Różnorodność wirusa RHD – znaczenie epidemiologiczne, diagnostyczne i immunologiczne

ANDRZEJ FITZNER, WIESŁAW NIEDBALSKI

Zakład Pryszczycy, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach,
ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola

Otrzymano 13.02.2017

Zaakceptowano 25.04.2017

Fitzner A., Niedbalski W.

Diversity of RHD virus: epidemiological, diagnostic and immunological importance

Summary

Rabbit haemorrhagic disease (RHD) was first recognized in China in 1984. In Europe, the disease appeared in 1986 in Italy, and in the following years RHD was observed in many other European countries, including Poland in 1988. The disease is caused by RHD virus (RHDV), classified as a representative of the Lagovirus genus within the Caliciviridae family. Lagoviruses include the non-pathogenic rabbit calicivirus (RCV) and the European brown hare syndrome virus (EBHSV). There are three basic variants (subtypes) of pathogenic RHD viruses: classic (RHDV) and antigenic subtypes RHDVa and RHDV2 (RHDVb), distinguished on the basis of epidemiological characteristics, infectious properties and antigenic and genetic modifications. Phylogenetic analysis of RHDV revealed the presence of five genogroups (G1-G5) with similar time of isolation, regardless of the place of occurrence. RHDVa strains are genetically more variable than RHDV, and all RHDVa strains belong to genogroup G6. RHDV2 was diagnosed for the first time in 2010 in domestic and wild rabbits in France, and later in the Iberian Peninsula, and it was called RHDVb. Like the previously identified variants of the RHD virus, RHDV2 spreads to other regions of the world, and in 2011-2016 it was diagnosed in many European countries, North America, Africa and Australia. Strains of RHD2 form a separate, uniform phylogenetic group and are more similar to the non-pathogenic rabbit calicivirus than to pathogenic RHDV and RHDVa. Infections with different variants of RHD viruses are a serious epidemiological, diagnostic and immunological problem. Advanced antigenic changes in RHD viruses limit the usefulness of standard RHD vaccines in controlling the disease.

Keywords: rabbit haemorrhagic disease (RHD), RHD virus diversity, variants (subtypes)

Występowanie krwotocznej choroby królików (rabbit haemorrhagic disease – RHD) na świecie datuje się od wiosny 1984 r., pierwsze doniesienia o masowych śmiertelnych przypadkach królików hodowlanych pochodzą z Chin (46). W 1985 r. chorobę stwierdzono w Korei Południowej (40). W Europie liczne zachorowania, o nieznanej etiologii, królików hodowlanych, a później dzikich odnotowano w 1986 r. we Włoszech (13). W latach 1987-1989 choroba opanowała cały kontynent, a na początku lat 90. przeniknęła na Wyspy Brytyjskie (17). W Polsce choroba powszechnie znana jako pomór królików występuje od 1988 r. (31). Globalny zasięg zarazy potwierdzają epizootie w Meksyku, w Afryce Północnej, na wyspie Reunion na Oceanie Indyjskim (32, 56). Wspólne cechy naturalnych przypadków RHD z tego okresu, to podatność na zakażenie królików dorosłych i młodych powyżej 6.-8. tygodnia życia (zwierzęta przed odsadzeniem pozostawały zdrowe) wyłącznie z rodzaju *Oryctolagus cuniculus* i gwałtowny przebieg, z bardzo wysokimi wskaźnikami

zachorowalności i śmiertelności, nierzadko sięgającymi 100%. U pojedynczych zwierząt choroba kończy się śmiercią w ciągu 48.-72. godzin. Objawy nerwowe, duszność, a czasami krwawienia z nosa obserwuje się jedynie w okresie agonalnym. W przypadkach trwających powyżej trzech dni część zakażonych królików przeżywa. Zmiany anatomopatologiczne obejmują: martwicowe zapalenie wątroby, obrzęk płuc, wynaczynienia i krwotoki w narządach mięsnych (płuca, nerki, grasicę). Zróżnicowane nazewnictwo choroby podkreśla dramatyczne skutki zarazy i odzwierciedla ówczesny stan wiedzy („rabbit viral sudden death”, „viral haemorrhagic pneumonia of rabbits”, „rabbit infectious necrotic hepatitis”, „Mallatix X”) (13, 40, 51). Z uwagi na podobieństwo obrazu sekcyjnego i histopatologicznego śmiertelne zakażenia łączono z rozpoznaniem na początku lat 80. krwotocznym syndromem zająca szaraka – European Brown Hare Syndrome (EBHS) (30, 47, 51). W maju 1989 r. nową jednostkę chorobową wpisano na ówczesną listę B kodeksu OIE

pod nazwą viral haemorrhagic disease of rabbits (VHD) (56), zmienioną później na rabbit haemorrhagic disease (RHD). W Polsce RHD znajduje się w wykazie chorób podlegających obowiązkowi rejestracji (Ustawa z dnia 11 marca 2004 r. o ochronie zdrowia zwierząt oraz o zwalczaniu chorób zakaźnych, zał. 3).

Czynnikiem etiologicznym RHD jest wirus krwotocznej choroby królików (rabbit haemorrhagic disease virus – RHDV), rodzaj *Lagovirus*, rodzina *Caliciviridae* (59). Bezotoczkowe wiriony RHDV zawierają pojedynczą nić RNA (ok. 7,5 kb) o dodatniej polaryzacji (ss+) zakończoną końcem poly A. Do lagowirusów należą również: niepatogeny króliczy kaliciwirus RCV (Rabbit Calicivirus), o predylekcji do przewodu pokarmowego (15) oraz hepatotropowy, patogeny dla zajęcy *Lepus europaeus* i *Lepus timidus* wirus EBHSV, zidentyfikowany w 1989 r. RHDV i EBHSV oprócz zbliżonej morfologii łączy występowanie krzyżowych reakcji antygenowych oraz struktura i organizacja genomu. Genom lagowirusów i kaliciwirusów z rodzajów *Sapovirus* i *Nebovirus* zawiera dwie, natomiast norowirusów i wesiwirusów trzy ramki odczytu (ORF). Obszerna ORF1 koduje jednolitą poliproteinę (257 kDa), z której w wyniku działania wirusowej proteazy powstają białka niestrukturalne i strukturalne białko kapsydu VP60 (60 kDa). ORF2 koduje mniejsze białko strukturalne VP10. W kapsydzie występuje także subgenomowy RNA (2,2 kb), który również koduje białko VP60 oraz bierze udział w procesach transkrypcji i translacji (55). Pomimo dużego podobieństwa genetycznego RHDV i EBHSV (52-60% i 63-70% homologia sekwencji nukleotydów i aminokwasów w obrębie genu vp60) są to całkowicie odrębne patogeny, niezdolne do zakażenia krzyżowego królików i zajęcy, których nie można namnożyć *in vitro* w systemach hodowli komórkowych oraz w zarodkach kurzych (16, 32, 58).

