

EBL VIRUSŲ EPIZOOTOLOGIJA IR EVOLIUCINĖ BIOLOGIJA. LITERATŪROS APŽVALGA

Dainius Zienius

LVA Veterinarijos institutas, Instituto g. 2, Kaišiadorys, LT – 4230, tel.: +370 346 60 691, +370 687 50 931; faks: +370 346 60 697; el. paštas: diректорius@lvavi.lt; dainzien@yahoo.com

Santrauka. Mūsų darbo tikslas buvo apžvelgti paskelbtus mokslo tyrimus apie pasiutligės virusų epizootologiją Europos šikšnosparnių populiacijoje, atsižvelgiant į šikšnosparnių pasiutligės virusų evoliucinius-adaptacinius procesus. Europoje nustatomi trys endeminiai *Lyssavirus* genotipai: klasikinės pasiutligės virusai (RABV) ir du šikšnosparnių pasiutligės virusų genotipai EBLV-1 ir EBLV-2. Jų nukleokapsidės (N) ir fosfoproteino (P) filogenetinė palyginamoji analizė leido identifikuoti du skirtingus linijinius virusų filogenetinius subtipus: EBLV-1a/1b ir EBLV-2a/2b, kurie pasižymi aminorūgščių sekų rūšiniu ir geografiniu kintamumu šikšnosparnių populiacijos viduje. Per pastaruosius 20 metų daugiau kaip 600 šikšnosparnių pasiutligės atvejų diagnozuota Europos teritorijoje, daugiausia Škotijoje, Olandijoje, Ispanijoje ir Danijoje. Daugiau kaip 95 proc. EBLV-1 pasiutligės virusų identifikuota *Eptesicus serotinus* šikšnosparniams, tačiau šis pasiutligės sukėlėjas buvo izoliuotas iš penkių avių Danijoje ir akmeninės kiaunės Vokietijoje. EBLV-2 pasiutligės virusų genotipas nustatytas *Myotis dasycname* ir *Myotis daubentonii* šikšnosparniams. Nustatyti keturi žmonių pasiutligės atvejai – du buvo infekuoti EBLV-1, kiti du – EBLV-2 pasiutligės virusais. Daugelis statistinių duomenų ir modelių (taksonominė koreliacija, šikšnosparnių populiacijos dinamika, filogenetinė geografija), leido mokslininkams prognozuoti, kad *Lyssavirus* šeimos virusai cirkuliavo *Chiroptera* populiacijoje žymiai anksčiau, nei jie paplito tarp mėsdžių (prieš 888–1459 metų), o EBLV-1 virusų genotipas galėjo atsirasti prieš 500–750 metų. EBLV-1 virusai turėjo skirtingus patekimo iš Šiaurės Afrikos ir plitimo Europos teritorijoje kelius. Europoje, sėkmingai atlikus oralines lapių vakcinacijas, klasikinė pasiutligė likviduota. Tačiau EBL virusų židiniai „laisvose nuo pasiutligės“ šalyse įgalina naujai pažvelgti į pasiutligės epizootologiją, nes eliminuoti pasiutligės virusus iš šikšnosparnių populiacijos vakcinacija artimiausiu metu nepavyks.

Raktažodžiai: EBLV, šikšnosparnis, epidemiologija, Europa, apžvalga.

THE EPIDEMIOLOGY AND BIOLOGY EVOLUTION OF RABIES EBL VIRUSES. REVIEW

Dainius Zienius

Department of Virology, Veterinary Institute of Lithuanian Veterinary Academy, Instituto 2, LT-56115 Kaišiadorys, Tel. +370 346 60691, +370 687 50931, fax. +370 346 60697, e-mails: diректорius@lvavi.lt; dainzien@yahoo.com;

Summary. The aim of this study was to review the EBLV epidemiology in Europe and provide the evolutionary history of these viruses. Rabies is still present in Europe and three *Lyssavirus* genotypes are endemic: genotype 1 or rabies virus (RABV), which infects terrestrial animals, and genotypes 5 and 6 or European bat lyssavirus type 1 (EBLV-1) and type 2 (EBLV-2). Each of the EBLV types, according to the nucleoprotein (N) and glycoprotein (G) genes nucleotide and amino acid sequence phylogenetic analysis, has been subdivided into two variants – EBLV-1a/1b and EBLV-2a/2b. During the last 20 years more than 600 cases of EBLV infection have been reported throughout Europe, most recently in Scotland, Netherlands, Spain and Denmark. More than 95% of EBLV-1 were isolated from *Eptesicus serotinus* bats, whereas EBLV-2 appears to be associated with *Myotis dasycname* and *Myotis daubentonii* bats. EBLV-1 infection has also been reported in small number of terrestrial mammals, including five sheep in Denmark and a stone marten in Germany. Four cases of bat-associated rabies in humans have been reported and confirmed: two cases were infected with EBLV-1 and two – with EBLV-2. By combining a variety of data (taxonomic relationships, virus population dynamics, phylogeography) it's able to reveal some aspects of the evolutionary history of EBLV in Europe: chiropteran lyssaviruses existed long before carnivoran RABV with the host switching from chiropters to carnivores to 888 -1459 years ago; the current lineages of EBLV-1 arose some 500 to 750 years ago and possible have different patterns of geographical spread from North Africa with different points of introduction into Europe. So rabies in bats will never be eradicated because of the nature of the infection, unlike classical rabies (RABV, serotype 1) in other terrestrial mammals, which can be eradicated using oral rabies vaccination programme in many “rabies free” countries. It is therefore something people must learn to live with.

Key words: EBLV, rabies, bat, epidemiology, Europe, review.

Įvadas. Šikšnosparniai (*Chiroptera* būrys, *Megachiroptera* ir *Microchiroptera* pobūris) paplitę visame pasaulyje (apie 1100 rūšių), įskaitant ir Europą, kurioje gyvena

apie 30, daugiausia vabzdžiaėdžių šikšnosparnių rūšių. Lietuvoje aptinkama 14 šikšnosparnių rūšių, iš kurių vandeninis pelėausis (*Myotis daubentonii*), kūdrinis pelėausis

