzo wysokim poziomie detekcji. PCR w czasie rzeczywistym może być użytecznym narzędziem w określaniu stanu sanitarnego ferm, które mogą stanowić rezerwuar wirusa, mimo braku widocznych objawów zakażeń u zwierząt. Jest to szczególnie istotne w przypadku uwalniania ferm od wirusa AMDV, gdyż nawet w przypadku eliminacji zainfekowanych zwierząt wirus może utrzymywać się w środowisku. W tym przypadku zakup materiału hodowlanego z fermy wolnej od AMDV i wprowadzenie ich do obiektu, w którym występował wirus, bez szczegółowej analizy stanu sanitarnego i gruntownie przeprowadzonej dezynfekcji, może prowadzić do transferu patogenu na nowo wprowadzone, wolne od wirusa zwierzęta. Metoda Real-Time PCR umożliwia detekcję wirusa w próbkach środowiskowych z czułością, pozwalającą na wykrycie kilku kopii.

### Podsumowanie

Metody CIEP oraz test ELISA wciąż pozostają złotym standardem w diagnostyce AMDV. Dynamiczny rozwój biologii molekularnej oraz bioinformatyki daje jednak nadzieję na coraz powszechniejsze stosowanie tych metod do wczesnego wykrywania zachorowań. Metody te mogą być także użyteczne podczas prób monitorowania przebiegu choroby oraz do analizy skuteczności potencjalnych prób leczenia w czasie rzeczywistym. Ponadto, zastosowanie narzędzi biologii molekularnej daje możliwości daleko wykraczające poza diagnostykę. Zastosowanie odpowiednich technik pozwala na monitorowanie stanu sanitarnego ferm poprzez ana-

lizę próbek środowiskowych. Metody sekwen-  
cjonowania w połączeniu z bazami bioinforma-  
tycznymi umożliwiają poznawanie sekwencji  
nukleotydowych patogenu, tworzenie map filo-  
genetycznych, śledzenie ewentualnych źródeł  
zakażenia oraz badanie przepływu patogenu

między populacjami hodowlanymi. Narzędzia  
oferowane przez biologię molekularną mogą  
mieć istotny wkład w uwalnianie ferm od wirusa  
AMD oraz ochronę przed wprowadzaniem pato-  
genu do hodowli dzięki rutynowej diagnostyce  
nowego materiału hodowlanego.

### Literatura

- Aasted B., Alexandersen S., Christensen J. (1998). Vaccination with Aleutian mink disease parvovirus (AMDV) capsid proteins enhances disease, while vaccination with the major non-structural AMDV protein causes partial protection from disease. *Vaccine*, 16: 1158–1165.
- Alexandersen S., Oleksiewicz M.B., Donaldson A.I. (2001). The early pathogenesis of foot-and-mouth disease in pigs infected by contact: a quantitative time-course study using TaqMan RT-PCR. *J. Gen. Virol.*, 82: 747–755.
- Andersson A.M., Wallgren P. (2013). Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assays for serodiagnosis of Aleutian mink disease virus infection in mink. *Acta Vet. Scand.*, 55: 1–6.
- Barzon L., Lavezzo E., Militello V., Toppo S., Palu G. (2011). Applications of next-generation sequencing technologies to diagnostic virology. *Int. J. Mol. Sci.*, 12: 7861–7884.
- Bloom M.E., Kanno H., Mori S., Wolfenbarger J.B. (1994). Aleutian mink disease – Puzzles and paradigms. *Infect. Agents Dis.*, 3: 279–301.
- Bodewes R., Ruiz-Gonzalez A., Schapendonk C.M.E., Brand J.M.A. van den, Osterhaus A.D.M.E., Smits S.L. (2014). Viral metagenomic analysis of feces of wild small carnivores. *Virol. J.*, 11: 422X–11.
- Cantalupo P.G., Calgua B., Zhao G., Hundesa A., Wier A.D., Katz J.P., Grabe M., Hendrix R.W., Girones R., Wang D., Pipas J.M. (2011). Raw sewage harbors diverse viral populations. *MBio*, 2 (5): e00180-11.
- Castelruiz Y., Blixenkrone-Moller M., Aasted B. (2005). DNA vaccination with the Aleutian mink disease virus *NS1* gene confers partial protection against disease. *Vaccine*, 23: 1225–1231.
- Cepica A., Iwamoto T. (2012). Field evaluation of CIEP and PCR detection/removal control methods of Aleutian mink disease (AD) in Canada. *Proc. Xth Int. Sci. Congress in fur animal production*. Wageningen Academic Publishers.
- Cheng F., Chen A.Y., Best S.M., Bloom M.E., Pintel D., Qiu J. (2009). The capsid proteins of Aleutian mink disease virus (AMDV) activate caspases and are specifically cleaved during infection. *J. Virol.*, 84: 2687–2696, doi: 10.1128/jvi.01917-09.
- Cho H.J., Greenfield J. (1978). Eradication of Aleutian disease of mink by eliminating positive counter-immunoelectrophoresis test reactors. *J. Clin. Microbiol.*, 7: 18–22.
- Christensen L.S., Gram-Hansen L., Chriel M., Jensen T.H. (2011). Diversity and stability of Aleutian mink disease virus during bottleneck transitions resulting from eradication in domestic mink in Denmark. *Vet. Microbiol.*, 149: 64–71.
- Cui Y., Wang Z., Ma X., Liu J., Cui S. (2014). A sensitive and specific nanoparticle-assisted PCR assay for rapid detection of porcine parvovirus. *Let. Appl. Microbiol.*, 58: 163–167.
- DNA Baser Sequence Assembler v4.x (2014). *Hercule BioSoft*, [www.DnaBaser.com](http://www.DnaBaser.com)
- 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. *Prev. Vet. Med.*, 106: 332–338.
- Felska-Błaszczuk L., Sulik M., Dobosz M. (2010). Wpływ wieku i odmiany barwnej na wskaźniki rozrodu norek (*Neovison vison*). *Acta Sci. Pol., Zoot.*, 9 (4): 225–230.
- Henson J.B., Gorham J.R., Leader R.W. (1962). A field test for Aleutian disease – preliminary report. *Nat. Fur News*, 34, 8.
- Huang Q., Luo Y., Cheng F., Best S.M., Bloom M.E., Qiu J. (2014). Molecular characterization of the small nonstructural proteins of parvovirus Aleutian mink disease virus (AMDV) during infection. *Virology*, 452: 23–31.
- Hussain I., Price G.W., Farid A.H. (2014). Inactivation of Aleutian mink disease virus through high tem-

