

Badania filogenetyczne wirusa RHD

JOANNA DZIAŁO, WIESŁAW DEPTUŁA

Katedra Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński w Szczecinie, ul. Felczaka 3c, 71-412 Szczecin

Otrzymano 14.11.2013

Zaakceptowano 29.01.2014

Działo J., Deptuła W.

Phylogenetic studies of RHD virus

Summary

RHD virus (RHDV), which causes rabbit hemorrhagic disease, is the object of phylogenetic studies. The results of these studies provide valuable information on this pathogen. The purpose of present review is to summarize current knowledge about the phylogenetic position of this virus. The paper discusses the results of previous phylogenetic studies of RHDV, including factors affecting the shape of the phylogeny of this species and the diversity of RHDV strains in different parts of the world. It also presents the results of phylogenetic analysis of RHDV enriched with non-pathogenic and low pathogenic strains of rabbit lagoviruses, as well as phylogenetic analyses performed using modern Bayesian methods. The paper also highlights the unclear situation of Lagovirus taxonomy and shows selected data on the evolution of RHDV, gathered using phylogenetic methods. Finally, the possibility of using rabbit lagoviruses as a model for the study of the evolution of mammalian ssRNA(+) viruses has been shown.

Keywords: RHD virus, rabbit lagoviruses, phylogenetic analyze

Wirus RHD (RHDV) jest wysoce zakaźnym patogenem królików, powodującym u nich chorobę krwotoczną – RHD (rabbit haemorrhagic disease), w Polsce określaną jako pomór królików. Choroba powodowana przez ten wirus szybko i łatwo przenosi się z osobnika na osobnika i odznacza się wysokim odsetkiem śmiertelności, co sprawia, że stanowi ona istotne zagrożenie dla populacji królików utrzymywanych w hodowlach oraz wolno żyjących (3, 46). RHDV jest przedstawicielem rodzaju Lagovirus, w obrębie rodziny *Caliciviridae*, która skupia bezosłonkowe wirusy ssRNA(+) (www.ictvonline.org; viralzone.expasy.org). Większości wirusów z tej rodziny, w tym RHDV, nie udaje się namnożyć w hodowlach komórkowych, co jest jedną z przyczyn ograniczeń w możliwościach ich badania (3). Skutkiem tego jest m.in.: niezadowolająca sytuacja taksonomiczna króliczych lagowirusów, jako że w obrębie tego rodzaju obowiązująca systematyka wirusologiczna wyodrębnia jedynie dwa gatunki, takie jak: wirus RHD zakażający króliki oraz wirus EBHS zakażający zające. Taki status taksonomiczny RHDV nie pokazuje różnorodności wśród króliczych lagowirusów. Przede wszystkim, obecna taksonomia tego rodzaju nie uwzględnia zmienności genetycznej wśród szczepów RHDV, które na podstawie analiz filogenetycznych zaklasyfikowano do różnych grup genetycznych (3). Wśród tych grup warto zwrócić uwagę m.in. na opisywany odrębny podtyp wirusa RHD, nazwany RHDVa lub wariantem antygenowym RHDV, w odróżnieniu od szczepów określanых jako

klasyczne, standardowe czy też oryginalne. Wirusy z podtypu RHDVa różnią się od szczepów klasycznych reaktywnością w teście ELISA z panelem przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko białku kapsydu tego wirusa (7, 43). Wśród króliczych lagowirusów opisywane są również szczepy znacznie zdystansowane genetycznie od RHDV, różniące się od nich dodatkowo patogennością w stosunku do królików, ale także w niektórych przypadkach tropizmem komórkowym, bo wiele z nich, w odróżnieniu od szczepów RHDV i RHDVa, wykrywano w jelitach, nie zaś w wątrobie królików. Te niepatogenne i słabo patogenne królicze lagowirusy określane bywają także jako wirusy RCV-like (24) lub NP-LV (non-pathogenic lagovirus) (21). Przesłanką do poszukiwania tych szczepów było odkrycie, iż u królików nieszczepionych przeciwko RHD i nie mających wcześniejszego kontaktu z RHDV występują przeciwciała przeciwko temu wirusowi (42). Do tej pory wśród nich opisano: włoski RCV (Rabbit calicivirus) (8), brytyjski Lambay (16), amerykański MRCV (Michigan Rabbit calicivirus) (5), francuski 06-11 (21) oraz australijski RCV-A1 (Rabbit calicivirus Australia 1), który ostatnio sklasyfikowano jako nowy dodatkowy typ króliczego kaliciwirusa (28, 44). Także ostatnio opublikowane prace (10, 19, 20) donoszą o pojawieniu się i szybkim rozprzestrzeleniu patogennych króliczych lagowirusów, takich jak francuski wariant RHDV (20) oraz RHDVb (10), sklasyfikowanych jako nowy typ RHDV – RHDV2 (19), które są bardziej spokrewnione z niepatogennymi

króliczymi lagowirusami aniżeli ze szczepami RHDV i RHDVa. Bardzo ważny wydaje się fakt, że szczepy RHDV2 powodują chorobę nie tylko u królików, ale także u jednego z gatunków zajęcy (*Lepus capensis mediterraneus*) występującego na Sardynii, przypominającą pod względem obrazu klinicznego pomór królików (41). Przypuszcza się, że króliczych lagowirusów, szczególnie tych niepatogennych, może być znacznie więcej i że występują one powszechnie w populacjach królików, a jedynie ich wykrywalność jest niska (32). Sytuacja powyższa powoduje, że królicze lagowirusy różniące się od RHDV i RHDVa są przez różnych autorów klasyfikowane jako przodek RHDV, jako warianty tego wirusa bądź jako nowy gatunek, który nie figuruje w systematyce wirusologicznej. Z drugiej strony, wirus RHD wydaje się dobrym modelem dla śledzenia ewolucji wirusów RNA z uwagi na zgromadzenie dosyć dużej liczby izolatów/szczepów pochodzących z całego świata i otrzymanych w stosunkowo długim czasie, obejmującym znaczną część okresu jego obecności w środowisku (29). Jednym z narzędzi do przewidywania zależności ewolucyjnych wśród wirusów są analizy filogenetyczne, których wiele wykonano dotychczas w oparciu o sekwencje kodujące różne części genomu wirusa RHD lub w oparciu o sekwencje aminokwasowe białek tego wirusa. Stąd celem niniejszej pracy jest przybliżenie stanu wiedzy nad zależnościami filogenetycznymi wśród szczepów RHDV, z uwzględnieniem króliczych lagowirusów o niewyjaśnionym do dziś statusie taksonomicznym.

