

Analiza molekularna genu hemaglutyniny wirusa nosówki izolowanego z klinicznych przypadków choroby od lisów i psów

ŁUKASZ ADASZEK, STANISŁAW WINIARCZYK,
ŁUKASZ JANKOWSKI, JOANNA MAJ, JERZY ZIĘTEK

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Adaszek Ł., Winiarczyk S., Jankowski Ł., Maj J., Ziętek J.

Molecular analysis of CDV hemagglutinin gene isolated from clinical cases of distemper in foxes and dogs

Summary

The aim of the study was to detect and characterize the canine distemper virus isolated from 4 foxes and 6 dogs, naturally infected in Poland, as well as from two vaccines. A 200-bp fragment of the CDV H gene was amplified and sequenced. Sequencing of the PCR products from the isolates led to the identification of 4 groups. The most numerous group No. 1 was represented by virus strains isolated from 4 foxes and 4 dogs. In group No. 2 there were two sequences of CDV isolated from two dogs. These sequences varied from group 1 by transitions in positions 133 and 135. The isolates from groups 1 and 2 showed significant differences of nucleotide as well as amino acid sequences in comparison with the isolates obtained from vaccines and with various CDV sequences obtained from GenBank. The results may indicate the appearance of new CDV variants in eastern Poland

Keywords: CDV, RT-PCR, N-gen, sequencing

Nosówka psów (*febris catarrhalis infectiosa canum*) jest wysoce zaraźliwą, ogólnoustrojową, gorączkową chorobą wirusową, przebiegającą wśród objawów niezżytu błon śluzowych przewodu pokarmowego, układu oddechowego i nerwowego, którym towarzyszą wtórne zakażenia, głównie bakteryjne (1). Czynnikiem etiologicznym choroby jest wirus nosówki (CDV), należący do rodzaju *Morbillivirus* znajdującego się w obrębie rodziny *Paramyxoviridae*. Wykazuje on szerokie spektrum zakażeń dla wielu gatunków zwierząt mięsożernych i może przyczyniać się do znacznej depopulacji niektórych z nich (11). Materiał genetyczny CDV stanowi pojedyncza nić RNA o wielkości około 15 616 nukleotydów. W obrębie genomu zlokalizowanych jest sześć genów kodujących: białko osłonki (M), dwie glikoproteiny (hemaglutynina-H oraz białko fuzyjne F), dwa białka biorące udział w replikacji (fosfoproteina P i białko L) oraz białko nukleokapsydu-N (12). Porównując sekwencje poszczególnych genów kodujących białka CDV wykazano, że najczęściej różnice pomiędzy referencyjnymi szczepami i izolatami wirusa nosówki wykazywane są w obrębie genów: hemaglutyniny, białka fuzyjnego F oraz nukleoproteiny. Przypuszcza się, że mutacje powstające w obrębie tych genów mogą być przyczyną występowania nosówki, zwłaszcza u psów, mimo powszechnie pro-

wadzonego programu szczepień tych zwierząt na świecie (13).

Hemaglutynina jest powierzchniową glikoproteiną wirusa nosówki o długości 8-12 nm i masie cząsteczkowej 76 kDa. Odpowiada ona za przyłączenie się wirusa do odpowiedniego receptora znajdującego się na powierzchni komórki, a także bierze udział w aglutynacji erytrocytów ssaków, nie posiada natomiast właściwości neuraminidazowych, jak u wirusów z rodzaju *Parainfluenza*. Indukuje powstawanie w organizmie zakażonych zwierząt przeciwciał anty CDV. Z racji swej lokalizacji białko to narażone jest w większym stopniu na działanie czynników mutagennych niż np. nukleoproteina, co z kolei wpływa na jego dużą zmienność, u podstawy której leżą zmiany w sekwencji nukleotydowej genu kodującego H (5, 6).

Celem badań była analiza molekularna fragmentu genu hemaglutyniny CDV izolowanego z klinicznych przypadków nosówki lisów i psów.