W diagnostyce wirusologicznej RHD stosuje się techniki mikroskopii elektronowej (EM/IEM) umożliwiające bezpośrednią detekcję kubicznych cząstek o średnicy 27-40 nm, metody immunoenzymatyczne ELISA do wykrywania antygeny oraz odczyn hemaglutynacji do określenia właściwości hemaglutynacyjnych. Techniki molekularne, takie jak: amplifikacja wirusowego RNA metodą RT-PCR, real-time RT-PCR (RTq-PCR) oraz sekwencjonowanie wykorzystuje się do określenia typu wirusa oraz w badaniach filogenetycznych. Zakażenie doświadczalne podatnych królików jest metodą stosowaną do potwierdzenia rozpoznania oraz podczas produkcji szczepionek: do namnożenia wirusa i kontroli serii. Ważnym elementem diagnostyki RHD są metody serologiczne: odczyn zahamowania hemaglutynacji i test ELISA (OIE Manual 2016, rozdział 2.6.2).

Niepatogenne kaliciwirusy królików

Wczesne dowody mówiące o wysoce prawdopodobnym występowaniu bliskiego, niepatogennego przodka RHDV pochodzą z badań archiwalnych surowic królików europejskich z połowy lat 70., w których wykryto

swoiste przeciwciała (61) oraz z retrospektywnych molekularnych analiz próbek szpiku królików hodowlanych i dzikich z lat 1950-1990 w Wielkiej Brytanii (57). Kontakt nieszczepionych królików hodowlanych z hipotetycznym, niechorobotwórczym wirusem, stymulującym produkcję przeciwciał swoistych dla RHDV potwierdzono we Włoszech, w połowie lat 90. Króliczy kaliciwirus (Rabbit calicivirus) RCV został ostatecznie wyizolowany z przednich odcinków przewodu pokarmowego. Badania genetyczne wykazały 85% homologię RCV i RHDV w odcinku genu kodującego strukturalne białko kapsydu (15). Obecność niewirulentnego lagowirusa (nvRHDV-LV) i australijskiej odmiany wirusa (RCV-A1) potwierdzono serologicznie w Nowej Zelandii i Australii (10, 19, 35, 63). Z badań tych wynika, że niechorobotwórcze wirusy występowały w Australii już przed niekontrolowanym uwolnieniem w 1995 r. patogenego, czeskiego szczepu V-351 RHDV. Analiza 38 izolatów RCV-A1 z lat 2007-2009 ujawnia postępujące zmiany genomu i obecność sześciu różnych kładów wirusa. Pojawienie się niepatogenego protoplasty najprawdopodobniej zbiega się z datą sprowadzenia królików na kontynent australijski w XIX w. Analiza współczesnych, niechorobotwórczych szczepów RCV-A1 wskazuje na interakcje z patogenym RHDV oraz istotny, hamujący wpływ kaliciwirusa A1 na szerzenie się RHD w Australii, a w konsekwencji ograniczenie możliwości efektywnej regulacji populacji dzikich królików metodami biologicznymi (19, 35). Występowanie „łagodnego” wirusa u zdrowych, nieszczepionych dzikich królików stwierdzono również na wyspie Lambay w Irlandii. Silna serokonwersja może świadczyć o długotrwałym krążeniu RHDV w środowisku i bezobjawowej stymulacji królików w tej populacji. Wirus Lambay charakteryzuje się wysokim stopniem pokrewieństwa genetycznego z patogenym RHDV (29). Z kolei istnienie innego, słabo patogenego kaliciwirusa Michigan (MRCV), bliższego filogenetycznie wirusowi RCV i znacznie różniącego się od RHDV, potwierdzono w 2001 r. w Stanach Zjednoczonych (8). W hodowli złożonej z 200 królików rasy nowozelandzkiej padło ponad 30% zwierząt, w tym króliki młode oraz dorosłe samice i samce, z objawami nerwowymi, biegunką, krwotokami z nosa i odbytu, przekrwieniami i zapaleniem spojówek. W wątrobach chorych królików zidentyfikowano wiriony morfologicznie podobne do kaliciwirusów. Zwierzęta zakażone doświadczalnie nie zachorowały, ale obecność wirusa w wątrobie, płucach i jelitach potwierdzono metodą RT-PCR. Sekwencja nukleotydów w genomie MRCV jest w 79% identyczna z RHDV. Sugeruje się subkliniczne występowanie zakażeń MRCV i powrót do formy zakaźnej w sprzyjających warunkach środowiskowych (8). Obecność przeciwciał o wysokich mianach przeciwko wirusowi spokrewnionemu z RHDV (RHDV-like), które nie chronią przed zakażeniem chorobotwórczym RHDV, potwierdzono serologicznie u królików dzikich na początku 2001 r. we Francji (52). Kilka lat później u se-

ropozytywnych królików hodowlanych wyizolowano niepatogenne bądź słabo patogenne wirusy różniące się tropizmem tkankowym (dwunastnica) (43). Króliki zakażone eksperymentalnie, poprzez kontakt lub drogą inokulacji, szczepem 06-11/2006 nie chorowały, lecz produkowały przeciwciała. Transmisję niechorobotwórczego wirusa potwierdzono metodą PCR. Niepatogenny wirus z Francji jest w 94% podobny genetycznie do brytyjskiego niepatogennego lagowirusa Ashington, wykazuje 83% podobieństwo do klasycznego RHDV i tylko 85% oraz 79% do RCV z Włoch i australijskiego RCV-A1. Największe zmiany sekwencji aminokwasów stwierdzono w odcinkach wysoce zmiennych C i E znajdujących się w 5' końcowej połowie genu, kodującej zewnętrzną powłokę kapsydu, co może wyjaśniać tropizm i stopień odmienności wirusa. W próbie biologicznej wykazano, że seropozytywne króliki, niezależnie od miana, nie były chronione przed patogenym RHDV.

Niechorobotwórcze lagowirusy w odróżnieniu od wariantu RHDVa czy RHDV typu 2 nie tworzą zwartej grupy filogenetycznej (36, 43). Mogą cyrkulować w sposób niezauważony u królików hodowlanych i dzikich. Do transmisji może dochodzić drogą ustno-pokarmową i kałowo-pokarmową, co tłumaczy ich jelitowy tropizm, a także serokonwersję u zwierząt, które nigdy nie miały kontaktu z RHDV (36). W celu jednoznacznego odróżnienia niechorobotwórczego wirusa królików, grupującego wiele szczepów o zróżnicowanych cechach, niektórzy badacze proponują stosowanie terminu: niepatogeny kaliciwirus królików (non-pathogenic rabbit calicivirus) lub: niepatogeny lagowirus – non-pathogenic lagovirus (NP-LV), a inni określają tę grupę wirusów skrótem RCV-like (36, 43).

Chorobotwórcze typy (warianty) wirusa RHD

Uwzględniając różnice epidemiologiczne, zróżnicowane właściwości zakaźne, modyfikacje antygenowe i odrębność genetyczną, wyróżnia się trzy zasadnicze typy patogennego wirusa RHD: klasyczny – RHDV, wariant (podtyp) antygenowy RHDVa i RHDV typu 2 (RHDV2), określane także akronimem RHDVb. RHDV i RHDVa należą do jednego serotypu, natomiast RHDV2 prawdopodobnie reprezentuje osobną serogrupę (42). Klasyczny wirus RHD obejmuje szczepy izolowane od 1984 r. Badania epizootyczne, antygenowe i filogenetyczne przeprowadzone w pierwszych latach występowania RHD w Europie oraz po dwóch latach od uwolnienia wirusa na Antypodach podkreślają stabilność i niewielką zmienność RHDV (5, 41, 58). W miarę upływu czasu i gromadzenia nowych izolatów obraz ten ulegał coraz większym zmianom. Filogenetyczny podział klasycznego RHDV na 5 grup (G1-G5) łączy szczepy o podobnym czasie izolacji, bez względu na obszar geograficznego występowania. Stopniowy zanik występowania poszczególnych grup genetycznych na świecie obserwuje się od końca lat 90. (44, 54). Enklawą klasycznego RHDV w Europie

był do niedawna Półwysep Pirenejski, gdzie diagnozowano go jeszcze 2008 r. (3, 4, 22). Badania krajowych patogennych szczepów RHDV z lat 1988-2000 odzwierciedlają co najmniej dwukrotne przeniknięcie do Polski klasycznego wirusa powiązanego z genogrupami G2 i G3-G4 (26).