Czynniki wpływające na wyniki badań filogenetycznych RHDV

Podstawę przewidywania zależności filogenetycznych między wirusami stanowią dane otrzymywane z porównania sekwencji nukleotydowych różnych części ich genomu, bądź przewidywanych w oparciu o te sekwencje – sekwencji aminokwasowych białek. Pierwsze wyniki analiz filogenetycznych szczepów wirusa RHD opublikowane zostały w 1997 r. (37) i od tamtej pory regularnie pojawiają się opracowania z tej tematyki badawczej. W różnych pracach z zakresu zależności filogenetycznych pomiędzy szczepami RHDV, ale także w pracach określających zależności filogenetyczne w obrębie króliczych lagowirusów stwierdzono na podstawie topologii generowanych drzew filogenetycznych grupowanie się analizowanych w nich szczepów w 2-8 grup (tab. 1). Można sądzić, że różnice w liczbie tych grup wynikają po części z zastosowanej metodologii prowadzenia analizy filogenetycznej, to jest z doboru sekwencji do badań (nukleotydowych lub aminokwasowych, jak też wielkości analizowanych fragmentów) i wyboru metody do konstrukcji drzewa filogenetycznego.

Analiza wyników dotychczas opublikowanych badań z zakresu filogenezy RHDV (tab. 1) wskazuje, że ważnymi czynnikami wpływającymi na wyniki filogenezy są: liczba szczepów użytych do analizy

oraz okres z jakiego pochodzą szczepy. W przypadku tych dwóch kryteriów wydaje się istnieć pewna zależność, jako że im więcej szczepów poddawano analizie i im wyższa była różnica czasu otrzymania pomiędzy szczepem najstarszym a najnowszym, tym większą liczbę grup genetycznych uzyskiwano (18, 22, 35, 37). Tę hipotezę najlepiej obrazuje porównanie wyników pierwszych badań z zakresu filogenezy RHDV (18, 37), gdzie oceniono poddano po kilkadziesiąt szczepów tego wirusa otrzymanych w okresie 9 lat, wśród których wyodrębniono 3 grupy, z badaniami nieco nowszymi (22, 35), gdzie oceniając więcej szczepów niż poprzednio, otrzymanych w dłuższym przedziale czasowym, uzyskano wśród nich 6 i 7 grup. Przykładowo, analiza filogenetyczna 62 europejskich (głównie francuskich) szczepów RHDV otrzymanych w latach 1987-1994 wykazała ich przynależność do trzech genogrup (G1-G3), z których dwie – G1 i G2 – wydawały się zanikać, zaś G3 pokazywała tendencję rozwojową (18). Obserwację tę potwierdziła kolejna analiza europejskich szczepów RHDV, także głównie francuskich, przeprowadzona przez Le Gall-Recule i wsp. (22), obejmująca lata 1987-2000 i znacznie większą liczbę szczepów, w której oprócz potwierdzenia tendencji zanikowej dla genogrup G1 i G2, zaobserwowano także pojawienie się dodatkowych trzech genogrup (G4-G6), w których znalazły się szczepy otrzymane po 1993 r. Zasygnalizowano również, że w miarę upływu czasu i pojawiania się nowych genogrup, szczepy z wcześniejszych grup genetycznych, zmniejszały swój udział w populacji wirusa RHD w środowisku, ustępując szczepom z nowo pojawiających się genogrup. Wyjątek stanowiły szczepy z genogrupy G6, gromadzącej szczepy RHDVa, które zgodnie z przewidywaniami Capucciego i wsp. (7), wydają się zdobywać liczebną przewagę w środowisku. Należy dodać, że prace zespołu francuskiego (22), do chwili obecnej stanowią fundament dla wielu analiz filogenetycznych, w których badacze (6, 9, 10, 33, 36, 38, 47) odnoszą uzyskany dla ocenianych przez siebie szczepów podział do podziału według Le Gall-Recule i wsp. (22), przy czym trzeba zaznaczyć, iż część ze wspomnianych analiz (10, 36, 38, 47) nie rozdziela genogrup G3-G5, traktując je jako jedną grupę. Taka sytuacja oraz wyniki badań filogenetycznych przeprowadzonych metodami bayesowskimi (18, 29, 30), stanowią potwierdzenie przewidywań Le Gall-Recule i wsp. (22), iż grupy G3-G5 powstawały, ewoluując kolejno jedna z drugiej. Rozpatrując wpływ doboru sekwencji do badań filogenetycznych dotyczących wirusa RHD, warto również zwrócić uwagę na te analizy, w których oprócz szczepów RHDV uwzględniono także niepatogenne i słabo patogenne królicze lagowirusy (10, 11, 20, 28, 44). W badaniach tego typu uzyskiwano nieco niższą liczbę grup w obrębie szczepów RHDV. Topologia drzew filogenetycznych wzbogaconych o sekwencje szczepów RCV-like i/lub RCV-A1, wskazuje na dosyć bliskie pokrewieństwo

Tab. 1. Wyniki badań filogenetycznych dotyczących wirusa RHD i innych króliczych lagowirusów

