

Skuteczność szczepień przeciwko krwotocznej chorobie królików (RHD) w kontekście zmienności genetycznej i antygenowej wirusa

Andrzej Fitzner, Wiesław Niedbalski

z Zakładu Pruszczycy Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Zduńskiej Woli

The effectiveness of vaccination against rabbit haemorrhagic disease (RHD) in the context of the genetic and antigenic variability of the virus

Fitzner A., Niedbalski W., Department of Foot and Mouth Disease, National Veterinary Research Institute, Zduńska Wola

The aim of this article is the presentation of current data on effectiveness of vaccines against rabbit haemorrhagic disease (RHD). RHD, a highly contagious, acute and fatal viral disease of rabbits, was first diagnosed in 1984 in China. At the late 80. RHD spread worldwide and first outbreaks in Poland were identified in 1988. In the middle 90ties. an antigenic variant of the virus (RHDVa), was isolated in Italy and Germany and has started to replace the classic RHDV strains. Despite of the antigenic and genetic differences between RHDV and RHDVa, the available RHD vaccines still provide cross-protection against infection. In 2010, a new virulent RHD virus named RHDV2 (RHDVb), was isolated from rabbits in France. This strain has high virulence potential to affect very young rabbits. RHDV2 differs from previously known classic RHDV and RHDVa, and has the ability to overcome postvaccinal protective immunity of rabbits. In addition, RHDV2 can infect hares confirming its unique pathogenic characteristics. In Poland, the presence of RHDV2 field infections were confirmed in 2016. Taking into account the data from natural cases of RHDV2 and the results of experimental work, this paper presents the problem of immunoprophylaxis and the effectiveness of vaccinations against RHD.

Keywords: RHD, rabbits, vaccines, protection.

Śmiertelną chorobę królików znaną jako krwotoczna choroba królików (rabbit haemorrhagic disease – RHD) opisano w 1984 r. w Chinach (1). Straty w hodowlach objęły ponad 140 milionów królików. Ponieważ pierwsze przypadki stwierdzono u królików rasy angorskiej importowanych z Niemiec przypuszczano, że choroba może mieć rodowód europejski. W 1985 r. choroba dotarła do Korei Południowej (2), a 3 lata później ogniska RHD rozpoznano w Meksyku (3). Początki RHD na kontynencie europejskim należy wiązać z masowymi padnięciami królików we Włoszech w 1986 r., których bezpośredniej przyczyny nie udało się wówczas ustalić (4). Pojawienie się epizootii RHD w większości krajów Europy Zachodniej i Środkowej miało miejsce w latach 1987–1989 (5), a na Wyspach Brytyjskich w 1992 r. (6).

RHD znajduje się na liście chorób Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (OIE) podlegających zgłaszaniu. W Polsce istnieje obowiązek jej rejestracji (załącznik nr 3 ustawy o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczania chorób zakaźnych zwierząt z 2004 roku – tekst jednolity, Dz.U. 2018, po. 1967). Obecnie choroba występuje w Europie, Azji, Afryce i Australii.

Pojedyncze epizootie notuje się co pewien czas w Ameryce Północnej (USA, Kanada, Kuba). Według aktualnych informacji zamieszczonych w systemie WAHID OIE (The World Animal Health Information Database, WAHID) (https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasetimelines) w latach 2005–2018 występowanie RHD odnotowano lub podejrzewano w 50 krajach, z czego ponad połowa zgłoszeń przypada na kraje europejskie.

Przebieg choroby, obraz kliniczny

Obserwacje epizootii w Azji i Europie wykazały, że na RHD podatne są zarówno króliki dzikie, jak i hodowlane z gatunku *Oryctolagus cuniculus*. W sposób naturalny odporne na zakażenie pozostawały króliki młode, do około drugiego miesiąca życia. Występowanie choroby należy podejrzewać w przypadkach nagłej, gwałtownej śmierci wielu królików, często bez widocznych objawów klinicznych, co jest charakterystyczne dla zakażeń o przebiegu nadostrym i ostrym. Znaczne uszkodzenia wątroby, która jest docelowym narządem, ale także śledziony, płuc i nerek prowadzą do rozwoju skazy krwotocznej, z obecnością wewnętrznych krwotoków, krwawych wycieków z otworów nosowych, objawów nerwowych i niewydolności oddechowej zauważalnych dopiero w fazie agonalnej. Z uwagi na krótki okres inkubacji choroby (zwykle 24–48 godzin) i szybkie tempo szerzenia się zakażeń, wskaźniki zachorowalności i śmiertelności są bardzo wysokie i sięgają 70–90%, a często nawet 100% zakażonych zwierząt. Straty ekonomiczne w rezultacie szybko rozprzestrzeniającej się zarazy są bardzo dotkliwe. W przypadkach o przebiegu przewlekłym choroba rozwija się dłużej (4–7 dni), króliki są apatyczne, a część z nich przeżywa. Do śmierci dochodzi po 10–15 dniach od stwierdzenia objawów klinicznych. Pośmiertnie stwierdza się powiększenie i zażółcenie wątroby.