- perature exposure *in vitro* and under field-based composting conditions. *Vet. Microbiol.*, 173: 50–58.
- Jahns H., Daly P., McElroy M.C., Sammin D.J., Bassett H.F., Callanan J.J. (2010). 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.
- 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.
- Jensen T.H., Hammer A.S., Chriel M. (2014). Monitoring chronic infection with a field strain of Aleutian mink disease virus. *Vet. Microbiol.*, 168: 420–427.
- Knuutila A., Uzategui N., Kankkonen J., Vapalahti O., Kinnunen P. (2009 a). Molecular epidemiology of Aleutian mink disease virus in Finland. *Vet. Microbiol.*, 133: 229–238.
- Knuutila A., Aronen P., Saarinen A., Vapalahti O. (2009 b). Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant VP2 capsids for the detection of antibodies to Aleutian mink disease virus. *Clin. Vaccine Immunol.*, 16: 1360–1365.
- Knuutila A., Aronen P., Eerola M., Gardner I.A., Virtala A.-M.K., Vapalahti O. (2014). 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 (1): 141.
- Kumar M., Nandi S. (2010). Development of a SYBR Green based real-time PCR assay for detection and quantitation of canine parvovirus in faecal samples. *J. Virol. Methods*, 169: 198–201.
- 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 Res.*, 199: 56–61.
- Li H.K., Huang J.H., Lv J.H., An H.J., Zhang X.D., Zhang Z.Z., Fan C.H., Hu J. (2005). Nanoparticle PCR: Nanogold-assisted PCR with enhanced specificity. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44: 5100–5103.
- 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.
- Ma X., Cui Y., Qiu Z., Zhang B., Cui S. (2013). A nanoparticle-assisted PCR assay to improve the sensitivity for rapid detection and differentiation of wild-type pseudorabies virus and gene-deleted vaccine strains. *J. Virol. Methods*, 193: 374–378.
- Marguerat S., Wilhelm B.T., Baehler J. (2008). Next-generation sequencing: applications beyond genomes. *Biochem. Soc. Trans.*, 36: 1091–1096.
- Mech L.D., Almberg E.S., Smith D., Goyal S., Singer R.S. (2012). Use of real-time PCR to detect canine parvovirus in feces of free-ranging wolves. *J. Wildl. Dis.*, 48: 473–476.
- Mihalov-Kovacs E., Feher E., Martella V., Banyai K., Farkas S.L. (2014). The fecal virome of domesticated animals. *Virus Dis.*, 25: 150–157.
- Mullis K.B. (1990). Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, 48: 579–582.
- Nordgren H., Aaltonen K., Sironen T., Kinnunen P.M., Kivisto I., Raunio-Saarnisto M., Moisander-Jylha A.-M., Korpela J., Kokkonen U.-M., Hetzel U., Sukura A., Vapalahti O. (2014). Characterization of a new epidemic necrotic pyoderma in fur animals and its association with *Arcanobacterium phocae* infection. *Plos One*, 9(10): e110210.
- Ocetkiewicz J., Stefan, J.W., Wojtacha H. (1972). Wartość metod rozpoznawczych choroby aleuckiej i ich zastosowania w hodowli norek. *Acta Agr. Silv., Ser. Agr.*, 122: 33–45.
- Olofsson A., Mittelholzer C., Berndtsson L.T., Lind L., Mejerland T., Belak S. (1999). Unusual, high genetic diversity of Aleutian mink disease virus. *J. Clin. Microbiol.*, 37: 4145–4149.
- Pennick K.E., Stevenson M.A.M., Latimer K.S., Ritchie B.W., Gregory C.R. (2005). Persistent viral shedding during asymptomatic Aleutian mink disease parvoviral infection in a ferret. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 17: 594–597.
- Perez R., Calleros L., Marandino A., Sarute N., Iraola G., Grecco S., Blanc H., Vignuzzi M., Isakov O., Shomron N., Carrau L., Hernandez M., Francia L., Sosa K., Tomas G., Panzera Y. (2014). Phylogenetic and genome-wide deep-sequencing analyses of canine parvovirus reveal co-infection with field variants and emergence of a recent recombinant strain. *Plos One*, 9(11): e111779.