Lp.	Liczba szczepów	Pochodzenie szczepów	Czas otrzymania szczepów	Porównywana sekwencja nukleotydowa/aminokwasowa	Metoda analizy	Grupowanie szczepów	Rok publikacji i pozycja piśmiennictwa
1.	44 RHDV	Europa, Azja, Ameryka	1987-1995	Sekwencja kodująca VP60, bliżej C-końca (pozycja 6412-6809nt)	NJ	3 grupy genetyczne	1997 (37)
2.	62 RHDV	Europa (głównie Francja)	1987-1994	Sekwencja kodująca VP60, C-koniec (pozycja 6473-7011nt) Sekwencja kodująca VP60, N-koniec (pozycja 5271-5829 nt) Sekwencja kodująca p30/p29 (pozycja 2302-2793 nt)	UPGMA	3 genogrupy	1998 (18)
3.	59 RHDV (w tym niepatogenne) 2 RCV-like	Europa (głównie Wielka Brytania), Ameryka, Nowa Zelandia	1955-2001	Sekwencja kodująca VP60, bliżej C-końca (pozycja 6135-6719 nt)	ML	8 grup, w tym jedna zawierająca szczepy RCV-like	2002 (35)
4.	142 RHDV	Europa (głównie Francja) i Ameryka	1987-2000	Sekwencja kodująca VP60, C-koniec (pozycja 6473-7011nt)	NJ	6 genogrup	2003 (22)
5.	78 RHDV (w tym niepatogenne)	Europa, Azja, Ameryka, Nowa Zelandia	1955-2003	Sekwencja kodująca VP60, bliżej C-końca (pozycji nie podano)	ML	2 grupy z Nowej Zelandii, dla reszty szczepów nie analizowano grupowania	2003 (14)
6.	61 RHDV (w tym niepatogenne)	Europa, Azja, Ameryka, Nowa Zelandia	1955-2001	Sekwencja kodująca VP60, bliżej C-końca (pozycji nie podano)	ML	3 grupy	2006 (13)
7.	34 RHDV	Europa (głównie Węgry)	1987-2003	Sekwencja kodująca VP60, C-koniec (pozycja 6384-7010 nt)	NJ	3 genogrupy	2006 (33)
8.	24 RHDV	Europa, Azja, Ameryka	1987-2004	Sekwencja kodująca VP60, bliżej C-końca (pozycja 6482-6782 nt)	ML	6 genogrup	2006 (6)
9.	71 RHDV (w tym niepatogenne)	Europa, Azja, Ameryka, Nowa Zelandia	1955-2003	Sekwencja kodująca VP60, bliżej C-końca (pozycji nie podano)	ML	7 grup	2006 (17)
10.	61 RHDV (w tym niepatogenne) 3 RCV-like	Europa, Azja, Ameryka, Nowa Zelandia	1955-2003	Sekwencja kodująca VP60, bliżej C-końca (pozycja 6135-6719 nt)	NJ	8 grup, w tym jedna zawierająca szczepy RCV-like	2007 (16)
11.	43 RHDV	Europa (głównie Polska), Azja i Ameryka	1984-2005	Sekwencja kodująca VP60, bliżej C-końca (pozycja 6514-6970)	NJ	6 genogrup	2007 (9)
12.	17 RHDV	Europa, Azja, Nowa Zelandia	1984-2005	Sekwencja aminokwasowa VP60, cała	bd	2 klastry	2007 (45)
13.	45 RHDV	Europa Azja Nowa Zelandia, Ameryka	1984-2005	Sekwencja aminokwasowa VP60, cała	UPGMA	2 grupy	2007 (34)
14.	34 RHDV	Azja (głównie Korea), Europa, Nowa Zelandia, Ameryka	1985-2008	Sekwencja kodująca VP60 (pozycja 5305-7047)	NJ	2 klastry	2009 (39)
15.	15 RHDV 3 RCV-like 1 RCV-A1	Australia, Europa, Ameryka, Azja	1987-2006	Sekwencja kodująca VP60 (pozycji nie podano)	NJ	4 grupy, przy czym dwie z nich skupiają szczepy RCV-like i RCV-A1	2009 (44)
16.	66 RHDV	Europa (głównie Półwysep Iberyjski), Azja, Ameryka	1987-2007	Sekwencja kodująca VP60, bliżej C-końca, (pozycja 6157-6703)	NJ	6 genogrup i 3 grupy szczepów z Półwyspu Iberyjskiego w obrębie jednej z nich	2009 (36)
17.	14 RHDV	Europa, Azja, Ameryka	1987-2006	Sekwencja kodująca p30/p29 (pozycja 2302-2793 nt)	OD ML	4 grupy genetyczne	2009 (26)
18.	210 RHDV (w tym niepatogenne)	Europa, Azja, Ameryka, Nowa Zelandia	1984-2008	Krótką sekwencja kodująca VP60 (pozycja 1111-1387 nt w sekwencji kodującej VP60)	MCC	4 grupy	2009 (29)
19.	31 RHDV (w tym niepatogenne) 3 RCV-like	Europa, Azja, Ameryka, Nowa Zelandia	1987-2007	Sekwencja aminokwasowa 97% białka VP60	NJ	3 grupy, w tym jedna skupia szczepy RCV-like	2010 (1)
20.	32 RHDV (w tym niepatogenne)	Europa, Azja, Ameryka, Nowa Zelandia	1987-2006	Sekwencja kodująca RdRp długości 1326 nt (pozycji nie podano)	ML	2 grupy genetyczne	2010 (25)
21.	16 RHDV	Europa – Francja	1988-2005	Sekwencja kodująca VP60, C-koniec (pozycja 6473-7011 nt)	OD	4 grupy genetyczne	2010 (24)
22.	46 RHDV (w tym niepatogenne)	Europa, Azja, Ameryka, Nowa Zelandia	1987-2008	Sekwencja kodująca VP60, N-koniec (pozycja 5271-5829 nt)	Kimury	6 grup genetycznych	2010 (40)

Tab. 1. c.d.