Czynnik etiologiczny RHD

Wirus krwotocznej choroby królików (RHDV) z rodzaju *Lagovirus*, rodzina *Caliciviridae* został zidentyfikowany na przełomie lat 80. i 90. dwudziestego wieku (2). Oprócz podobieństwa morfologicznego bezotoczkowy RHDV, o wielkości 28–35 nm i kubicznym kształcie, posiada wiele innych wspólnych cech z lagowirusem odpowiedzialnym za krwotoczny zespół zająca szaraka (European brown hare syndrome virus – EBHS). Wśród najważniejszych należy

wymienić podobną strukturę, organizację i wielkość genomów (ok. 7,5 kb) zbudowanych z pojedynczej nici RNA o dodatniej polaryzacji (s+). Ponadto na podobieństwo RHD do chronologicznie wcześniejszego syndromu EBH, notowanego w Szwecji już na początku lat 80. XX w., wskazuje obraz makroskopowych zmian pośmiertnych u padłych zwierząt (4, 5). Jednak próby zakażenia krzyżowego królików i zajęcy patogennymi lagowirusami RHDV bądź EBHSV, przeprowadzone w warunkach doświadczalnych na początku lat 90., potwierdziły ich całkowitą odrębność i występowanie bardzo wąskiego, ściśle powiązanego z gatunkiem, zakresu swoistego gospodarza (5). Do chwili obecnej żadnego z patogenów nie udało się także namnożyć w hodowli *in vitro*, co dodatkowo komplikuje prowadzenie badań.

Nowa systematyka lagowirusów, podstawą której są relacje filogenetyczne, wyróżnia występowanie dwóch patogennych postaci wirusa RHD: RHDV typu 1, do którego zaliczają się klasyczny RHDV (GI.1) i wariant antygenowy RHDVa (GI.1a) oraz RHDV typu 2 (GI.2) (7).

W okresie pierwszych 6–8 lat globalnego występowania RHD podkreślano znaczną stabilność antygenową RHDV występującego w postaci jednego serotypu i niską zmienność genomu, zarówno na poziomie sekwencji nukleotydów, jak i aminokwasów (8, 9, 10). W analizach filogenetycznych, skoncentrowanych głównie na regionie strukturalnego białka kapsydu, potwierdzano wysoką homologię wyisobnionych szczepów, lecz zarazem ujawniano ich stopniowe różnicowanie, bez konsekwencji dla ochrony poszczepiennej. Ocena filogenetyczna 56 francuskich szczepów RHDV z lat 1988–1995 przeprowadzona na podstawie analizy porównawczej dwóch fragmentów genu białka strukturalnego i odcinka białek niestrukturalnych potwierdziła wysoką konserwatywność genomu. Maksymalna zmienność sekwencji nukleotydów analizowanych fragmentów wynosiła odpowiednio 7,7, 9,4 i 8%. Trzy wyodrębnione grupy genetyczne znacznie bardziej łączył podobny czas izolacji, natomiast geograficzne miejsce pochodzenia miało mniejsze znaczenie (9). Badania blisko 40 szczepów wirusa wykazały podobieństwo sekwencji nukleotydów we fragmencie genu *vp60* od 89,4 do 100% (10). Z kolei analiza czeskiego szczepu RHDV V-351 (rok izolacji 1987) ujawniła tylko 2% zmienność sekwencji nukleotydów i aminokwasów w obrębie białka VP60 szczepów potomnych, w okresie 2 lat od uwolnienia do środowiska na kontynencie australijskim (8).

Wariant antygenowy RHDVa

Zmienność wirusa RHD po raz pierwszy potwierdzono we Włoszech i w Niemczech, gdzie w latach 1997–1998 zdiagnozowano szczepy wariantu (podtypu) antygenowego i genetycznego RHDVa, który szybko rozprzestrzenił się na świecie, obejmując swym zasięgiem także kraje Azji, Afryki i Ameryki Północnej (2, 11, 12). Szczepy RHDVa prezentują się jako odrębna i jednorodna grupa genetyczna – G6 (13). Zmiany genetyczne RHDVa są szczególnie mocno wyrażone w odcinku wysoce zmiennym genu białka strukturalnego, gdzie homologia sekwencji nukleotydów

wynosi tylko 70%. Istotne, że mimo niskiej reaktywności RHDVa z surowicą ozdrowieńca RHDV i odmienną reaktywnością z przeciwciałami monoklonalnymi specyficznymi dla RHDV obraz choroby nie uległ zmianie. Króliki immunizowane szczepionką zawierającą klasyczny antygen RHDV są odporne na zakażenie wariantem antygenowym (11).

Obszerne badania filogenetyczne francuskich szczepów RHDV z lat 1993–2000 oraz szczepów wirusa pochodzących z Niemiec i USA ujawniły większą zmienność RHDV i podział na sześć grup genetycznych. W efekcie silnej ekspansji RHDVa zaobserwowano zjawisko zanikania wczesnych grup genetycznych, co wskazywałoby na proces selekcji wirusa RHD, prawdopodobnie na skutek nagłego i szybkiego eliminowania dużych populacji wrażliwych królików (13, 14). W Polsce obecność wariantu RHDVa zidentyfikowano wśród szczepów z lat 2003–2004 (15, 16). Ostatnio wyizolowany krajowy szczep RHDVa, którego pełną sekwencję genomu zgłoszono do bazy genów, pochodzi z 2017 r. (17). Znamienne, że wariant RHDVa znacznie później pojawił się na Półwyspie Iberyjskim. Pierwsze portugalskie szczepy pochodzą z lat 2007–2008, a w Hiszpanii wyizolowano go dopiero w 2012 r., a więc już po pojawieniu się wariantu RHDV2 (18, 19). Tam też najdłużej utrzymują się filogenetycznie najstarsze patogenne szczepy klasycznego RHDV z genogrupy pierwszej, wykrywane jeszcze w 2008 r.

