

VALSTYBINIS MOKSLINIŲ TYRIMŲ INSTITUTAS  
INOVATYVIOS MEDICINOS CENTRAS

INGRIDA JACEVIČIENĖ

LAUKINIŲ IR NAMINIŲ GYVŪNŲ PASIUTLIGĖS EPIDEMIOLOGIJA,  
DIAGNOSTIKA IR IMUNOPROFILAKTIKA LIETUVOJE

Daktaro disertacija  
Biomedicinos mokslai, biologija (01B),  
Imunologija, serologija, transplantacija (B 500)

Vilnius, 2012

Disertacija rengta 2008-2012 m. Vilniaus universiteto Imunologijos institute (nuo 2010 metų Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Inovatyvios medicinos centras) ir Nacionaliniame maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institute (NMVRVI).

Mokslinis vadovas:

Prof. habil. dr. Vytas Antanas Tamošiūnas (Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Inovatyvios medicinos centras, biomedicinos mokslai, biologija – 01B, imunologija, serologija, transplantacija – B500).

## Turinys

<b>SANTRUMPOS</b> .....	6
<b>1. ĮVADAS</b> .....	8
<b>DARBO TIKSLAS</b> .....	10
<b>DARBO UŽDAVINIAI</b> .....	10
<b>MOKSLINIS DARBO NAUJUMAS IR PRAKTINĖ REIKŠMĖ</b> .....	11
<b>GINAMIEJI TEIGINIAI</b> .....	12
<b>2. LITERATŪROS APŽVALGA</b> .....	13
2.1. Trumpa pasiutligės istorija .....	13
2.2. Pasiutligės epidemiologija.....	14
2.2.1. Pasiutligės paplitimas pasaulyje .....	14
2.2.2. Pasiutligės paplitimas Europoje.....	15
2.3. Pasiutligės virusų charakteristika .....	18
2.3.1. Klasifikacija .....	18
2.3.2. Pasiutligės viruso viriono struktūra ir cheminė sudėtis .....	19
2.3.3. Pasiutligės viruso reprodukcija.....	24
2.4. Pasiutligės patogenezė, klinikiniai ir pataloginiai požymiai.....	26
2.4.1. Patogenezė .....	26
2.4.2. Klinikiniai simptomai.....	30
2.4.3. Patologija.....	33
2.5. Pasiutligės imunologiniai, molekulinės biologijos ir virusologiniai tyrimo metodai .....	33
2.5.1. Histologiniai pasiutligės viruso diagnostikos metodai.....	34
2.5.2. Imunologiniai tyrimo metodai .....	34
2.5.3. Molekuliniai tyrimo metodai .....	38
2.5.4. Pasiutligės viruso identifikavimas.....	39
2.6. Imunoprofilaktikos priemonės nuo pasiutligės .....	41
<b>3. TYRIMO METODAI</b> .....	50
3.1. Tyrimų objektas ir schema.....	50
3.2. Tiriamųjų mėginių surinkimas.....	54

3.3. Imunologiniai, virusologiniai ir molekuliniai tyrimai.....	55
3.3.1 Pasiutligės viruso antigeno nustatymas imunofluorescencijos metodu.....	55
3.3.2. Ląstelių kultūrų infekavimas pasiutligės virusu ir jo identifikavimas tiesioginės imunofluorescencijos metodu .....	56
3.3.3. Imunofermentinės analizės metodas .....	61
3.3.4. Pasiutligės virusų neutralizacijos fluorescuojančiais antikūnais metodas .....	62
3.3.5. Pasiutligės virusų neutralizacijos reakcijos vertinimas.....	64
3.3.6. Palyginamasis diagnostinių imunofermentinės analizės ir viruso neutralizacijos fluorescuojančiais antikūnais metodų vertinimas .....	65
3.3.7. Pasiutligės viruso nustatymas atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandininės reakcijos metodu .....	66
3.4. Statistinė duomenų analizė.....	67
<b>4. TYRIMŲ DUOMENYS .....</b>	<b>68</b>
4.1. Laukinių ir naminių gyvūnų pasiutligės paplitimo Lietuvoje analizė ..	68
4.2. Pasiutligės paplitimo geografiniai ypatumai .....	73
4.3. Pasiutligės paplitimas usūrinių šunų populiacijoje .....	75
4.4. Pasiutligės paplitimas rudųjų lapių populiacijoje .....	76
4.5. Pasiutligės viruso antigeno nustatymas fluorescuojančiais antikūnais ir viruso identifikavimo ląstelių kultūrose metodų palyginamasis įvertinimas .....	77
4.6. Pasiutligės serologinių tyrimo metodų palyginamasis įvertinimas ....	80
4.7. Usūrinių šunų ir rudųjų lapių oralinės vakcinacijos nuo pasiutligės efektyvumo įvertinimas.....	81
4.8. Pasiutligės viruso filogenetinė analizė .....	85
4.9. Žmonių, laukinių ir naminių gyvūnų imunoprofilaktikos priemonės nuo pasiutligės Lietuvoje .....	87
<b>5. TYRIMŲ DUOMENŲ APIBENDRINIMAS.....</b>	<b>94</b>
<b>6. IŠVADOS.....</b>	<b>105</b>
<b>7. PASKELBTŲ PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS .....</b>	<b>107</b>
<b>8. PRANEŠIMAI KONFERENCIJOSE.....</b>	<b>108</b>

<b>9. LITERATŪROS SARAŠAS.....</b>	<b>109</b>
<b>PADĒKA.....</b>	<b>134</b>

## SANTRUMPOS

Ag – antigenas;

Ak – antikūnai;

AKID – (angl. *tissue culture infectious dose*) – audinių kultūrų infekcinė dozė;

ANSES – (pranc. *Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail*) – Nacionalinė maisto, aplinkos ir profesinės sveikatos ir saugos agentūra;

AT – atvirkštinė transkriptazė;

AT-PGR – atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandininė reakcija;

BHK – (angl. *Baby Hamster Kidney cell culture*) – žiurkėno jauniklio inksto ląstelių linija;

bp– bazių poros;

CNS – centrinė nervų sistema;

CPE – (angl. *cytopathogenic effect*) – citopatogeninis efektas;

CVS-11 – (angl. *Challenge/control virus strain*) – laboratorinė pasiutligės viruso padermė;

DMEM – (angl. *Dulbecco's modified Eagles medium*) – ląstelių mitybinė terpė;

EK – Europos Komisija;

ERA – (angl. *Evelyn Rokitnicki Abelseth strain*) –pasiutligės viruso padermė;

ES – Europos Sąjunga;

FAVN – (angl. *Fluorescent Antibody virus neutralisation test*) viruso neutralizacijos fluorescuojančiais antikūnais testas;

FAT – (angl. *Fluorescent Antibody test*) fluorescuojančių antikūnų testas;

FITC – fluoresceino izotiocionatas;

FVS – fetalinis veršelio serumas;

ICTV – (angl. *International Committee on Taxonomy of Viruses*) – Tarptautinis virusų taksonomijos komitetas;

IFA – imunofermentinė analizė;

LR – Lietuvos Respublika;

Mabs – (angl. *Monoclonal antibodies*) – monokloniniai antikūnai;  
MIT – (angl. *Mouse Inoculation test*) – pelių infekavimo tyrimas;  
MNA - (angl. *murine neuroblastoma*) – Pelių neuroblastoma;  
N2a CCL-131 – (angl. *murine neuroblastoma cell culture*) – pelių neuroblastomos ląstelių linija;  
NEE – (angl. *North East Europe*) – Šiaurės Rytų Europos;  
NMVRVI – Nacionalinis maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institutas;  
ORV – oralinė vakcinacija nuo pasiutligės viruso;  
OT – optinis tankis;  
PBS – (angl. *Phosphate buffered saline*) – fosfatinis buferinis tirpalas;  
PGR – polimerazės grandininė reakcija;  
PGSO – Pasaulinė gyvūnų sveikatos organizacija;  
PSO – pasaulinė sveikatos organizacija;  
RBE – (angl. *Rabies Bulletin Europe*) – pasiutligės Europos biuletenis;  
RNR – ribonukleorūgštis;  
RVI – pasiutligės viruso išskyrimas;  
RV – (angl. *Rabies virus*) – pasiutligės virusas;  
RTCIT – (angl. *Rabies Tissue Culture Infection Test*) – audinių kultūrų infekavimo pasiutligės virusu metodas;  
SAD – (angl. *Street Alabama Dufferin*) – viruso vakcininė padermė;  
SAG – (angl. *Street Alabama Gif*) – viruso vakcininė padermė;  
TMB – (angl. *3,3',5,5' tetramethylbenzidine*) – 3-, 3-, 5-, 5 tetrametilbenzidinas;  
VMVT – Valstybinė maisto ir veterinarijos tarnyba;  
VN – virusų neutralizacija;  
V- RG – (angl. *Vaccinia-Rabies Glycoprotein*) – raupų viruso vakcininė padermė – pasiutligės glikoproteinas

## 1. ĮVADAS

Pasiutligė yra virusinė liga – viena iš seniausių ir pavojingiausių žmonių ir gyvūnų ligų. Tai liga, kuri yra perduodama tiesiogiai nuo gyvūno gyvūniui, ir nuo gyvūno žmogui. Žmonių pasiutligė yra fatališkiausia iš kada nors girdėtų ligų (Rupprecht, 2004). Ligą sukelia neurotropinis virusas, priklausantis *Lyssavirus* genties *Rhabdoviridae* šeimai. Tai RNR turintis virusas, kurio daugiausia randama sergančių žmonių, naminių ir laukinių gyvūnų galvos smegenyse, daug - stuburo smegenyse, seilių liaukose, seilėse. Šia liga užsikrečiama kai pasiutęs gyvūnas įkanda žmogui ar kitam gyvūnui, ar apseilėja sužalotą odą. Žmonės dažniausiai užsikrečia nuo valkataujančių naminių gyvūnų, todėl išlieka visiems reali užsikrėtimo pasiutligės virusu (RV) grėsmė. Nepaisant esamų pasiutligės prevencijos priemonių, žmonės turėtų vengti kontaktų su nežinomais ir keisto elgesio gyvūnais, o įvykusį sąlytį įvertinti kaip pavojų gyvybei. Ankstyvieji pasiutligės požymiai žmonėms yra nespecifiniai: karščiavimas, drebulys, galvos skausmas, bendri negalavimai (OIE, 2008; Tortora et al., 2010). Kai liga ima progresuoti, atsiranda neurologiniai simptomai: nerimas, baimė, nemiga, sumišimas, dalinis paralyžius, haliucinacijos, seilėtekis, pasunkėjęs rijimas, agresija. Mirtis paprastai įvyksta po kelių dienų nuo simptomų atsiradimo (Dietzschold et al., 1987; Fooks et al., 2009).