Szczepy HA-ujemne. Pierwsze istotne różnice właściwości RHDV stwierdzono w odczynie hemaglutynacji (37). Brak hemaglutynacji u patogennych szczepów wirusa z niezdegradowanym białkiem VP60 może wynikać z mutacji w obrębie nieciągłej determinanty zlokalizowanej w końcu 5' genu i modyfikacji powierzchni kapsydu (14). W warunkach doświadczalnych potwierdzono przekazywanie właściwości zakaźnych i brak hemaglutynacji wirusa po pasażowaniu (62, 25). Występowanie izolatów przejściowo lub trwale HA-ujemnych obserwowano u zwierząt szczepionych przeciwko RHD (62). W Polsce wyizolowano dwa szczepy HA-ujemne, które dzieli dziesięcioletni przedział czasowy (25, 37), powiązane filogenetycznie z podobnymi wirusami z Wielkiej Brytanii i Niemiec.

Wariant (podtyp) antygenowy RHDVa. Patogeny wirus RHDVa o nowych cechach antygenowych i genetycznych po raz pierwszy wyizolowano we Włoszech i w Niemczech, w latach 1996-1997. Na zakażenie podatne są jedynie króliki *Oryctolagus cuniculus* w takim samym przedziale wiekowym, jak w przypadku RHDV, głównie hodowlane, ale także dzikie (14, 62). Wszystkie izolaty podtypu RHDVa wyosobnione dotąd na świecie należą do genogrupy G6 (11, 36, 44, 48, 54). W porównaniu do klasycznego wirusa RHD, podtyp RHDVa wykazuje znaczne zmiany genetyczne, sprzyjające selekcji i zwiększające możliwości przetrwania. Konsekwencją mutacji i zmian konformacyjnych białka kapsydu jest znacznie niższa reaktywność z przeciwciałami poliklonalnymi specyficznymi dla klasycznego RHDV lub całkowity brak reakcji z niektórymi przeciwciałami monoklonalnymi (14, 36). Mimo zmian antygenowych RHDVa, szczepionki, których składnikiem aktywnym jest inaktywowany, standardowy RHDV, skutecznie chronią przed zakażeniem RHDVa. Widocznym skutkiem globalnej ekspansji RHDVa jest stopniowy zanik występowania poszczególnych linii genetycznych klasycznego wirusa RHD (22, 54). Szczepy RHDVa szybko dotarły do innych krajów europejskich, rozprzestrzeniły się w Azji, w Ameryce Północnej i Środkowej oraz w północnych regionach Afryki. Przyczyną nielicznych przypadków RHD diagnozowanych w USA od 2000 r. był patogeny wariant antygenowy i genetyczny RHDVa, a każda z 4 potwierdzonych epizootii w latach 2000-2005 (szczepy: Iowa2000, UT-01, NY-01, IN-05) najprawdopodobniej miała swoje odrębne, nieustalone, pierwotne źródło (8, 54). W Polsce, na Węgrzech i w Rosji RHDVa jest diagnozowany od połowy pierwszej dekady obecnego stulecia (11, 18, 25, 53). Z ognisk RHD zarejestrowanych w kraju w ostatnich pięciu latach i potwierdzonych

w Krajowym Laboratorium Referencyjnym RHD izolowano wyłącznie wirus RHDVa (dane niepublikowane).

Na tle globalnej ekspansji RHDVa, zwłaszcza w Europie, zadziwia bardzo późne pojawienie się tego wariantu na Półwyspie Iberyjskim, co może być związane z genetyczną izolacją ekosystemu będącego kolebką współczesnych ras królików (3). Pierwszy przypadek RHDVa w Hiszpanii zdiagnozowano u królików hodowlanych ponad rok po wykryciu RHDV2 (2). W Portugalii wirus mógł być obecny kilka lat wcześniej (22). Naturalnych zakażeń RHDVa jak dotąd nie rozpoznano tam u królików dzikich. Obserwacje z innych krajów Europy Zachodniej, o dużym zagęszczeniu hodowli przemysłowych, wskazują na ogólną dominację zakażeń RHDVa u królików hodowlanych. Trwałe utrzymywanie się klasycznego wirusa RHD z najstarszej grupy genetycznej (G1), reprezentowanej przez szczep AST89, na tym rozległym obszarze tłumaczy się obecnością naturalnej bariery, jaką tworzą Pireneje oraz czynnikami zależnymi od gospodarza (zagęszczenie populacji, dominacja jednego podgatunku królika domowego) i warunkami klimatycznymi. Z jednej strony, może to świadczyć o znacznej konserwatywności poszczególnych linii klasycznego RHDV, mimo presji związanej ze szczepieniami królików hodowlanych, a z drugiej, o wykształceniu wirulentnych form zdolnych do długotrwałego przetrwania (3, 22, 36, 48).

RHDV2. Całkowicie nowy typ patogennego wirusa RHD zdiagnozowano po raz pierwszy późnym latem 2010 r. w północnej i północno-zachodniej części Francji. Liczne przypadki śmiertelnej choroby królików rozpoznano u królików hodowlanych i dzikich występujących na tym samym obszarze. W ciągu kilku miesięcy epizootie o podobnym charakterze potwierdzono w kilkudziesięciu hodowlach. Śmiertelne przypadki notowano zarówno u nieszczepionych królików ras mięsnych w okresie tuczu, jak i u bardzo młodych królików przed odsadzeniem, w wieku ok. 4 tygodni, które dotychczas uznawano za odporne na zakażenie RHDV. Padnięcia samic szczepionych przeciwko RHD świadczyły o prawdopodobnym przełamaniu odporności. Zmiany krwotoczne stwierdzane pośmiertnie w wątrobie, płucach, grasicy, sercu, nerkach odpowiadały obrazowi anatomopatologicznemu RHD. Wspólną cechą tych naturalnych przypadków, w odróżnieniu od wcześniej znanych epizootii RHD, był stosunkowo niski ogólny wskaźnik śmiertelności, w granicach 30%. Obecność wirusa w wątrobach zakażonych królików potwierdzono metodami wirusologicznymi. Wysoka homologia sekwencji nukleotydów szczepów RHDV2 w N-końcowym fragmencie VP60 (98,5-100%) kontrastowała ze znacznie niższym podobieństwem (87,5%) do klasycznego RHDV i do podtypu RHDVa. Aby podkreślić odrębność i specyficzność tego wariantu, który prawdopodobnie nie wywodzi się od klasycznego RHDV, lecz stanowi całkowicie nową linię o nieustalonym jeszcze źródle pochodzenia, okre-