Niepatogeny kaliciwirus RCV

Patogenne lagowirusy RHDV i EBHSV pozostawały jedynymi reprezentantami tego rodzaju do połowy lat 90. XX w. Sytuacja uległa zmianie w 1995 r., kiedy to, również we Włoszech, wykryto niechorobotwórczego kaliciwirusa królików – RCV (GI.3) charakteryzującego się wysokim podobieństwem genetycznym do RHDV i stymulującego produkcję przeciwciał reagujących z RHDV (20). Pod względem antygenowym RCV jest bardziej podobny do RHDV niż do EBHSV. W przeciwieństwie do RHDV charakteryzuje go tropizm do jelit cienkich (został wyizolowany z dwunastnicy, a nie z wątroby bądź śledziony). Ponieważ RCV stymuluje powstawanie przeciwciał reagujących krzyżowo z RHDV, obecność seroreagentów RHDV w populacji zdrowych królików, bez wcześniejszych kontaktów z tym wirusem, była w przeszłości pierwszym sygnałem wskazującym na występowanie bezobjawowych zakażeń, świadczącym o występowaniu niechorobotwórczego przodka. Nowych reprezentantów niechorobotwórczych kaliciwirusów zidentyfikowano w Nowej Zelandii, Australii (RCV-A1), Francji, Irlandii, Wielkiej Brytanii, Stanach Zjednoczonych (2).

RHDV2

Nowy typ wirusa – RHDV2 (GI.2) rozpoznano jesienią 2010 r. we Francji (21, 22). Wzrost liczby ognisk RHD odnotowano u królików hodowlanych i dzikich. Wskaźniki zachorowalności i śmiertelności w przebiegu tych zakażeń były ogólnie niższe, w granicach od 30 do 50%. Śmiertelne przypadki stwierdzano natomiast u królików uprzednio szczepionych

przeciwko RHD oraz w grupie królików bardzo młodych (znacznie poniżej drugiego miesiąca życia) nieszczepionych, które dotychczas nie były podatne na zakażenie RHDV (22, 23, 24). W 2011 r. epizootie RHD wywołane przez wirus o nowych cechach odnotowano we Włoszech i w Hiszpanii, gdzie dla odróżnienia od wcześniejszych form opisano jako RHDVb. Rok później RHDV2 pojawił się w Portugalii, a w 2013 r. w Wielkiej Brytanii i Niemczech (23, 25, 26). Niektóre epizootie RHDV2 w kolejnych krajach w Europie Zachodniej i na Półwyspie Skandynawskim były pierwszymi potwierdzonymi przypadkami RHD, inne odnotowywano po długiej przerwie. Występowanie zakażeń RHDV2 potwierdzono poza Europą kontynentalną – na Wyspach Azorskich, w Maroku i Tunezji w Afryce Północnej i Kanadzie. Z kolei w Australii, gdzie RHDV2 pojawił się w 2015 r., w ciągu 18 miesięcy zaczął przeważać nad klasycznym RHDV i zagrażać realizacji programu biokontroli populacji dzikich królików (27, 28, 29, 30, 31, 32). Nową, specyficzną cechą RHDV2 jest zdolność do przełamania bariery gatunkowej swoistego gospodarza. Udowodniono to najpierw u zajęcy z gatunków *Lepus capensis mediterraneus* i *Lepus corsicanus*, później u zająca szaraka *Lepus europaeus* i zająca górskiego *Lepus timidus* (30, 33, 34, 35, 36). Analizy filogenetyczne szczepów wirusa wyosobnionego z przypadków we Francji, jak również z ognisk w Hiszpanii i we Włoszech, potwierdziły, że jest to całkowicie nowy typ lagowirusa, wyraźnie różny od RHDV i RHDVa, znacznie bardziej powiązany z niepatogennymi kaliciwirusami (RCV i RCV-A1). O odrębności RHDV2 i konieczności przygotowania swoistych testów diagnostycznych świadczą badania profilu antygenowego, m.in. z wykorzystaniem cząstek wirusopodobnych (26, 37).

RHD w Polsce

W Polsce krwotoczną chorobę królików, znaną także jako „pomór królików”, rozpoznano w 1988 r. Z dwóch przypadków w hodowlach drobnotowarowych na Śląsku i w Małopolsce wyizolowano też pierwsze rodzime szczepy wirusa RHD (38). Podobnie jak w wielu innych państwach europejskich nowe przypadki RHD rejestrowane są w naszym kraju od lat i po potwierdzeniu w krajowym laboratorium referencyjnym zgłaszane do OIE. Identycznie jak we Włoszech, Niemczech, Francji, również w Polsce potwierdzono występowanie trzech patogennych postaci wirusa RHD: klasycznego RHDV, wariantu antygenowego RHDVa i RHDV2 (16, 17, 38). O ile jednak wyosobnienie RHDV w Polsce w 1988 r. było zbieżne w czasie z rozpoznaniem RHD w całej Europie, to już obecność podtypu RHDVa potwierdzono w naszym kraju po około 7–8 latach od jego wykrycia we Włoszech i w Niemczech (11, 12, 15, 16). Molekularna analiza epidemiologiczna polskich szczepów RHDV i RHDVa z lat 1988–2015 potwierdza pojawienie się w Polsce klasycznego RHDV (genogrupa 2) pod koniec lat 80. minionego wieku oraz zanik szczepów o tej charakterystyce około 2004 r. wraz z pojawieniem się w tym okresie wirusa podtypu RHDVa (genogrupa 6; 39). Można sądzić, że podobny scenariusz obserwuje się obecnie w przypadku wirusa RHD typu 2. Pierwsze