Pirmieji pasiutligės laboratoriniai tyrimai buvo atlikti XIX amžiuje. Nuo tada buvo imtasi žmonių apsaugojimo priemonių, pradedama gyvūnų pasiutligės kontrolė ir studijuojama šios ligos epidemiologija, patogenezė ir imuninis atsakas. Daugumoje ekonomiškai išsivysčiusių šalių pasiutligės diagnostikos sistema yra labai gerai organizuota, kuri veikia greitai ir efektyviai. Yra sukurtos labai efektyvios žmonių apsaugos priemonės, technologiškai išvystytos šios ligos kontrolės ir likvidavimo priemonių sistemos. Tačiau nepaisant to, pasiutligė vis dar sukelia labai didelius ekonominius nuostolius, o žmonių mirtys ypač dažnai pasitaiko Afrikos,



Azijos ir Pietų Amerikos regionuose (Bourhy et al., 1992, Schneider et al., 1994).

Plėšrieji žinduoliai (lapės, usūriniai šunys, šikšnosparniai, vilkai ir kt.) yra pagrindinis pasiutligės užsikrėtimo šaltinis laukinėje faunoje. Daugiausia (85 proc.) teigiamų pasiutligės atvejų sudaro rudosios lapės (*Vulpes vulpes*), kurios yra vienos iš pagrindinių pasiutligės viruso platintojų (Aubert et al., 1995). Antrasis pagal dydį pasiutligės šaltinis Europoje yra usūriniai šunys (*Nyctereutes procyonoides*). Šių gyvūnų prisitaikymo sugebėjimai naujose aplinkos sąlygose yra geresni nei lapių (WHO, 2010).

Lietuvoje 1919–1921 metais pasiutligė nebuvo diagnozuota, tačiau ši informacija abejotina, kadangi netrukus, 1922 metais, nustatyti 222 gyvūnai, užsikrėtę šia liga. 1923 metais didžiausi pasiutligės protrūkiai buvo aprašyti Kėdainių, Raseinių, Kauno ir Panevėžio apskrityse (Svičiulis ir kt., 1989). 1924–1927 metais buvo registruotas 261 infekuotas gyvūnas, 1928–1931 metais – 288. 1940–1950 metais daugiausia pasiutlige buvo infekuoti katės ir šunys, 1960–1969 metais nustatyti 1094 gyvūnų pasiutligės atvejai. Dažniau buvo infekuoti naminiai gyvūnai (68%) negu laukiniai gyvūnai (32%). 1970–1979 metais nustatyti 1333 pasiutligės atvejai, naminių ir laukinių gyvūnų infekuotumas buvo beveik vienodas. 1980–1989 metais aprašytas 1251 pasiutligės atvejis (Svičiulis ir kt., 1989). 1994–2003 metais pasiutligė buvo registruojama visoje Lietuvoje (Milius ir kt., 2004). Dažniausiai pasiutlige infekuoti laukiniai ir naminiai gyvūnai, tačiau pasitaiko ir žmonių susirgimų, ypač Baltarusijoje, Rusijoje, Ukrainoje, kur pasiutligės virusu infekuota daug naminių gyvūnų (RBE, 2011).

Vienintelis ir efektyviausias apsisaugojimo būdas nuo pasiutligės, apkančiojus sergančiam ar nežinomam gyvūnui, yra imunoprofilaktika. Kuo greičiau bus pradėta vakcinacija, tuo greičiau pasiekiamas aukštesnis imuniteto lygis (Toovey et al., 2007). Žmogus kontaktavęs su nežinomu naminiu ar laukiniu gyvūnu turi kuo skubiau pasiskiepyti nuo pasiutligės ir paskirto vakcinacijos kurso nenutraukti. Siekiant išvengti pasiutligės plitimo naminių gyvūnų populiacijoje, jie turi būti kasmet profilaktiškai vakcinuojami

nuo pasiutligės. Jau 1897 metais gydytojo V. Orlovskio iniciatyva Vilniuje buvo įkurta pirmoji ir viena iš seniausių Pastero stočių (Svičiulis ir kt., 1989). Joje buvo gaminamos vakcinos, skiepijama nuo pasiutligės, atliekami moksliniai tyrimai. Pagrindinė priemonė siekiant likviduoti pasiutligės paplitimą mėsėdžių laukinių gyvūnų populiacijoje yra oralinė vakcinacija (ORV) (Cliquet et al., 2010). Lietuvoje pirmoji laukinių gyvūnų ORV buvo pradėta 1995–2000 metais. Lapių oralinės vakcinacijos poveikis įvertintas pagal diagnostinius tyrimus, nustatant sumedžiotų lapių žandikauliuose įsijungusį žymeklį – tetracikliną (Milius ir kt., 2004). Tačiau laukinių gyvūnų ORV efektyvumo tyrimai iš kraujo nustatant imuninį atsaką (RV specifinius antikūnus kraujo seume) Lietuvoje 1995-2000 metais nebuvo atliekami. 2001–2005 metais oralinė lapių vakcinacija prieš pasiutligę nebuvo atlikta. Nuo 2006 metų Lietuvoje vėl buvo pradėta laukinių gyvūnų ORV naudojant nusilpnintą SAD Berne vakciną (Bioveta, Čekijos Respublika), o nuo 2011 metų nusilpnintą SAD B19 vakciną (Fuchsoral, Vokietija).

Šiuo metu pasiutligė vis dar yra nustatoma tiek Lietuvos tiek ir kitose šalyse (Rusija, Lenkija, Baltarusija ir Latvija). Pasiutligės epidemiologinės situacijos ir vakcinacijos efektyvumo tyrimai mūsų šalyje padės išaiškinti ligos plitimo tendencijas ir sumažins pavojų žmonėms užsikrėsti pasiutlige. Tuo tikslu naudojami įvairūs pasiutligės imunologiniai tyrimo metodai, o jos likvidavimui – efektyvios imunoprofilaktikos priemonės – vakcinos.

## **DARBO TIKSLAS**

Išaiškinti laukinių ir naminių gyvūnų pasiutligės epidemiologinę situaciją Lietuvoje, atlikti pasiutligės diagnostikos bei imunoprofilaktikos efektyvumo tyrimus.

## **DARBO UŽDAVINIAI**

1. Įvertinti laukinių ir naminių gyvūnų pasiutligės viruso epidemiologinius ypatumus Lietuvoje 2003–2011 metais.

2. Nustatyti pasiutligės paplitimo geografinius ypatumus Lietuvoje 2007–2011 metais.
3. Atlikti pasiutligės diagnostikos (fluorescuojančių antikūnų (FAT) ir audinių kultūrų infekavimo pasiutligės virusu (RTCIT) metodais) ir imunoprofilaktikos efektyvumo (imunofermentinės analizės (IFA) ir RV neutralizacijos fluorescuojančiais antikūnais (FAVN) metodais) tyrimus laukinių ir naminių gyvūnų mėginiuose bei palyginti ir įvertinti naudojamus metodus.
4. Atlikti laukinių ir naminių gyvūnų pasiutligės virusų filogenetinę analizę nukleoproteino (N) geno regione ir nustatyti, kokio geografinio tipo RV cirkuliuoja.
5. Apžvelgti ir įvertinti Lietuvoje taikomas pasiutligės prevencijos priemones žmonėms, laukiniams ir naminiams gyvūnams.

### **MOKSLINIS DARBO NAUJUMAS IR PRAKTINĖ REIKŠMĖ**

Nustatyta, kad 2003–2011 metais laukinių gyvūnų tarpe Lietuvoje usūriniai šunys (*Nyctereutes procyonoides*) ir rudosios lapės (*Vulpes vulpes*) yra pagrindiniai laukinės faunos pasiutligės viruso nešiotojai gamtoje. Nustatyta, pasiutligės geografinio vaizdo apibrėžta riba yra ties Nemuno upe, skirianti Lietuvos Pietinę dalį – Lenkijos pasienyje ir kiek mažesniu mastu ties Neris ir Šventosios upėmis, skirianti Lietuvos Rytinę dalį – Latvijos pasienyje.

Naudoti pasiutligės diagnostikos metodai pasižymi speciškumu ir jautrumu. Įrodyta, kad kartu taikant tiesioginį FAT ir RTCIT metodus, galima užtikrinti greitą ir efektyvų RV nustatymą laukinių ir naminių gyvūnų tiriamuosiuose mėginiuose, tuo užtikrinant diagnozės patvirtinimą dėl užsikrėtimo RV. ORV periodu 2007-2011 metais pirmą kartą atlikta naminių ir laukinių gyvūnų RV izoliatų filogenetinę analizę N geno srityje atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandininės reakcijos (AT-PGR) metodu. Laukinių

ir naminių gyvūnų populiacijoje paplitusio RV N geno filogenetinė analizė parodė, kad lietuviškos padermės patenka į Šiaurės Rytų Europos pogrupį.

Pirmą kartą 2006-2011 m. atliktas usūrinių šunų ir rudųjų lapių ORV efektyvumo vertinimas kiekybiniu IFA tyrimo metodu, nustatant specifinius vakcininiam pasiutligės virusui antikūnus kraujo mėginiuose. Nustatytas metodo jautrumas ir specifiškumas parodė, kad IFA metodas yra tinkamiausias ORV efektyvumui įvertinti, nes šiuo metodu galima nustatyti vidutinius ir žemus titrus net ir labai užterštuose mėginiuose. Šį tyrimo metodą rekomenduojame naudoti laukinės faunos ORV efektyvumo įvertinimui. Nustatyta, kad Lietuvoje naudojamos vakcinos nuo pasiutligės – efektyvi ir saugi imunoprofilaktikos priemonė, stabdanti pasiutligės plitimą. Atlikti vakcininiam pasiutligės virusui specifinių antikūnų dinamikos tyrimai parodė, kad naudojant SAD Berne vakciną laukinių gyvūnų ORV efektyvumo procentas yra aukštesnis, nei naudojant SAD B19.