Materiał i metody

Przedmiotem badań były lisy srebrzyste i psy z objawami nosówki. Lisy pochodziły z fermy zlokalizowanej na terenie wschodniej Polski, na której u chorych klinicznie zwierząt obserwowano objawy duszności, zapaleń spojówek, ronień u samic oraz pojedyncze padnięcia u szceniąt. U 2 sztuk

zaobserwowano objawy nerwowe. Obsadę fermę, stada podstawowego stanowiło: 60 samic i 11 samców lisów srebrzystych. Materiał do badań w kierunku nosówki stanowiły narządy wewnętrzne pobrane od 7 padłych zwierząt (wątroba, nerki, płuca) oznaczone jako próbki nr 001-007.

Psy, w liczbie 10 (6 samców i 4 samice w wieku 2 miesięcy-1,5 roku, oznaczone numerami 008-017) pochodziły z terenu województwa lubelskiego. Zwierzęta nie były szczepione przeciwko nosówce, natomiast do Kliniki Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie zostały zgłoszone z objawami gorączki, silnej duszności, zapalenia spojówek, braku apetytu i odwodnienia. Krew do badań pobierano do próbek z EDTA.

Izolacja leukocytów z pełnej krwi. Leukocyty izolowano z pełnej krwi przy użyciu odczynnika Histopaque (Sigma). Krew w ilości 3 ml nawarstwiano na 3 ml odczynnika, po czym wirowano przez 30 min. przy 1490 obrotów/min., w temperaturze 20°C. Frakcję leukocytów przepłukiwano 3-krotnie buforem PBS, osadzano przy 1178 obrotów/min. przez 10 min. (Sigma 3K15, rotor Nr. 11133). Osad leukocytów zawieszano w 500 µl PBS (15).

Izolacja RNA z leukocytów. Do izolacji całkowitego RNA z leukocytów wykorzystano odczynnik Trizol LS (Invitrogen). Do 250 µl zawiesiny leukocytów wprowadzono 750 µl Trizol. Po 5-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej do próbek dodawano 200 µl chloroformu, wirowano 15 minut przy 10 000 obrotów/min., w temperaturze 4°C. Powstałą fazę wodną przenoszono do 500 µl izopropanolu i inkubowano w temperaturze -20°C przez 24 h. Następnie próbki wirowano w 4°C przy 14 000 obrotów/min., przez 45 minut. Wirusowe RNA wytrącano 70% etanolem, a uzyskany precipitat zawieszano w 20 µl wody (15).

Izolacja RNA z narządów wewnętrznych padłych lisów. Izolację RNA wirusa nosówki przeprowadzano z wątroby, nerek, płuc padłych szczeniąt. Skrawki tkanek o masie 10 g zalewano 50 ml płynu Eagle'a, po czym poddawano je rozdrobnieniu w homogenizatorze MPW-120. 250 µl zawiesiny tkanek dodawano do 750 µl Trizolu, po czym dalsze etapy izolacji RNA przebiegały jak w przypadku izolacji z leukocytów.

Startery reakcji PCR. W badaniach wykorzystano parę starterów swoistych dla genu białka hemaglutyniny CDV – H13: 5'-CAAGACAAGGTGGGTGCCTT-3' i H18: 5'-CTTGGTGAAATCGAACTCCA-3' (10), które umożliwiały amplifikację odcinka genu o długości ok. 200 par zasad.

Reakcja odwrotnej transkrypcji. Mieszaninę składającą się z 5 µl wyizolowanego, całkowitego RNA, 9,5 µl wody i 1 µl dNTP₆ (Invitrogen) denaturowano w temperaturze 65°C przez 5 minut, po czym umieszczano na 5 minut w łaźni lodowej. Następnie dodawano: 5 µl buforu dla odwrotnej transkryptazy (Fermentas); 2,5 µl dNTP (2 mM); 1,0 µl inhibitora RNA-zy (10 u/µl, Fermentas); 1,0 µl odwrotnej transkryptazy (200 u/µl, Fermentas). Syntezę cDNA przeprowadzano w temperaturze 50°C przez 30 minut w termocyklerze Biometra. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w 94°C przez 5 minut.