polskie szczepy RHDV2 rozpoznano po sześciu latach od stwierdzenia go we Francji w 2010 r. (17). Pierwszy przypadek rozpoznano we wrześniu 2016 r. u królików mieszańców z hodowli drobnotowarowej w województwie łódzkim, natomiast drugi w czerwcu 2017 r., wystąpił u dwuletniego królika do towarzystwa z województwa zachodniopomorskiego. W obu sytuacjach RHDV2 wyizolowano od królików uprzednio immunizowanych przeciwko RHD szczepionką monowalentną lub dwuskładnikową (RHD i myksomatoza). Obie szczepionki obecne na naszym rynku od wielu lat były dotąd stosowane z dobrym skutkiem w immunoprofilaktyce RHD. Należy zaznaczyć, że w innym ognisku RHD z kwietnia 2017 r., w hodowli drobnotowarowej w województwie mazowieckim, potwierdzono występowanie wariantu RHDVa. Kolejne 3 przypadki RHD świadczące o cyrkulacji RHDV typu 2. w naszym kraju wykryto w 2018 r. (dane niepublikowane). W pierwszym z nich materiał biologiczny dostarczony do badań pochodził od pięciomiesięcznych królików rasy nowozelandzkiej padłych w hodowli drobnotowarowej w województwie świętokrzyskim, a w drugim od pięcioletniowych królików mieszańców z hodowli drobnotowarowej w województwie małopolskim. W trzecim przypadku wirus RHD typu 2 wyizolowano od 2 królików utrzymywanych jako zwierzęta towarzyszące, u różnych właścicieli. Możliwą przyczyną zakażenia, wspólną dla obu zwierząt, był najprawdopodobniej kontakt z innym królikiem lub z jego wydzielinami podczas wizyty w gabinecie weterynaryjnym.

Immunoprofilaktyka RHD

W okresie od rozpoznania pierwszych przypadków RHD na świecie w badaniach tej śmiertelnej choroby i jej czynnika etiologicznego można wyróżnić kilka znaczących etapów, związanych z pojawieniem się nowych form patogennych szczepów RHDV. W każdym przypadku zmiany natury genetycznej skutkowały zmianami właściwości antygenowych wirusa, co w konsekwencji rzutowało na możliwości jego wykrywania i skutecznego zapobiegania chorobie. Opracowanie inaktywowanych szczepionek przeciwko RHD było możliwe dzięki poznaniu właściwości fizyko-chemicznych i biologicznych wirusa RHD. Kluczową rolę w indukcji syntezy przeciwciał neutralizujących odgrywa strukturalne białko kapsydu VP60 RHDV. Źródłem wirusa wykorzystanym do produkcji szczepionek są narządy wewnętrzne zakażonych królików – wątroba, w mniejszym stopniu śledziona oraz nerki. Szczepionki narządowe weszły do powszechnego użycia, umożliwiając ochronę królików hodowlanych, a szczepienia pozostają najskuteczniejszym narzędziem w walce z RHD w ramach programów immunoprofilaktycznych. Ponieważ wzorcowy szczep RHDV nie został ustalony, do produkcji wykorzystywano lokalne szczepy szczepionkowe o ustalonych cechach biologicznych (patogenność i immunogenność). Wysoce immunogenny, inaktywowany chemicznie wirus RHD stymuluje szybką (brak przełamań odporności nawet już po 5 dniach od immunizacji) i trwałą ochronę szczepionych zwierząt, która utrzymuje się przez co najmniej rok po jedнокrotnej

immunizacji. Szczepionki tego typu wykorzystywano także do szczepień interwencyjnych w sytuacji bezpośredniego zagrożenia hodowli (2). Efektywne i długolecnie stosowanie szczepionek zawierających w swym składzie antygen wirusa RHD typu pierwszego było również możliwe ze względu na jednorodność serotypową szczepów wirusa występujących na świecie, mimo zróżnicowania genetycznego. Cunivac – krajowa szczepionka przeciwko RHD, zawierająca polski szczep wirusa z 1988 r., weszła do użycia w 1989 r. i była stosowana z bardzo dobrym skutkiem przez 2 dekady. Szczepy szczepionkowe klasycznego RHDV z lat 1987–1998 są również aktywnymi składnikami monowalentnych lub dwuskładnikowych szczepionek przeciwko RHD, od wielu lat stosowanych w naszym kraju – Pestorin, Pestorin Mormyx, Castorex, Castomix, produkcji czeskiej i słowackiej. Inne używane w Europie szczepionki przeciwko RHD lub RHD i myksomatozie to m.in. Cunipravac RHD, Dercunimix, Lapinject. Przykładem komercyjnego produktu do zapobiegania RHD i myksomatozie, zawierającego produkt ekspresji genu kodującego białko VP60 RHDV, jest szczepionka Nobivac Myxo-RHD.