Lp.	Liczba szczepów	Pochodzenie szczepów	Czas otrzymania szczepów	Porównywana sekwencja nukleotydowa/aminokwasowa	Metoda analizy	Grupowanie szczepów	Rok publikacji i pozycja piśmiennictwa
23.	151 RHDV (w tym niepatogenne)	Europa (głównie Półwysep Iberyjski), Azja, Ameryka, Nowa Zelandia	1955-2007	Sekwencja kodująca VP60, bliżej C-końca (pozycji nie podano)	BI	3 linie i 6 grup szczepów z Półwyspu Iberyjskiego w obrębie jednej z nich	2010 (4)
24.	31 RHDV	Europa, Azja, Ameryka, Australia	1984-2006	Sekwencja kodująca VP60, cała (pozycji nie podano)	MCC	4 kłady	2010 (30)
25.	29 RHDV 2 RCV-like 38 RCV-A1	Australia, Europa, Azja	1984-2009	Sekwencja kodująca VP60, cała (pozycji nie podano)	MCC	4 linie, w tym jedna skupia szczepy RCV-like i jedna RCV-A1 (ta dzieli się na 6 kładów)	2010 (28)
26.	32 RHDV (w tym niepatogenne) 3 RCV-like 1 RCV-A1	Europa, Azja, Ameryka, Australia, Nowa Zelandia	1984-2007	Sekwencja kodująca VP60, cała (pozycji nie podano)	ME	3 grupy genetyczne skupiające szczepy RCV-like, RCV-A1 i RHDV (tu podział na dwie podgrupy)	2011 (20)
27.	54 RHDV (w tym niepatogenne)	Europa, Azja, Ameryka, Nowa Zelandia	1987-2006	Sekwencja kodująca VP60, cała (pozycji nie podano)	NJ	4 kłady	2011 (38)
28.	125 RHDV 4 RCV-like 36 RCV-A1	Nie podano	Nie podano	Sekwencja kodująca VP60, bliżej C-końca (pozycja 1188-1541 nt w sekwencji kodującej VP60)	ME	4 grupy genetyczne, w tym grupa zawierająca szczepy RCV-like i kolejna ze szczepami RCV-A1	2011 (21)
29.	34 RHDV	Europa (głównie Polska), Azja, Ameryka	1987-2006	Sekwencja kodująca VP60, bliżej C-końca (pozycja 6069-6654 nt)	NJ	3 grupy genetyczne	2012 (12)
30.	30 RHDV 6 RCV-like	Nie podano	Nie podano	Sekwencja kodująca VP60, bliżej C-końca (pozycja 6056-6794 nt)	NJ	3 kłady, w tym jeden skupiający szczepy RCV-like	2012 (10)
31.	44 RHDV	Azja (głównie Chiny), Europa, Ameryka	1984-2010	Sekwencja kodująca VP60, cała (pozycja 5290-7273 nt)	NJ	6 genogrup i 4 podgrupy chińskie	2012 (47)
32.	65 RHDV	Nie podano	1984-2009	Sekwencja kodująca VP60, cała (pozycji nie podano)	ML MCC	4 linie	2012 (23)
33.	31 RHDV	Nie podano	1987-2009	Sekwencja kodująca RdRp, cała (pozycji nie podano)	MCC	4 linie	2012 (23)
34.	32 RHDV	Europa, Azja, Ameryka, Australia	1984-2005	Sekwencja kodująca VP60, N-końiec, (pozycja 5271-5829 nt)	ML	5 grup genetycznych	2013 (27)
35.	85 RHDV 3 RCV-like	Europa, Azja, Ameryka, Australia	1989-2012	Sekwencja kodująca VP60, cała (pozycji nie podano)	ML	5 grup, w tym grupa zawierająca szczepy RCV-like	2013 (2)
36.	70 RHDV 3 RCV-like 36 RCV-A1 7 RHDV2	Europa, Azja, Ameryka, Australia	1984-2012	Sekwencja kodująca VP60, cała (pozycji nie podano)	NJ	4 grupy zawierające szczepy: RHDV (z 4 podgrupami), RCV-like, RCV-A1, RHDV2	2013 (19)

Objaśnienia: NJ – metoda przyłączania sąsiadów; UPGMA – metoda średnich połączeń; ML – metoda największej wiarygodności; OD – metoda rzeczywistej rozbieżności (observed divergence); MCC – metoda najwyższej wiarygodności kładów (maximum clade credibility); BI – inferencja bayesowska (bayesian inference); ME – metoda minimalnej odległości (minimum evolution); bd – brak danych; nt – nukleotyd; aa – aminokwas

między tymi wirusami a RHDV, co w obliczu nie do końca zdefiniowanego dla wirusów pojęcia gatunku (31) i nieuregulowanej sytuacji taksonomicznej króliczych lagowirusów oraz pojawiania się nowych patogennych szczepów króliczych lagowirusów – RHDV2, bardziej podobnych do RCV-like aniżeli do RHDV (10, 19, 20), sygnalizuje wyraźną potrzebę usystematyzowania ich statusu taksonomicznego. Co więcej, uwzględnienie tych niepatogennych i słabo patogennych lagowirusów w analizie filogenetycznej, a co za tym idzie – zwiększenie stopnia zmienności analizowanych sekwencji, powoduje iż na generowa-

nych drzewach filogenetycznych dochodzi do zredukowania liczby grup w obrębie klasycznych szczepów RHDV do jednej, zawierającej wszystkie analizowane szczepy, bądź dwóch, z których jedna zawiera szczepy RHDV, a druga szczepy RHDVa (10, 20, 21, 28, 44).

Kolejnym ważnym czynnikiem determinującym zaszeregowanie szczepów RHDV do grup w oparciu o ich analizę filogenetyczną, jest rodzaj użytego do badań markera. Analizując ten aspekt, można stwierdzić, że znaczenie ma nie tyle analizowany fragment genomu wirusa RHD, co rodzaj użytych sekwencji. Jeżeli drzewa filogenetyczne generowane są w opar-

ciu o sekwencje nukleotydowe genomu wirusowego, to uzyskiwana liczba grup jest zazwyczaj wyższa aniżeli liczba grup otrzymana w oparciu o sekwencje aminokwasowe, gdzie uzyskiwano zwykle dwie grupy szczepów – szczepy określane jako oryginalne lub dzikie oraz szczepy typu RHDVa (2, 34, 39, 45). Fakt ten można wytłumaczyć dużym stopniem zmian synonimicznych w genomie RHDV, które nie skutkują zmianą aminokwasu w białkach wirusowych.

Odnosząc się do kwestii rodzaju metod wykorzystanych do analizy filogenetycznej i ich wpływu na topologię drzewa i grupowanie się szczepów RHDV, należy stwierdzić, że nie prowadzono obszernych badań z tego zakresu. Niemniej porównania przeprowadzone przez Le Gall i wsp. (18) w odniesieniu do europejskich (głównie francuskich) izolatów RHDV wykazały niezmienną, niezależnie od metody grupowanie się szczepów wirusa przy wykorzystaniu metod: średnich połączeń (UPGMA – unweighted pair group method with arithmetic mean), najwyższej parsymonii (MP – maximum parsimony) i najwyższego prawdopodobieństwa (ML – maximum likelihood). Podobne obserwacje poczynili Matiz i wsp. (33), porównując drzewa filogenetyczne wygenerowane metodą łączenia sąsiadów (NJ – neighbour joining) i średnich połączeń. Z kolei porównania drzew filogenetycznych generowanych według metody ML, mimo uzyskiwanych niskich wartości bootstrap, wskazują, iż drzewa te wykazują grupowanie szczepów wysoce podobne lub identyczne jak grupowanie metodami bayesowskimi, gdzie drzewa filogenetyczne są generowane w oparciu o zaawansowane techniki obliczeniowe i odznaczają się znacznie wyższym prawdopodobieństwem (23, 29, 30).

