Wykrycie BBLV u nocka Natterera w Polsce

MARCIN SMRECZAK, ANNA ORŁOWSKA, PAWEŁ TRĘBAS

Zakład Wirusologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Otrzymano 15.02.2019

Zaakceptowano 09.07.2019

Smreczak M., Orłowska A., Trebas P.
Detection of BBLV in Natterer's bat in Poland

Summary

Rabies is a zoonosis caused by RNA viruses belonging to the genus *Lyssavirus*, which includes 16 species. In Europe, the majority of rabies cases in bats are caused by European bat 1 lyssavirus (EBLV-1) associated mainly with serotine bats (*Eptesicus serotinus* and *Eptesicus isabellinus*). In 2010, Bokeloh bat lyssavirus (BBLV) was detected in Natterer's bat (*Myotis nattereri*) in Germany and it was isolated several times in Germany and France in the following years. As required by the programme of passive rabies surveillance, the dead bat was sent to the laboratory and identified as Natterer's bat on the basis of morphological criteria, which was confirmed by genetic identification using the sequencing of the cytochrome b gene. Brain tissue and salivary glands were collected for examination. In the brain, the direct immunofluorescence test revealed lyssavirus antigen. The presence of the infectious virus in brain tissue was confirmed by a tissue culture inoculation test. High levels of viral RNA were found in the brain and salivary glands. In order to determine the virus species, a complete genome sequence was obtained by next-generation sequencing of RNAs. The analysis of the full virus genome sequence confirmed the occurrence of BBLV in Poland and revealed that it showed the highest similarity (99.3%) to German isolates from Bavaria.

Keywords: bats, rabies, Bokeloh bat lyssavirus, diagnosis

Nietoperze – *Chiroptera*, czyli rękoskrzydłe, dzielą się na dwa podrzędy: *Megachiroptera* i *Microchiroptera*. Do pierwszego z nich należą duże nietoperze owoco, nektarożerne, zasiedlające strefy tropikalne, reprezentujące jedną rodzinę Rudawkowate (*Pteropodidae*). Pozostałe nietoperze należą do podrzędu *Microchiroptera*, a wśród nich znajdują się nietoperze odżywiające się owadami, które występują także w Polsce. Nietoperze należą do grupy najmniej poznanych zwierząt spośród wszystkich ssaków, a zarazem są najbardziej rozpowszechnionymi ssakami na świecie, ustępując liczbą gatunków tylko gryzoniom. Spośród ponad 4600 znanych gatunków ssaków 1116 (około 20%) stanowią nietoperze, zasiedlając wszystkie kontynenty, z wyjątkiem Antarktydy, obszarów polarnych i kilku wysp oceanicznych (3).

Pomimo że już prawie 100 lat temu nietoperze były znane jako nosiciele wirusa wścieklizny w Ameryce Południowej i Środkowej, to do niedawna ich rola jako rezerwuaru wirusa wścieklizny nie była jednoznacznie określona. Wykrycie lyssawirusów u nietoperzy różnych gatunków niemal na całym świecie spowodowało, że zwierzęta te wzbudzają obecnie duże zainteresowanie jako źródło wielu nowo pojawiających się chorób. Publikacje ostatnich lat wskazują na wzrastające znaczenie tej grupy zwierząt jako ważnego

rezerwuaru wirusów, które mogą przekraczać bariery gatunkowe i zakażać ludzi oraz zwierzęta (ssaki) wolno żyjące i domowe (2, 3).

Wścieklizna jest chorobą odzwierzęcą (zoonozą) wywołaną przez RNA wirusy należące do rodzaju *Lyssavirus*, które wraz z innymi rodzajami tworzą rodzinę *Rhabdoviridae* w obrębie rzędu *Mononegavirales*. Obecnie rodzaj ten obejmuje 16 sklasyfikowanych gatunków, a dwa kolejne czekają na klasyfikację (11). Wszystkie dotychczas wykryte gatunki lyssawirusów występują u nietoperzy, z wyjątkiem dwóch lyssawirusów: Mokola virus (MOKV) i Ikoma lyssavirus (IKOV) (2).