Reakcja PCR. Amplifikację uzyskanego cDNA przeprowadzono w 50 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej: 31,5 µl wody, 5 µl buforu dla Taq polimerazy, 1 µl dNTP (10 mM), 1 µl każdego ze starterów H13 i H18 (końcowa koncentracja 50 pM), 5 µl MgCl₂ (25 mM), 0,5 µl polimerazy DNA Taq w stężeniu 5 u/µl (Fermentas), oraz 5 µl matrycy (zsyn-

tetyzowanej wcześniej nici cDNA). Reakcja PCR składała się z 40 cykli: denaturacji nici w 94°C przez 30 sekund, przyłączenia starterów w 55°C przez 30 sekund i wydłużenia nici w 68°C przez 1 minutę. Reakcję RT-PCR przeprowadzano z zastosowaniem kontroli dodatniej i ujemnej. Kontrolę dodatnią stanowił materiał genetyczny CDV izolowany z inaktywowanych szczepionek (Canivac, Vangaurd) w sposób analogiczny do materiału izolowanego z tkanek padłych lisów. Kontrolę ujemną stanowiło DNA wyizolowane z krwi zdrowego psa.

Elektroforeza. Uzyskane produkty reakcji RT-PCR były analizowane metodą elektroforezy w 1% żelu agarozowym, w buforze TBE przy 10 V/cm przez 50 minut. Wielkość produktów amplifikacji określano w odniesieniu do wzorca masowego DNA ladder 100 bp (Gibco BRL).

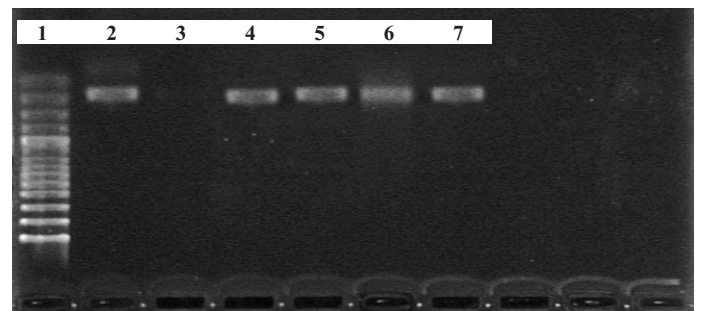
Sekwencjonowanie. Oczyszczone produkty reakcji PCR poddawano sekwencjonowaniu w Serwisie Sekwencjonowania i Syntezy DNA Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Wyniki sekwencjonowania odbierano poprzez pocztę elektroniczną, po czym opracowywano je za pomocą programu komputerowego Lasergene DNA Star.

Wykorzystując ten sam program analizowano sekwencje fragmentu genu H izolatów własnych oraz porównywano je z sekwencjami fragmentu genu H uzyskanego ze szczepionek zawierających szczep Onderstepoort (Vanguard i Canivac) oraz z sekwencjami izolatów umieszczonych w banku genów pochodzących z terenów Danii (Z47761), Niemiec (Z77673, Z77671), Turcji (AY093674), Włoch (DQ228166), Japonii (AB040766), Tajwanu (AY378091), USA (AY466011) i Grenlandii (Z47760). Dodatkowo informację genetyczną zawartą w sekwencjach nukleotydowych izolatów własnych przepisywano na białko celem wykazania ewentualnych mutacji jawnych w obrębie genu hemaglutyniny.

Wyniki i omówienie

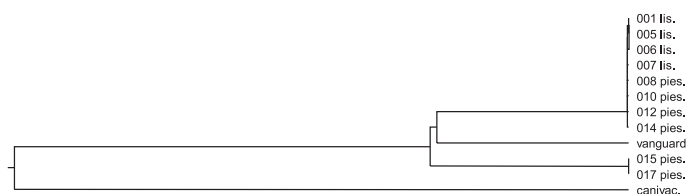
Wyniki PCR. Dodatkowo wyniki reakcji PCR uzyskano w przypadku 4 lisów (nr 001, 005, 006 i 007) oraz 6 psów (nr 008, 010, 012, 014, 015 i 017) (ryc. 1). Dodatkowo wyniki reakcji PCR uzyskano także w następstwie amplifikacji materiału genetycznego CDV izolowanego z dwóch szczepionek (Canivac i Vanguard).