ślono go terminem RHDV2 (42). Z kolei patogeny wirus o charakterystyce antygenowej i genetycznej podobnej do RHDV2, ale wyisobniony kilka miesięcy później na Półwyspie Iberyjskim określono akronimem RHDVb (20, 21, 48). W większości przypadków nowy typ wirusa wykazywał aktywność hemaglutynacyjną. Obserwacje naturalnych przypadków choroby z Hiszpanii, Portugalii i Włoch – potwierdzone eksperymentalnie – jednoznacznie podkreślają unikalność zakażeń RHDV2 (RHDVb): niższy odsetek zachorowalności i śmiertelności, zdecydowanie niższy wiek młodych królików podatnych na zakażenie, przełamywanie odporności poszczepiennej i nienotowany uprzednio większy zakres swoistego gospodarza, obejmujący inne rodzaje *Leporidae* (12, 20, 60, 64). Wzorem klasycznego RHDV i podtypu RHDVa, nowy typ wirusa szybko poszerza zasięg geograficznego występowania o nowe regiony, kraje, kontynenty. O potencjale epizootycznym i tempie rozprzestrzeniania RHDV2 świadczą przypadki odnotowane w latach 2011-2016 w Europie (Hiszpania, Włochy, Szkocja, Wielka Brytania, Irlandia, Niemcy, państwa skandynawskie), w Ameryce Północnej i Afryce (OIE World Animal Health Database (WAHID), (6, 12, 20, 60, 65). We Francji, w ciągu ostatnich trzech lat 97% zdiagnozowanych zakażeń RHD przypada wyłącznie na RHDV2 (9). Zakażenia RHDVb dominują w populacji królików dzikich i hodowlanych w Portugalii i Hiszpanii, gdzie obserwuje się proces zastępowania klasycznego RHDV (21, 22, 48). W 2012 r. rozpoznano tam tylko pojedyncze ogniska wywołane przez klasyczny RHDV, przy czym na jednej z ferm stwierdzono niezwykle rzadki przypadek równoległego zakażenia królików przez wirusy RHDVb i RHDV (20). We Włoszech notuje się stały wzrost zakażeń, których przyczyną jest wirus RHDV2 (60). W 2015 r. RHDV2 zdiagnozowano u królików w Australii (33). Zakażenia RHDV2 rozprzestrzeniają się wśród królików dzikich i hodowlanych, w tym użytkowanych dla celów hobbyistycznych. Zwraca uwagę fakt, że mimo generalnie niższego poziomu zachorowalności i śmiertelności, przypadki zakażeń RHDV2 w Danii, Finlandii, Norwegii, Szwecji, Kanadzie, Beninie czy Tunezji (cyt. wg 64, OIE WAHID 2014-2016) zostały tam odnotowane po raz pierwszy w historii lub po bardzo długim okresie, wielokrotnie z pominięciem występowania podtypu RHDVa. Wszystko wskazuje też, że obecność RHDV2 na Antypodach jest wynikiem naturalnych zakażeń, bez udziału czynnika ludzkiego (ProMED-mail. Rabbit hemorrhagic disease – Australia (02): (SA, VI) wild, RHDV2 strain, OIE. 20160701.4319975).

Szczepy RHDV2 tworzą oddzielną, jednolitą grupę genetyczną i wykazują większe podobieństwo do niepatogennych kaliciwirusów króliczych – włoskiego RCV i australijskiego RCV-A1 niż do RHDV i RHDVa (4, 48). Podobne wyniki uzyskano także w naszym laboratorium na podstawie analizy filogenetycznej 22 wirusów reprezentujących niepatogenne kaliciwirusy królików,

klasyczny RHDV, podtyp RHDVa, RHDV2 i EBHSV (ryc. 1). W warunkach eksperymentalnych RHDV2 namnożono na królikach doświadczalnych w wieku poniżej miesiąca (nawet jedenastodniowych). Podobnie jak w przypadkach zakażeń naturalnych wskaźniki śmiertelności były znacznie niższe (30-67%). Okres inkubacji jest zwykle zbliżony do zakażeń RHDV i RHDVa (2-3 dni), ale wielokrotnie stwierdzano wydłużenie czasu padnięć zakażonych królików powyżej tygodnia (20, 21, 42). Zakażenia RHDV2 stwarzają problem diagnostyczny i immunoprofilaktyczny. Znaczne modyfikacje białka kapsydu RHDV2, wyrażające się niższą reaktywnością z poliklonalnymi surowicami anti-RHDV bądź brakiem reakcji z funkcjonującymi dotąd przeciwciałami monoklonalnymi były powodem opracowania nowych immunoenzymatycznych testów diagnostycznych, do przygotowania których wykorzystano m.in. cząstki wirusopodobne – VLP (7, 42). Daleko zaawansowane zmiany antygenowe, a w rezultacie słabe właściwości ochronne i ograniczona przydatność szczepionek standardowych, stanowiły przesłankę do pilnego opracowania nowych, inaktywowanych szczepionek, których składnikiem aktywnym jest antygen RHDV2 (7, 20, 45).

Zakażenia RHDV2, związki RHDV – EBHSV, spektrum swoistego gospodarza. Do niedawna jedynym naturalnym gatunkiem podatnym na zakażenie wirusem RHD były króliki domowe i dzikie *Oryctolagus cuniculus*, natomiast na EBHS chorowały wyłącznie zajęce europejskie *Lepus europaeus* i zajęce bielaki *Lepus timidus*. W przeszłości ściśle podobieństwo morfologiczne obu wirusów oraz obraz zmian anatomopatologicznych przemawiały za uznaniem RHD i EBHS za jedną chorobę – „infectious hepatitis of Leporids” (51), której przyczyną są warianty tego samego kaliciwirusa. Próby krzyżowego zakażenia królików i zajęcy z wczesnego okresu badań obu krwotocznych syndromów, mimo początkowo sprzecznych wyników, zakończyły się niepowodzeniem. Ostatecznie teza o jednym wirusie nie znalazła potwierdzenia w późniejszych badaniach (39). Pojawienie się wirusa RHD typu 2 stawia w nowym świetle kwestię udziału innych gatunków zwierząt w szerzeniu choroby oraz utrzymywania i transmisji wirusa. Wszystko wskazuje na to, że RHDV2 nie tylko przełamuje barierę wiekową królików podatnych na zakażenie (20, 42), ale może wywoływać śmiertelne zakażenia u innych przedstawicieli zajęcowatych (*Leporidae*), czego nie notowano wcześniej ani w przypadku klasycznego

Ryc. 1. Drzewo filogenetyczne lagowirusów na podstawie porównania sekwencji nukleotydowych odcinka strukturalnego białka kapsydu (VP60). Opracowano w programie BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) NCBI z wykorzystaniem 22 sekwencji reprezentujących niepatogenne kaliciwirusy królików (RCV, RCV-A1), klasyczny RHDV (genogrupy G 1-G5), podtyp RHDVa (genogrupa 6), RHDV2 i EBHSV