W Europie większość przypadków wścieklizny u nietoperzy spowodowana była przez European bat lyssavirus 1 (EBLV-1) stwierdzany głównie u nietoperzy z rodziny mroczkowatych (*Vespertilionidae*) – mroczka późnego (*Eptesicus serotinus*) i mroczka pustynnego (*Eptesicus isabellinus*). Zakażenia EBLV-1 odnotowywane są przede wszystkim w Holandii, Niemczech, Danii, Polsce, Francji, Hiszpanii (13). Drugi z lyssawirusów wykrywany najczęściej u nietoperzy w Europie to European bat lyssavirus 2 (EBLV-2), który izolowany jest głównie od nocka rudego (*Myotis daubentonii*) oraz sporadycznie nocka łydkowatego (*Myotis dasycneme*) w Holandii, Szwajcarii,

Wielkiej Brytanii, Finlandii, Niemczech oraz ostatnio w Norwegii (10, 13-16).

W Europie odnotowywano również przypadki wścieklizny u nietoperzy innych gatunków wywołane przez inne lyssawirusy takie jak: West Caucasian bat virus (WCBV), Kotalahti bat lyssavirus (KBLV), Lleida bat lyssavirus (LLEBV) oraz Bokeloh bat lyssavirus (BBLV) (1, 5, 6, 10, 20, 22). BBLV po raz pierwszy izolowano od nietoperza z gatunku nocek Natterera (*Myotis Nattererii*) w 2010 r. w Niemczech. Od tego czasu zarejestrowano kolejne przypadki wścieklizny u nietoperzy spowodowane przez BBLV we Francji i Niemczech. Z wyjątkiem jednego przypadku zakażenia BBLV, stwierdzonego u karlika malutkiego (*Pipistrellus pipistrellus*), pozostałe przypadki diagnozowano u nocka Natterera, co wskazuje na jego rolę jako rezerwuaru dla tego gatunku lyssawirusa.

Nocek natterera jest gatunkiem nietoperza, który występuje niemalże w całej Europie z wyjątkiem środkowej i północnej Skandynawii, sięgając na wschodzie do Uralu i Kaukazu. W Polsce stwierdzany jest w całym kraju i uważa się go za gatunek niezagrożony i jest jednym z częściej i liczniej spotykanych nietoperzy. Podczas liczenia zimowego jest zwykle gatunkiem dominującym wśród nietoperzy zimujących w ceglanych piwnicach czy fortyfikacjach. Latem związany jest przede wszystkim z lasami ale może zasiedlać także parki. Jednak rzadko jest stwierdzany na terenach zurbanizowanych, gdzie najczęściej można go spotkać go zimą (21).

W Polsce w 1972 r. zdiagnozowano pierwszy przypadek wścieklizny u nietoperza z rodziny mroczkowatych. Do 1998 r. w Polsce zdiagnozowano kolejne 3 przypadki wścieklizny u nietoperzy w latach 1985, 1990 i 1995 (24). Od 1998 r. nastąpił wzrost liczby nietoperzy przesyłanych do diagnostyki wścieklizny, a tym samym nastąpił wzrost wykrywalności wścieklizny w tej grupie zwierząt. W Polsce do 2018 r. zdiagnozowano 119 przypadków wścieklizny u nietoperzy, w większości u mroczka późnego, wywołanych EBLV-1 (<https://www.who-rabies-bulletin.org>).

W pracy przedstawiano pierwszy w Polsce przypadek wścieklizny wywołany BBLV u nietoperza z gatunku nocek Natterera (*Myotis nattereri*).

Opis przypadku

W dniu 26.10.2016 r. martwy nietoperz został znaleziony na ulicy w miejscowości Kościelna Wieś, pow. Pleszew, woj. wielkopolskie. Zwłoki nietoperza zostały przekazane do regionalnego Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Poznaniu celem przeprowadzenia badania w kierunku obecności lyssawirusów w ramach biernego nadzoru nad wścieklizną. Po stwierdzeniu testem immunofluorescencji bezpośredniej charakterystycznych świeceń wskazujących na zakażenie lyssawirusem, nietoperza przesłano do Krajowego Laboratorium Referencyjnego ds. Wścieklizny Zakładu Wirusologii PIWet-PIB w celu potwierdzenia wyniku badania oraz do dalszych badań.