Czytelne sekwencje fragmentu genu H CDV uzyskano dla wszystkich 10 badanych produktów PCR,



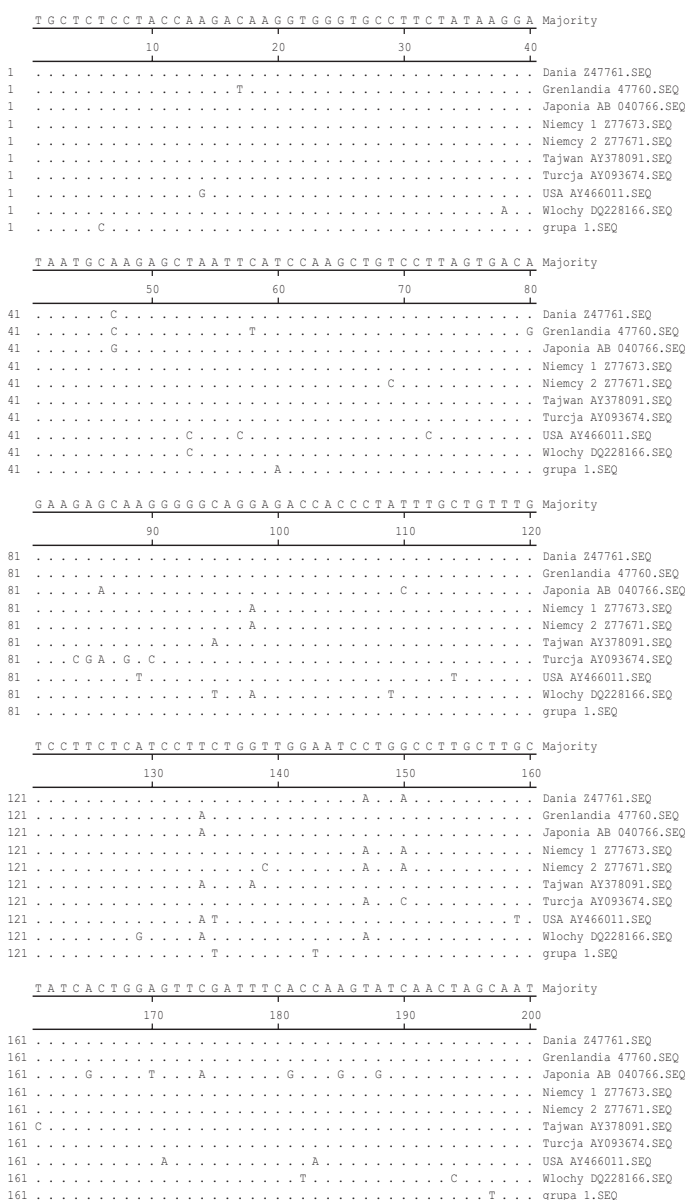
Ryc. 1. Elektroforeza w żelu agarozowym produktów PCR fragmentu genu H CDV, o długości 200 par zasad

Ścieżki: (1) – marker masowy 100 pz; (2) – kontrola pozytywna; (3) – kontrola negatywna; (4, 5, 6, 7) – produkty PCR uzyskane w reakcji amplifikacji DNA izolowanego z tkanek badanych osobników



Ryc. 2. Podobieństwo filogenetyczne pomiędzy izolatami własnymi

izolowanych od chorych lisów i psów oraz w dwóch przypadkach próbek zawierających materiał szczepionkowy. Ich opracowanie w programie komputerowym Lasergene DNA Star pozwoliło na stworzenie drzewa filogenetycznego, obrazującego podobieństwo pomiędzy poszczególnymi izolatami (ryc. 2). Jego analiza pozwoliła na wyróżnienie 4 grup. Grupę nr 1 stanowiły izolaty: lis 001, 005, 006, 007, pies 008, 010, 012, 014, grupę nr 2 stanowiły izolaty: pies 015 i pies 017.