RHDV, ani podtypu RHDVa. Szersze spojrzenie na odporność królików i zajęcy po zakażeniu lagowirusami RHD i EBHS oraz występowanie zakażeń międzygatunkowych dają wyniki badań przeprowadzonych na Sardynii (12). W 2014 r. pojawiły się dowody, że RHDV2 może śmiertelnie zakażać zarówno króliki, jak i zajęce z rodzaju *Lepus*, wywołując chorobę klinicznie podobną do EBHS. Po raz pierwszy zakażenia o takim przebiegu stwierdzono u zajęcy apenińskich (*Lepus corsicanus*) (12) i zajęcy śródziemnomorskich *Lepus capensis* (60), bytujących naturalnie we Włoszech. Międzygatunkową transmisję RHDV2 ze skutkiem śmiertelnym, tym razem u zajęcy *Lepus europaeus*, potwierdzono we Włoszech i Hiszpanii. W obu przypadkach obecność lagowirusa RHDV2 w wątrobach zajęcy wykryto testem ELISA i zidentyfikowano metodą PCR, jednoznacznie wykluczając udział EBHSV (64). Doniesienia z Australii, gdzie EBHS nigdy nie występował, także potwierdzają patogenność RHDV2 dla zajęcy szaraków (34). Nieoczekiwanie patogenne cechy klasycznego RHDV dla zajęcy *Lepus granatensis* potwierdziły współczesne analizy archiwalnych próbek pobrane na Półwyspie Iberyjskim w latach 90. (50). Szczególną rolę w pojawieniu się i rozprzestrzenianiu RHD i EBHS może odgrywać królik florydzki (*Sylvilagus floridanus* – Eastern cottontail), którego nasilone sprowadzanie z Ameryki Północnej do Europy zbiega się w czasie z pojawieniem obu krwotocznych syndromów. Królik florydzki zajmujący te same stanowiska

ekologiczne, co króliki dzikie i zające, może w określonych warunkach ulegać zakażeniu EBHSV, lecz nie jest podatny na zakażenie RHDV. Z epizootycznego i ewolucyjnego punktu widzenia gatunek *Sylvilagus* spełnia tu rolę „ostatecznego gospodarza”, a tę ścieżkę transmisji należy uznać za „ślepy zaułek” (38).

Zmienność wirusa RHD

Ewolucyjne przejście od niepatogennego przodka to podstawowa koncepcja, która tłumaczy pojawienie się patogenego wirusa RHD, jednak dotychczas nie zidentyfikowano na tyle wyraźnych mutacji, które wyjaśniałyby przeskok między wirulentnymi i niechorobotwórczymi postaciami wirusa. Nie wykryto też przełomowych zjawisk genetycznych bezpośrednio odpowiedzialnych za wzrost zakaźności (36). Analizując pełne sekwencje genu VP60 ponad 40 szczepów RHDV i RHDVa z lat 1989-2005, zlokalizowano kodony odpowiedzialne za pozytywną selekcję (PSC), które mają wpływ na stymulowanie odpowiedzi immunologicznej i są powiązane z właściwościami ochronnymi. Substytucje aminokwasów w kodonach PSC mogą prowadzić do zmiany polarności i ładunku białek oraz przyczyniać się do N-glikozylacji protein. Ten proces z kolei wpływa na strukturę białka, umożliwiając wirusom zróżnicowanie powierzchni kapsydu, co przekłada się na tropizm, aktywność proteolityczną i ucieczkę przed układem immunologicznym gospodarza. Co istotne, miejsc N-glikozylacji nie ma niechorobotwórczy RCV. Dwa kodony PSC zidentyfikowano w odcinkach wysoce zmiennych C (poz. 307) i E (poz. 432) zawierających główne determinanty antygenowe odpowiedzialne za specyficzność szczepu RHDV, w obrębie subdomeny P2 kodującej zewnętrzną powierzchnię kapsydu, a trzeci we fragmencie F (poz. 476) (24). Ważną rolę w interakcjach z receptorami komórek gospodarza może odgrywać najbardziej wyeksponowany powierzchniowo region C. Relacje pomiędzy pozytywną selekcją i antygenowością sugerują udział w ewolucji RHDV mechanizmu zależnego od układu odpornościowego. Z kolei udział kodonu 476, jako części nieciągłej determinanty antygenowej odpowiedzialnej za hemaglutynację podkreśla wpływ tego fragmentu genu na fenotyp wirusa (14), jednakże koncepcja ewolucyjnego przejścia od pierwotnych, niechorobotwórczych wirusów krążących w populacji europejskich zającowatych do formy patogennej nie w pełni wyjaśnia pochodzenie RHDV, EBHSV i RHDV2 (23). Nie tłumaczy też wielokrotnie obserwowanego zjawiska nagłego pojawienia się choroby o bardzo wysokim współczynniku śmiertelności, w krótkim przedziale czasu, w sytuacji, gdy wirusy patogenne i niepatogenne różnią się tak znacznie pod względem filogenetycznym (20% sekwencji nukleotydów genu vp60). Motorem zmienności mogą być równoległe zachodzące zjawiska międzygatunkowego przeskoku lagowirusów (species jump) pomiędzy pokrewnymi gatunkami *Leporidae*, zajmującymi ten sam obszar geograficzny. Dowodami potwierdzającymi

skok międzygatunkowy lagowirusów i udział w tym procesie królika florydzkiego z rodzaju *Sylvilagus* są serokonwersja przeciwiał RHDV i EBHSV oraz ograniczona podatność na zakażenie wirusem EBHSV. Prawdopodobnie pierwotne lagowirusy mogły wywoływać bezobjawowe zakażenia u naturalnych gospodarzy, podobnie jak miało to miejsce w przypadku łagodnych postaci myksomatozy u gatunków *Sylvilagus*, które okazały się śmiertelne dla królika europejskiego w następstwie międzygatunkowego przeskoku (38). Na występowanie tego zjawiska wskazują zakażenia klasycznym RHDV stwierdzone u pokrewnych gatunków zające iberyjskich (*Lepus granatensis*) w Portugalii (50) i RHDV2 u zające płowych (*Lepus capensis*) na Sardynii oraz zające apenińskich (*Lepus corsicanus*) na Korsyce (12, 60). Pochodzenie, zmienność i tempo ewolucji RHDV oceniano także na podstawie danych retrospektywnych oraz za pomocą zegara molekularnego z wykorzystaniem specjalistycznego oprogramowania informatycznego, symulacji komputerowych i metod statystycznych (36, 57). Z analiz obejmujących ponad dwieście częściowych i pełnych sekwencji VP60 patogenego RHDV i niechorobotwórczego RCV, w których zastosowano różne, często odmienne metodologie badawcze wynika, że czas pojawienia się wczesnego przodka (TMRCA) obu lagowirusów szacuje się na około 550-150 lat przed wybuchem RHD w Chinach. W tym okresie w środowisku prawdopodobnie cyrkulowało wiele linii wirusa, co wskazuje na bardzo wczesne procesy ewolucyjne wirusa RHD zmierzające do wykształcenia form patogennych w drodze stopniowych mutacji i mechanizmów rekombinacji. W obrębie sekwencji patogenego RHDV zidentyfikowano cztery linie filogenetyczne, ewoluujące niezależnie, które łączy wspólne pochodzenie i podobny okres powstania, oceniany na lata 70. minionego wieku. To oznacza, że oddzielne linie RHDV musiały istnieć już przed 1984 r., ale istnieje też alternatywna koncepcja, która mówi, że do powstania wirulentnych form wirusa mogło dochodzić kilkakrotnie w okresie XX w. (36).