Identyfikacja gatunku nietoperza. Wstępnej identyfikacji gatunku nietoperza dokonano na podstawie cech morfologicznych (21). W celu potwierdzenia morfologicznej identyfikacji gatunkowej przeprowadzono identyfikację genetyczną opartą na analizie polimorfizmu fragmentu sekwencji genu cytochromu b mitochondrialnego DNA (cytbmtDNA). W celu izolacji mitochondrialnego DNA (mtDNA) od nietoperza pobrano fragment błony skrzydłowej, która poddana została ręcznej homogenizacji, a następnie trawieniu w buforze lizującym z dodatkiem proteinazy K w temperaturze 56°C przez noc. Po inkubacji lizat nanoszono na kolumnę, na której dochodziło do selektywnego wiązania się DNA, które następnie poddawano oczyszczaniu i elucji z wykorzystaniem zestawu QIAamp DNA Mini Kit. Amplifikacji, z wykorzystaniem mieszaniny starterów BarbF1/BWF/WF i BarbR2/BWR/WR (7) oraz Platinum Taq DNA polimerazy (Invitrogen) poddano fragment genu cytb o wielkości 900 nukleotydów. Reakcje przeprowadzano w termocyklerze xx według parametrów podanych przez Harris i wsp. (7). Amplikony uwiadczniano w 1% żelu agarozowym, oceniając ich masę, a następnie poddawano je sekwencjonowaniu z wykorzystaniem zestawu starterów użytych do amplifikacji DNA. Identyfikacja gatunku nietoperza odbywała się na podstawie porównania wszystkich par zasad uzyskanej sekwencji cytb mtDNA z referencyjnymi sekwencjami nukleotydowymi europejskich gatunków nietoperzy dostępnych w bazie GenBank z wykorzystaniem narzędzia bioinformatycznego Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Gatunek był określony (ustalony), jeśli podobieństwo uzyskanej sekwencji nukleotydowej było nie mniejsze niż 90% w odniesieniu do sekwencji referencyjnej wskazanej przez BLAST.

Test immunofluorescencji bezpośredniej (FAT). Wykonano odciski z tkanki mózgowej nietoperza, które następnie utrwalono i znakowano koniugatem FITC zawierającym przeciwciała dla wirusa wścieklizny. W badaniach wykorzystano dwa, dostępne komercyjnie, koniugaty: BioRad (Francja) oraz Sifin (Niemcy).

Tkankę mózgową oraz ślinianki pochodzące od badanego nietoperza poddawano homogenizacji, sporządzając 10% zawiesinę, która wykorzystywana była w teście izolacji wirusa oraz służyła do ekstrakcji całkowitego RNA.

Izolacja wirusa w hodowli komórek. Izolację przeprowadzano wykorzystując do zakażenia komórek Neuro-2a 10% zawiesinę tkanki mózgowej nietoperza. Następnie zakażona hodowla komórek inkubowana była przez 48 godzin w temp. 37°C w obecności 5% CO₂. Po inkubacji hodowla była utrwalana acetonem i znakowana koniugatem FITC w celu uwiadczenia ognisk namnażania się wirusa.

Ekstrakcja RNA. Ekstrakcji całkowitego RNA dokonano z 10% homogenatów tkanki mózgowej oraz ślinianek nietoperza z wykorzystaniem komercyjnego zestawu QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen), zgodnie z instrukcją producenta.

Diagnostyka molekularna

RT-PCR. Reakcję przeprowadzono zgodnie z opublikowaną wcześniej metodą (25) dla fragmentu genu N (600 pz) kodującego wirusową nukleoproteinę w oparciu o zestaw starterów zaprojektowanych przez Heaton i wsp. (8) oraz przy wykorzystaniu zestawu SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen).