#### **GINAMIEJI TEIGINIAI**

- Lietuvoje laukinių ir naminių gyvūnų populiacijose nuo 2003 iki 2006 metų pasiutligės teigiamų atvejų daugėjo dėl netaikomų laukiniams gyvūnams imunoprofilaktikos priemonių. 2006–2011 metų laikotarpyje laukiniams gyvūnams (rudosioms lapėms ir usūriniams šunims) taikytos imunoprofilaktikos priemonės nuo pasiutligės efektyviai stabilizavo pasiutligės plitimą.
- Naudoti pasiutligės diagnostikos metodai yra specifiški ir patikimi.
- Naudotos imunoprofilaktikos priemonės pasižymi efektyviu poveikiu.

## 2. LITERATŪROS APŽVALGA

### 2.1. Trumpa pasiutligės istorija

Pasiutligė – ūminė virusinė šiltakraujų gyvūnų liga, pažeidžianti centrinę nervų sistemą. Ligą sukelia neurotropinis virusas, priklausantis *Lyssavirus* genties *Rhabdoviridae* šeimai (Bourhy et al., 1993). Tai RNR turintis virusas, kurio daugiausia randama sergančių gyvulių galvos smegenyse, daug - stuburo smegenyse, seilių liaukose, seilėse. Šia liga užsikrečiama kai pasiutęs gyvūnas įkanda kitam gyvūnui ar žmogui, ar apseilėja sužalotą odą. Žmonės dažniausiai užsikrečia nuo valkataujančių naminių gyvūnų, todėl išlieka reali užsikrėtimo pasiutligės virusu grėsmė. Pasiutligė jau buvo žinoma daugiau kaip prieš 2000 metų ir pirmą kartą rašytiniuose šaltiniuose paminėta Mesopotamijoje XXIII amžiuje pr. Kr. (Adamson, 1977, Blancou, 2004). Pasiutligė yra paplitusi beveik visuose pasaulio žemynuose - Azijoje, Afrikoje, Europoje ir Amerikoje, išskyrus Antarktidą, tačiau yra šalių ir salų kuriose nėra pasiutligės - Japonija, Naujoji Zelandija, Graikija, Portugalija, Čilė (Dacheux et al., 2008). Kasmet nuo šios ligos miršta apie 55 000 pasaulio gyventojų (Hemachudha, 1997; Hemachudha et al., 2002). Žmonėms pasiutligės klinikiniai simptomai po įkandimo dažniausiai pasirodo 30-50 dieną (Tortora et al., 2010). Pasireiškus pasiutligės simptomams žmogus ar gyvūnas paprastai miršta.

Apie šunų pasiutligę savo veikaluose jau rašė Demokritas, Aristotelis ir Plutarchas, nurodydami, kad šuns savininkas, jei tam pasireiškė pasiutligės simptomai, turi imtis apsisaugojimo priemonių nuo įkandimų. Senovės graikai manė, kad pasiutligę sukelia po liežuvio esančios kirmėlaitės, todėl ligą vadino „*Lyssa*“ (Adamson, 1977). Šią ligą pirmame mūsų eros amžiuje aprašė Kornelijus Celcijus, kuris pastebėjo, kad šia liga sergantys ligoniai bijo vandens ir pavadino pasiutligę *hydrophobia*, todėl pasiutligė dar vadinama hidrofobija (vandens baime) (Adamson, 1977). Žodis „*rabies*“ kilęs nuo žodžio „*rabhas*“, kuris sanskrito kalboje reiškia „smurtauti“

(Wunner, 2007). Graikiško žodžio šaknis „lyssa“ yra naudojama pasiutligės *Lyssavirus* genties pavadinimui (Tortora et al., 2010). *Lyssavirus* gentį sudaro skirtingų virusų rūšys, prie kurių nurodomas ir genotipas (Bourhy et al, 1993; ICTV, 2011).

1770 metais Van Svitenas pirmasis aprašė žmogaus pasiutligės paralyžiaus formą. XIX amžiuje buvo pradėta atlikti pasiutligės laboratorinė diagnostika, imtasi žmonių apsaugojimo priemonių, pradedama gyvulių pasiutligės kontrolė ir studijuojama šios ligos epidemiologija, patogenezė ir imuninis atsakas (Tortora et al., 2010).

Didžiausi nuopelnai tiriant pasiutligę ir atrandant aktyvios imunizacijos nuo pasiutligės priemones – priskirti L. Pasterui. XIX amžiuje jis įrodė, kad pasiutligės sukėlėjas yra virusas, randamas sergančio gyvūno seilėse, liaukose ir audiniuose, bet dažniausiai – galvos ir stuburo smegenyse. L. Pasteras savo eksperimentais nustatė pasiutligės viruso natūralią „lauko“ padermę (pranc. *Virus de rues*) ir pirmą kartą dirbtinai išskyrė fiksuotą (pranc. *Virus fixe*) pasiutligės virusą ir užkrėtęs juo triušį, iš jo smegenų pagamino skiepus, kuriuos panaudojo žmonėms imunizuoti (Sureau et al., 1983). Pirmasis nuo pasiutligės paskiepytas žmogus buvo berniukas Joseph Meister, 1885 metų liepos mėn. 6 d. įkastas pasiutusio šuns, jis išgyveno ir L. Pastero gydymas paplito po visą pasaulį (King et al., 2004). Fiksuotas virusas - išvestas iš natūralaus „lauko“ viruso 1885 metais, todėl gautas pasiutligės viruso biotipas yra tinkamas pasiutligės vakcinoms gamybai (Sureau et al., 1983). Natūralus „lauko“ virusas cirkuliuoja tarp laukinių ir naminių gyvūnų ir pasižymi ilgu, bet nevienodos trukmės inkubaciniu periodu. Po kontakto su sergančiu laukiniu ar naminiu gyvūnu žmonės ir gyvūnai gali užsikrėsti ir susirgti pasiutlige. Kritusių nuo pasiutligės gyvūnų pailgosiose smegenyse, Amonio rage ir kitose smegenų dalyse randama Babešo-Negrinio kūnelių (Sureau et al., 1983).

## **2.2. Pasiutligės epidemiologija**

### **2.2.1. Pasiutligės paplitimas pasaulyje**

Pasiutligė yra plačiai paplitusi visame pasaulyje, daugiau kaip 55 000 žmonių mirčių atvejų kasmet yra nustatoma bendrai visuose žemynuose, išskyrus Antarktidą (Cleaveland et al., 2003; Kobel et al., 2005). Visi žinduoliai yra labai imlūs pasiutligės virusui, tačiau pagrindiniai ligos platintojai yra *Carnivora* ir *Chiroptera* rūšys (t. y. šunys, lapės, šakalai, kojotai, usūriniai šunys, skunkai, meškėnai, mangustai) (Bourhy et al., 1993; WHO, 2004; Rupprecht, 2008). Pasaulyje daugiau nei 98% žmonių mirčių atvejų buvo nustatyti dėl pasiutlige infekuotų šunų ikandimų (Rupprecht, 2004; WHO 2004; Knobel et al., 2005).

Skirtinguose pasaulio žemynuose ir šalyse pasiutligės virusą gali platinti ir infekuoti įvairios gyvūnų rūšys. *Canidea* šeimos atstovai yra pagrindiniai pasiutligės viruso šeimininkai Afrikoje, nes daugeliu atvejų jie virusu užkrečia ir žmones (Fevre et al., 2005). Be to, Afrikoje *Canidea* šeimos atstovai (naminiai ir laukiniai šunys, šakalai ir vilkai), mangustai ir šikšnosparniai sukelia pasiutligės epidemijas (Adeiga et al., 1996; Bingham, 2005). Tailande šunys taip pat yra pagrindinis pasiutligės rezervuaras (Tepsumethanon et al., 2005). Pasiutligės epidemijas JAV sukelia keletas gyvūnų rūšių, bet pagrindinis rezervuaras išlieka meškėnai ir skunkai (Krebs et al., 2003). Po 1970 metų JAV pradėjo plisti laukinių gyvūnų pasiutligė, kurią sukėlė meškėnų pasiutligės epizootija (Childs et al., 2000). Pasiutligė graužikų ir kiškinių šeimų atstovų tarpe yra nustatoma rečiausiai, o dažniausiai - Šiaurės Amerikos švilpikams (Childs et al., 1997) bei poliarinėms lapėms (Ballard et al., 2001). Šikšnosparniai, sergantys pasiutlige, taip pat gali užkrėsti ir žmones (Miah, 2005).

### 2.2.2. Pasiutligės paplitimas Europoje

Europoje rudosios lapės (*Vulpes vulpes*) yra pagrindinis klasikinės pasiutligės vektorius ir rezervuaras (Artois, 1992; Kihm et al., 1992; Gyls et al., 1998). Tačiau Rytų ir Šiaurės Europoje pasiutligės perdavimo veiksniai keičiasi – šiuose regionuose usūriniai šunys (*Nyctereutes procyonoides*) ir

arktinės lapės (*Alopex vulpes*) ima vyrauti infekcijos grandinėje (Wandeler, 2008).

Apie 1939 metus nuo Lenkijos į vakarus 1400 km paplito lapių pasiutligė, per metus paplisdama nuo 20 iki 60 km, taip infekcija paplito keliose Europos šalyse. 1982 metais tolimiausia vakaruose pasiutligės paplitimo vieta buvo nustatyta Prancūzijoje (EU Commission, 2002). Aštuoniasdešimt tris procentus teigiamų pasiutligės atvejų sudarė rudosios lapės (*Vulpes vulpes*) (Aubert, 1995), kurios buvo pagrindinės pasiutligės viruso platintojos.