Ryc. 3. Porównanie sekwencji nukleotydowych izolatów światowych (GenBank) z sekwencją grupy nr 1 uzyskaną w badaniach własnych

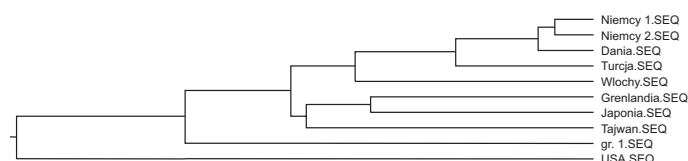
Tab. 1. Porównanie sekwencji nukleotydowych poszczególnych grup uzyskanych w badaniach własnych

Numer zwierzęcia	Podstawienie	Pozycja
Grupa nr 1	-	-
Grupa nr 2	C → T	133
	T → A	135
Grupa nr 3 (Vanguard)	C → T	107
	T → A	135
Grupa nr 4 (Canivac)	T → C	35
	T → C	53
	G → A	86
	A → T	89
	Delecja C	107
	Insercja T	109
	C → T	115
	C → T	133
	T → C	134
	Insercja A	136
G → C	177	

Do grupy nr 3 zakwalifikowano izolat szczepionkowy Vanguard, zaś grupę nr 4 tworzył izolat szczepionkowy Canivac.

Najbardziej liczna grupa nr 1 reprezentowana była przez 8 izolatów o wspólnej sekwencji nukleotydowej przedstawionej na ryc. 3. Porównanie sekwencji izolatów zaklasyfikowanych do pozostałych trzech grup, uzyskanych w badaniach własnych, z sekwencją izolatów grupy nr 1 pozwoliło na wykazanie różnic nukleotydowych, przedstawionych w tab. 1.

W celu określenia stopnia podobieństwa molekularnego genu H CDV izolatów polskich z sekwencjami izolatów światowych porównywano w programie Lasergene najliczniej reprezentowaną w badaniach własnych sekwencję nukleotydową grupy nr 1 z sekwencjami fragmentu genu H uzyskanymi z banku genów pochodzących z Danii (Z47761), Niemiec (Z77673, Z77671), Turcji (AY093674), Włoch (DQ228166), Japonii (AB040766), Tajwanu (AY378091), USA (AY466011) i Grenlandii (Z47760) (ryc. 3). Graficznym przedstawieniem tego podobieństwa jest drzewo filogenetyczne (ryc. 4). Jego analiza pozwala stwierdzić niewielkie podobieństwo genu hemaglutyniny rodzimych szczepów wirusa nosówki ze



Ryc. 4. Graficzne przedstawienie podobieństwa pomiędzy grupą nr 1 uzyskaną w badaniach własnych a sekwencjami izolatów dostępnymi w banku genów

szczepami światowymi CDV. Wskazuje na to umiejscowienie grupy nr 1 na oddzielnej gałęzi utworzonego dendrogramu w stosunku do lokalizacji izolatów światowych, które poza szczepem amerykańskim tworzą dwie wyraźne grupy filogenetyczne. Potwierdzeniem interpretacji drzewa filogenetycznego jest dokładna analiza sekwencji nukleotydowych izolatów światowych wykazujących różnice z sekwencją izolatów własnych, co przedstawiono na ryc. 3.

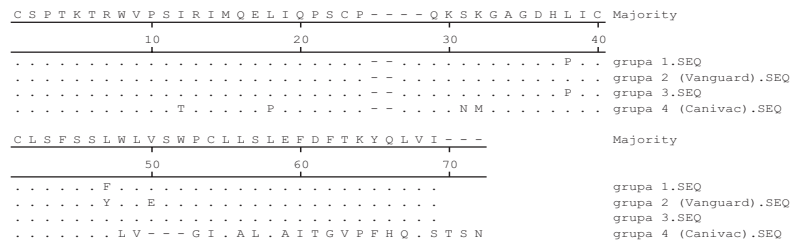
Translacja sekwencji nukleotydowych poszczególnych grup uzyskanych w badaniach własnych i porównanie ich sekwencji białkowych za pomocą programu komputerowego umożliwiła wykazanie zmian aminokwasowych. Za punkt odniesienia przyjęto sekwencję przedstawicieli grupy nr 1: CSPTKTRWVPSIRIMQELIQPSCP..QKSKGAGDHPICCLSFSFWLWSWPCLLSLEFDFTKYQLV, zaś obserwowane zmiany aminokwasowe pomiędzy przedstawicielami poszczególnych grup przedstawia ryc. 5.