Real time RT-PCR. W celu określenia gatunku lyssawirusa przeprowadzono reakcję RT-PCR w czasie rze-

czywistym (rtRT-PCR). W pierwszej kolejności rtRT-PCR przeprowadzono z wykorzystaniem starterów i sond specyficznych dla EBLV-1 i EBLV-2 zgodnie z metodyką opisaną przez Weakeley i wsp. (26), a następnie RNA wyizolowane z mózgowia i ślinianek nietoperza poddano badaniu rtRT-PCR ze starterami i sondą zaprojektowaną do wykrywania BBLV (6).

Sekwencjonowanie i analiza filogenetyczna. Produkt amplifikacji RT-PCR o wielkości 600 pz poddano sekwencjonowaniu w obydwu kierunkach nici metodą Sangera. W celu identyfikacji gatunku lyssawirusa uzyskaną sekwencję konsensusową fragmentu genu N porównano za pomocą algorytmu BLAST do referencyjnych sekwencji homologicznych dostępnych w bazie GenBank.

W celu potwierdzenia wstępnej identyfikacji gatunku lyssawirusa wyizolowane z mózgu nietoperza RNA poddano głębokiemu sekwencjonowaniu – Next Generation Sequencing (Genomed, Warszawa), dzięki czemu uzyskano kompletną/pełną sekwencję genomu wirusa. W pierwszym etapie sekwencjonowania genomowego przygotowano biblioteki z użyciem zestawu NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina, a następnie sprawdzono je przy użyciu BioAnalyzer 2100 z wykorzystaniem zestawu Agilent High Sensitivity DNA Kit. NGS przeprowadzono z wykorzystaniem sekwencjatora genomowego MiSeq (Illumina). Do przeprowadzenia analizy bioinformatycznej użyto oprogramowania Trimmomatic (filtrowanie odczytów, usuwanie adapterów) oraz CLC Genomic Workbench (mapowanie do sekwencji referencyjnej oraz analiza *de novo*). Uzyskaną w wyniku sekwencjonowania genomowego sekwencję nukleotydową (11880 nt) poddano analizie filogenetycznej w oparciu o sekwencje nukleotydowe referencyjnych lyssawirusów dostępnych w bazie GenBank. Stopień identyczności sekwencji nukleotydowych (stopień homologii) obliczono z wykorzystaniem programu BioEdit Sequence Alignment Editor, v. 7.0.9.0. Drzewo filogenetyczne utworzono w programie Mega 5.0 metodą NJ (neighbour joining) z wykorzystaniem modelu Kimura 2-parametrycznego. Ocenę wiarygodności topologii drzew filogenetycznych (bootstrap) przeprowadzono w liczbie 1000 powtórzeń. Wartość bootstrap $\geq 70\%$ została uznana jako wiarygodna przy tworzeniu podgrup.

Ryc. 1. Nietoperz przesłany do diagnostyki – na podstawie obecności rzędu sztywnych, haczykowatych włosów (strzałki) na brzegu błony ogonowej zidentyfikowany jako nocek Natterera

Wyniki i omówienie

Na podstawie cech morfologicznych, w tym obecności rzędu sztywnych, haczykowatych włosów na brzegu błony ogonowej między końcem ogona a końcami ostróg (ryc. 1), jak również przeprowadzonej identyfikacji genetycznej, w oparciu o analizę polimorfizmu fragmentu sekwencji genu cytochromu b mitochondrialnego DNA, otrzymany do diagnostyki wścieklizny nietoperz został zidentyfikowany jako nocek Natterera (*Myotis nattereri*).