Antrasis pasiutligės šaltinis yra usūriniai šunys (*Nyctereutes procyonoides*). Šių gyvūnų prisitaikymo sugebėjimai naujose aplinkos sąlygose geresni nei lapių. 1929-1950 metais formuojantis Sovietų Sąjungai, Sibire, Mažonoje Azijoje (Kazachstane, Kirgistane) ir Kaukaze gyvenantys usūriniai šunys dėl kailio vertės buvo pervežti į Europinę Sovietų Sąjungos dalį (Kauhala, 1996). Pirmieji gyvūnai buvo pradėti platinti iš Amūro ir Usūrijos regiono (Kauhala, 1996), t. y. vėliau usūriniai šunys buvo gaudomi populiacijos vietose ir vežami į naujus plotus. *Nyctereutes procyonoides* labai gerai adaptavosi Rytų Europoje ir greitai paplito į vakarus ir rytus. Pirmiausiai usūriniai šunys paplito Suomijoje 1935 metais, 1945-1946 metais pasiekė Švediją, 1952 metais Rumuniją, 1955 metais Lenkiją, 1959 metais Slovakiją, o 1961-1962 metais Vokietiją ir Vengriją, 1983 metais Norvegiją (Kauhala, 1996). 1950 metais usūriniai šunys buvo atvežti į Estiją ir labai greitai paplito Latvijoje, Lietuvoje (Baltrunaite et al., 2002). Azijos usūrinių šunų (*Nyctereutes procyonoides*) rūšis atkeliavusi apie 1920 metus į vakarų Rusiją, vėliau išplatino pasiutligės virusą Centrinėje Europoje ir Suomijoje (10,5 % atvejų) (Finnegan et al., 2002). Usūriniai šunys Rytų Europoje gali sudaryti atskirą nepriklausomą pasiutligės viruso infekcinį ciklą (Potsch et al., 2006), bet šiuos teiginius patvirtinančių tyrimų nepakanka.

Pagal 2005-2011 metų pasiutligės paplitimo duomenis 13-oje Europos šalių pasiutligės atvejų nenustatyta (Belgija, Čekijos Respublika, Kipras, Suomija, Graikija, Švedija, Norvegija, Malta, Danija, Airija, Islandija,



Portugalija) (RBE, 2011). Pasiutligė yra plačiai paplitusi Centrinės ir Rytų Europos šalyse. 2002 metais Europoje daugiausia pasiutligės atvejų registruota Rusijoje (3089), Ukrainoje (1549), Lenkijoje (1188), Baltarusijoje (809), Latvijoje (500) (RBE, 2011). Visos šios valstybės, išskyrus Ukrainą, yra Lietuvos kaimynės. Pagal 2005-2011 metų pasiutligės paplitimo duomenis Centrinės ir Rytų Europos šalyse buvo nustatyti pasiutligės atvejai: Baltarusijos Respublikoje 6382, Rusijoje 18651, Estijoje 391, Latvijoje 1291, Lietuvoje 4490, Lenkijoje 551, Ukrainoje 12931. Kaimyninėje Baltarusijos Respublikoje epidemiologinė pasiutligės situacija kelia grėsmę ir kitoms kaimyninėms šalims: Rusijai, Ukrainai, Lenkijai, Lietuvai ir Latvijai. Baltarusija visą laiką yra vertinama kaip endeminė pasiutligės šalis. Žmonių pasiutligės atvejų skaičius taip pat yra labai aukštas, ypač 1950 m. – nustatyti 52 atvejai. Per 1951-2003 metais Baltarusijos Respublikoje nuo pasiutligės mirė 135 žmonės, paskutinis žmonių pasiutligės atvejis buvo registruotas 2002 metais (Mishaeva et al., 2006). Didžiausias registruotas gyvūnų pasiutligės atvejų skaičius buvo 2003 metais (1077). Vertinant 2003 metais ištirtų laukinių ir naminių gyvūnų pasiutligės paplitimą buvo nustatyti 94,9% pasiutligės atvejų (RBE, 2011). Remiantis RBE duomenimis per 2003-2011 metų laikotarpį Baltarusijos Respublikoje buvo nustatyti 5559 pasiutlige infekuotų laukinių gyvūnų atvejai, o tuo tarpu naminių 2111 atvejai.

Per 10 metų (1994–2003) pasiutligė buvo registruojama visoje Lietuvoje. Naminių ir laukinių gyvūnų pasiutligė atskiruose regionuose buvo paplitusi nevienodai. Daugiausia šios ligos atvejų buvo registruojama šiaurinėje, Šiaurės rytinėje ir pietvakarinėje Lietuvoje, tuo tarpu anksčiau – 1991–2000 metais – daugiau šiaurinėje ir Šiaurės vakarinėje dalyje (Zienius, 2004). Latvijoje laukinių ir naminių gyvūnų pasiutligė plito ne taip intensyviai kaip Lietuvoje. Daugiausia šios ligos atvejų 1995–2000 metais užregistruota tarp lapių. Per šį laikotarpį Latvijoje pasiutligė buvo užregistruota 23 apskrityse (iš 26): dažniausiai Kuldino, Ventspilio, Saldus ir Luizas regionuose, taip pat Vidurio Latvijoje (Dobelės, Jelgavos, Bauskės ir Rygos rajonai) (Zienius, 2004). Lenkijoje 1995–2000 metais daugiausia pasiutligė plito rytinėje ir Šiaurės

rytinėje dalyje. Baltarusijoje, kaip ir Lietuvoje, labiausiai pasiutligė plito gamtoje – lapių ir mangutų populiacijoje. Didelę reikšmę platinant pasiutligę tiek tarp žmonių, tiek tarp gyvūnų turi kaip tik šios laukinių gyvūnų rūšys ir kitose Europos šalyse – Lenkijoje, Latvijoje, Baltarusijoje (Zienius, 2004).

### **2.3. Pasiutligės virusų charakteristika**

#### **2.3.1. Klasifikacija**

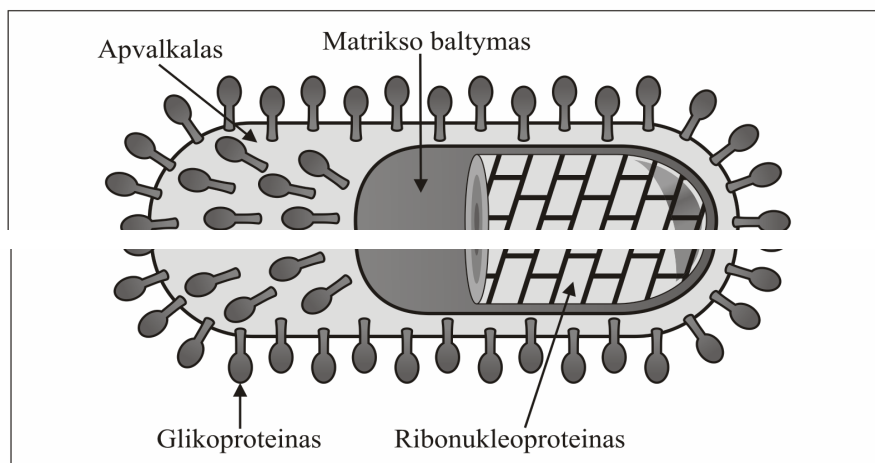
Pasiutligės virusas, esantis *Mononegavirales* eilėje, priklauso *Rhabdoviridae* šeimai, *Lyssavirus* genčiai (Wunner, 2007). Pagal tarptautinį virusų taksonomijos komitetą (ICTV) (Virus taxonomy, 2011) nuo 2011 metų *Lyssavirus* gentis yra skirstoma į 12 genetinių rūšių (<http://www.ictvonline.org>) (Bourhy et al., 1993; Gould et al., 1998; Guyatt et al., 2003). *Lyssavirus* genties rūšys suskirstytos į dvi filogenetines grupes. Pirmai filogenetinei grupei priklauso: klasikinis pasiutligės virusas (RV), Duvenhage virusas, Europinis šikšnosparnių *lyssavirus* 1 ir 2 tipas, Australijos šikšnosparnių *lyssavirus*, Aravan virusas, Khujand virusas ir Irkut virusas. Antrai filogenetinei grupei priklauso: Lagos šikšnosparnių virusas, Mokola virusas, Shimoni šikšnosparnių virusas ir Vakarų Kaukazo šikšnosparnių virusas. Dalis šių rūšių identifikuotos ir klasifikuotos tik pastaraisiais metais. Keturios naujos *lyssavirus* rūšys buvo pripažintos ICTV 2009 metais (<http://talk.ictvonline.org>). Kirgizijoje iš šikšnosparnio buvo išskirtas Aravan virusas ir klasifikuotas į atskirą aštuntą rūšį (Arai et al., 1997; Kuzmin et al., 2008). Tadžikistane išskirtas Kjuhand virusas buvo klasifikuotas į atskirą *lyssavirus* rūšį (Kuzmin et al., 2003, 2008). Taip pat papildomai tarp jau egzistuojančių *lyssavirus* rūšių buvo įtraukti dar du Irkut ir Vakarų Kaukazo virusai išskirti iš šikšnosparnių Rusijos Federacijoje (Botvinkin et al., 2003, Kuzmin et al., 2005, 2008).

Dar viena virusų rūšis ICTV buvo pripažinta tik 2011 metais, tai yra Kenijoje rasta nauja *lyssavirus* rūšis Shimoni, kuri buvo išskirta iš mirusio vabzdžiaėdžio šikšnosparnio (*Hipposideros comerson*) (Kuzmin et al., 2010). Shimoni virusas nebuvo panašus nei su vienu jau anksčiau nustytos rūšies virusu, ir tik vėliau įvertinus visus penkis *Rhabdoviridea* viruso struktūroje

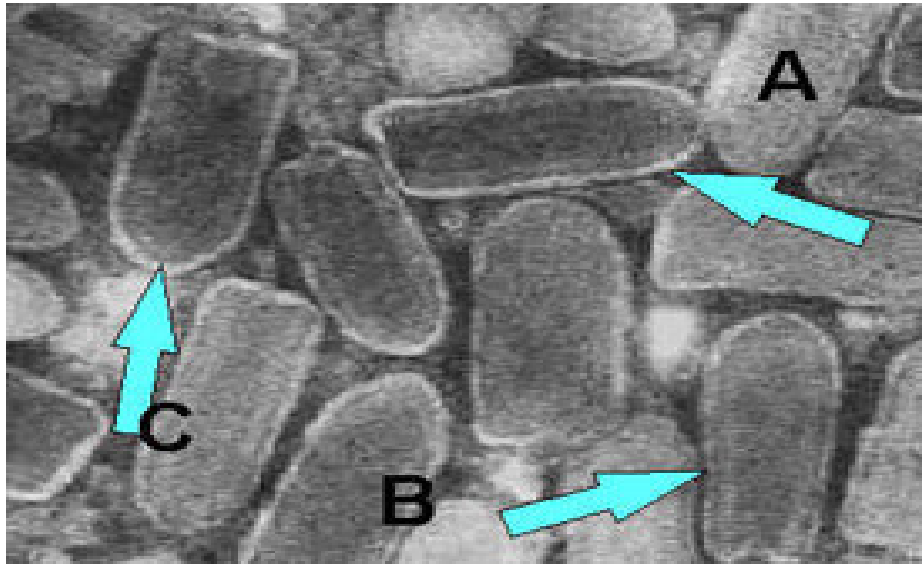
esančius proteinus (N, P, M, G, ir L) buvo nustatyta, kad šis virusas labai artimas Lagos šikšnosparnių virusui ir priskirtas II filogenetinei grupei (Kuzmin et al., 2010). Vokietijos teritorijoje 2011 metais iš mirusio vabzdžiaėdžio pelėausio šikšnosparnio (*Myotis nattereri*) Bokeloh žemėje, Žemutinėje Saksonijoje, buvo išskirtas virusas, kuris skyrėsi nuo kitų *Lyssavirus* (Freuling et al., 2011). Atlikus filogenetinę analizę manoma, kad išskirtas virusas gali priklausyti naujai *Lyssavirus* rūšiai.