W badaniach własnych dokonano analizy molekularnej fragmentu genu H CDV uzyskanego od 4 lisów i 6 psów, a także z dwóch wirusów szczepionkowych. Amplifikacja badanego materiału genetycznego, jego sekwencjonowanie, a następnie obróbka komputerowa uzyskanych sekwencji i ich porównanie z analogicznymi sekwencjami CDV dostępnymi w banku genów potwierdziła brak homologii tego genu rozpatrywanej pomiędzy różnymi izolatami CDV. Analiza sekwencji fragmentu genu H uzyskanego z klinicznych przypadków nosówki od psów i lisów pozwoliła wyróżnić dwie grupy polimorficzne, różniące się stosunkowo niewiele, bo zaledwie dwoma podstawieniami w pozycjach 133 i 135 badanego odcinka genu. O ile wysokie podobieństwo rzędu 99% wykazano także pomiędzy sekwencjami izolatów grupy nr 1 a szczepem szczepionkowym zawartym w preparacie Vanguard, to w przypadku wirusa izolowanego z preparatu Canivac różnice były znaczne i manifestowały się 8 podstawieniami, 2 insercjami i jedną delecją w stosunkowo krótkim – dwustunukleotydowym fragmencie genu hemaglutyniny.

Porównanie sekwencji fragmentu genu H grupy nr 1 uzyskanej w badaniach własnych z odpowiednimi sekwencjami izolatów światowych dostępnymi w GenBank wykazało znaczną odmienność izolatów polskich w stosunku do izolatów europejskich, azjatyckich, amerykańskich oraz pochodzących z Grenlandii.

Seqwencje fragmentu białka uzyskane na bazie sekwencji nukleotydowych genu hemaglutyniny szczepów terenowych wirusa nosówki izolowanego w Polsce i szczepów szczepionkowych wykazały znaczne różnice pomiędzy grupą nr 1 a grupą nr 4 (różniące się 25 na 66 rozpatrywanych aminokwasów – 38%).

Zaobserwowane zmiany nukleotydów w sekwencjach izolatów własnych przekładały się na zamiany strukturalnie ważnych aminokwasów (mutacja geno-



Ryc. 5. Zmiany w sekwencjach aminokwasowych w poszczególnych grupach uzyskanych w badaniach własnych

wa) – proliny i cysteiny na inne aminokwasy. Sytuacja taka może być następstwem ewoluowania wirusa w czasie. Większość szczepów CDV przeznaczonych do produkcji szczepionek pochodzi z lat 50. XX w. Brak aktualizacji szczepów szczepionkowych wirusa, przy jednoczesnym stałym dryfie antygenowym terenowych odmian patogenu może być przyczyną nieskuteczności szczepień, efektem czego są okresowo występujące na świecie epizootie, w przebiegu których chorują także psy wcześniej zaszczepione (5, 6).

Właśnie przypadki wystąpienia nosówki u psów wcześniej szczepionych przyczyniły się do nasilenia badań nad polimorfizmem genu H. Gen ten jest najbardziej zmiennym spośród wszystkich genów CDV. Białko powstające na jego matrycy odpowiada za przyłączenie się wirusa do komórki, jak również za łączenie się z przeciwciałami. Naturalną więc rzeczą jest fakt, że zmiany w strukturze tego białka przekładają się będą na zjadliwość wirusa.

Polimorfizm genu hemaglutyniny badali Haas i wsp. (5, 6). Autorzy przeprowadzali doświadczenia na 3 szczepach wirusa wyizolowanych od psów z okolic Berlina i Hamburga. Posługując się metodą RT-PCR wyizolowali oni cały gen H, który analizowano i porównywano z genem H szczepu Synder Hill. Translacja uzyskanej sekwencji nukleotydowej na białko pozwoliła uzyskać 607-aminokwasową sekwencję. Jej porównanie z analogicznymi sekwencjami zawartymi w GenBank pokazało, że o ile sekwencje izolatów własnych, uzyskanych od psów niemieckich wykazywały wysoki stopień wzajemnej homologii (> 99%), to ich zgodność z sekwencjami szczepów szczepionkowych wynosiła zaledwie 90-91%. Autorzy ci wykazali ponadto 4 dodatkowe miejsca glikozylacji w sekwencjach izolatów niemieckich w porównaniu ze szczepem Onderstepoort i 1 w porównaniu ze szczepem Canvac. Zestawienie badanych sekwencji umożliwiło stworzenie drzewa filogenetycznego. Analiza drzewa pozwoliła na wyraźne rozgraniczenie światowych linii wirusa (europejska, amerykańska oraz arktyczna) od szczepów szczepionkowych.