Wobec braku systemu namnażania wirusa RHD w hodowli komórek duże znaczenie mają możliwości ekspresji rekombinowanego białka VP60 w postaci cząstek wirusopodobnych (VLP), morfologicznie identycznych jak wirus natywny. Do tego celu wykorzystuje się m.in. bakulowirusowy system ekspresji genów i komórki owadzie. Ta alternatywna droga pozyskania wysoce immunogennego antygeny do produkcji wirusologicznych i serologicznych testów diagnostycznych oraz jako potencjalnej szczepionki, została już z powodzeniem sprawdzona w badaniach klasycznego RHDV (37, 40). Za pomocą cząstek VLP wygenerowanych niedawno w badaniach RHDV2 potwierdzono zarówno odmienny profil reakcji antygenowej dwóch typów wirusa RHD, jak i przewagę seroreagentów RHDV2 w populacji dzikich królików, co jest kolejnym dowodem świadczącym o zanikaniu szczepów RHDV1 i dominacji wirusa RHD typu 2 (27, 37, 41, 42).

Skuteczność szczepień przeciwko RHDV2

Obserwacje terenowe z początkowego okresu występowania zakażeń RHDV2 dotyczące ochrony poszczepiennej były niepełne i często dostarczały sprzecznych danych. Obraz komplikował fakt związany z generalnie niższą patogennością szczepów RHDV2 oraz częstszym występowaniem zakażeń w formie przewlekłej. W tym czasie nie było dowodów, które jednoznacznie potwierdzałyby tezę o niedostatecznej ochronie królików immunizowanych dostępnymi wówczas szczepionkami komercyjnymi. Niektóre informacje mówiły o całkowitym braku ochrony krzyżowej u królików szczepionych lub występowaniu ograniczonej odporności immunizowanych zwierząt, inne uznawały za celowe podjęcie szczepień interwencyjnych z użyciem szczepionek zawierających antygen RHDV1 (21, 37). Z analiz epizootii RHD na fermach królików hodowlanych w zachodniej i północnej Francji w 2010 r. wynikało, że pomimo systematycznych szczepień, zgodnie z wcześniej przyjętymi zasadami postępowania

immunoprofilaktycznego, znaczna część zwierząt nie była chroniona przed zakażeniem. To wskazywało by na brak skuteczności szczepionek komercyjnych, których aktywnym komponentem był klasyczny wirus RHD (43). W grupie szczepionych reproduktorów śmiertelność sięgała 20%. Równocześnie nową cechą epizootii była podatność na zakażenie królików młodych, poniżej 4 tygodnia życia (21, 23, 41).

Nowsze dane związane z szybkim rozprzestrzenianiem wirusa RHD typu 2, poparte wynikami badań eksperymentalnych, wskazują, że zapobieganie przypadkom RHD2 wymaga użycia szczepionki swoistej (22, 24, 37, 43, 44). Wyniki prac eksperymentalnych z użyciem szczepionki Filavac, której składnikiem aktywnym jest inaktywowany francuski szczep RHDV2 z 2012 r., wykazały niezbicie, że szczepionka chroni całkowicie przed zakażeniem króliki doświadczalne (100% odporność zwierząt klasy SPF) zaszczepione między 11–12 tygodniem życia, jak również króliki czterotygodniowe. Śmiertelność w grupach królików kontrolnych (nieszczepionych) zakażonych szczepem RHDV2 innym niż użyty do produkcji szczepionki wynosiła od 30 do 67% w piętnastodniowym okresie obserwacji (43). Wzrost odsetka zakażeń i śmiertelności w grupie bardzo młodych króliczek przed odsadzeniem (około czterotygodniowych) pozwolił na ocenę skuteczności wczesnych szczepień. W próbie obejmującej króliki szczepione w 14 i 21 dniu życia oraz kontrolne wrażliwość na zakażenie wykonane po 7 dniach wyniosła od 50–54% zwierząt w grupie kontrolnej. Zaobserwowano wzrost podatności na zakażenie w tej grupie wraz z rosnącym wiekiem zwierząt oraz występowanie u niektórych przewlekłej postaci zakażenia, trwającej 12 dni. Szczepione młode króliki nie wykazywały żadnych objawów choroby w okresie obserwacji po zakażeniu. W eksperymencie potwierdzono pełną odporność dwutygodniowych królików już po 7 dniach od szczepienia oraz dobrą tolerancję szczepionki (po eutanazji nie wykazano obecności zmian patologicznych w narządach wewnętrznych). Ponieważ tak jak poprzednio do eksperymentu użyto króliki SPF, nie uzyskano odpowiedzi na pytanie o wpływ na odporność przeciwciał matczynych, co będzie wymagało badania na królikach konwencjonalnych (24).

Inne, interesujące spojrzenie na zagadnienia ochrony krzyżowej oraz patogenności RHDV2 i RHDV1 dostarczają analizy współczynników śmiertelności w miotach młodych królików, zróżnicowanych wiekowo. Poziom ochrony krzyżowej określano na podstawie ilości zwierząt, które przeżyły dwukrotne zakażenie doświadczalne (challenge) z wykorzystaniem RHDV1 i RHDV2. Wyniki testu wykazały istotny udział odporności nieswoistej w zakażeniach RHDV2. Patogenność RHDV1 była natomiast zależna od bliżej niesprecyzowanych czynników powiązanych z wiekiem zwierząt (45).