W teście immunofluorescencji bezpośredniej z wykorzystaniem dwóch koniugatów (BioRad, Francja oraz Syfin, Niemcy) wykryto antygen lyssawirusa w odciskach z mózgowia nietoperza (ryc. 2, ryc. 3). Wynik FAT potwierdzony został poprzez izolację wirusa w hodowli komórek Neuro-2a. W teście rtRT-PCR uzyskano wyniki negatywne ze starterami specyficznymi dla gatunków EBLV-1 i EBLV-2, podczas gdy

Ryc. 2. Dodatni preparat z mózgowia badanego nietoperza znakowany koniugatem BioRad – widoczne świecenia charakterystyczne dla zakażenia lyssawirusem

Ryc. 3. Ujemny preparat z mózgowia nietoperza (kontrola ujemna) znakowany koniugatem BioRad – brak świeceń charakterystycznych dla zakażenia lyssawirusem

silnie dodatni wynik (Ct 14,39 i 24,57, odpowiednio, dla tkanki mózgowej i ślinianek) uzyskano w wyniku reakcji rtRT-PCR ze starterami komplementarnymi dla gatunku BBLV. W reakcji RT-PCR uzyskano produkt o oczekiwanej wielkości 600 pz, który następnie poddano sekwencjonowaniu metodą Sangera. Uzyskaną sekwencję fragmentu genu N poddano analizie z wykorzystaniem narzędzia bioinformatycznego BLAST. Przeprowadzona analiza wykazała obecność sekwencji nukleotydowej odpowiadającej sekwencji BBLV. Następnie materiał genetyczny wyizolowany z mózgowia nietoperza poddano sekwencjonowaniu genomowemu (NGS), uzyskując pełną sekwencję genomu (11801 pz). Analiza sekwencji wykazała najwyższe podobieństwo polskiego izolatu BBLV z BBLV izolowanym w Niemczech w miejscowości Ebermannstadt w Bawarii (99% homologii w obrębie całego genomu), podczas gdy z pozostałymi izolatami niemieckim z 2010 r. i 2016 r. oraz francuskim z 2012 r. podobieństwo było niższe (93% homologii dla każdego w obrębie całego genomu). Analiza filogenetyczna wszystkich dostępnych sekwencji genomowych BBLV wykazała zróżnicowanie pomiędzy izolatami, które tworzyły linie filogenetyczne A i B. Polski izolat grupował się w kładzie razem z 3 izolatami niemieckimi z Bawarii (Kronach, Lichtenfels, Ebermannstadt) oraz jednym z Francji (La Broidoire), który był najbardziej odmienny od pozostałych, tworząc linię B. Pozostałe izolaty tworzyły linię A (ryc. 4).

Dotychczas przypadki wścieklizny diagnozowane u nietoperzy w Polsce wywoływane były głównie przez European bat 1 lyssavirus (EBLV-1) – podtyp a, który dominuje w kraju (23). Z kolei zakażenia wywołane BBLV u nietoperzy były rejestrowane tylko w Niemczech i we Francji (5). Na podstawie przeprowadzonych badań po raz pierwszy w Polsce zdiagnozowano przypadek wścieklizny wywołany gatunkiem Bokeloh bat lyssavirus. Przypadek ten został stwierdzony w ramach prowadzonego w Polsce od lat biernego nadzoru nad wścieklizną u nietoperzy. Wirus został wyizolowany od nocka Natterera (*Myotis nattereri*), potwierdzając tym samym wcześniejsze badania, w których BBLV wykrywano głównie u tego gatunku nietoperza. Spośród wszystkich przypadków wścieklizny u nietoperzy wywołanych BBLV tylko jeden przypadek na 9 wykrytych, został stwierdzony u karlika malutkiego (*Pipistrellus pipistrellus*) w Niemczech, podczas gdy pozostałe zdiagnozowano u nocka Natterera (5). Zatem można przypuszczać, że nokie Natterera jest najprawdopodobniej gatunkiem stanowiącym rezerwuuar dla BBLV.

Przeprowadzone badania wykazały obecność antygeny lyssawirusa w mózgu nietoperza (FAT), a wysoki poziom wirusowego RNA (rtRT-PCR) wykryto zarów-

Ryc. 4. Drzewo filogenetyczne określające pokrewieństwo polskiego izolatu BBLV (080N) z europejskimi izolatami BBLV oraz lyssawirusa występującymi w Europie na podstawie pełnych sekwencji genomów

no w tkance mózgowej, jak i w śliniankach (Ct 14,39 i 24,57, odpowiednio, dla tkanki mózgowej i ślinianek). Wysoki poziom wirusowego RNA w śliniankach naturalnie zakażonego BBLV nietoperza sugeruje, że zakaźny wirus znajduje się w ślinie, co potwierdza, iż pogryzienia lub zadrapania przez chore zwierzęta powinny być traktowane jako potencjalne źródło zakażenia i zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt.