Nowych danych na temat dróg ewolucji RHDV i udziału w tym procesie innych gatunków swojego gospodarza dostarczają badania z ostatniego okresu, związane z pojawieniem się wirusa RHD typu 2. Procesy rekombinacji genetycznej stwierdzono już u RHDV i RHDVa, ale skala zjawisk była ograniczona i nie miała decydującego wpływu na szeroką pojętą zmienność wirusa RHD (1, 24, 28). Znacznie większy udział mechanizmów rekombinacji lagowirusów wykazano, badając sekwencje kilkudziesięciu portugalskich szczepów RHDV z lat 1994-2014 (7, 49). Częste zjawiska wielokrotnej rekombinacji i kluczową rolę regionu startowego VP60, dzielącego genom na białka niestrukuralne i strukturalne, potwierdzono w grupie izolatów najmłodszych, zidentyfikowanych jako RHDV2, wykazujących znaczne genetyczne różnice w stosunku do szczepów starszych (21, 49). Filogeneza odcinków genów białek strukturalnych (VP60 i VP10) dowodzi,

że wszystkie szczepy RHDV2 tworzą zwartą grupę monofiletyczną, usytuowaną pomiędzy niepatogennymi szczepami typu RCV-A1 i słabo patogennym MRCV, co potwierdza bliskie pokrewieństwo patogenego wirusa RHDV2 z lagowirusami niechorobotwórczymi. Natomiast w przypadku pełnych genomów wielokrotnie wykazano, że obok sekwencji specyficznych dla RHDV2 występują zrekombinowane warianty, zawierające zawsze sekwencję VP60 RHDV2 w połączeniu z niestrukturalnym komponentem najmłodszych szczepów klasycznego RHDV z genogrupy G1 lub niechorobotwórczych lagowirusów RCV/RCV-A1 (49).

Obecność licznych rekombinantów RHDVG1/RHDV2 w populacji najnowszych szczepów wirusa z Półwyspu Iberyjskiego dowodzi, że jest to obecnie główny mechanizm warunkujący adaptację wirusa. Mechanizmy zmienności wirusowej rozpoznane u RHDV2 w powiązaniu z możliwościami zakażenia wielu gatunków zajęcowatych, innych niż *Oryctolagus cuniculus s. cuniculi*, podkreślają wyjątkową pozycję i przełomowe znaczenie tego wariantu wirusa RHDV w epidemiologii krwotocznych zakażeń u *Leporidae*.

Na podstawie wyników badań własnych można stwierdzić, że specyfika krajowych hodowli, z przewagą ferm drobnotowarowych oraz brak królików dzikich, wolno żyjących powodują, że głównym rezerwuarem wirusa podtypu RHDVa i źródłem nowych zakażeń są króliki z małych gospodarstw. Z kolei wybitnie sezonowy wzrost populacji królików, w tym podatnych na zakażenie RHDV i RHDVa zwierząt dwumiesięcznych i starszych, przypada na stosunkowo krótki okres od wiosny do jesieni, co w pewnym stopniu ogranicza transmisję wirusa. W połączeniu ze szczepieniami, stosowanymi regularnie od lat przez część hodowców są to czynniki ograniczające możliwości przetrwania i cyrkulacji wirusa w środowisku i zmniejszające ryzyko zakażeń RHDV, pomimo ogólnie wysokiego odsetka królików potencjalnie podatnych na zakażenie (27). RHDV2 to trzeci, po klasycznym RHDV i wariantcie RHDVa, patogenny wariant wirusa zdiagnozowany w okresie ponad 30 lat od rozpoznania krwotocznej choroby królików (RHD). Wyraźnie odrębna charakterystyka RHDV2 pod względem wielu cech (genetycznych, antygenowych, zakaźności, przełamywania bariery wiekowej i większego zakresu swoistego gospodarza) stanowi wyzwanie epidemiologiczne, potęguje trudności diagnostyczne. Udowodnione przełamywanie odporności poszczepiennej stawia pod znakiem zapytania skuteczność dotychczasowych programów immunoprofilaktycznych. Niski poziom ochrony, a często jej całkowity brak w zakażeniach RHDV2 wymaga stosowania nowych szczepionek, dopasowanych antygenowo do aktualnie krążącego wirusa. Można sądzić, że ryzyko pojawienia się w Polsce RHDV2 jest obecnie bardzo realne, mimo iż struktura rodzimych gatunków zajęcowatych jest odmienna niż we Francji, Włoszech, Hiszpanii czy Portugalii. Pojawienie się nowego typu wirusa RHD w kraju może być spowodowane różnymi

czynnikami, z których najbardziej prawdopodobne to: indywidualny wwóz z zagranicy zakażonych królików, utrzymywanych jako zwierzęta do towarzystwa, wprowadzanie zwierząt do celów hodowlanych lub naturalne przeniknięcie RHDV2 za pośrednictwem wektorów owadzych z krajów europejskich, gdzie choroba była już notowana.

Piśmiennictwo

1. Abrantes J., Esteves P. J., van der Loo W.: Evidence for recombination in the major capsid gene VP60 of the rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). Arch. Virol. 2008, 153, 329-335.
2. Abrantes J., Lopes A. M., Dalton K. P., Parra F., Esteves P. J.: Detection of RHDVa on the Iberian Peninsula: isolation of an RHDVa strain from a Spanish rabbitry. Arch. Virol. 2014, 159, 321-326.
3. Alda F., Gaitero T., Suarez M., Merchan T., Rocha G., Doadrio I.: Evolutionary history and molecular epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus in the Iberian Peninsula and Western Europe. BMC Evol. Biol. 2010, 10:347. DOI: 10.1186/1471-2148-10-347.
4. Almeida T., Lopes A. M., Magalhães M. J., Neves F., Pinheiro A., Gonçalves D., Leitão M., Esteves P. J., Abrantes J.: Tracking the evolution of the G1/RHDVb recombinant strains introduced from the Iberian Peninsula to the Azores islands, Portugal. Infect. Gen. Evol. 2015, 34, 307-313.
5. Asgari S., Hardy J. R. E., Cooke B. D.: Sequence analysis of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in Australia: alterations after its release. Arch. Virol. 1999, 144, 135-145.
6. Bailly J. L., Dagleish M. P., Graham M., Maley M., Rocchi M. S.: RHDV variant 2 presence detected in Scotland. Vet. Rec. 2014, 174, 411.
7. Bárcena J., Guerra B., Angulo I., González J., Válcárcel F., Mata C. P., Castón J. R., Blanco E., Alejo A.: Comparative analysis of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) and new RHDV2 virus antigenicity, using specific virus-like particles. Vet. Res. 2015, 46, 106.
8. Bergin I. L., Wise A. G., Bolin S. R., Mullaney T. P., Kiupel M., Maes R. K.: Novel calicivirus identified in rabbits, Michigan, USA. Emerg. Inf. Dis. 2009, 15, 1955-1962.
9. Boucher S., Rubeaux D., Le Gall-Reculé G., Rigau-deau A.: Cartographie des cas de VHD à RHDV2 (virus variant 2010) à partir des virus isolés depuis 2010 de lapins domestiques en France métropolitaine, sur l'île de la Réunion et en Espagne à l'aide d'une technique de RT-PCR temps réel. 2015, 16èmes Jour. Rech. Cunicole, 24-25 novembre, Le Mans, France, s. 25-28.
10. Bruce J. S., Twigg L. E.: Rabbit Haemorrhagic Disease: serological evidence of a non-virulent RHDV-like virus in south-western Australia. Wildl. Res. 2004, 31, 605-612.
11. Burmakina G., Malogolovkina N., Lunitsin A., Titov I., Tsybanov S., Malogolovkin A.: Comparative analysis of rabbit hemorrhagic disease virus strains originating from outbreaks in the Russian Federation. Arch. Virol. 2016, 161, 1973-1979.
12. Camarda A., Pugliese N., Cavadini P., Circella E., Capucci L., Caroli A., Legretto M., Mallia E., Lavazza A.: Detection of the new emerging rabbit haemorrhagic disease type 2 virus (RHDV2) in Sicily from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and Italian hare (*Lepus corsicanus*). Res. Vet. Sci. 2014, 97, 642-645.
13. Cancellotti F. M., Renzi M.: Epidemiology and the current situation of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome in Italy. Rev. Sci. Tech. 1991, 10, 409-422.
14. Capucci L., Fallacara F., Grazioli S., Lavazza A., Pacciarini M. L., Brocchi E.: A further step in the evolution of rabbit hemorrhagic disease virus: the appearance of the first consistent antigenic variant. Virus Res. 1998, 58, 115-126.
15. Capucci L., Fusi P., Lavazza A., Pacciarini M. L., Rossi C.: Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit hemorrhagic disease virus but nonpathogenic. J. Virol. 1996, 70, 8614-8623.
16. Capucci L., Scicluna M. T., Lavazza A.: Diagnosis of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome. Rev. Sci. Tech. 1991, 10, 347-370.
17. Chasey D.: Rabbit haemorrhagic disease: the new scourge of *Oryctolagus cuniculus*. Lab. Anim. 1997, 31, 33-44.
18. Chrobocińska M., Mizak B.: Phylogenetic analysis of partial capsid protein gene of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) strains isolated between 1993 and 2005 in Poland. B. Vet. I. Pulawy 2007, 51, 189-197.
19. Cooke B. D.: Rabbit haemorrhagic disease: field epidemiology and the management of wild rabbit populations. Rev. Sci. Tech. 2002, 21, 347-358.
20. Dalton K. P., Nicieza I., Abrantes J., Esteves P. J.: Spread of new variant RHDV in domestic rabbits on the Iberian Peninsula. Vet. Microbiol. 2014, 169, 67-73.