(*Myotis dasycneme*), Branto pelėausis (*Myotis brandtii*), Natererio pelėausis (*Myotis natereri*), rudasis ausylis (*Plecotus auritus*), europinis plačiaausis (*Barbastella barbastellus*), vėlyvasis šikšnys (*Eptesicus serotinus*) ir šiaurinis šikšnys (*Eptesicus nilssonii*) gyvena žiemovietėse (Pauža ir Paužienė, 1996; Baranauskas ir kt., 2005). Šie žinduoliai evoliucijos eigoje dėl savo populiacinių charakteristikų (pašaro pasirinkimas, kolonijinis gyvenimo būdas, populiacijos struktūra, galimybė skraidyti, naktinis maitinimasis, žiemos miego periodas, sezoninės migracijos, echolokacija, ilga gyvenimo trukmė) užėmė įvairias geografines nišas ir tapo jautriu infekcinių ligų pernešimo veiksniu. Daugiau kaip 30 virusų rūšių yra izoliuota iš šikšnosparnių, 12 iš jų – zoonozų sukėlėjai; vieni šikšnosparniai yra natūralūs šių virusų šeimininkai, kiti – pernešėjai arba vektoriai, todėl mokslininkų dėmesys šiems žinduoliams kasmet didėja (Van der Poel et al., 2006). Šikšnosparniai yra kai kurių ypač pavojingų žmonėms virusų rezervuarai ir pernešimo vektoriai, pvz.: Nipav virusų (NiV), sukėlusių Malaizijoje ir Singapūre encefalito protrūkį (Wong et al., 2002); Hendra paramikso virusų (HeV), sukeliančių žmonių meningitą, o šių virusų antikūnai identifikuoti vaisiaėdžių Australijos šikšnosparnių kraujo serumo mėginiuose (Chant et al., 1998; Philbey et al., 1998); Ebola virusų (EBOV), izoliuotų iš Afrikos vaisiaėdžių šikšnosparnių ir sukeliančių 50–90 proc. žmonių mirtinumą (Pourrut et al., 2005), Korona virusų (SARS), kurių natūralus rezervuaras identifikuojamas Kinijos vabzdžiaėdžiuose šikšnosparniuose (Marra et al., 2003). Be to, šikšnosparniai gali būti Vakarų Nilo virusų (WNV) ir Šv. Luiso encefalito virusų rezervuarai (Pilipski et al., 2004). Tačiau pasiutligės virusai iš *Rhabdoviridae* šeimos, *Lyssavirus* genties izoliuojami iš daugelio vabzdžiaėdžių, vaisiaėdžių, mėšėdžių, vampyrinių šikšnosparnių visame pasaulyje, taip pat ir Europoje (Van der Poel et al., 2006).

Pasiutligės virusų epizootinės grandinės erdvinė dinamika pakito, epizootinis arealas išsiplėtė, atsirado skirtingos pasiutligės virusų ir jautrių populiacijų sąveikos formos, kurias suprasti, įvertinti bei prognozuoti ypač sudėtinga dėl laukinių gyvūnų ekologinių faktorių ir menkos mėginių bazės (Smith, 2002; Cliquet, Picard-Meyer, 2004; Calisher et al., 2006). Šiuo metu Europoje pasiutligė sudaro keletą epidemiologinių cirkuliacijos ciklų, kuriuose dalyvauja daugelis laukinių ir naminių žinduolių. Šikšnosparnių pasiutligės epidemiologinis ciklas yra unikalus, savarankiškas, tačiau atviro tipo, todėl jo tyrimai yra ypač svarbūs nustatant naujus virusų perdavimo veiksnius, ypač antropofilinėse šikšnosparnių populiacijose (Gordon et al., 2004; Bourhy et al., 2005).

Pasiutligės sukėlėjas yra neurotropinis neigiamos poliarizacijos RNR-virusas, priklausantis *Rhabdoviridae* genčiai, *Lyssavirus* šeimai. Naudojant monokloninius antikūnus (MkA) bei polimerazės grandininę reakciją (PGR) nustatyti septyni skirtingi pasiutligės virusų genetiniai tipai: klasikinis pasiutligės (RABV, 1 genotipas, 1 serotipas), Logos šikšnosparnių (LBV, 2 genotipas, 2 serotipas), Mokola (MV, 3 genotipas, 3 serotipas), Duvenhage (DUVV, 4 genotipas, 4 serotipas), Europinis šikšnosparnių (EBLV-1, 5 genotipas ir EBLV-2, 6 genotipas)

ir Australijos šikšnosparnių (ABV, 7 genotipas). RABV, ALB, EBL-1, EBL-2 ir DUVV priskiriami pirmai, o LBV ir MV – antrai filogenetinei grupei. Visų genotipų, išskyrus Mokola, virusų rezervuaras yra šikšnosparniai (Badrane et al., 2001; Davis et al., 2005). Be to, Centrinėje ir Pietų Azijoje nustatyti keturi nauji šikšnosparnių pasiutligės virusų genotipai: Aravijos – ARAV, izoliuotas iš *Myotis blythi* šikšnosparnių (Arai et al., 2003), Kijando – KHUV (Kuzmin et al., 2003), Irkuto – IRKV ir Vakarų Kaukazo – WCBV, izoliuoti iš *Miniopterus shreibersii* šikšnosparnių (Botvinkin et al., 2003; Fooks, 2005). Europoje iš šikšnosparnių izoliuoti pasiutligės virusai priskiriami EBLV-1 ir EBLV-2, atitinkamai 5 ir 6 genotipams. Šių virusų nukleokapsidės (N) ir fosfoproteino (P) filogenetinė palyginamoji analizė leido identifikuoti du skirtingus linijinius virusų filogenetinius subtipus: EBLV-1a/1b bei EBLV-2a/2b, kurie pasižymi aminorūgščių sekų rūšiniu ir geografiniu kintamumu šikšnosparnių populiacijos viduje (Serra-Cobo et al., 2002; Davis et al., 2005).

Darbo tikslas – apžvelgti paskelbtus mokslo tyrimus apie pasiutligės virusų epizootologiją Europos šikšnosparnių populiacijoje, atsižvelgiant į šikšnosparnių pasiutligės virusų evoliucinius-adaptacinius procesus.

Medžiagos ir metodai. Pasiutligės diagnostika atliekama pagal standartizuotus Tarptautinio epizootijų biuro metodus – imunofluorescencinį (IFA) ir laboratorinių pelių užkrėtimo (MIT) (WHO, 2004; OIE, 2004-a). Šie „standartiniai“ tyrimo metodai yra labiau priimtini tiriant klasikinius pasiutligės virusus (RABV-1), tuo tarpu EBL virusų grupei identifikuoti gali būti taikomi antigeniniai (monokloniniai antikūnai MkA) ir genetiniai tyrimų metodai – dažniausiai polimerazės grandininės reakcijos: atvirkštinės transkripcijos (AT-PGR), „lizidinės“ (nAT-PGR, hnAT-PGR), realaus laiko (TaqMan technologinės). Techniniu požiūriu šios reakcijos yra panašios ir apima atskirus procesinius žingsnius – RNR ekstrakciją ir valymą, RNR atvirkštinę transkripciją į cDNR, dviejų žingsnių amplifikaciją, nAT-PGR produktų vizualizaciją, valymą, nukleotidų ir aminorūgščių sekų identifikavimą bei palyginamąją analizę (Ondrejčková et al., 2004; Wakeley et al., 2005). Filogenezės analizė atliekama kompiuterinėmis programomis (PHILIP (DNADIST), PAUP, UPGMA, ir kt.), suformuojant filogenetinius „medžius“ maksimalaus homologiškumo – heterologiškumo principais. Dažniausiai šiose reakcijose analizuojami EBL virusų nukleoproteino (N) ir glikoproteino (G) genetinės kombinacijos nukleotidų ir aminorūgščių lygiu, panaudojant universalius arba tipui (subtipui) specifinius pradmenis (Picard-Meyer et al., 2004). EBL virusų izoliavimo audinių kultūrose metodai dėl prastų šių virusų kultivavimo ir adaptacinių ląstelių kultūroms savybių taikomi rečiau.