Zależności filogenetyczne między króliczymi lagowirusami w aspekcie geograficznym

Badania filogenetyczne RHDV, w których oceniano różnicowanie genetyczne izolatów pochodzących z wielu geograficznie odległych obszarów świata, przeprowadzono dla szczepów z Francji (18, 22, 24, 27), Chin (47), Holandii (6), Węgier (33), Korei (39), Polski (9, 12), Półwyspu Iberyjskiego (4, 36) i Wielkiej Brytanii (15, 16, 35), a także Nowej Zelandii (14). Wyniki dotyczące krajów europejskich, wskazują, iż w pierwszych kilkunastu latach obecności wirusa w środowisku odnotowywano obecność klasycznych szczepów RHDV, reprezentujących kilka różnych grup, zaś w ostatnim dziesięcioleciu obserwuje się zmniejszenie liczby grup i redukcję różnorodności wśród szczepów RHDV na korzyść szczepów RHDVa (11, 12, 29). Podobną tendencję do dominacji szczepów RHDVa odnotowano w ostatnich latach w krajach azjatyckich (39, 47) i w Ameryce (34). Inaczej sytuacja filogenetyczna wirusa RHD kształtuje się w regionach odosobnionych geograficznie, takich jak Półwysep Iberyjski oraz Wyspy Brytyjskie (4, 15, 16, 35, 36). Pierwszy z tych rejonów wydaje się szczególnie ważny dla badań nad RHDV, gdyż występują

tu obydwa podgatunki królików europejskich, to jest *Oryctolagus cuniculus cuniculus*, z którego wywodzą się przodkowie wszystkich królików dzikich i hodowlanych żyjących poza Półwyspem Iberyjskim oraz *Oryctolagus cuniculus algirus* unikalny dla tego regionu (36). Można więc stwierdzić, iż na Półwyspie Iberyjskim różnicowanie genetyczne wśród królików europejskich, a więc gatunku gospodarza dla wirusa RHD, jest najwyższe na świecie (36). Odwrotnie przedstawia się różnicowanie wśród występujących w tym rejonie szczepów RHDV, które jest niższe w porównaniu ze różnicowaniem wśród szczepów RHDV w innych krajach europejskich (4). Ta sytuacja znajduje odzwierciedlenie w grupowaniu się szczepów z Półwyspu Iberyjskiego w obrębie genogrupy G1 według klasyfikacji Le Gall-Recule i wsp. (22). Przypuszcza się, że szczepy wirusa RHD na Półwyspie Iberyjskim i szczepy RHDV z genogrupy G1, wyodrębniły się ze wspólnego przodka, a w regionie tym doszło do zastąpienia typowych szczepów z grupy G1, szczepami lokalnymi (4, 36). Wśród szczepów RHDV występujących w tym rejonie wyodrębniono 6 grup iberyjskich (IB1-IB6), których rozlokowanie w obrębie drzewa filogenetycznego zależało głównie od czasu otrzymania szczepów, a w mniejszym stopniu od miejsca ich otrzymania (4, 36). Należy jednak dodać, że w ostatnich latach sytuacja w tym rejonie wydaje się ulegać zmianie, jako że w 2011 r. odnotowano tam obecność nowego szczepu z grupy RHDV2 (10, 19), zaś w 2012 r. u królików hodowlanych opisano nowy szczep wirusa RHD, który na podstawie analiz filogenetycznych zaklasyfikowano do podtypu RHDVa (2). Z kolei inaczej wydaje się przedstawiać sytuacja filogenetyczna wirusa RHD na Wyspach Brytyjskich, czego dowiodły wielokierunkowe analizy filogenetyczne szczepów RHDV z tego regionu (15, 16, 35). Badania te wprowadziły także wiele nowych danych do stanu wiedzy na temat różnorodności i epidemiologii tego wirusa. Przede wszystkim dokonano zaskakującego odkrycia, że materiał genetyczny wirusa RHD występuje w próbkach tkanek króliczych, uzyskanych w latach 90. na terenie Wysp Brytyjskich, nie tylko od zwierząt padłych z nieznanymi przyczyn, ale również od klinicznie zdrowych. Także poszukiwanie materiału genetycznego RHDV w archiwalnych próbkach tkanek króliczych, pobranych od królików z tego regionu przed odnotowaniem pojawienia się choroby RHD, dało pozytywne wyniki, jako że najstarsza próbka, z której uzyskano wynik pozytywny, pochodziła z 1955 r. (35). Do analiz filogenetycznych wykorzystano sekwencje kodujące fragment białka kapsydu RHDV opracowane na podstawie zgromadzonego materiału biologicznego, jak również homologiczne sekwencje szczepów pochodzących z różnych krajów świata otrzymane z Banku Genów (łącznie 59 sekwencji). Ich analiza wykazała, że oceniane szczepy należą do 7 grup, zaś izolaty pochodzące z Wysp Brytyjskich plasują się w obrębie tylko 4 z nich (35). Należy podkreślić fakt, że szczepy