21. Dalton K. P., Nicieza I., Balseiro A., Muguerza M. A., Rosell J. M., Casais R., Alvarez A. L., Parra F.: Variant rabbit hemorrhagic disease virus in young rabbits, Spain. *Emerg. Inf. Dis.* 2012, 18, 2009-2012.
22. Duarte M. D., Henriques A. M., Barros S., Luis T., Fagulha T., Ramos F., Faveiro M.: New insight into the epidemiology of rabbit hemorrhagic diseases viruses in Portugal: Retrospective study reveals the circulation of genogroup 5 (G5) in Azores and discloses the circulation of G1 and G6 strains in mainland until 2008. *Infect. Gen. Evol.* 2014, 27, 149-155.
23. Esteves P. J., Abrantes J., Bertagnoli S., Cavadini P., Gavner-Widen D., Guitton J.-S.: Emergence of pathogenicity in lagoviruses: Evolution from pre-existing nonpathogenic strains or through a species jump? *PLOS pathog.* 2015, 11 (11): e1005087. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005087.
24. Esteves P. J., Abrantes J., Carneiro M., Müller A., Thompson G., van der Loo W.: Detection of positive selection in the major capsid protein VP60 of the rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). *Virus Res.* 2008, 137, 253-256.
25. Fitzner A.: Characterisation and immunogenic properties of Polish strains of RHD virus. *B. Vet. I. Pulawy* 2009, 53, 575-582.
26. Fitzner A., Kęsy A.: Variability of Polish isolates of the RHD virus. *Med. Weter.* 2003, 59, 905-908.
27. Fitzner A., Niedbalski W.: Serological survey for RHD antibodies in rabbits from two types of rabbit breeding farms. *Pol. J. Vet. Sci.* 2016, 19, 597-607.
28. Forrester N. L., Moss S. R., Turner S. L., Schirmer H., Gould E. A.: Recombination in rabbit haemorrhagic disease virus: Possible impact on evolution and epidemiology. *Virology* 2008, 376, 390-396.
29. Forrester N. L., Trout R. C., Gould E. A.: Benign circulation of rabbit haemorrhagic disease virus on Lambay Island, Eire. *Virology* 2007, 358, 18-22.
30. Gavner-Widen D., Mörner T.: Epidemiology and diagnosis of the European brown hare syndrome in Scandinavian countries: a review. *Rev. Sci. Tech.* 1991, 10, 453-458.
31. Górski J., Mizak B., Mizak Z., Komorowski A.: Obraz kliniczny oraz zmiany anatomopatologiczne w przebiegu pomoru królików (wirusowej krwiotocznej bronchopneumonii królików). *Zycie Wet.* 1988, 63, 266-269.
32. Gregg D. A., House C., Meyer R., Berninger M.: Viral haemorrhagic disease of rabbits in Mexico: epidemiology, and viral characterization. *Rev. Sci. Tech.* 1991, 10, 435-451.
33. Hall R. N., Mahar J. E., Haboury S., Stevens V., Holmes E. C., Strive T.: Emerging rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDVb), Australia. *Emerging Infect. Dis.* 2015, 21, 2276-2278.
34. Hall R. N., Peacock D. E., Kovaliski J., Mahar J. E., Mourant R., Piper M., Strive T.: Detection of RHDV2 in European brown hares (*Lepus europaeus*) in Australia. *Vet. Rec.* 2016. DOI: 10.1136/vr.104034.
35. Jahnke M., Holmes E. C., Kerr P. J., Wright J. D., Strive T.: Evolution and phylogeography of the nonpathogenic calicivirus RCV-A1 in wild rabbits in Australia. *J. Virol.* 2010, 84, 12397-12404.
36. Kerr P. J., Kitchen A., Holmes E. C.: The origin and phylodynamics of rabbit hemorrhagic disease virus. *J. Virol.* 2009, 83, 12129-12138.
37. Kęsy A., Fitzner A., Niedbalski W., Paprocka G., Walkowiak B.: A new variant of the viral haemorrhagic disease of rabbits virus. *Rev. Sci. Tech.* 1996, 15, 1029-1035.
38. Lavazza A., Cavadini P., Barbieri I., Tizzani P., Pinheiro A., Abrantes J., Esteves P. J., Grilli G., Gioia E., Zanoni M., Meneguz P. G., Guitton J. S., Marchandeu S., Chiari M., Capucci L.: Field and experimental data indicate that the eastern cottontail (*Sylvilagus floridanus*) is susceptible to infection with European brown hare syndrome (EBHS) virus and not with rabbit haemorrhagic disease (RHD) virus. *Vet. Res.* 2015. DOI 10.1186/s13567-015-0149-4.
39. Lavazza A., Scicluna M. T., Capucci L.: Susceptibility of hares and rabbits to the European brown hare syndrome virus (EBHSV) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) under experimental conditions. *J. Vet. Med. B* 1996, 43, 401-410.
40. Lee C. S., Park C. K.: Aetiological studies on a acute fatal disease of Angora rabbits: so-called rabbit viral sudden death. *Korean J. Vet. Res.* 1987, 27, 277-290.
41. Le Gall G., Arnaud C., Boilletot E., Morisse J. P., Rasschaert D.: Molecular epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus outbreaks in France during 1988 to 1995. *J. Gen. Virol.* 1998, 79, 11-16.
42. Le Gall-Reculé G., Lavazza A., Marchandeu S., Bertagnoli S., Zwingelstein F., Cavadini P., Martinelli N., Lombardi G., Guerin J. L., Lemaître E., Decors A., Boucher S., Le Normand B., Capucci L.: Emergence of a new lagovirus related to rabbit haemorrhagic disease virus. *Vet. Res.* 2013, 44:81. DOI: 10.1186/1297-9716-44-81.
43. Le Gall-Reculé G., Zwingelstein F., Fages M. P., Bertagnoli S., Gelfi J., Aubineau J., Roobrouck A., Botti G., Lavazza A., Marchandeu S.: Characterisation of a non-pathogenic and non-protective infectious rabbit lagovirus related to RHDV. *Virology* 2011, 410, 395-402.