Jak już wspomniano wcześniej, w Europie, w tym także w Polsce, wścieklizna nietoperzy wywoływana jest głównie przez EBLV-1 (13). Tak duże różnice w liczbie diagnozowanych przypadków wścieklizny u nietoperzy w Europie wywołanych EBLV-1 w porównaniu z BBLV można wyjaśnić częściowo przypuszczalnymi gatunkami nietoperzy, które stanowią rezerwuuar dla tych dwóch gatunków lyssawirusów. Podczas gdy dla EBLV-1 za rezerwuuar uważany jest mroczek późny, to, jak wynika z dostępnych danych dla BBLV, rezerwuuar wirusa stanowi nokie Natterera. Choć występowanie nocka Natterera w Europie jest dość częste (21), to niewiele próbek pochodzących od tego gatunku przesyłanych jest do badań w kierunku wścieklizny. We Francji w ramach biernego nadzoru nad wścieklizną w latach 2001-2011 do badań w kierunku wścieklizny przesłano 2357 nietoperzy, z których tylko 11 stanowiły noki Natterera (20). W Polsce wstępne badania dotyczące molekularnej identyfikacji gatunków nietoperzy przysyłanych w latach 2012-2018 w ramach biernego nadzoru nad wścieklizną pokazują, iż 13 spośród 385 dotychczas zbadanych nietoperzy zidentyfikowano jako noki Natterera, podczas gdy 96 nietoperzy zidentyfikowano jako mroczek późny. Bardzo zróżnicowany bierny nadzór nad wścieklizną nietoperzy w Europie (4, 5), w połączeniu z niewielką liczbą nocków Natterera poddanych badaniom w kierunku wścieklizny i zasięgiem przypuszczalnego rezerwuaru sugerują, że BBLV występuje na znacznie

większym obszarze, daleko wykraczając poza miejsce jego faktycznego dotychczasowego wykrycia, czego potwierdzeniem jest izolacja BBLV w Polsce wskazująca, że wirus może być szeroko rozpowszechniony w Europie i najprawdopodobniej pokrywa się z zasięgiem występowania tego gatunku nietoperza na kontynencie europejskim.

Ponieważ obecne na rynku szczepionki przeciwko wściekliznie dla ludzi i zwierząt oparte są na wirusie wścieklizny (gatunek 1) to wraz z odkryciem nowego gatunku lyssawirusa pojawia się pytanie o krzyżową protekcję po narażeniu, uzyskaną po szczepieniu dostępnymi szczepionkami. Pomimo nielicznych przypadków wścieklizny wywołanych transmisją lyssawirusów od nietoperzy do ludzi i zwierząt w Europie należy stwierdzić, iż zagrożenie jest niewielkie, ale jednak realne i niezaprzeczalne (22). Przeprowadzone wstępne badania, dotyczące krzyżowej protekcji, wykazały, że dostępne na rynku szczepionki przeciwko wściekliznie, indukują odpowiedź immunologiczną zabezpieczając przed zakażeniem BBLV (12, 18).