### 2.3.2. Pasiutligės viruso viriono struktūra ir cheminė sudėtis

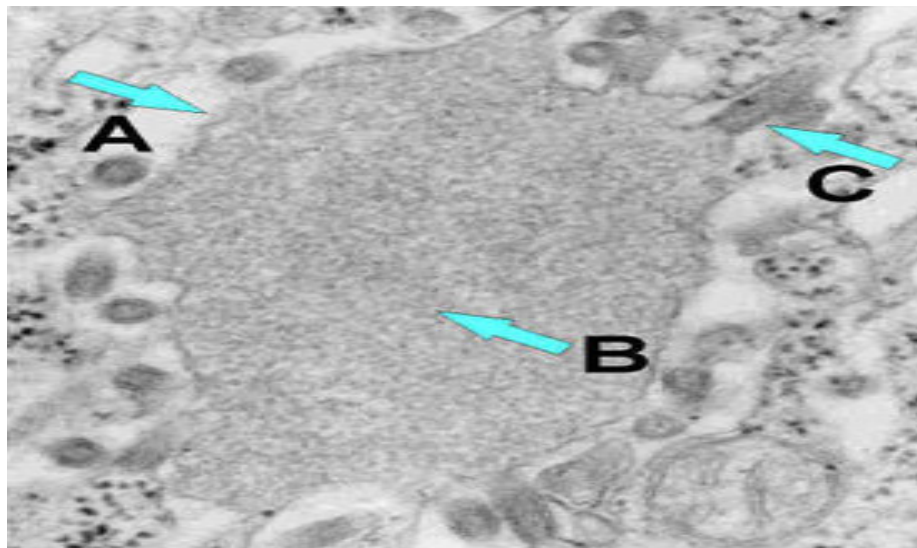
Virionas yra dalelė, sudaryta iš nukleorūgšties molekulės ir ją supančio baltyminio apvalkalo (2.3.1 pav). Pasiutligės viruso virionas yra 75 nm diametro ir 100-300 nm ilgio kulkos formos dalelė, turinti viengrandę (-) ribonukleorūgštį (RNR) (2.3.2 pav., 2.3.3 pav., 2.3.4 pav) (Tordo et al., 1988(a), 1988(b)). Sandaros ir morfogenezės sudėtingumo požiūriu pagal lipidinį apvalkalą *Rhabdoviridea* šeimos virusai yra priskiriami sudėtingesnei struktūrai, nes jie turi papildomą matrikso baltymą M.



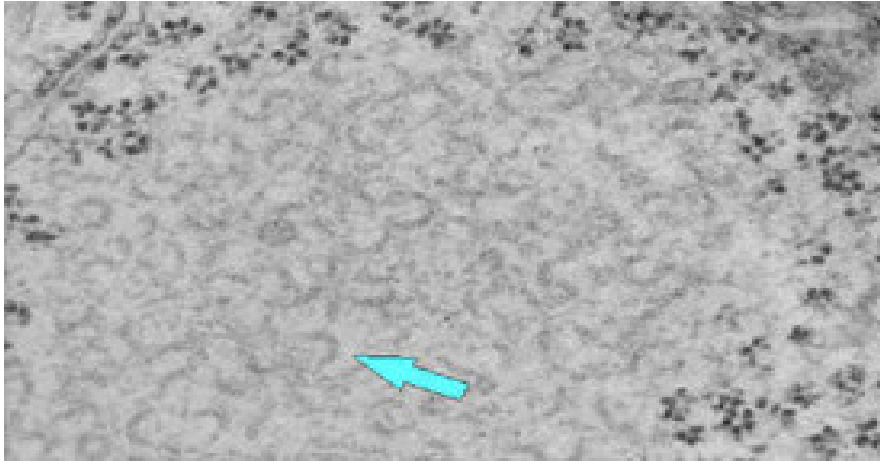
2.3.1 pav. *Rhabdoviridea* virusų šeimos struktūra. Pastaba: pagal Bakienė, 2008.



2.3.2 pav. **Pasiutligės viruso virionas.** A) Matomas kulkos formos virusas. B) RNR baltymas panašus į “bičių avilyje” išsidėsčiusius griovelius. C) Matomas dvigubas glikoproteino smaigalys. *Pastaba: pagal [http://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/electron\\_microscopy.html](http://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/electron_microscopy.html)*



2.3.3 pav. **Pasiutligės viruso Negri kūnelių susidarymas intarpuose, endoplazminiame nervinių ląstelių tinkle.** A) Negri kūnelis. B) Intarpuose gausu RNR baltymų. C) Pasiutligės viruso pumpuravimas. *Pastaba: pagal [http://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/electron\\_microscopy.html](http://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/electron_microscopy.html)*

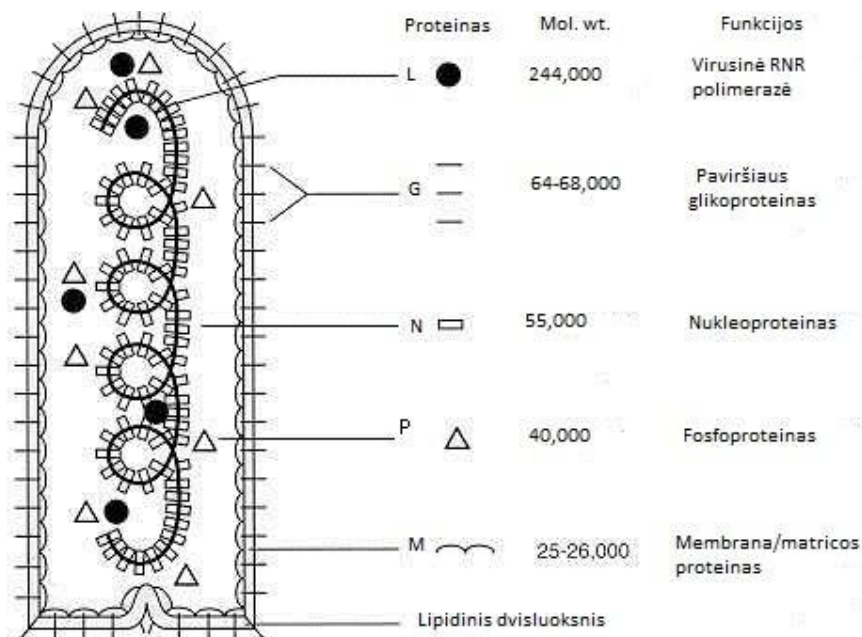


2.3.4 pav. Ribonukleoproteino (RNR) baltymas – gausiai pastebima susisukusių RNR. Pastaba: pagal:

[http://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/electron\\_microscopy.html](http://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/electron_microscopy.html)

*Rhabdoviridae* šeimą sudaro spiralės simetrijos virusai, infekuojantys gyvūnus ir žmogų (Bourhy et al., 1993). Virionas sudarytas iš dviejų pagrindinių subvienetų: iš ribonukleoproteino (nukleokapsidės) sudarytos spiralės formos šerdies ir išorinio dviejų sluoksnių lipidų dangalo (2.3.1 pav.). Pasiutligės viruso spiralinę kapsidę iš išorės dengia lipidinis apvalkalas, kurio paviršiuje yra 10 nm ilgio glikoproteino spyglių (2.3.1 pav.) (Goto et al., 2000). Ši nukleokapsidė, kartu su keliomis nestruktūrinių baltymų L ir P molekulėmis (pastarosios atlieka viruso polimerazės komplekso funkcija), sudaro 180 nm ilgio ir 80 nm skersmens viruso šerdį. Viruso RNR susijusi su 5 pagrindiniais baltymais: nukleoproteinas (N), fosfoproteinas (P), glikoproteinas (G), polimerazė (L), tarpląstelinės medžiagos baltymas (matrikso baltymas) (M) (2.3.5 pav). Nukleokapsidę dengia amorfinis matrikso baltymo M sluoksnis. Iš išorės viruso nukleokapsidę supa apvalkalėlis, sudarytas iš dvigubo fosfolipidų sluoksnio ir glikoproteino (Wunner et al., 2007). Pasiutligės viruso genomas – viengrandis, nesegmentuotas, sudarytas iš mažos 12 kilobazių RNR. Genomas, sąveikaudamas su baziniu kapsidės baltymu N, sudaro spiralinę struktūrą iš 30-35 vijų, po 40 subvienetų kiekvienoje (2.3.6 pav). Genome randama

pagrindinė seka sudaryta iš maždaug 50 nukleotidų, bei N, P, M, G ir L genų (2.3.6 pav). Pasiutligės viruso struktūrą nulemia baltymų genų išsidėstymas RNR genome (Tordo et al., 1986).