44. Le Gall-Reculé G., Zwingelstein F., Laurent S., de Boissesson C., Portejoie Y., Rasschaert D.: Phylogenetic analysis, of rabbit haemorrhagic disease virus in France between 1993 and 2000, and the characterisation of RHDV antigenic variants. *Arch. Virol.* 2003, 148, 65-81.
45. Le Minor O., Beilvert F., Le Moulec T., Djadour D., Martineau J.: Evaluation de l'efficacité d'un nouveau vaccin contre le virus variant de la maladie hémorragique du lapin (VHD). 15èmes Jour. Rech. Cunicole. 2013, 19-20 Novembre, Le Mans, France, s. 241-244.
46. Liu S. J., Xue H. P., PU B. Q., Qian N. H.: A new viral disease in rabbits. *Anim. Husb. Vet. Med.* 1984, 16, 253-255.
47. Löfliger H. C., Eskens U.: Incidence, epizootiology and control of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome in Germany. *Rev. Sci. Tech.* 1991, 10, 423-434.
48. Lopes A. M., Correia J., Abrantes J., Melo P., Ramada M., Magalhães M. J., Alves P. C., Esteves P. J.: Is the new variant RHDV replacing genogroup 1 in Portuguese wild rabbit populations? *Viruses* 2015, 7, 27-36.
49. Lopes A. M., Dalton K. P., Magalhães M. J., Parra F., Esteves P. J., Holmes E. C., Abrantes J.: Full genomic analysis of new variant rabbit hemorrhagic disease virus (RHDVb) revealed multiple recombination events. *J. Gen. Virol.* 2015, 96, 1309-1319.
50. Lopes A. M., Marques S., Silva E., Magalhães M. J., Pinheiro A., Alves P. C., Le Pendu J., Esteves P. J., Thompson G., Abrantes J.: Detection of RHDV strains in the Iberian hare (*Lepus granatensis*): earliest evidence of rabbit lagovirus cross-species infection. *Vet. Res.* 2014, 45:94. DOI: 10.1186/s13567-014-0094-7.
51. Marcato P. S., Benazzi C., Vecchi G., Galeotti M., Della Salda I., Sarli G., Lucidi P.: Clinical and pathological features of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome. *Rev. Sci. Tech.* 1991, 10, 371-392.
52. Marchandeu S., Le Gall-Reculé G., Bertagnoli S., Aubineau J., Botti G., Lavazza A.: Serological evidence for a non-protective RHDV-like virus. *Vet. Res.* 2005, 36, 53-62.
53. Matiz K., Ursu K., Kecskemeti S., Bajmocy E., Kiss I.: Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) strains isolated between 1988 and 2003 in eastern Hungary. *Arch. Virol.* 2006, 151, 1659-1666.
54. McIntosh M. T., Behan S. C., Mohamed F. M., Lu Z., Moran K. E., Burrage T. G., Neilan J. G., Ward G. B., Botti G., Capucci L., Metwally S. A.: A pandemic strain of calicivirus threatens rabbit industries in the Americas. *Virology J.* 2007, 4:96. DOI 10.1186/1743-422X-4-96.
55. Meyers G., Wirblich Ch., Thiel H. J.: Rabbit hemorrhagic disease virus – molecular cloning and nucleotide sequencing of a calivirus genome. *Virology* 1991, 184, 664-676.
56. Morisse J. P., Le Gall G., Boilletot E.: Hepatitis of viral origin in Leporidae: introduction and aetiological hypotheses. *Rev. Sci. Tech.* 1991, 10, 283-295.
57. Moss S. R., Turner S. L., Trout R. C., White P. J., Hudson P. J., Desai A., Armesto M., Forrester N. L., Gould E. A.: Molecular epidemiology of Rabbit haemorrhagic disease virus. *J. Gen. Virol.* 2002, 83, 2461-2467.
58. Novotny M., Ros-Bascunana C., Ballagi-Pordany A., Gavner-Widen D., Uhlen M., Belak S.: Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease and European brown hare syndrome viruses by comparison of sequences from the capsid protein gene. *Arch. Virol.* 1997, 142, 657-673.
59. Ohlinger V. F., Haas B., Meyers G., Weiland F., Thiel H. J.: Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. *J. Virol.* 1990, 64, 3331-3336.
60. Puggioni G., Cavadini P., Maestrale C., Scivoli R., Botti G., Ligios C., Le Gall-Reculé G., Lavazza A., Capucci L.: The new French 2010 Rabbit hemorrhagic disease virus causes an RHD-like disease in the Sardinian Cape hare (*Lepus capensis mediterraneus*). *Vet. Res.* 2013, 44:96. DOI: 10.1186/1297-9716-44-96.
61. Rodák L., Šnid B., Valiček L., Veselý T., Štěpánek J., Hampl J., Jurák E.: Enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus and determination of its major structural proteins. *J. Gen. Virol.* 1990, 71, 1075-1080.
62. Schirmer H., Reimann I., Köllner B., Granzow H.: Pathogenic, antigenic and molecular properties of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) isolated from vaccinated rabbits: detection and characterization of antigenic variants. *Arch. Virol.* 1999, 144, 719-735.
63. Strive T., Wright J. D., Robinson A. J.: Identification and partial characterisation of a new lagovirus in Australian wild rabbits. *Virology* 2009, 384, 97-105.
64. Velarde R., Cavadini P., Neimanis A., Cabezon O., Chiari M., Gaffuri A., Lavin S., Grilli G., Gavner-Widen D., Lavazza A., Capucci L.: Spillover events of infection of Brown hares (*Lepus europaeus*) with rabbit haemorrhagic disease type 2 virus (RHDV2) caused sporadic cases of an European Brown Hare Syndrome-like disease in Italy and Spain. *Transbound. Emerg. Dis.* 2016. DOI 10.1111/tbed.12562.
65. Westcott D. G., Frossard J. P., Everest D., Dastjerdi A., Duff J. P., Steinbach F., Choudhury B.: Incursion of RHDV2-like variant in Great Britain. *Vet. Rec.* 2014, 174, 333.

Adres autora: dr hab. Andrzej Fitzner, prof. nadzw., ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola; e-mail: andrzej.fitzner@piwzp.pl