Visos 30 Europoje aptinkamos šikšnosparnių rūšys yra saugomos (Europos šikšnosparnių apsaugos sutartis – 1991 ir 1995 metų redakcijos, direktyva 92/43/EEC), todėl surenkama tik natūraliai arba nelaimingo atsitikimo metu nugaišę, žuvę žvėreliai, o tai mažina tyrimų mastą, apsunkina serologinių tyrimų galimybes, bet leidžia detalai ištirti kiekvieną atvejį (Stanic-Pavlinic, 2005; Lina, Hutson, 2006). EBL virusų patogeniškumui ir imunoge-

niškumui tirti taikomi klasikiniai virusologiniai biologiniai modeliai, serologinės ir histocheminės reakcijos (OIE, 2004-a).

Tyrimų rezultatai. *EBL-1 ir EBL-2.* Pirmieji šikšnosparnių pasiutligės virusai buvo izoliuoti Vokietijoje ir buvusioje Jugoslavijoje. Šiuo metu daugiau kaip 600 šikšnosparnių pasiutligės atvejų diagnozuota Europos teritorijoje (OIE, 2002; OIE 2004-b). Pasyvus EBLV stebėjimas Anglijoje parodė, kad per 18 paskutiniųjų metų buvo atlikta daugiau nei 3000 tyrimų, kurių daugelis buvo neigiami pasiutligės atžvilgiu. Čia nebuvo nustatyta nė vieno EBLV-1 atvejo, tačiau identifikuoti keturi EBLV-2 atvejai, visi *Myotis daubentonii* šikšnosparniuose (Whitby et al., 1996; Smith et al., 2005; Johnson et al., 2006). Filogenetinė aminorūgščių sekų analizė parodė, kad identifikuotas virusas priskiriamas EBLV-2a subtipui ir yra filogenetiškai artimas kitiems EBLV-2 virusams, išskirtiems Didžiojoje Britanijoje ir Olandijoje (Johnson et al., 2003; Fooks et al., 2004-a; Fooks et al., 2004-b). Daugiausia šikšnosparnių pasiutligės virusų tyrimų atliekama Olandijoje. Pirmasis EBLV atvejis Olandijoje užfiksuotas 1987 m. (Nieuwenhuijs et al., 1992). Per 20 metų čia ištirta daugiau kaip 3 tūkst. šikšnosparnių, tame tarpe 1219 *Eptesicus serotinus*, iš kurių 251 (21 proc.) buvo teigiami *Lyssavirus* antigeno atžvilgiu. Nukleoproteino analizė įrodė, kad filogenetiškai Olandijoje nustatomi EBL-1a ir EBL-1b subtipai, o penktas pasiutligės virusų genotipas yra endemiškas *Eptesicus serotinus* Olandijos šikšnosparnių populiacijoje (Van der Poel et al., 2005). Prancūzijoje 1989–2002 metais diagnozuota 14 EBLV-1 atvejų, visi jie buvo identifikuoti *Eptesicus serotinus* šikšnosparniuose (Picard-Meyer et al., 2004). Danijoje šikšnosparnių pasiutligės tyrimai atliekami nuo 1996 metų, tačiau tirama tik apie 50–60 mėginių per metus ir identifikuojama 5–10 teigiamų EBL-1 pasiutligės virusų (Bohr et al., 2006). Be to, 1998-aisiais EBLV-1a buvo izoliuotas iš trijų, o 2002 metais dar iš dviejų avių smegenų suspensijos (Ronshold, 2002; Tjornehoj et al., 2006). Panašus EBL virusų transrūšinis perdavimo faktas nustatytas Vokietijoje, kur 2001 metais iš pasiutligę įtariamoms akmeninės kiaunės (*Martes foina*) smegenų suspensijos buvo identifikuotas EBL-1 virusas. Pažymėtina, kad rutininiai pasiutligės tyrimai (FAT) buvo neigiami, tačiau AT-PGR ir nukleoproteino fosfoproteino filogenetine analize buvo nustatyta, kad virusas priskiriamas EBLV-1a subtipui ir genetiškai artimas (99,5 proc. homologiškumas) daniškajam EBLV-1a izoliatui iš *Eptesicus serotinus* (Muller et al., 2004).

Skirtumai tarp 5 ir 6 pasiutligės virusų genotipų determinuoti rūšine ir geografine priklausomybe. Europoje 95 proc. EBL-1 virusų buvo izoliuoti iš *Eptesicus serotinus* šikšnosparnių, išskyrus vieną atvejį – izoliatas iš *Vespertilio murinus* šikšnosparnio Ukrainoje 1991 metais (Selimov et al., 1991; Muller, 2000). EBL-1a ir EBLV-1b filogenetiškai artimi virusų subtipai, evoliucijos eigoje adaptavosi vienoje šikšnosparnių rūšyje. Olandija – vienintelė šalis, kurioje izoliuoti abu EBL-1 virusų subtipai. Geografiškai EBLV-1a identifikuojamas Vakarų ir Rytų Europos regionuose, EBLV-1b – Šiaurės ir Pietų regionuose (Fooks et al., 2003). EBL-2 virusas pirmą kartą buvo nustatytas iš šveicarų biologo, tyrinėjusio šikšnos-

parnius Suomijoje, smegenų mėginių (Schneider, 1982). Vėliau buvo identifikuota šių pasiutligės virusų genotipo rūšinė adaptacija *Myotis dasycneme* (EBLV-2a) ir *Myotis daubentonii* (EBLV-2b) šikšnosparniuose. Geografiniu požiūriu EBLV-2 determinaciją sunku nustatyti, nes identifikuoti tik keturi židiniai: Olandijoje, Didžiojoje Britanijoje, Suomijoje ir Šveicarijoje.