uzyskane od zwierząt zdrowych z Wysp Brytyjskich występowały w tych samych grupach, co szczepy otrzymane od padłych królików. Należy dodać, że grupowanie się szczepów wydawało się przypadkowe, jako że nie stwierdzono zależności ani od czasu, ani od miejsca otrzymania szczepu (35). Analogiczne grupowanie się szczepów RHDV otrzymano w późniejszej analizie filogenetycznej dotyczącej 61 szczepów tego wirusa i przeprowadzonej przez Forrestera i wsp. (16). Pulę szczepów z Wysp Brytyjskich wzbogacono o 7 szczepów z Irlandii i dodatkowo w analizie użyto sekwencji kilkunastu szczepów z innych części świata (16). W badaniach tych autorzy zwracają uwagę na wysoką zmienność wśród króliczych lagowirusów występujących na Wyspach Brytyjskich, czego dowodzi wyizolowanie tam dwóch szczepów zdystansowanych genetycznie od RHDV i tworzących wspólną grupę z włoskim szczepem niepatogennym RCV (16). Stan wiedzy o zmienności i grupowaniu się szczepów króliczych lagowirusów pochodzących z tego rejonu został uzupełniony na podstawie wyników innych badań Forrestera i wsp. (15), w których kontynuowano poszukiwanie materiału genetycznego RHDV u królików zdrowych na terenie Szkocji, wprowadzając dodatkowo kryterium pory roku, w której uzyskano próby. Około 10% przebadanych prób było dodatnich w reakcji RT-PCR i uzyskane z tych prób sekwencje wykorzystano do przeprowadzenia analizy filogenetycznej, obejmującej także 22 opisane wcześniej izolaty króliczych lagowirusów z Wysp Brytyjskich, 47 szczepów RHDV z innych części świata i włoski szczep RCV. Wyniki tej analizy (15) wykazały obecność dwóch przestrzennie i genetycznie odmiennych grup szczepów RHDV i podobnych do RHDV, które nazwano, odpowiednio, Pit-EP oraz Pit-WD. Izolaty Pit-EP otrzymano w maju i czerwcu, czyli w okresie roku, kiedy w Wielkiej Brytanii panowała epidemia pomoru królików i utworzyły one wspólną grupę wraz ze szczepami RHDV z Irlandii, Walii, Anglii i Szkocji, z których wiele wiązano z epidemiami pomoru królików notowanymi na tym terenie we wcześniejszych latach. W grupie skupiającej szczepy Pit-EP znalazły się ponadto pozostałe, użyte do analizy szczepy RHDV z różnych kontynentów. Natomiast szczepy typu Pit-WD otrzymane w okresie od marca do sierpnia różniły się zarówno od szczepów epidemicznych RHDV, jak i od innych króliczych lagowirusów, tj. RCV, Lambay Island, Ashington. Warto także wspomnieć o nietypowych zależnościach filogenetycznych zachodzących wśród szczepów RHDV na terenie Nowej Zelandii, która nie tylko należy do regionów odosobnionych geograficznie, ale także jest miejscem, gdzie w sposób sztuczny wprowadzono szczep V-351 wirusa RHD (14). Sytuacja filogenetyczna na tym obszarze jest podobna jak na Półwyspie Iberyjskim przed opisaniem tam nowych szczepów RHDVa (2) oraz RHDV2 (19), jako że szczepy z Nowej Zelandii utworzyły dwa kłady o niewielkim zróżnicowaniu pomiędzy sobą w obrębie

grupy skupiającej wprowadzony na ten teren szczep V-351. Niezwykle wydaje się fakt, iż 38 sekwencji otrzymanych od królików z Nowej Zelandii i wykorzystanych do tej analizy wyizolowano od klinicznie zdrowych królików. W obliczu tych informacji interesujące są również obserwacje dotyczące zależności filogenetycznych wśród australijskich niepatogennych lagowirusów króliczych, określanymi jako RCV-A1 (28, 44). Badania mające na celu poszukiwanie króliczych lagowirusów u klinicznie zdrowych królików żyjących w Australii dowiodły, że na tym kontynencie, inaczej niż miało to miejsce na terenie Nowej Zelandii, u zdrowych królików występuje niepatogenny króliczy lagowirus – RCV-A1, wyraźnie odrębny od znanych szczepów RHDV, ale także od szczepów określanymi jako RCV-like (44). Dogłębna analiza filogenetyczna szczepów RCV-A1 wykazała ich przynależność do 6 kładów, których ułożenie w drzewie filogenetycznym wydaje się zależeć zarówno od czasu otrzymania szczepów, jak i od miejsca ich otrzymania (28).

Filogeneza RHDV na podstawie wnioskowania bayesowskiego

Przybliżając dane z zakresu zależności filogenetycznych wśród szczepów RHDV należy również podać wyniki uzyskane z zastosowaniem najnowszych technik bioinformatycznych, to jest analiz bayesowskich, które, jak wspomniano wcześniej, charakteryzują się wysokim stopniem prawdopodobieństwa (4, 23, 29, 30). Pierwsze badania tego typu przeprowadzili Kerr i wsp. (29) w oparciu o krótką sekwencję kodującą fragment białka VP60, gdzie analizie pierwotnie poddano 217 szczepów RHDV pochodzących z całego świata, izolowanych zarówno od królików padłych w wyniku zakażenia RHDV, jak i od klinicznie zdrowych osobników. Uzyskane wyniki wydają się podstawą do podważenia części wyników badań Mossa i wsp. (35), dotyczących izolacji RNA wirusa RHD z archiwalnego materiału biologicznego, pobranego od królików w okresie od 3 do 29 lat przed pierwszą zarejestrowaną epidemią pomoru królików. Kerr i wsp. (29) zasugerowali, iż sekwencje te są prawdopodobnie zanieczyszczeniem próbek współczesnymi szczepami RHDV, za czym przemawia grupowanie się tych sekwencji na drzewach filogenetycznych w obrębie grup tworzonych przez współczesne szczepy tego wirusa. W związku z tym właściwą analizę filogenetyczną przeprowadzono w oparciu o sekwencje 210 szczepów, z wyłączeniem szczepów uzyskanych przed 1984 r. (29). Wyniki tej analizy wskazują, iż badane szczepy RHDV układają się na drzewie filogenetycznym w 4 grupy, a przynależność szczepów do określonych grup warunkowana jest w większym stopniu miejscem aniżeli czasem ich otrzymania (29). Badacze ci (29) podkreślają jednak, iż dane uzyskane w tej analizie należy traktować z ostrożnością, jako że podstawą do wnioskowania o przynależności szczepów do grupy stanowiły bardzo krótkie sekwencje nukleo-

tydowe. Występowanie wśród szczepów RHDV 4 kładów monofiletycznych potwierdzili Kinnear i Linde (30), analizując pełną sekwencję kodującą białko kapsydu dla 31 szczepów tego wirusa, nie podając jednak, czy grupowanie się badanych szczepów jest związane z czasem, czy z miejscem ich otrzymania. Kolejne badania nad grupowaniem się 151 szczepów RHDV, ze szczególnym uwzględnieniem szczepów z Półwyspu Iberyjskiego przeprowadzili Alda i wsp. (4), wykorzystując jako marker sekwencje kodujące koniec karboksylowy białka kapsydu VP60 o długości blisko 600 nukleotydów. Stwierdzono, że badane szczepy RHDV tworzą 3 linie, a grupowanie ich wykazuje w większym stopniu zależność czasową aniżeli przestrzenną (4). Ciekawej obserwacji dokonali także Hicks i Duffy (23), którzy analizowali grupowanie się szczepów RHDV w drzewach filogenetycznych w oparciu o dwa markery, to jest sekwencję kodującą białko kapsydu VP60 65 szczepów oraz sekwencję kodującą RNA-zależną polimerazę RNA (RdRp) 44 szczepów RHDV. Oprócz stwierdzenia dla obydwu badanych markerów grupowania się szczepów wirusa RHD w 4 linie, stworzone w oparciu o strukturę czasową, wykazano także, iż jeden ze szczepów chińskich opublikowany w Banku Genów jako pochodzący z 1985 r., został najprawdopodobniej zanieczyszczony szczepem dużo młodszym (23).