Omówienie szczepionek przeznaczonych do zapobiegania zakażeniom RHDV2 (Eravac, Filavac VHD K+C, Novarvilap i Cunipravac RHDV2) dostępnych w Wielkiej Brytanii i Europie przedstawia publikacja Rocchi i Dagleish (46). Z tej grupy szczepionek kompozycję antygenów RHDV1 i RHDV2 zawiera jedynie

szczepionka Filavac VHD KC+V, pozostałe to produkty monowalentne. Spośród nich na polskim rynku do obrotu dopuszczona jest szczepionka Eravac (Hipra Laboratories S.A.). Produkt z adjuwantem olejowym, przeznaczony do stosowania u królików o użyteczności mięsnej od 30. dnia życia. Pełną odporność poszczepioną zwierzęta osiągają po 7 dniach, identycznie jak w przypadku pozostałych szczepionek. Wytwórca nie określa czasu trwania odporności. Na podstawie analizy danych epidemiologicznych związanych z rozprzestrzenianiem się wirusa RHDV2 i występowaniem zakażeń RHDV1 proponowany schemat postępowania immunoprofilaktycznego zakłada oddzielne szczepianie przeciwko obu typom wirusa RHD, z zachowaniem dwutygodniowego okresu przerwy w przypadku produktów immunologicznych, dla których nie określono informacji o równoczesnym szczepieniu.

Podsumowanie

Przyczyną wysokiej zmienności genetycznej wirusów RNA jest brak mechanizmów korekcyjnych podczas replikacji. Zmiany antygenowe wynikają z mutacji zachodzących z dużą częstotliwością w czasie replikacji oraz procesów rekombinacji, skutkujących wymianą materiału genetycznego między pokrewnymi szczepami w czasie wspólnej infekcji. Pojawienie się wirusa RHD typu 2 stanowi przełomowy punkt w dotychczasowej historii występowania RHD. O potencjale genetycznym i możliwościach adaptacyjnych tego wirusa świadczy obecność rekombinantów RHDV2, wykrytych w Portugalii w okresie niespełna 2 lat od pojawienia się pierwotnego RHDV2 (26, 47). Z epizootycznego punktu widzenia najważniejsze zmiany biologicznych właściwości wirusa dotyczą poszerzenia zakresu swoistego gospodarza, co wyraża się możliwościami zakażenia kilku gatunków zajęcy oraz zdolnością do pokonania bariery wiekowej, dotychczas skutecznie chroniącej młode, około dwumiesięczne króliki przed zakażeniem. Równie ważnym elementem jest brak odporności na zakażenie RHDV2 u królików immunizowanych antygenem RHDV typu 1. Wobec wyraźnego zróżnicowania wirusów RHD typu 1 i typu 2, wyrażającego się dystansem genetycznym oraz odrębnością antygenową i serologiczną w profilaktyce RHD, niezbędne jest stosowanie szczepionek specyficznych dla każdego z wymienionych typów wirusa. Przytoczone wyniki prac badań eksperymentalnych potwierdzają skuteczność użytych szczepionek przeciwko RHDV2, jak również skuteczność i bezpieczeństwo wczesnych szczepień u bardzo młodych – dwutygodniowych królicząt.

Mając na uwadze obserwowane wcześniej zjawisko zanikania najstarszych grup genetycznych klasycznego RHDV, aż do całkowitego wyparcia tej formy wirusa przez nowszą antygenową i genetyczną postać RHDVa, można przypuszczać, że podobna sytuacja zachodzi obecnie w przypadku RHDV2 (26, 27, 41). Zgodnie z aktualnym stanem wiedzy, przy wyborze szczepionek skutecznie zabezpieczających przed RHD należy uwzględnić wykonanie podwójnego szczepienia przeciwko zakażeniom wywołanym przez wirusa RHD typu 1 i RHDV2. Za wielce prawdopodobny

należy uznać scenariusz, w którym szczepy wirusa RHDV1 ulegną całkowitemu zanikowi, a działania immunoprofilaktyczne będą wymagały szczepień przeciwko RHDV2.