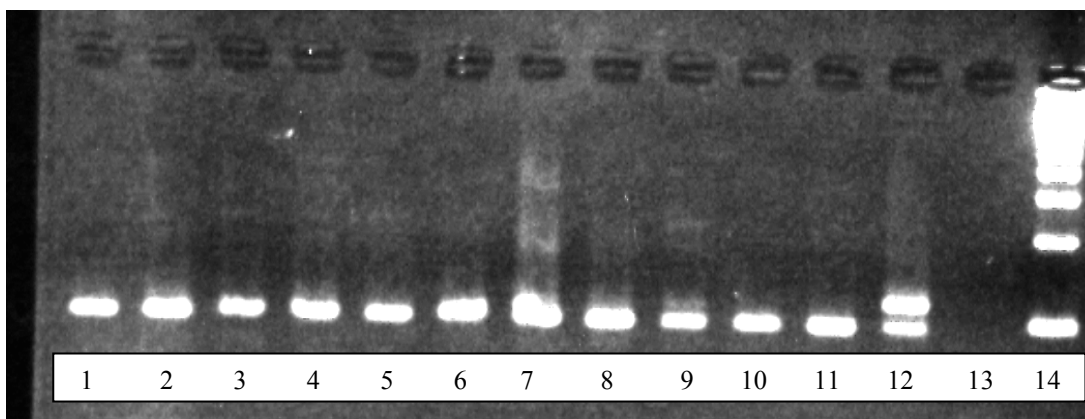
Adaptacija audiniuose ir audinių kultūrose. Klasikinė pasiutligės virusų neuroadaptacija būdinga ir EBLV, transsinaptinis virusų nukleokapsidžių persikėlimas nustatomas ir *in vivo*, ir *in vitro* (Etessami et al., 2000), tačiau literatūroje minimi tik fragmentiniai EBL virusų izoliavimo ir kultivavimo atvejai iš šikšnosparnių seilių liaukų, minkštojo gomurio, liežuvio, skrandžio, žarnų (tiesiosios), kepenų ir širdies (Fooks et al., 2003). Laboratorijoje EBL virusų kultivavimui naudojamos pirminės pelių embrionų smegenų suspensijos – CD-1 (Weli et al., 2006), persėjamos pelių neuroblastomos – N2A arba McCoy ląstelių linijos, kuriose nustatomas atitinkamai 90 ir 95 proc. jautrumas ir specifiskumas EBL virusams (Nogueira, 2004).

Patogeniškumas ir imunogeniškumas. EBL virusų patogeniškumas kitoms laukinių ir naminių gyvulių rūšims identifikuojamas retai, tačiau literatūroje yra duomenų, kad šie pasiutligės virusų genotipai yra mažiau patogeniški nei pirmasis genotipas (RABV). Pvz., eksperimentiškai infekuojant EBLV kates bei šunis, pasiutligės klinikiniai simptomai pastebėti tik po intracerebralinės virusų injekcijos, o pointramuskulinės pasiutligės klinikos nebuvo (Van der Poel et al., 2006). Analogiškas bandymas su rudosiomis lapėmis (*Vulpes vulpes*) parodė, kad po eksperimentinio užkrėtimo į raumenis visoms lapėms nustatyti neurologiniai simptomai, tačiau galvos smegenyse, seilių liaukose, tonzilėse, plaučiuose ir kituose organuose virusiniai antigenai nebuvo nustatyti, išskyrus vieną lapę, kurios stuburo smegenyse EBLV-1 RNR identifikuota AT-PGR (Vos et al., 2004). Tiriant naujų Aravijos (ARAV), Kujando (KHUV), Irkuto (IRKV) pasiutligės virusų patogeniškumą *Eptesicus fuscus* šikšnosparniams, nustatyta, kad 55–75 proc. infekuotų gyvūnų sirgo klinicine pasiutligės forma. Virusinė RNR nustatyta daugelyje organų (smegenyse, seilių liaukose, gerklose, plaučiuose), tačiau virusus izoliuoti audinių kultūrose pavyko tik iš 20 proc. mėginių (Hughes et al., 2006). Kai kurie kliniškai sveiki šikšnosparniai turi antikūnų prieš EBLV, o jų seilėse identifikuojama virusinė RNR (Serra-Cobo et al., 2002; Wellenberg et al., 2002). Tarp RV, DUVV, EBLV ir ABV pasiutligės virusų genotipų nustatyti antigeniniai saitai, apsprendžiantys kryžmines antigenines ir protektyvines reakcijas po imunizavimo (OIE, 2004-a). SAD kamieno vakcinomis oraliai imunizuotos lapės ir usūriniai šunys įgavo imunitetą, saugantį juos nuo užkrėtimo EBL virusais, be to, statistiškai patikimo skirtumo tarp virusus neutralizuojančių antikūnų prieš EBLV-1 ir EBLV-2 nenustatyta (Muller et al., 2006). Kita vertus, komercinės pasiutligės vakcinos prieš naujuosius Eurazijos šikšnosparnių pasiutligės virusus (ARAV, KHUV, IRKV, WCBV) buvo mažai efektyvios, t. y. nors antikūnų titras buvo aukštas, specifiskumas – nepakankamas, kad apsaugotų Sirijos žiurkėnus ir šeškus nuo infekavimo minėtais pasiutligės virusais (Hanlon et al., 2005).

EBL virusų molekulinė biologija. AT-PGR, kaip specifinė identifikavimo ir analitinė priemonė, gali būti taikoma visiems pasiutligės virusų genotipams (1 pav.; Echevarria et al., 2005) identifiuoti ir analizuoti (Echevarria et al., 2005; Vazquez-Moron et al., 2006). Nukleoproteino filogenetinė nukleotidų sekų analizė parodė 77,7–89,5 proc. homologiškumą tarp EBL-1 ir RABV ir 80,5–99,5 proc. panašumą tarp skirtingų EBL-1 mėginių (Echevarria et al., 2001). Analogiškai tyrimai pasiutligės virusų glikoproteino regione parodė 80,5 proc. homologiškumą tarp EBL-1 ir ABL bei 83,5 proc. tarp EBL-2 ir ABL. Grupės specifinis homologiškumo laipsnis tarp skirtingų EBL-1 ir EBL-2 mėginių siekė 94,0–98,5 proc. (Badrane, Tardo, 2001). AT-PGR produktų nukleoproteino (N) nukleotidų ir aminorūgščių filogenetinė analizė parodė, kad „naujieji“ šikšnosparnių ARAV, KHUV, IRKV, WCBV virusai negali būti priskirti nė vienam iš 7 pasiutligės virusų genotipui. Jie sudaro skirtingus ekologinius-geografinius fenotipus, nors pirmieji trys virusai nestipriai koreliavo su EBL-1, EBL-2 ir DUVV pasiutligės virusų genotipais (Kuzmin et al., 2005). Geografiniu požiūriu tarp EBL-1a ir EBL-1b subtipų (2 pav.; Davis et al., 2005) nustatytas didelis homologiškumo laipsnis (96–

98 proc.) Vokietijos, Danijos ir Olandijos šikšnosparnių pasiutligės virusų izoliatuose tiek N, tiek G virusų genuose. Labiausiai divergentiškai buvo prancūziški (90–88 proc.) ir ispaniški (90–92 proc.) EBL-1 izoliatai (Davis et al., 2005; Muller et al., 2007).