Wraz z eliminacją wścieklizny u psów i innych ssaków, nie tylko w Europie, ale także na całym świecie, wzrastał będzie odsetek przypadków wścieklizny diagnozowanych u nietoperzy, dlatego też oprócz zwiększonego nadzoru nad wścieklizną nietoperzy oraz akcją informacyjną wśród społeczeństwa, dotyczącą potencjalnego zagrożenia płynącego z kontaktów z nietoperzami, konieczne są dalsze badania w celu oceny epidemiologii zakażeń lyssawirusami u nietoperzy, w tym BBLV. Dlatego wszystkie nietoperze, u których stwierdzono objawy wskazujące na wściekliznę lub padłe, zgodnie z zaleceniami EUROBATS (www.eurobats.org/sites/default/files/documents/pdf/Meeting_of_Parties/MoP5_Record_Annex5_Res5_2_bat_rabies.pdf) i EFSA (4), powinny być badane w kierunku wścieklizny, co może być pomocne w identyfikacji nowych gatunków lyssawirusów, gatunków nietoperzy będących ich rezerwuarami, geograficznego rozmieszczenia jak również stwierdzenia czy nowo odkryte lyssawirusy stanowią zagrożenie dla ludzi. Stworzenie odpowiedniego nadzoru nad wścieklizną nietoperzy w celu zapewnienia reprezentatywnej liczby próbek dobrej jakości nie jest jednak możliwe bez dobrej współpracy pomiędzy chiropterologami oraz osobami/laboratoriami zajmującymi się diagnostyką wścieklizny u zwierząt.