Piśmiennictwo

- 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.
- 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**, 12–30. doi: 10.1186/1297-9716-43-12.
- 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.
- Cancelotti F., Renzi M.: Epidemiology and current situation of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome in Italy. *Rev. Sci. Tech.* 1991, **10**, 409–422.
- 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.
- Chasey D.: Possible origin of rabbit haemorrhagic disease in the United Kingdom. *Vet. Rec.* 1994, **135**, 496–499.
- Le Pendu J., Abrantes J., Bertagnoli S., Guitton J.S., Le Gall-Reculé G., Lopes A.M., Marchandeanu S., Alda F., Almeida T., Celio A.P., Barcena J., Burmakina G., Blanco E., Calvete C., Cavadini P., Cooke B., Dalton K., Delibes Mateos M., Deputula W., Eden J.S., Wang F., Ferreira C.C., Ferreira P., Foronda P., Goncalves D., Gavier-Widén D., Hall R., Hukowska-Szematowicz B., Kerr P., Kovaliski J., Lavazza A., Mahar J., Malogolovkin A., Marques R.M., Marques S., Martin-Alonso A., Monterroso P., Moreno S., Mutze G., Neimanis A., Niedzwiedzka-Rystwey P., Peacock D., Parra F., Rocchi M., Rouco C., Ruvoen-Cloet N., Silva E., Silverio D., Strive T., Thompson G., Tokarz-Deputula B., Esteves P.: Proposal for a unified classification system and nomenclature of lagoviruses. *J. Gen. Virol.* 2017, **98**, 1658–1666.
- 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.
- 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.
- Novotny M., Ros-Bascunana C., Ballagi-Pordany A., Gavier-Widén 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.
- Capucci L., Fallacara F., Grazioli S., Lavazza A., Pacciarini M.L., Brocchi E.: A further step in the evolution of rabbit haemorrhagic disease virus: the appearance of the first consistent antigenic variant. *Virus Res.* 1998, **58**, 115–126.
- 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.
- Le Gall-Reculé G., Zwengelstein F., Laurent S., de Boissésion 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.
- McIntosh M.T., Behan S.C., Mohamed F.M., Lu Z., Moran K.E., Burege 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.
- 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.
- Fitzner A.: Characterisation and immunogenic properties of Polish strains of RHD virus. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 2009, **53**, 575–582.
- Fitzner A., Niedbalski W.: Detection of rabbit haemorrhagic disease virus 2 (GI.2) in Poland. *Pol. J. Vet. Sci.* 2018, **21**, 451–458.
- Duarte M.D., Henriques A.M., Barros S., Luis T., Fagulha T., Ramos F., Fevereiro M.: New insight into the epidemiology of rabbit haemorrhagic disease viruses in Portugal: Retrospective study reveals the circulation of genogroup 5 (G5) in Azores and discloses the circulation of GI and G6 strains in mainland until 2008. *Infect. Gen. Evol.* 2014, **27**, 149–155.
- 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.
- Capucci L., Fusi P., Lavazza A., Pacciarini M.L., Rossi C.: Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit haemorrhagic disease virus but nonpathogenic. *J. Virol.* 1996, **70**, 8614–8623.

Firma Biowet Puławy Sp. z o.o.
 poszukuje lekarzy weterynarii
 do pracy na stanowisku

Przedstawiciel regionalny

z terenu województw:
 łódzkie i wielkopolskie

Jeśli jesteś:

- ✓ energiczną i dynamiczną osobą,
- ✓ masz silną motywację do rozwijania i doskonalenia własnego talentu,
- ✓ cechuje Cię łatwość nawiązywania kontaktów, miła aparycja i wysoka kultura osobista,
- ✓ potrafisz organizować własną pracę i samodzielnie realizować powierzone zadania,
- ✓ masz ciekawe pomysły i kreatywne rozwiązania,
- ✓ jesteś dyspozycyjny/a, a Twoją pasją jest jazda samochodem,

to jesteś właściwym kandydatem na to stanowisko.



Oferujemy:

- ✓ ciekawą i pełną wyzwań pracę, w prężnie działającej i stabilnej polskiej firmie,
- ✓ możliwość rozwijania wiedzy i doskonalenia swojego talentu,
- ✓ atrakcyjne wynagrodzenie,
- ✓ stałą umowę o pracę.

Jeśli jesteś zainteresowany współpracą z nami, prześlij swoje CV ze zdjęciem i listem motywacyjnym, oraz z klauzulą o ochronie danych osobowych na adres e-mailowy:

adejko@biowet.pl, marketing@biowet.pl
 lub pocztą na adres: Biowet Puławy Sp. z o.o.,
 Dz. Marketingu, ul. Arciucha 2, 24-100 Puławy,
 tel. + 81 888-91-34,
 +81 888-91-45 lub 602 337 341.