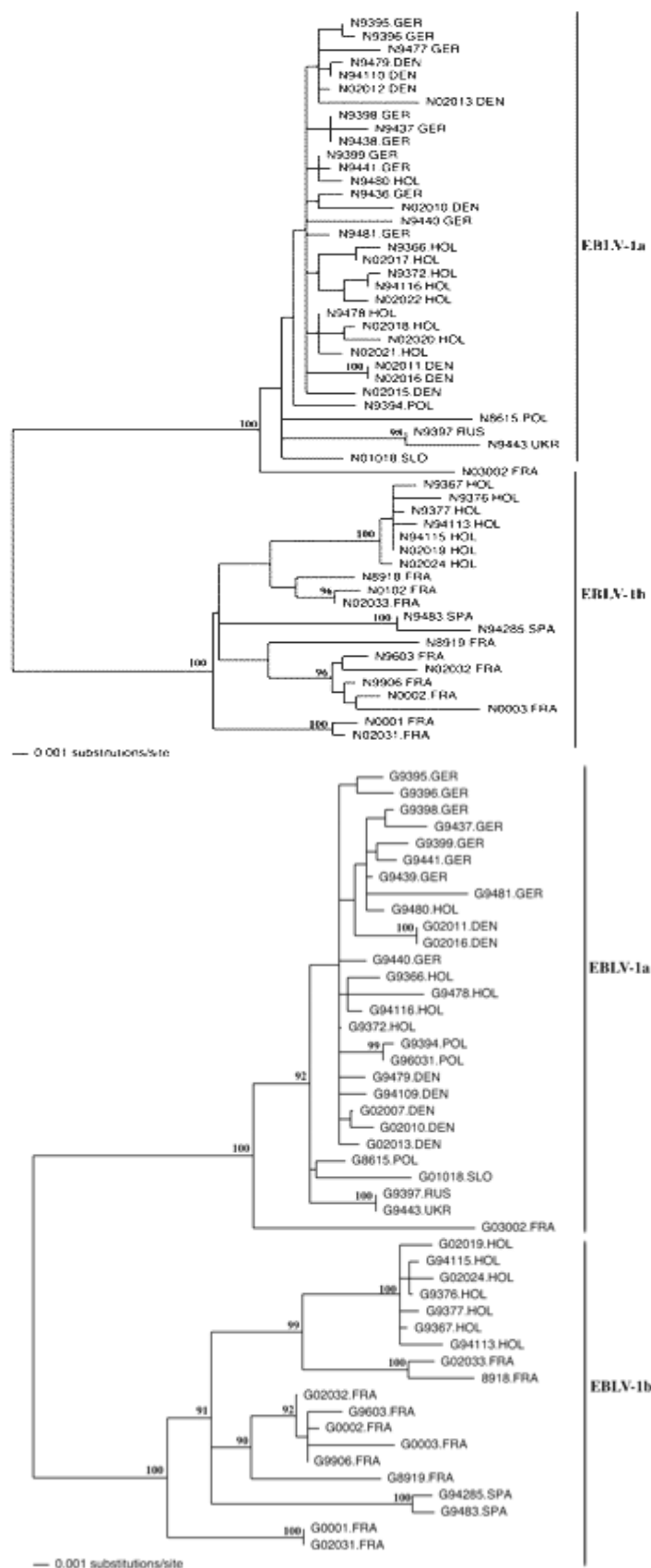
Žmonių užsikrėtimo EBLV rizika. Šiuo metu identifiuoti keturi letaliniai žmonių pasiutligės susirgimai, kurių užsikrėtimo šaltinis buvo EBL virusais infekuoti šikšnosparniai: 1977 metais Ukrainoje ir 1985 metais Rusijoje šikšnosparniai įkando dviem mergaitėms; 1985 metais ir 2002 metais nuo EBL virusų mirė du biologai Suomijoje ir Škotijoje (Lina, Hutson, 2006). Nukentėjusieji nesikreipė į gydymo įstaigas, jiems neatliktas pokontaktinis pasiutligės imunizavimas. Visiems šikšnosparnių apkandžiotiems žmonės turi būti atliekamos pokontaktinės vakcinacijos pagal klasikinę pasiutligės prevencijos schemą – 0, 3, 7, 14, 28 dieną po įkandimo. Kai kurios Europos šalys turi pasiutligės prevencijos programas, kuriose numatomas ne tik pokontaktinis, bet ir prieškontaktinis žmonių imunizavimas 0, 7 ir 21 dieną (WHO, 2004). Tokio tipo vakcinacijos programos turi būti atliekamos rizikos grupėse – biologų, zoologų, rabiologų, speleologų, veterinarijos gydytojų.



1 pav. *Lyssavirus* genties N geno 405 bp RT- PGR produktai (Echevarria et al., 2005) LBV (1-2); MOKV (3-4-5); DUVV (6); EBLV-1 (7-8); EBL-2 (9-10); ABL (11); RABV (12); neigiama kontrolė (13) ir masės žymeklis (14)