### 2.3.5. pav. Pasiutligės viruso viriono struktūros schema.

Pastaba: pagal [http://www.virology.net/Big\\_Virology/BVRNArhabdo.html](http://www.virology.net/Big_Virology/BVRNArhabdo.html)

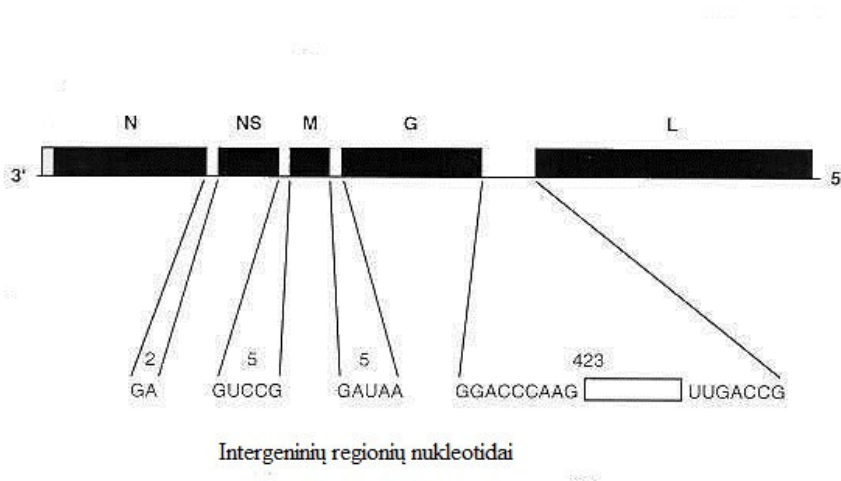
*Rhabdoviridea* viruso genomas sudarytas iš 11931 ribonukleotidų (nt): N (1350 nt), P (891 nt), M (606 nt), G (1572 nt), nuo RNR priklausoma RNR polimerazė L (6384 nt) bei Psi regionas, arba G-L tarpgeninis regionas (400 nt), kuriuos sekvenuojant duomenys įtraukiami filogenetinei analizei atlikti (Wu et al., 2007). Naudingiausi epidemiologiniai duomenys gaunami tiriant nukleoproteino N ir glikoproteino G genų regionus (2.3.7 pav). Naudojant atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandininę reakciją (AT-PGR) pasiutligės viruso N geno analizei atlikti (Sacramento et al., 1991), galima įvertinti pasiutligės sukėlėjo geografinius ir rūšinius ypatumus – identifikuoti pasiutligės viruso genetines rūšis skirtinguose pasaulio geografiniuose arealuose (Kissi et al., 1995) ir atlikti *lyssavirus* rūšių genetinį tipizavimą (Vazquez-Moron et al., 2006).

Nukleobaltymai susideda iš 450 amino rūgščių ir dalyvauja persijungiant nuo RNR transkripcijos į replikaciją (Tordo et al., 1996(a)). Viena iš imunodominuojančių vietų yra žinoma ir fiksuota 404-418 pozicijoje (Dietzschold et al., 1987; Ertl et al., 1989). Pastaruoju metu buvo aiškiai apibrėžta pasiutligės viruso RNR nukleoproteino komplekso struktūra (Albertini et al., 2006).



### 2.3.6. pav. Pasiutligės viruso genomai.

Pastaba: pagal [http://www.virology.net/Big\\_Virology/BVRNArhabdo.html](http://www.virology.net/Big_Virology/BVRNArhabdo.html)



### 2.3.7 pav.. Pasiutligės viruso RNR genomai

Pastaba: pagal <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8618/>

Tarpląstelinės medžiagos matrikso baltymas (M) yra 202 aminorūgščių polipeptidas, kuris vaidina pagrindinį vaidmenį viruso surinkime ir surišime (Mebatsion et al., 1999). Virusų M baltymas, jungdamasis prie

nukleokapsidės, lemia, kad nukleokapsidė patenka į virioną, o ne būna transkripcijos matrica. Sumažėjus M baltymo sintezės efektyvumui arba sutrikus jo pernašai, infekcija dažnai būna abortyvi ar persistentinė (Bakienė, 2008). Užkrėstoje ląstelėje M baltymas sintetinamas vėliausiai. Jo dėka pumpuravimas vyksta labai greitai (Lasinskaitė-Čerkašina ir kt., 2005). Iš pasiutligės viruso baltymų daugiausiai yra ištyrinėtas G baltymas, tai 524 aminorūgščių polipeptidas ir yra susijęs su viruso patogeniškumu (Seif et al., 1985, Gaudin et al., 1992, Badrane et al., 2001). L baltymas yra didžiausias pasiutligės viruso baltymas ir L genas užimantis daugiau nei pusę viruso genomo. Šis pasiutligės baltymas yra mažiausiai ištyrinėtas biocheminiais ir imunologiniais tyrimais, bet geriausiai išanalizuotas teoriškai (Tordo, 1996(a)).

### 2.3.3. Pasiutligės viruso reprodukcija

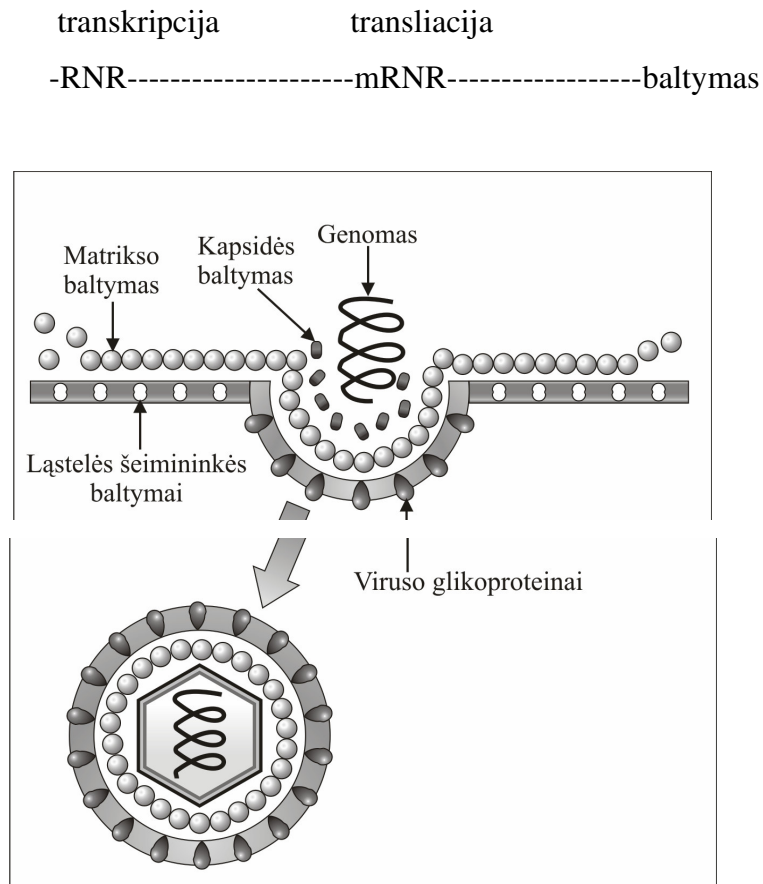
Virusai kaip obligatiniai viduląsteliniai parazitai dauginasi tik ląstelėje. Virusų genomo tipas lemia replikacijos strategiją. Tačiau koks bebūtų viruso genomas, tam, kad susidarytų infekciniai šio viruso palikuonys, turi būti išpildytas vienas reikalavimas, jų koduojama informacija turi sutapti su ląstelės šeimininkės, kad galėtų ją atpažinti ir iššifruoti (Flint, 2004).

Adsorbcijos metu G baltymas sąveikauja su specifiniais ląstelės paviršiaus receptoriais, viruso apvalkalas susilieja su ląstelės membrana ir pinocitozės būdu įsiskverbia į ląstelės šeimininkės citoplazmą, kur virionai kaupiasi ir užpildo visą endosomą (citoplazmos pūslelę) (2.3.8 pav). Ištirpusios viruso ir endosominės membranos išleidžia virusinį RNP (ribonukleino rūgšties proteino) - RNR genomą į citoplazmą. Patekus viruso genomui į ląstelę, pirmiausia vyksta transkripcija, susidaro informacinė RNR (mRNR), kurioje užkoduota informacija apie pirminę baltymo struktūrą (Forterre, 2006).

Pasiutligės viruso transkripcija ir translacija vyksta ląstelės citoplazmoje, translacija ant laisvų ribosomų citoplazmoje. G baltymo sintezė pradedama ant laisvų ribosomų, o baigiama ir glikozilinimas atliekamas



endoplazminiame tinkle ir Goldžio aparate. *Rhabdoviridea* šeimos (-) RNR virusų reprodukcijos metu transkribuojama genomine RNR, o susintetinta +RNR atlieka mRNR funkciją pagal schemą:



2.3.8 pav. Pasiutligės viriono penetracija ir pumpuravimas tuo pat metu.  
Pagal Bakienė, 2008

Pasiutligės virusai turi virusui būdingą fermentą, dalyvaujantį transkripcijoje - nuo RNR priklausančią RNR polimerazę (transkriptazę), kuri į ląstelę patenka kartu su virusu. „Nusirengusi“ viruso RNR transkribuojama į +RNR viruse esančiu fermentu RNR polimeraze, susidaro trumpi ir ilgi transkriptonai. Trumpos RNR grandinės transliuojamos į viruso baltymus ir fermentus viruso palikuonims. Vienas iš šių baltymų yra glikoproteinas, kuris įterpiamas į ląstelės membraną. Ilgos +RNR grandinės naudojamos virusų palikuonių -RNR sintezei,

virusas pumpuruodamas įgyja apvaskalą ir pasišalina iš ląstelės (Lasinskaitė-Čerkašina et al., 2005).

Virusui skverbiantis iš ląstelės pumpuravimo būdu, baltymas M sąveikauja su viruso kapside ir su ląstelės plazmos membranoje esančiais glikoproteinais. Virusas įgauna lipidinį apvaskalėlį, kai jo nukleokapsidė pumpuruoja per ląstelės šeimininkės plazminę membraną: baltymas M susisieja su plazmine membrana ir padeda prie jos sutelkti viruso sandus iš ląstelės citoplazmos, t. y. kapsidė susirenka ir virusas pumpuruoja tuo pat metu (2.3.8 pav). Pasiutligės virusai pumpuruoja pamatinėje membranos srityje, todėl jie prasiskverbia į audinių gilumą ir sukelia sisteminę organizmo infekciją, lydimą viremijos. Pirminis virusinis pumpuravimas vyksta centrinėje nervų sistemoje (CNS) per plazmos membraną. Seilių liaukose atvirkščiai - virusas pumpuruoja iš ląstelių membranos į seilių latakėlius. Virusas seilių liaukose sukelia „šeimininko“ gyvūno elgesyje agresiją ir padidina šansą išplatinti virusinę infekciją – įkandus kitam gyvūnui ar žmogui (Bakienė, 2008).