21. Le Gall-Reculé G., Lavazza A., Marchandeu S., Bertagnoli S., Zwingelstein F., Cavadini P., Martinelli N., Lombardi G., Guerin 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.
22. Boucher S., Le Gall-Reculé G., Plassiart G., Sraka B.: Description clinique, nécropsique et histologique de cas de Maladie Hémorragique Virale (VHD) à virus variant, survenus dans 60 élevages de lapins de chair (*Oryctolagus cuniculus*) vaccinés ou non vaccinés en France en 2010/2011. 14èmes J. Rech. Cunicole Fr, 22-23 novembre 2011, Le Mans (INRA ed), ITAVI publ. Paris. p. 143-146.
23. Dalton K.P., Nicieza I., Balseiro A., Muguierza 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.
24. Le Minor O., Joudou L., Le Moulec T., Beilvert F.: Innocuité et efficacité de la vaccination à 2 et 3 semaines d'âge contre le virus RHDV2 de la maladie hémorragique virale du lapin (VHD). 17èmes J. Rech. Cunicole. 2017, 21-22 Novembre, Le Mans, France, pp. 127-130.
25. Abrantes J., Lopes A.M., Dalton K.P., Melo P., Correia J.J., Ramada M., Alves P.C., Parra F., Esteves P.J.: New variant of rabbit hemorrhagic disease virus, Portugal, 2012-2013. *Emerg. Infect. Dis.* 2013, 19, 1900-1902.
26. Lopes A.M., Dalton K.P., Magalhaes M.J., Parra F., Esteves P.J., Holmes E.C., Abrantes J.: Full genomic analysis of new variant rabbit hemorrhagic disease virus revealed multiple recombination events. *J. Gen. Virol.* 2015, 96, 1309-1319.
27. Mahar J.E., Hall R.N., Peacock D., Kovaliski J., Piper M., Mourant R., Huang N., Campbell S., Gu X., Read A., Urakova N., Cox T., Holmes E.C., Strive T.: Rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2; GI.2) is replacing endemic strains of RHDV in the Australian landscape within 18 months of its arrival. *J. Virol.* 2018, 92:e01374-17. doi: 10.1128/JVI.01374-17.
28. Martin-Alonso A., Martin-Carillo N., Garcia-Livia K., Valldares B., Foronda P.: Emerging rabbit haemorrhagic disease virus 2 (RHDV2) at the gates of the African continent. *Infect. Genet. Evol.* 2016, 44:46-50.
29. Neimanis A.S., Ahola H., Zohari S., Larsson Pettersson U., Brojer C., Capucci L., Gavier-Widen D.: Arrival of rabbit haemorrhagic disease virus 2 to northern Europe: Emergence and outbreaks in wild and domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Sweden. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017, doi: 10.1111/tbed.12650.
30. Neimanis A., Ahola H., Larsson Pettersson U., Lopes A.M., Abrantes J., Zohari S., Esteves P.J., Gavier-Widen D.: Overcoming species barriers: an outbreak of lagovirus europaeus GI.2/RHDV2 in an isolated population of mountain hares (*Lepus timidus*). *BMC Vet. Res.* 2018, 14:367.
31. Lopes A.M., Rouco C., Esteves P.J., Abrantes J.: GI.1b/GI. Recombinant rabbit hemorrhagic disease virus 2 (*Lagovirus europaeus*/GI.2) in Morocco, Africa. *Arch. Virol.* 2018, doi: 10.1007/s00705-018-4052-y.
32. Rahali N., Sghaier S., Khaier H., Zanati A., Bahloul C.: Genetic characterization and phylogenetic analysis of rabbit hemorrhagic disease virus isolated in Tunisia from 2015 to 2018. *Arch. Virol.* 2019, doi: 10.1007/s00705-019-04311-z.
33. 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.
34. Le Gall-Reculé G., Lemaitre E., Bertagnoli S., Hubert C., Top S., Decors A., Marchandeu S., Guitton J.S.: Large-scale lagovirus disease outbreaks in European brown hares (*Lepus europaeus*) in France caused by RHDV2 strains spatially shared with rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet. Res.* 2017, 48:70.
35. Puggioni G., Cavadini P., Maestrace 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.
36. Velarde R., Cavadini P., Neimanis A., Cabazon O., Chiari M., Gaffuri A., Lavin S., Grilli G., Gavier-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.
37. Barcena J., Guerra B., Angulo I., Gonzalez J., Valcarcel F., Mata C.P., Caston 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. doi: 10.1186/s13567-015-0245-5.
38. Górski J., Mizak B., Mizak Z., Komorowski A.: Obraz kliniczny oraz zmiany anatomopatologiczne w przebiegu pomoru królików (wirusowej krwotocznej bronchopneumonii królików). *Życie Wet.* 1988, 63, 266-269.
39. Fitzner A., Niedbalski W.: Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) strains isolated in Poland. *Arch. Virol.* 2017, 162, 3197-3203.
40. Gromadzka B., Szewczyk B., Konopa G., Fitzner A., Kęsy A.: Recombinant VP60 in the form of virion-like particles as a potential vaccine against rabbit hemorrhagic disease virus. *Acta Biochim. Pol.* 2006, 53, 371-376.
41. 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.
42. 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 genotype 1 in Portuguese wild rabbit populations? *Viruses* 2015, 7, 27-36.
43. Le Minor O., Beilvert F., Le Moulec T., Djador 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, pp. 241-244.
44. Peacock D., Kovaliski J., Sinclair R., Mutze G., Iannella A., Capucci L.: RHDV2 overcoming RHDV immunity in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Australia. *Vet. Rec.* 2017, doi: 10.1136/vr.104135.
45. Calvete C., Mendoza M., Alcaraz A., Sarto M.P., Jimenez-de-Baguess M.P., Calvo A., Monroy F., Calvo J.H.: Rabbit haemorrhagic disease: Cross-protection and comparative pathogenicity of GI.2/RHDV2/b and GI.1b/RHDV2 lagovirus in a challenge trial. *Vet. Microb.* 2018, 219, 87-95.
46. Rocchi M., Dagleish M.P.: Diagnosis and prevention of rabbit viral haemorrhagic disease 2. *In Practice.* 2018, 40, 11-16.
47. Almeida T., Lopes A.M., Magalhaes M.J., Neves F., Pinheiro A., Goncalves D., Leitao M., Esteves P.J., Abrantes J.: Tracking the evolution of the GI/RHDVb recombinant strains introduced from the Iberian Peninsula to the Azores islands, Portugal. *Infect. Genet. Evol.* 2015, 34, 307-313.

Dr hab. Andrzej Fitzner, prof. nadzw.,
 e-mail: andrzej.fitzner@piwzp.pl