Aptarimas ir išvados. Pasiutligės virusai (PV) yra endemiški žinduolių populiacijose visame pasaulyje. Šie zoonozės persistentiniai procesai šikšnosparniuose yra ypač įdomūs. Pasiutligės virusų N ir P genų molekulinė biologija leido identifiuoti EBLV-1 ir EBLV-2 virusų rūšinį ir geografinį kintamumą erdvėje ir laike. EBL virusai turi penkis struktūrinius proteinus: nukleokapsidės proteiną (N), fosfoproteiną (P), matricos (M), glikoproteiną (G), RNR-polimerazę (L) 3'-N-P-M-G-L-5' sekoje. Nukleoproteinas labai konservatyvus, stabilus visuose genotipuose, turi T ir B limfocitų specifinius epitopus ir dalyvauja imuninėse reakcijose. Glikoproteino mutacinis kintamumas pats didžiausias (genotipinis divergentiškumas aminorūgščių lygmenyje siekia 54 proc.), turi domenų atpažįstančius ląstelių receptorių ir virusus neutralizuojančius antikūnus, atsakingas už susiliejimą ir viruso patekimą į ląstelių-taikinį, svarbiausias virusinėje patogenezėje. Šio baltymo filogenetinė analizė – pagrindinė tyrimų grandis EBL virusų evoliucinėje biologijoje (Badrane, Tardo, 2001; Davis et al., 2005). EBL-1 virusų mo-

lekuliniai tyrimai parodė, kad geografiškai Vakarų Europoje EBLV-1a plėtros ašis yra pietų–vakarų kryptimi, o EBLV-1b – rytų–šiaurės kryptimi. Galima versija, kad EBLV virusai evoliuciniu požiūriu konkuruoja tarpusavyje (pvz. EBL-1 ir EBL-2) skirtingų rūšių šikšnosparnių populiacijos viename areale (Davis et al., 2005). Manoma, kad Afrikos–Ispanijos kelias buvo pagrindinis EBLV plintant Europos pietvakarių regionuose veiksnys (Amen-gual et al., 1997). EBLV-1 patogeniškumas yra didesnis nei EBLV-2, tačiau jie gali sukelti kliniškai besimptomę pasiutligę gamtoje, o virusai aktyvuojami tik tam tikrais stresiniais periodais (nėštumas, dauginimosi metas) (Fooks et al., 2003). EBLV persistensijos šikšnosparnių organizme galimybę rodo sunkiai izoliuojami virusai audinių kultūrose, dažnai nustatomi AT-PGR teigiami mėginiai iš šikšnosparnių gerklų bei minkštojo gomurio tepinėlių, tačiau izoliuoti virusus iš smegenų mėginių nepavyksta – išskirti galima tik esant neurologinėi simptomatikai (Echevarria et al., 2001; 2005).



2 pav. EBLV-1a ir EBLV-1b 55 N ir 47 G genų filogenetiniai medžiai (Davis et al., 2005)

EBL virusų evoliucinius procesus apsprendžia pasiutligės virusų RNR mutageninis ir adaptacinis aktyvumas.

RNR virusai niekada nebuvo „genetinės stazės būsenoje“. Tai leido įveikti rūšinius barjerus. Atlikti tyrimai panau-

dojant neutralius statistinius evoliucinius modelius (pvz. Tajimos-Fu-Li), analizuojant taksonominę koreliaciją, šikšnosparnių populiacijos dinamiką ir filogenetinę geografiją, leido įvertinti *carnivora* ir *chiroptera* lyssavirusų nukleotidų sekų polimorfinius saitus. Prognozuojama, kad šikšnosparnių pasiutligės virusai egzistavo daug anksčiau, nei lyssavirusai paplito tarp mėšėdžių (prieš 888–1459 metus). Taigi galima teigti, kad *Lyssavirus* evoliucija vyksta labai lėtai (genetinis dreifas) ir yra mažo polimorfizmo (Badrane, Tardo, 2001). „Molekulinis laikrodis“ rodo, kad EBLV-1 (5 genotipas) galėjo atsirasti prieš 500–750 metų, o EBLV-1a ir EBLV-1b Europoje plito skirtingais keliais. EBLV-1a asocijuotas su *Eptesicus serotinus* (nemigruojantys šikšnosparniai), kurių antropofilinės kolonijos gali kelti pasiutligės pavojų žmonių gyvenamuose regionuose, EBLV-1a per Ispaniją greičiausiai paplito Europoje iš pietinių Afrikos regionų, o EBLV-1b galėjo atsirasti Prancūzijoje ir tik vėliau išplisti Europoje. EBLV-1 virusų mutageninis aktyvumas mažas, konservatyvūs aminorūgščių pasikeitimai eliminuojami iš populiacijos kartu su vienetiniais susirgimais, todėl šio genotipo skirtingų virusų izoliatai filogenetiniame medyje išsidėsto labai arti vienas kito (2 pav.; Davis et al., 2005).

Vabzdžiaėdžiai šikšnosparniai yra šešių iš septynių pasiutligės virusų genotipų vektoriai, todėl daroma prielaida, kad *Lyssavirus* šeima gali būti kilusi iš vabzdžių rhabdovirusų. Daugelis virusų iš *Rhabdoviridae* genties, išskyrus *Novirhabdovirus*, buvo izoliuoti iš vabzdžių, trys neklasifikuoti *Lyssavirus* šeimai priskiriami Kotonkan, Obodhiang ir Rochambeau virusai taip pat išskirti tik iš vabzdžių, be to, *Mokola virus*, izoliuotas iš kirstuko (taip pat vabzdžiaėdžio), gali būti adaptuotas ir dauginasi *Aedes aegypti* moskituose. Manoma, kad pasiutligės virusų „persikėlimas“ iš vabzdžių į šikšnosparnių populiaciją galėjo vykti prieš 7080–11631 metų (Badrane, Tardo, 2001).

Europoje, sėkmingai atlikus oralines lapių vakcinacijas, klasikinė pasiutligė likviduota. Tačiau EBL virusų židiniai „laisvose nuo pasiutligės“ šalyse įgalina kurti nacionalines kontrolės programas, aktyviai tirti šikšnosparnius ir naujai įvertinti žmonių užsikrėtimo pasiutligės virusais grėsmę, nes eliminuoti pasiutligės virusus iš šikšnosparnių populiacijos vakcinuojant artimiausiu metu nepavyks.