Badania nad hemaglutyniną wirusa nosówki izolowanego od hien, lisów i lwów w Parku Narodowym Serengeti wskazują na znaczny polimorfizm struktury tego genu. Carpenter i wsp. (3) przeprowadzali badania na CDV izolowanym na hodowlach komórkowych, z narządów wewnętrznych padłych zwierząt. Zaobserwowane znaczne różnice w strukturze genu hemaglu-

tyliny izolatów CDV uzyskanych w badaniach autorów w stosunku do izolatów światowych wskazują na przemianę, jaka dokonała się w strukturze wirusa i wyjaśniają wystąpienie nosówki u gatunków, które do niedawna były od tej choroby wolne.

Podobne badania nad polimorfizmem genu H wirusa nosówki izolowanego od zwierząt przeprowadzono w Japonii (7, 8, 14). Amplifikowano w nich zarówno cały gen hemaglutyniny, jak i jego fragmenty, przy użyciu różnych zestawów starterów. Dodatkowo produkty reakcji PCR poddawano badaniu metodą RFLP z użyciem różnych enzymów restrykcyjnych (EcoRV, SspI, NdeI). Wyniki badań wykazały obecność dwóch azjatyckich linii wirusa nosówki (początkowo sądzono, że jest jedna) różniące się sekwencjami aminokwasowymi w białku hemaglutyniny oraz liczbą miejsc glikozylacji. Linie te nie wykazywały powinowactwa do znanych linii (europejskiej, amerykańskiej czy arktycznej) wirusa. Dodatkowo potwierdzono możliwość wykorzystania enzymów restrykcyjnych do różnicowania szczepów szczepionkowych, nie trawionych przez restryktazy, od szczepów terenowych CDV, ulegających trawieniu na fragmenty o zdefiniowanej długości.

Badania polimorfizmu genu H CDV w populacji psów we Włoszech wykazały wysokiego stopnia homologii (99%) pomiędzy terenowymi izolatami wirusa a innymi izolatami europejskimi (9). Wśród przebadanych szczepów CDV wykazano jednak również izolaty należące do linii arktycznej, a także stwierdzono, że w niektórych przypadkach nosówka wywołana jest przez szczepy wirusa uznane za nie występujące już w przyrodzie, takie jak np. szczepy szczepionkowe Onderstepoort, co może wskazywać na ich ponowne uzjadliwienie.

Z kolei Demeter i wsp. (4) wyróżnili na Węgrzech dwie linie wirusa: arktyczną i europejską. Kryterium zaszeregowania wirusów do każdej z tych linii były różnice struktury genu hemaglutyniny. Coraz częstsze występowanie różnych genotypów wirusa na tak małym terytorium tłumaczone jest niekontrolowanymi ruchami dzikich zwierząt, brakiem barier geograficznych a także importem psów z różnych regionów świata.

Calderon i wsp. (2) prowadzili badania nad polimorfizmem genu H CDV na terenie Argentyny. Analiza przez nich przeprowadzona wykazała istnienie w Argentynie oddzielnej linii wirusa nosówki różniącej się od obecnie znanych, a także istnienie w jej obszarze 2 genotypów, według twierdzenia Mochizuki i wsp. (10), że jeśli podobieństwo sekwencji aminokwasów jest mniejsze niż 95%, to mamy do czynienia z oddzielnym genotypem.

Reasumując należy stwierdzić, że wszystkie przeprowadzone do tej pory badania nadal nie dały jasnej odpowiedzi, czy występowanie nosówki u psów wcześniej zaszczepionych spowodowane jest zmianami zachodzącymi w genie H czy może innym czynnikiem.