Podsumowanie

W ciągu blisko 30 lat od opisanie obecności wirusa RHD w środowisku, na podstawie licznych analiz filogenetycznych sekwencji genomu tego patogenu, udało się uzyskać wiele informacji na temat jego ewolucji. Wyniki tych badań filogenetycznych stanowią merytoryczną podstawę do postawienia hipotez na temat pochodzenia wirusa RHD, a także przewidywania przyszłych zjawisk epidemiologicznych z nim związanych. Niemniej jednak wiele pytań z tego zakresu pozostaje nadal bez odpowiedzi. Na chwilę obecną wydaje się, że wirus RHD wyewoluował z niepatogennego przodka, z którego wywodzą się także występujące współcześnie niepatogenne lagowirusy królicze, tj. szczepy RCV-like i RCV-A1. Podstawową zaś kwestią, która pozostała do rozstrzygnięcia, jest fenomen pojawienia się patogennej formy wirusa RHD, zarówno w ujęciu czasowym, jak i w aspekcie mechanizmu powstania, choć pewne nowe światło na rozstrzygnięcie tej kwestii rzuca niedawne opisanie patogennych szczepów króliczych lagowirusów, określanych jako RHDV2, które są bliższe genetycznie niepatogennym szczepom RCV-like aniżeli patogennym szczepom RHDV. Fakt ten wyraźnie wskazuje, że po wielu latach stabilnej sytuacji ewolucja króliczych lagowirusów z nieznanymi przyczynami zmieniła dynamikę. Wydarzenia związane z pojawieniem się szczepów RHDV2 oraz zakażeń tymi szczepami u jednego z gatunków zająca wyraźnie wskazują na potrzebę ponownego rozważenia, czy patogenny wirus RHD mógł powstać w wyniku

„przeskoczenia” na królika nie poznanego dotychczas wirusa od innego gatunku zwierząt, który to scenariusz jest brany pod uwagę w przypadku tych szczepów (19, 41). Wydaje się, że duże nadzieje na rozwiązanie tej zagadki można wiązać również z dalszymi badaniami nad poszukiwaniem i analizą filogenetyczną sekwencji genomów nowych lagowirusów izolowanych od klinicznie zdrowych królików oraz innych zwierząt, zasiedlających te same nisze ekologiczne, co króliki wolno żyjące. Równie wartościowe dla bliższego poznania biologii wirusa RHD wydaje się wyjaśnienie kwestii znacznych różnic w występowaniu króliczych lagowirusów w poszczególnych obszarach globu. Stąd wydaje się, że śledzenie sytuacji filogenetycznej króliczych lagowirusów jest uzasadnione nie tylko z powodu zagrożeń, jakie powodują one dla hodowli królików, ale także dlatego, że wirusy te mogą być cennym modelem dla poznawania nowych faktów z zakresu ewolucji wirusów RNA, wśród których występuje wiele patogenów bardzo groźnych dla ssaków, w tym człowieka.

Piśmiennictwo

1. Abrantes J., Esteves P. J.: Not-so-novel Michigan Rabbit Calicivirus. *Emerg. Inf. Dis.* 2010, 16, 1331-1332.
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.* 2013 (doi: 10.1007/s00705-013-1808-2).
3. Abrantes J., van der Loo W., Le Pendu J., Esteves P. J.: Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review. *Vet. Res.* 2012, 43, 12, (doi: 10.1186/1297-9716-43-12).
4. 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).
5. 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. Infect. Dis.* 2009, 15, 1955-1962.
6. Bildt van de M. W. G., Bolhuis van G. H., Zijdeveld van F., Riel van D., Drees J. M., Osterhaus A. D. M. E., Kuiken T.: Confirmation and Phylogenetic Analysis of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus in Free-living Rabbits from the Netherlands. *J. Wildlife Dis.* 2006, 42, 808-812.
7. Capucci L., Fallacara F., Grazioli S., Lavazza A., Lodovica Pacciarini M., 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.
8. Capucci L., Fusi P., Lavazza A., Nardin A., Pacciarini M. L., Rossi C.: Detection and preliminary characterization of new Rabbit Calicivirus related to Rabbit haemorrhagic disease virus but non-pathogenic. *J. Virol.* 1996, 70, 8614-8623.
9. 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.
10. Dalton K. P., Nicieza I., Baseiro A., Mugerza M. A., Rosell J. M., Casais R., Alvarez A. L., Parra F.: Variant rabbit hemorrhagic disease virus in young rabbits, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 2012, 18, 2009-2012.
11. Farnos O., Rodriguez D., Valdes O., Chiong M., Parra F., Toledo J. R., Fernandez E., Leonart R., Suarez M.: Molecular and antigenic characterization of rabbit hemorrhagic disease virus isolated in Cuba indicates a distinct antigenic subtype. *Arch. Virol.* 2007, 152, 1215-1221.
12. Fitzner A., Niedbalski W., Paprocka G., Kęsy A.: Identification of Polish RHDVa subtype strains based on the analysis of a highly variable part of VP60 gene. *Pol. J. Vet. Sci.* 2012, 15, 21-29.
13. Forrester N. L., Abubakr M. I., Abu Elzein E. M. E., Afaleq al A. I., Housawi F. M. T., Moss S. R., Turner S. L., Gould E. A.: Phylogenetic analysis of Rabbit haemorrhagic disease virus strains from the Arabian Peninsula: Did RHDV emerge simultaneously in Europe and Asia? *Virology* 2006, 344, 277-282.