Literatūra

1. Anon. Office International des Epizooties (O.I.E). Multiannual animal diseases status. Europe/ Rabies. 2002. P. 1–12.
2. Anon. Office International des Epizooties (O.I.E). Manual of Standards Diagnostic and Vaccines. Rabies. 2004-a. Chap. 2.2.5. P. 2–45.
3. Anon. World Health Organization (WHO). WHO Expert Consultation on Rabies: first report. WHO Tech. Rep. Ser.931. 2004. Geneva, Switzerland. P. 20–30.
4. Anon. Office International des Epizooties (O.I.E). Multiannual animal diseases status. Europe/ Rabies. 2004-b. P. 1–10.
5. Amengual B., Whitby J. E., King A., Serra-Cobo J., Bourhy H. Evolution of European Bat Lyssaviruses. J. Gen. Virol. 1997. N. 78. P. 2319–2328.
6. Arai Y. T., Kuzmin I. V., Kameoka Y., Botvinkin A. D. New Lyssavirus Genotype from the Lesser-eared Bat (*Myotis blythi*), Kyrgyzstan. Emerg. Inf. Dis. 2003. V. 9. N. 3. P. 333–337.
7. Badrane H., Tardo N. Host switching in Lyssavirus history from the Chiroptera to the Carnivora orders. J. Virol. 2001. V. 75. P. 8096–8104.
8. Badrane H., Bahloul C., Perrin P., Tardo N. Evidence of Two *Lyssavirus* Phylogroups with Distinct Pathogenicity and Immunogenicity. J. Clin. Microbiol. 2001. V. 75. N. 7. P. 3268–3276.
9. Baranauskas K., Mickevičienė I., Mickevičius E. Šikšnosparnių įvairovė ir gausumas Vilniaus miesto žiemavietėse. Ekologija. 2005. N. 1. P. 37–42.
10. Bohr L., Christensen L.S., Christiansen A.H. Potential rabies exposure after bat bite, Denmark, June 2006. Eurosurveil. 2006. N. 11(11). 1611103.
11. Botvinkin A. D., Poleschuk E. M., Kuzmin I. V., Borisova T. I., Gazarian S. V., Yager P., Rupprecht C. E. Novel lyssaviruses isolated from bats in Russia. Emerg. Infect. Dis. 2003. N. 9. P. 1623–1625.
12. Bourhy H., Dacheux L., Strady C., Mailles A. Rabies in Europe. Euroraund. Eurosurveill. 2005. N. 10. Is. 10-12. P. 213–216.
13. Calisher C. H., Childs J. E., Field H. E., Holmes K. V., Schounts T. Bats: important reservoir of emergency viruses. Clin. Microbiol. Rev. 2006. N. 19(3). P. 531–545.
14. Chant K., Chan R., Smith M., et al. Probable human infection with a newly described virus in the family *Paramyxoviridae*. Emerg. Infect. Dis. 1998. N. 4. P. 273–275.
15. Cliquet F., Picard-Meyer E. Rabies and rabies –related viruses: a modern perspective on an ancient disease. Rev. Sci. Tech. 2004. N. 23(2). P. 625–642.
16. Davis P. L., Holmes E. C., Alonso W. J., Larrous F., Bourhy H., Van der Poel W. H. M., Tjornehoj K. Phylogeography, population dynamics, and molecular evolution of European bat Lyssaviruses. J. Virol. 2005. Vol. 79. N.16. P. 10487–10497.
17. Echevarria J. E., Avellon A., Juste J., Vera M., Ibanez C. Screening of Active Lyssavirus Infection in Wild Bat Population by Viral RNA Detection on Oropharyngeal Swabs. J. Clin. Microbiol. 2001. V. 39. N. 10. P. 3678–3683.
18. Echevarria J. E., Vazquez S., Ibanez C., Juste J. EBLV1 Circulation in Natural Bat Colonies of *Eptesicus serotinus*: a Six Year Survey. First Inter. Conf. Rab. in EU. Dev. Biol. 2005. V. 125. P. 257–261.
19. Etesami R., Conzelmann K. K., Fadai-Ghotbi B., Natelson B., Tsiang H., Ceccaldi P. E. Spread and pathogenic characteristics of G-deficient rabies virus recombinant: an *in vivo* and *in vitro* study. J. Gen. Virol. 2000. N. 81. P. 2147–2153.
20. Fooks A. R., McIlhinney L. M., Marston D. A., Selden D., Jolliffe T. A., Wakeley P. R., Johnson N., Brookes S. M. Identification of a European bat lyssavirus type 2 in a Daubenton's bat found in Staines, Surrey, UK. Vet. Rec. 2004-a. N. 155(14). P. 434–435.
21. Fooks A. R., Selden D., Brookes S. M., Johnson N., Marston D. A., Jolliffe T. A., Wakeley P. R., McIlhinney L. M. Identification of a European bat lyssavirus type 2 in a Daubenton's bat found in Lancashire. Vet. Rec. 2004-b. N. 155(19). P. 606–607.
22. Fooks A. R. Rabies remains a “neglected disease”. Eurosurveil. 2005. V.10. P. 211–213.
23. Fooks A. R., Brookes S. M., Johnson N., McIlhinney L. M., Hutson A. M. European bat lyssaviruses: an emerging zoonosis. Epidemiol. Infect. 2003. N. 131. P. 1029–1039.
24. Gordon E. R., Curns A. T., Krebs J. W., Rupprecht C. E., Real L. A., Childs J. E. Temporal dynamics of rabies in wildlife host