Niewątpliwie pojawiające się nowe szczepy wirusów nosówki charakteryzują się nieco odmienną budową antygenową od szczepów szczepionkowych. Brak aktualizacji składu immunopreparatów w nowe warianty wirusa nie pozostaje bez wpływu na ich skuteczność.

W badaniach własnych przedstawiciele grup nr 1 i 2 izolowanych z klinicznych przypadków nosówki od lisów i psów wykazywali znaczne różnice zarówno nukleotydowe, jak i aminokwasowe w stosunku do sekwencji wirusów szczepionkowych oraz sekwencji genu hemaglutyniny światowych izolatów CDV dostępnych w banku genów, co może świadczyć o pojawieniu się na terenie Polski wschodniej nowych odmian wirusa.

Piśmiennictwo

1. Appel M. J. G.: Canine Distemper Virus, [w:] Virus Infections of Carnivores. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam 1987, 133-159.
2. Calderon M. G., Remorini P., Periolo O., Iglesias M., Mattion N., La Torre J.: Detection by RT-PCR nad genetic characterization of canine distemper virus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina. Vet. Microbiol. 2007, 125, 341-349.
3. Carpenter M. A., Apple M. J. G., Roelke-Parker M. E., Munson L., Hofer H., East M., O'Brien S. J.: Genetic characterization of canine distemper virus in Serengeti carnivores. Vet. Immunol. Immunopathol. 1998, 65, 259-266.
4. Demeter Z., Lakatos B., Palade E. A., Kozma T., Forgách P., Rusvai M.: Genetic diversity of Hungarian canine distemper virus strains. Vet. Microbiol. 2007, 122, 258-269.
5. Haas L., Martens W., Greiser-Wilke I., Mamaev L., Butina T., Maack D., Barret T.: Analysis of the hemagglutinin gene of current wild-type canine distemper virus isolates from Germany. Vir. Res. 1997, 48, 165-171.
6. Haas L.: Molecular epidemiology of animal virus diseases. J. Vet. Med. 1997, 44, 257-272.
7. Hashimoto M., Une Y., Mochizuki M.: Hemagglutinin genotype profiles of canine distemper virus from domestic dogs in Japan. Arch. Virol. 2001, 146, 149-155.
8. Lan N. T., Yamaguchi R., Inomata A., Furuya Y., Uchida K., Sugano S., Tateyama S.: Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs. Vet. Microbiol. 2006, 115, 32-42.
9. Martella V., Cirone F., Elia G., Lorusso E., Decaro N., Campolo M., Desario C., Lucente M. S., Bellacicco A. L., Blixenkrone-Müller M., Carmichael L. E., Buonavoglia C.: Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. Vet. Microbiol. 2006, 116, 301-309.
10. Mochizuki M., Hashimoto M., Hagiwara S., Yoshida Y., Ishiguro S.: Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the hemagglutinin genes of recent isolates from dogs in Japan. J. Clin. Microbiol. 1999, 37, 2936-2942.
11. Myers D. L., Zurbriggen A., Lutz M., Pospischil A.: Distemper: not a new disease in lions and tigers. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1997, 4, 180-184.
12. Sidhu M. S., Husar W., Cook S. D., Dowling P. C., Udem S. A.: Canine distemper terminal and intergenic non-protein coding nucleotide sequences: completion of the entire CDV genome sequence. Virology 1993, 193, 66-72.
13. Simon-Martínez J., Ulloa-Arvizu R., Soriano V. E., Fajardo R.: Identification of a genetic variant of canine distemper virus from clinical cases in two vaccinated dogs in Mexico. Vet. J. 2008, 175, 423-426.
14. Uema M., Ohashi K., Wakasa C., Kai C.: Phylogenetic and restriction fragment length polymorphism analyses of hemagglutinin (H) protein of canine distemper virus isolates from domestic dogs in Japan. Vir. Res. 2005, 109, 59-63.
15. Winiarczyk S., Adaszek Ł., Dzikusko A., Grądzki Z., Madany J., Skrzypczak M.: Applying the PCR method in diagnosing canine distemper virus. Medycyna Wet. 2006, 62, 840-842.

Adres autora: dr Łukasz Adaszek, ul. Głębocka 30, 20-612 Lublin; e-mail: ukaszek0@wp.pl