Piśmiennictwo

- Aréchiga Ceballos N., Vázquez Morón S., Berciano J. M., Nicolás O., Aznar López C., Juste J., Rodríguez Nevado C., Aguilar Setién A., Echevarría J. E.: Novel lyssavirus in bat, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 2013, 19, 793-795.
- Banyard A. C., Evans J. S., Luo T. R., Fooks A. R.: Lyssaviruses and bats: Emergence and zoonotic threat. *Viruses* 2014, 6, 2974-2990.
- Calisher C. H., Childs J. E., Field H. E., Holmes K. V., Schountz T.: Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006, 19, 531-545.
- Cliquet F., Freuling C., Smreczak M., Van der Poel W. H. M., Horton D., Fooks A. R., Robardet E., Picard-Meyer E., Müller T.: Development of harmonised schemes for monitoring and reporting of rabies in animals in the European Union. EFSA Supporting Publication 2010; 7(7):EN-67, 60 pp.
- Ergerbauer E., Troupin C., Passior K., et al.: The Recently Discovered Bokeloh Bat Lyssavirus: Insights Into Its Genetic Heterogeneity and Spatial Distribution in Europe and the Population Genetics of Its Primary Host. *Adv. Virus Res.* 2017, 99, 199-232.
- Freuling C. M., Abendroth B., Beer M., Fischer M., Hanke D., Hoffmann B., Höper D., Just F., Mettenleiter T. C., Schatz J., Müller T.: Molecular diagnostics for the detection of Bokeloh bat lyssavirus in a bat from Bavaria, Germany. *Virus Res.* 2013, 177, 201-204.
- Harris S. L., Johnson N., Brookes S. M., Hutson A. M., Fooks A. R., Jones G.: The application of genetic markers for EBLV surveillance in European bat species. Towards the Elimination of Rabies in Eurasia. Vol. 131. Karger 2008, s. 347-363.
- Heaton P. R., Johnstone P., McElhinney L. M., Cowley R., O'Sullivan E., Whitby J. E.: Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. *J. Clin. Microbiol.* 1997, 35, 2762-2766.
- Hu S. C., Hsu C. L., Lee M. S., Tu Y. C., Chang J. C., Wu C. H., Lee S. H., Ting L. J., Tsai K. R., Cheng M. Ch., Wen-Jane Tu W. J., Wei-Cheng Hsu W. C.: Lyssavirus in Japanese Pipistrelle, Taiwan. *Emerg. Infect. Dis.* 2018, 24, 782-785.
- Jakava-Viljanen M., Lilley T., Kyheröinen E. M., Huovilainen A.: First encounter of European bat lyssavirus type 2 (EBLV-2) in a bat in Finland. *Epidemiol. Infect.* 2010, 138, 1581-1585.
- Maes P., Amarasinghe G. K., Ayllón M. A., et al.: Arch. Virol. 2019, <https://doi.org/10.1007/s00705-018-04126-4>.
- Malerczyk C., Freuling C., Gniel D., Giesen A., Selhorst T., Müller T.: Cross-neutralization of antibodies induced by vaccination with Purified Chick Embryo Cell Vaccine (PCECV) against different Lyssavirus species. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2014, 10, 2799-2804.
- McElhinney L. M., Marston D. A., Leech S., Freuling C. M., van der Poel W. H., Echevarría J., Vázquez-Morón S., Horton D. L., Müller T., Fooks A. R.: Molecular Epidemiology of Bat Lyssaviruses in Europe. *Zoon. Pub. Health*, 2013, 60, 35-45.
- McElhinney L. M., Marston D. A., Wise E. L., Freuling C. M., Bourhy H., Zanoni R., Moldal T., Kooi E. A., Neubauer-Juric A., Nokireki T., Müller T., Fooks A. R.: Molecular Epidemiology and Evolution of European Bat Lyssavirus 2. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 156.
- Megali A., Yannic G., Zahno M. L., Brugger D., Bertoni G., Christe P., Zanoni R.: Surveillance for European bat lyssavirus in Swiss bats. *Arch. Virol.* 2010, 155, 1655-1662.
- Moldal T., Vikoren T., Cliquet F., Marston D. A., van der Kooij J., Madslien K., Ørpetveit I.: First detection of European bat lyssavirus type 2 (EBLV-2) in Norway. *BMC Vet. Res.* 2017, 13, 216-223.
- Nokireki T., Tammiranta N., Kokkonen U. M., Kantala T., Gadd T.: Tentative novel lyssavirus in a bat in Finland. *Transbound. Emerg. Dis.* 2018, 65, 593-596.
- Nolden T., Banyard A. C., Finke S., Fooks A. R., Hanke D., Höper D., Horton D. L., Mettenleiter T. C., Müller T., Teifke J. P., Freuling C. M.: Comparative studies on the genetic, antigenic and pathogenic characteristics of Bokeloh bat lyssavirus. *J. Gen. Virol.* 2014, 95, 1647-1653.
- Picard-Meyer E., Beven V., Hirschaud E., Guillaume C., Larcher G., Robardet E., Servat A., Blanchard Y., Cliquet F.: Lleida Bat Lyssavirus isolation in *Miniopterus schreibersii* in France. *Zoon. Pub. Health* 2019, 66, 254-258.
- Picard-Meyer E., Servat A., Robardet E., Moinet M., Borel C., Cliquet F.: Isolation of Bokeloh bat lyssavirus in *Myotis nattereri* in France. *Arch. Virol.* 2013, 158, 2333-2340.
- Sachanowicz K., Ciechanowski M.: Nietoperze Polski. Multico, Warszawa 2005.
- Shipley R., Wright E., Selden D., Wu G., Aegerter J., Fooks A. R., Banyard A. C.: Bats and Viruses: Emergence of Novel Lyssaviruses and Association of Bats with Viral Zoonoses in the EU. *Trop. Med. Infect. Dis.* 2019, 4, 31.
- Smreczak M.: Charakterystyka genotypowa szczepów EBLV 1 pochodzących od nietoperzy w Polsce. Rozprawa habilitacyjna, PIWet-PIB, Puławy 2013.
- Smreczak M., Orłowska A., Trębas P., Żmudziński J. F.: First case of the European Bat Lyssavirus type b in bats (*Eptesicus serotinus*) in Poland in retrospective study. *Bull. Vet. Inst. Puławy* 2009, 53, 589-595.
- Smreczak M., Orłowska A., Trębas P., Żmudziński J. F.: Wykorzystanie metody hemi-nested-RT-PCR do różnicowania zakażeń wywołanych klasycznym wirusem wścieklizny i EBLV1 u zwierząt lądowych. *Med. Weter.* 2008, 64, 314-317.
- Wakeley P. R., Johnson N., McElhinney L. M., Marston D., Sawyer J., Fook A. R.: Development of a real-time, TaqMan reverse transcription-PCR assay for detection and differentiation of lyssavirus genotypes 1, 5, and 6. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43, 2786-2792.

Adres autora: dr hab. Marcin Smreczak, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: smreczak@piwet.pulawy.pl