- and the risk of cross-species transmission. *Epidem. Infect.* 2004. N. 132. P. 515–524.
25. Hanlon C. A., Kuzmin I. V., Blanton J. D., Weldon W. C., Manangan J. S., Rupprecht C. E. Efficacy of rabies biologics against new lyssaviruses from Eurasia. *Virus. Rec.* 2005. N. 111(1). P. 44–45.
 26. Hughes G. J., Kuzmin I. V., Schmitz A., Blanton J., Manangan J., Murphy S., Rupprecht C. E. Experimental infection of big brown bats (*Eptesicus fuscus*) with Eurasian bat lyssaviruses Aravan, Khujand and Irkut virus. *Arch. Virol.* 2006. N. 151(10). P. 2021–2035.
 27. Johnson N., Wakeley P. R., Brookes S. M., Fooks A. R. European bat lyssavirus type 2 RNA in *Myotis daubentonii*. *Emerg. Infect. Dis.* 2006. N. 12(7). P. 1142–1144.
 28. Johnson N., Selden D., Parsons G., Healy D., Brookes S.M., McElhinney L. M., Hutsson A. M., Fooks A. R. Isolation of European bat lyssavirus type 2 from a Daubenton's bat in the United Kingdom. *Vet. Rec.* 2003. N. 152(13). P. 383–387.
 29. Kuzmin I. V., Orciari L. A., Arai Y. T., Smith J. S., Hanlon C. A., Kameoka Y., Rupprecht C. E. Bat lyssaviruses (Aravan and Khujand) from Central Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences. *Virus. Res.* 2003. N. 97. P. 65–79.
 30. Kuzmin I. V., Botvinkin A. D., Poleschuk E. M., Orciari L. A., Rupprecht C. E. Bat Rabies Surveillance in the Former Soviet Union. First Inter. Conf. Rab. in EU. *Dev. Biol.* 2005. V. 125. P. 273–282.
 31. Lina P. H., Hutson A. M. Bat rabies in Europe: a review. *Dev. Biol. (Basel)*. 2006. N. 125. P. 245–254.
 32. Marra M. A., Jones S. J. M., Astell C. R., et al. The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science*. 2003. N. 300. P. 1399–1404.
 33. Muller T., Cox J., Peter W., Schafer R., Johnson N., McElhinney L. M., Geue J. L., Tjornehoj K., Fooks A. R. Spill over of European bat lyssavirus type 1 into stone marten (*Martes foina*) in Germany. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public. Health.* 2004. N. 51(2). P. 49–54.
 34. Muller W. W. Review of reported rabies cases data in Europe to the WHO Collaborative Centre Tubingen from 1977 to 2000. *Rab. Bulletin. Eu.* 2000. N. 24. P. 11–19.
 35. Muller T., Johnson N., Freuling C. M., Fooks A. R., Selhorst T., Vos A. Epidemiology of bat rabies in Germany. *Arch. Virol.* 2007. N. 152(2). P. 273–288.
 36. Muller T., Selhorst T., Burrow J., Schameitat A., Vos A. Cross reactive antigenicity in orally vaccinated foxes and raccoon dogs against European Bat Lyssavirus type 1 and 2. *Dev. Biol. (Basel)*. 2006. N. 125. P. 195–204.
 37. Nieuwenhuijs J., Haagsma J., Lina P. Epidemiology and control of rabies in bats in the Netherlands. *Rev. Sci. Tech.* 1992. N. 11(4). P. 1155–1161.
 38. Nogueira Y. L. Estimate of the validity of a new method for the isolation of rabies virus. *Rev. Saude Publ.* 2004. N. 38(2). P. 315–322.
 39. Ondrejškova A., Franka R., Ondrejška R., Svrček S., Suli J., Benisek Z., Zubrický P., Bajova V., Bugarský A., Bourhy H. Identification of lyssavirus isolate from bat (*Eptesicus serotinus*). *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 2004. N. 48. P. 11–13.
 40. Pauža D. H., Paužienė N. Distribution, status and protection of Lithuanian bats. *Ekologija.* 1996. N. 3. P. 44–65.
 41. Philbey A. W., Kirkland P. D., Ross A. D., et al. An apparently new virus (family paramixoviridae) infectious for pigs, humans and fruit bats. *Emerg. Infect. Dis.* 1998. N. 4. P. 269–271.
 42. Picard-Meyer E., Bruyere V., Barrat J., Tissot E., Barrat M.J., Cliquet F. Development of a heminested RT-PCR method for the specific determination of European Bat *Lyssavirus* 1. Comparison with other rabies diagnostic methods. *Vaccine.* 2004. N. 22. P. 1921–1929.
 43. Picard-Meyer E., J. Barrat V., Bruyere M. J., Cliquet F. Genetic analysis of European bat Lyssa virus type 1 isolates from France. *Vet. Rec.* 2004. N. 157(19). P. 1623–1625.
 44. Pilipski J. D., Pilipski L. M., Riley L. S. West Nile virus antibody in bats from New Jersey and New York. *J. Wildl. Dis.* 2004. N. 2. P. 335–337.
 45. Pourrut X., Kumulungui B., Wittmann T. et al. The natural history of Ebola virus in Africa. *Microb. Infect.* 2005. N. 7. P. 1005–1014.
 46. Ronshold L. A new case of European Bat Lyssavirus (EBL) infection in Danish sheep. *Rab. Bull. Eur.* 2002. N. 5. P. 15.
 47. Selimov M. A., Smekhov A. M., Antonova L. A., Shablovskaya E. A., King A., Kulikova L. G. New strains of rabies-related viruses isolated from bats in the Ukraine. *Acta Virol.* 1991. N. 35(3). P. 226–231.
 48. Schneider L. G. Antigenic variants of rabies virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1982. N. 5. P. 101–107.
 49. Serra-Cobo J., Amengual B., Abellan C., Bourhy H. European bat Lyssavirus infection in Spanish bat population. *Emerg. Infect. Dis.* 2002. V. 8. N. 4. P. 413–420.
 50. Smith D. L., Lucey B., Waller L. A., Childs J. E., Real L. Predicting the spatial dynamics of rabies epidemics on heterogeneous landscapes. *PNAS.* 2002. V. 99. N. 6. P. 3668–3672.
 51. Smith A., Morris J., Crowcroft N. Bat rabies in the United Kingdom. *BMJ.* 2005. N. 330. P. 491–492.
 52. Stanic-Pavlinic G. Public health concerns in bat rabies across Europe. *Eurosurveill.* 2005. N. 10. Is. 10-12. P. 217–220.
 53. Tjornehoj K., Fooks A.R., Agerholm J. S. et al. Natural and experimental infection of sheep with European bat lyssavirus type-1 of Danish origin. *J. Comp. Pathol.* 2006. N. 134. P. 190–201.
 54. Van der Poel W. H., Lina P. H., Kramps J. A. Public health awareness of emerging zoonotic viruses of bats: a European perspective. *Vector Borne Dis.* 2006. N. 6(4). P. 315–324.
 55. Van der Poel W. H., Van der Heide R., Verstraten E. R., Takumi K., Lina P. H., Kramps J. A. European bat lyssaviruses, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 2005. N. 11(12). P. 1854–1859.
 56. Vazquez-Moron S., Avellon A., Echevarria J. E. RT-PCR for detection of all seven genotypes of Lyssavirus genus. *J. Virol. Methods.* 2006. N. 135(2).
 57. Vos A., Muller T., Neubert L., Zubriggen A., Botteron C., Pohle D., Schoon H., Haas L., Jackson A. C. Rabies in red foxes (*Vulpes vulpes*) experimentally infected with European bat lyssavirus type 1. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.* 2004. N. 51(7). P. 327–332.
 58. Wakeley P. R., Johnson N., McElhinney L. M., Marton D., Sawyer J., Fooks A. R. Development of Real-Time, TaqMan Reverse Transcription-PCR Assay for Detection and Differentiation of Lyssavirus Genotypes 1, 5, and 6. *J. Clin. Microbiol.* 2005. V. 43. N. 6. P. 2786–2792.
 59. Welis S. C., Scott C. A., Ward C. A., Jackson A. C. Rabies virus infection of primary neuronal cultures and adult mice: failure to demonstrate evidence of excitotoxicity. *J. Virol.* 2006. Oct. P. 10270–10273.
 60. Wellenberg G. J., Audry L., Ronshold L., et al. Presence of European bat lyssavirus in apparently healthy *Rousettus aegyptiacus* bats. *Arch. Virol.* 2002. N. 147. P. 349–361.

61. Whitby J. E., Johnstone P., Parsons G., King A.A., Hutson A. M. Ten-years survey of British bats for the existence of rabies. *Vet. Rec.* 1996. N. 139 (20). P. 491–493.
62. Wong K. T., Shieh W. J., Kumar S. et al. Nipah virus infection: pathology and pathogenesis of an emerging paramyxoviral zoonosis. *Am. J. Path.* 2002. N. 161. P. 2153–2167.

Gauta 2007 04 23