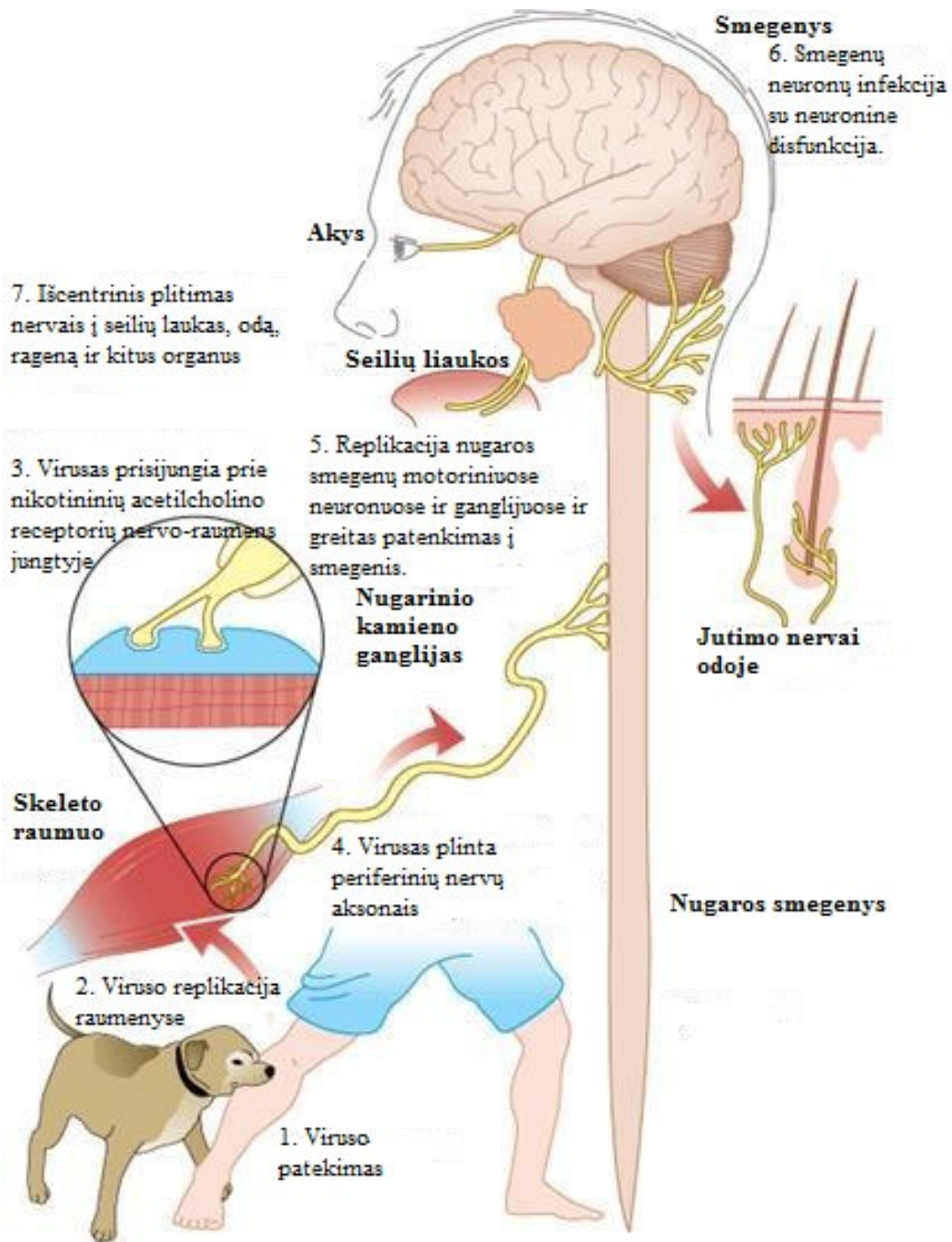
## **2.4. Pasiutligės patogenezė, klinikiniai ir patologiniai požymiai**

### **2.4.1. Patogenezė**

Pasiutligė - ūminė virusinė mirtina CNS infekcija, plintanti per sergančio gyvūno seiles ir pasireiškianti progresuojančiu kamieniniu encefalitu (Rupprecht et al., 2004; Dietzschold et al., 2005; Miah et al., 2005). Pasiutligė viena seniausių žinomų virusinių infekcijų, pavojinga žmonių ir gyvūnų gyvybei (Rupprecht et al., 2004; Jackson, 2007). Po sąlyčio su sergančiu laukiniu ar naminiu gyvūnu, žmonės gali užsikrėsti ir susirgti pasiutlige. Sergantiems pasiutlige išsivysto diseminuotas nepūlingas encefalomyelitas, kurio klinikiniai požymiai yra padidėjęs nervinis jautrumas, sąmonės sutrikimas ir paralyžius. Atsiradus simptomams, liga paprastai nepagydoma (WHO, 2004).

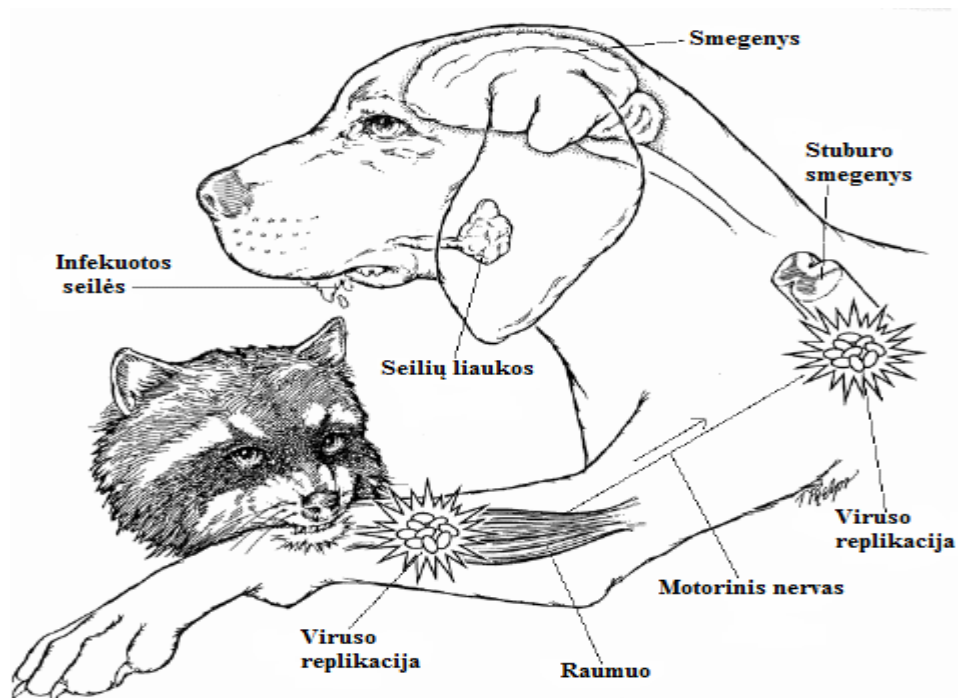
Pasiutlige žmonės užsikrečia, kai juos apseilėja, įdreskia, įkanda sergantis naminis ar laukinis gyvūnas ir su gyvūno seilėmis pasiutligės virusas patenka į žaizdą (2.4.1 pav.). Per žaizdą į organizmą patekęs pasiutligės

virusas rišasi prie skeleto raumenų nikotininių acetilcholino receptorių ir dauginasi įkandimo vietos raumenyse – miocituose, o susidarius pakankamai viruso koncentracijai, toliau plinta per periferinę nervų sistemą nervų kamienais ir perineuralinių tarpų skysčiais limfogeniniu keliu į CNS (2.4.1 pav.; 2.4.2 pav.). CNS virusai toliau dauginasi (Jackson, 2007; Charlton, 1994, Randal et al., 2008). Patekus virusui į CNS, infekcijos generalizacijos sustabdyti neįmanoma. Virusas, judėdamas periferinių nervų motoriniais ir juntamaisiais nervais 12-24mm/d greičiu, pasiekia nugaros smegenis kur toliau intensyviai dauginasi (Jackson, 2007, Randall et al., 2008 ).



2.4.1 pav. Pasiutligės viruso patogenezė, nuo gyvūno žmogui.

Pastaba: pagal <http://www.benhoc.com/content/1955-Chapter-188.-Rabies-and-Other-Rhabdovirus-Infections.html>

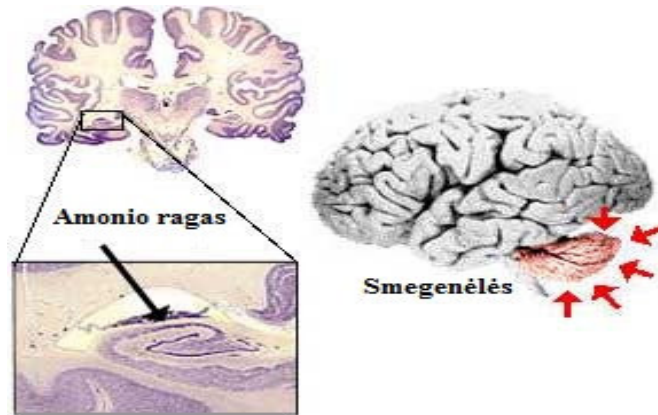


2.4.2 pav. Pasiutligės viruso patogenezė nuo gyvūno gyvūnui.

Pastaba: pagal

[http://www.northcentralanimalhospital.com/site/view/183737\\_RabiesInfo.pml](http://www.northcentralanimalhospital.com/site/view/183737_RabiesInfo.pml)

Tuomet gali atsirasti skausmas ir parestezijos sužeidimo vietoje. Pasidauginęs virusas toliau plinta į galvos smegenis 200-400 mm/d greičiu, kur pažeidžia smegenėlių branduolius ir Purkenje ląsteles, smegenų kamieną, smegenų žievės neuronus, pagumburį, Amonio ragą (2.4.3 pav.) (Randall et al., 2008). Iš CNS pasidauginę virusai išcentriškai nervų kamienais plinta į seilių liaukas, odą, rageną ir kitus organus (Jackson, 1991; Charlton, 1994, Jackson, 2007; Randall et al., 2008) (2.4.1 pav.; 2.4.2 pav.).



2.4.3 pav. Pasiutligės virusais pažeistos smegenų dalys.