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. *Vet. Microbiol.*, 173: 355–359.

Reichert M., Kostro K. (2014 a). Effect of persistent infection of mink with Aleutian mink disease virus on reproductive failure. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 58: 369–373.

Reichert M., Kostro K. (2014 b). *NSI* gene based molecular characteristics of Aleutian mink disease virus circulating in Poland. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 58: 187–191.

Sang Y., Ma J., Hou Z., Zhang Y. (2012). Phylogenetic analysis of the *VP2* gene of Aleutian mink disease parvoviruses isolated from 2009 to 2011 in China. *Virus Genes*, 45: 31–37.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463–5467.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 30: 2725–2729.

Wang X., Bai A., Zhang J., Kong M., Cui Y., Ma X., Ai X., Tang Q., Cui S. (2014 a). A new nanoPCR molecular assay for detection of porcine bocavirus. *J. Virol. Methods*, 202: 106–111.

Wang Z., Wu W., Hu B., Zhang H., Bai X., Zhao J., Zhang L., Yan X. (2014 b). Molecular epidemiology of Aleutian mink disease virus in China. *Virus Res.*, 184: 14–19.

Wang J., Cheng Y., Zhang M., Zhao H., Lin P., Yi L., Tong M., Cheng S. (2015). Development of a nanoparticle-assisted PCR (nanoPCR) assay for detection of mink enteritis virus (MEV) and genetic characterization of the *NSI* gene in four Chinese MEV strains. *BMC Vet. Res.*, 11: 1.

Wpływ ekonomiczny branży hodowców zwierząt futerkowych na gospodarkę Polski, raport PWC, maj 2014.

## THE POSSIBILITY OF USING TECHNIQUES OF MOLECULAR BIOLOGY IN THE DIAGNOSIS OF ALEUTIAN MINK DISEASE

### Summary

A significant problem for farmers is the Aleutian mink disease caused by a parvovirus belonging to the genus *Amdovirus*. The disease may take the form of a short-lived infection or be lethal. The most important for breeders is the fact that the disease is characterized by a significant reduction in reproductive traits and spontaneous abortions. In spite of attempts to introduce vaccines, still the most effective solutions are prevention, early diagnosis, and control of purchased animal material. There are many methods to detect the virus, from simple serological methods, through immunocytochemistry, to the rapidly developing molecular biology tools. Immunoassays measure serum antibodies and thus their coverage is limited to diagnostic blood. Because the virus may



be present in both the excretions and secretions of minks, it may contaminate the environment. Significant progress in diagnosis could be obtained with molecular methods, which not only confirm or exclude the infection, but also allow identifying the strain, and even trace the source of the infection. Tools offered by molecular biology may have a significant contribution to the elimination of AMDV from the farms, and protection against the introduction of the pathogen into the culture through routine diagnostics.

Fot. internet