14. Forrester N. L., Boag B., Moss S. R., Turner S. L., Trout R. C., White P. J., Hudson P. J., Gould E. A.: Long-term survival of New Zealand rabbit haemorrhagic disease virus RNA in wild rabbits, revealed by RT-PCR and phylogenetic analysis. *J. Gen. Virol.* 2003, 84, 3079-3086.
15. Forrester N. L., Boag B., Moureau G., Gould E. A.: Co-circulation of widely disparate strains of Rabbit haemorrhagic disease virus could explain localized epidemicity in the United Kingdom. *Virology* 2009, 393, 42-48.
16. 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.
17. Forrester N. L., Trout R. C., Turner S. L., Kelly D., Boag B., Moss S., Gould E. A.: Unravelling the paradox of rabbit haemorrhagic disease virus emergence, using phylogenetic analysis; possible implications for rabbit conservation strategies. *Biol. Conserv.* 2006, 131, 296-306.
18. Gall G. Le, Arnauld C., Boilletot E., Morisse J. P., Rasschaert D.: Molecular epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus outbreaks in France during 1988-1995. *J. Gen. Virol.* 1998, 79, 11-16.
19. Gall-Recule G. Le, Lavazza A., Marchandeu S., Bertagnoli S., Zwingelstein F., Cavadini P., Martinelli N., Lombardi G., Guérin J.-L., Lemaitre 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).
20. Gall-Recule G. Le, Zwingelstein F.: Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *Vet. Rec.* 2011, 168, 137-138.
21. Gall-Recule G. Le, 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.
22. Gall-Recule G. Le, Zwingelstein F., Laurent S., Boisseson de C., Portejoie Y., Rasschaert D.: Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus in France between 1993 and 2000, and the characterization of RHDV antigenic variants. *Arch. Virol.* 2003, 148, 65-81.
23. Hicks A. L., Duffy S.: One misdated sequence of rabbit hemorrhagic disease virus prevents accurate estimation of its nucleotide substitution rate. *BMC Evol. Biol.* 2012, 12, 74, (doi:10.1186/1471-2148-12-74).
24. Hukowska-Szematowicz B., Deptula W.: Phylogenetic analysis of French strains of the RHD virus on the basis of a fragment of gene encoding C-terminal part of structural capsid VP60 protein. *Adv. Agr. Sci.* 2010, 13, 159-168.
25. Hukowska-Szematowicz B., Lejkowska R., Deptula W.: Comparative analysis of the gene encoding RNA-dependent RNA polymerase in RHD virus strains originating from various continents. *Adv. Agr. Sci.* 2010, 13, 169-179.
26. Hukowska-Szematowicz B., Pawlikowska M., Deptula W.: Genetic variability of Czech and German RHD virus strains. *Pol. J. Microbiol.* 2009, 58, 237-245.
27. Hukowska-Szematowicz B., Tokarz-Deptula B., Deptula W.: Analysis of genetic variability and phylogenetic analysis of selected Czech and French strains of Rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). *J. Appl. Genet.* 2013, 54, 235-248.
28. 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.
29. Kerr P. J., Kitchen A., Holmes E. C.: The origin and phylodynamics of rabbit haemorrhagic disease virus. *J. Virol.* 2009, 83, 12129-12138.
30. Kinnear M., Linde C. C.: Capsid gene divergency in rabbit hemorrhagic disease virus. *J. Gen. Virol.* 2010, 91, 174-181.
31. Kitchen A., Shackleton L. A., Holmes E. C.: Family level phylogenies reveal modes of macroevolution in RNA viruses. *PNAS* 2011, 108, 238-243.
32. Marchandeu S., Bertagnoli S., Léonard Y., Santin-Janin H., Péralta B., Le Gall-Réculé G., Pontier D.: Serological evidence for the presence of non-pathogenic rabbit haemorrhagic disease virus-like strains in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) of the Kerguelen archipelago. *Polar Biol.* 2010, 33, 985-989.
33. 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.
34. 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. *Virol. J.* 2007, 4, 96, (doi:10.1186/1743-422X-4-96).
35. Moss S. R., Turner S. L., Trout R. C., White R. J., Hudson P. J., Desai A., Armes M., Forrester N. L., Gould E. A.: Molecular epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus. *J. Gen. Virol.* 2002, 83, 2461-2467.
36. Muller A., Freitas J., Silva E., Le Gall-Recule G., Zwingelstein F., Abrantes J., Esteves P. J., Alves P. C., van der Loo W., Kolodziejek J., Nowotny N., Thompson G.: Evolution of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) from the Iberian Peninsula. *Vet. Microbiol.* 2009, 135, 368-373.
37. Nowotny N., Bascunana C.-R., Ballagi-Pordany A., Gavier-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.
38. Nyström K., Le Gall-Reculé G., Grassi P., Abrantes J., Ruvoën-Clouet N., Le Moullac-Vaidye B., Lopes A. M., Esteves P. J., Strive T., Marchandeu S., Dell A., Haslam S. M., Le Pendu J.: Histo-blood group antigens act as attachment factors of rabbit hemorrhagic disease virus infection in a virus strain-dependent manner. *PLoS Pathog.* 2011, 7, e1002188, (doi:10.1371/journal.ppat.1002188).
39. Oem J. K., Lee K. N., Roh I. S., Lee K. K., Kim H. R., Park C. K., Joo Y. S.: Identification and characterization of rabbit haemorrhagic disease virus genetic variants isolated in Korea. *J. Vet. Med. Sci.* 2009, 71, 1519-1523.
40. Pawlikowska M., Hukowska-Szematowicz B., Deptula W.: Phylogenetic analysis of selected strains of Rabbit haemorrhagic disease virus on the basis of N-terminal fragment of the gene encoding structural protein VP60. *B. Vet. I. Pulawy* 2010, 54, 129-133.
41. Puggioni G., Cavadini P., Maestrone 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).
42. Rodák L., Šmíd B., Valíček 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.
43. Schirrmeyer 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.
44. 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.
45. Tian L., Liao J., Li J., Zhou W., Zhang X., Wang H.: Isolation and identification of a non-haemagglutinating strain of rabbit hemorrhagic disease virus from China and sequence analysis for the VP60 gene. *Virus Genes* 2007, 35, 745-752.
46. Tokarz-Deptula B.: Biological characteristics of the RHD (rabbit haemorrhagic disease) virus – novel data. *Centr. Europ. J. Immunol.* 2009, 34, 261-270.
47. Wang X., Hao H., Qiu L., Dang R., Du E., Zhang S., Yang Z.: Phylogenetic analysis of rabbit hemorrhagic disease virus in China and the antigenic variation of new strains. *Arch. Virol.* 2012, 157, 1523-1530.

Adres autora: dr Joanna Działo, ul. Felczaka 3c, 71-412 Szczecin; e-mail: joanna_dzialo@interia.pl