Pastaba: pagal <http://faculty.washington.edu/chudler/rabies.html>

Pavojingesni įkandimai yra į atviras kūno dalis, negu į apsaugotas rūbais. Labai pavojinga, kai pasiutę naminiai ar laukiniai gyvūnai giliai sukandžioja žmogui veidą, nes tada pasireiškia būdingas trumpesnis inkubacinis periodas ir didesnis pavojus susirgti pasiutlige (Knobel, 2005; Tordo et al., 2006). Rečiau žmogus užsikrečia sergančio gyvūno seilėmis patekus į odos įbrėžimus, jungines ir gleivines. Galimas pasiutligės užsikrėtimas ir neįprastu keliu: aerosoliniu keliu, kai virusas patenka į nosies gleivinę ir toliau uoslės nervais pasiekia CNS, taip pat per transplantuojamus organus iš užsikrėtusio pasiutlige paciento (Gode et al., 1988; Krebs et al., 1995, Hellenbrand et al., 2005; Smith et al., 2006). Didžiausia pasiutligės viruso koncentracija infekuotame gyvūne susidaro ne galvos smegenyse, o seilių liaukose. Virusui, patekus į CNS, pažeidžiami klajoklis, liežuvinis, poliežuvinis nervai, kurie sąlygoja rijimo ir kvėpavimo raumenų traukulius, gausų prakaitavimą. Itin gausus seilėtekis esti dėl simpatinio nervo dirginimo, o širdies ir kraujagyslių sistemos veikla sutrinka, kai pažeidžiami klajoklio nervo bei įvairių simpatinės nervų sistemos mazgai (Adeiga et al., 1996).

#### 2.4.2. Klinikiniai simptomai

Klinikiniai pasiutligės simptomai yra žinomi nuo senų laikų ir aprašyti dar Demokrito, Aristotelis ir Plutarcho (Blancou, 1994, 2004). Pasiutligės

inkubacinio periodo trukmė yra įvairi, tai priklauso nuo įkandimo vietos, inervacijos gausumo, nuo žaizdos dydžio ir gylio, nuo užkrato kiekio. Gyvūnui apkandžiojus žmogaus ar kito gyvūno galvą ar kaklą, inkubacinis periodas trunka mažiau nei 2-3 sav. Kai įkandimo vieta yra toliau nuo galvos srities ir negausi inervacija, inkubacinis periodas gali trukti iki 1-3 mėn, o labai retais atvejais iki 3 metų. Inkubaciniu laikotarpiu pasiutligės virusas keliauja periferiniais nervais į CNS (Jackson, 2007, Randall et al., 2008). Pasiutligę sergantys laukiniai gyvūnai, pradėję savisaugą, atbėga į kiemus, užpuola žmones, naminius gyvūnus (Artois, 1992). Naminiai gyvūnai tampa agresyvūs, bėga iš namų. Ligos pradžioje šunys būna apatiški, neėda, negeria. Vėliau ima staugti, blaškytis, loja užkime, nenuryja vandens, ėda neėdamus daiktus, 2-3 dieną atsiranda paralyžius, nukamba apatinę lūpa, seilėjasi, sunkiai keliasi ir gaišta. Susirgę galvijai nustoja ėdę, panašu lyg būtų pasprinę, iš snukio teka seilės, mykia (Delpietro, 2001). Gaišta praėjus 10 dienų. Visų rūšių gyvūnams taip pat ir žmogui būdingas požymis - pakitęs elgesys. Pasiutligę gali pasireikšti dvejomis formomis: klinikine ir slaptąja. Klinikinė pasiutligės forma pasireiškia tam tikromis stadijomis. Prodrominė stadija trunka iki 3 dienų, kol virusas patenka į CNS. Pirmieji simptomai yra nespecifiniai: karščiavimas (temperatūra gali siekti iki +40°C), galvos skausmas, ryklės uždegimas, silpnumas, nuovargis, irzlumas, anoreksija, pykinimas, vėmimas, viduriavimas, nerimas, miego sutrikimai, apatija, depresija, susijaudinimas. Klinikinis vaizdas primena ūmią kvėpavimo takų, virškinimo trakto ar psichikos ligą. Spazmų ir traukulių priepuolį gali išprovokuoti stipri šviesa (fotofobija) bei triukšmas (akustofobija). Neurologinė (susijaudinimo) stadija trunka sekančias 2-3 dienas, jų metu atsiranda CNS disfunkcijos požymiai. Pagrindinis šios ligos sindromas - progresuojantis encefalitas. Šiame periode iš pradžių vyrauja psichomotorinis sujaudinimas, hiperaktyvumas, neramumas, keistas elgesys, kliedesiai, haliucinacijos. Gali būti trumpalaikiai, trunkantys mažiau nei penkias minutes, ypač didelio agresyvumo epizodai, kai ligonis blaškosi, draskosi, gali mėginti užpulti ar įkąsti. Šiuos epizodus gali išprovokuoti garsas, šviesa, lietimasis. Gali

įvykti traukuliai. Daugumai ligonių būdingi kvėpavimo sutrikimai: inspiracinis dusulys, kvėpavimas tampa nelygus, gilus, atsiranda veido cianozė. Per priepuolį būna tachikardija, išsiplėtę vyzdžiai, tačiau sąmonė dažniausiai išlieka. Hidrofobija (vandens baimė) būna 50% sergančių pasiutlige. Duodant gerti skysčius, gali išsivystyti ryklės ir stemplės raumenų spazmai, rijimas tampa skausmingas. Šiuo ligos periodu taip pat gali atsirasti opistotonusas, hiperventiliacija, cholinerginiai simptomai – seilėtekis, ašarojimas, gausus prakaitavimas, dažnas karščiavimas. Dažniausiai mirštama staiga, be agonijos, dėl kvėpavimo centro paralyžiaus (Krukonytė ir kt., 2007). Paralyžine (slaptoji) forma sergantys, lyginant su klasikine forma infekuotais, yra ramūs, apatiški. Paralyžius išsivysto ankstyvame ligos periode, infekuotajam individui išsivysto gerklų raumenų paralyžius. Ši forma gali neturėti prodromo periodo (Krukonytė ir kt., 2007).

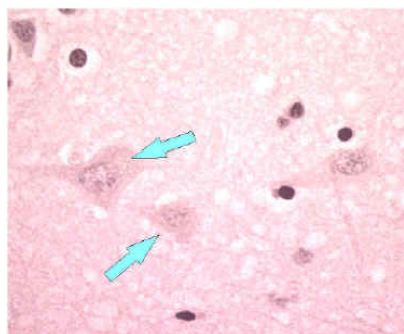
Geriausiai yra ištirta šunų pasiutligė. Šunys yra dažniausi pasiutligės sukėlėjo nešiotojai ir platintojai, esantys arčiausiai žmonių. Skiriamos dvi ligos formos: šėlstamoji ir ramioji, arba paralyžinė. Ligos eigai būdingos trys stadijos: prodrominė, susijaudinimo ir paralyžiaus. Šėlstamosios formos prodromas trunka 1-2 paras (šuo neėda, slepiasi, nuolat laižo įkandimo vietą), susijaudinimas – 2-3 paras (šuo visus puola, graužia ir ryja įvairius daiktus, blaškosi, užkimeš balsas, didelis seilėtekis, vandens baimė arba laka neįprastai). Kai ligos forma rami, susijaudinimo nebūna. Trečioji stadija yra kramtymo ir rijimo paralyžius: per 2-3 paras gyvūnas nugaišta (Tepsumethanon et al., 2005).

Šikšnosparnių pasiutligė kelia nerimą daugelyje Europos valstybių, jos klinikiniai požymiai tokie patys kaip ir kitų pasiutlige sergančių individų (Brass, 1994; Vos, 2007; Kuzmin, 2010). Nors šikšnosparnių *Lyssavirus* genotipai apibūdinami tik kaip „su pasiutlige susiję virusai“, išsivystanti liga nesiskiria nuo klasikinės pasiutligės (Whitby et al., 2000; Shankar et al., 2004).



### 2.4.3. Patologija

Pagrindinis patologinis sindromas yra virusinis encefalitas ir mielitas. Virusas sukelia smegenų žievės, tarpinių smegenų nervinių ląstelių destruktiją, smegenų medžiagos demielinizaciją. Pasiutligės virusas labiausiai pažeidžia pailgąsias smegenis, IV skilvelio, IX, X ir XII nervų branduolius, smegenų kamieną, Amonio ragą bei nugaros smegenų juosmeninės dalies segmentus. Nervinės ląstelės (neuronai) degeneruoja ir jose atsiranda eozinofiliniai apvalūs ar ovalūs neuronų citoplazmos intarpai, vadinami Babešo - Negri kūneliais, specifiški pasiutligės virusui (2.4.4. pav.). Stambūs, 0,25-27µm Babešo - Negri kūneliai laikomi ne pačiu virusu, o viruso sukeltais specifiniais pakitimais. Pasiutligės viruso kraujyje ar kraujo ląstelėse neaptikta (Krebs et al., 1995).



A. Neuronuose nėra Negri kūnelių



B. Negri kūneliai infekuotame neurone

2.4.4 pav. Aktyvi viruso replikacijos vieta -neuronų citoplazmos intarpai

(Negri kūneliai): A ir B

Pastaba: pagal <http://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/histologic.html>

### 2.5. Pasiutligės imunologiniai, molekuliniai ir virusologiniai tyrimo metodai

Pagal klinikinius požymius pasiutligę galima tik įtarti, kadangi ligos požymiai yra būdingi ne tik šiai ligai. Todėl, vienintelis kelias patvirtinantis galutinę pasiutligės diagnozę yra pasiutligės virusų ar specifinių jo komponentų nustatymas, naudojant laboratorinius diagnostinius tyrimus. Atšaldyta patologinė medžiaga (smegenys) tyrimams turi būti kuo skubiau

atvežama į laboratoriją, kuri turi galimybes atlikti laboratorinius tyrimus pasiutligei diagnozuoti.

#### 2.5.1. Histologiniai pasiutligės viruso diagnostikos metodai

Histologinis audinių dažymo metodas. Histologinio tyrimo metodo esmė yra charakteringų ląstelių histologinė indentifikacija. Histologinių tyrimų metu mikroskopuojant galima nustatyti Negri kūnelius nervinių ląstelių citoplazmoje. Jie dažniausiai randami Amonio rago piramidinėse ląstelėse ir smegenėlių Purkinje ląstelėse. Negri kūneliai gali būti randami seilių liaukų neuronuose ar kituose organuose. Gyvūnų smegenų nefiksuoti tepinėliai dažomi hematoksilinu ir eozinu, Manno ar Sellerio būdais, kad būtų galima atskirti pasiutligės viruso intarpus (Negri kūnelius) nuo kitų intraląstelių intarpų. (2.4.1 pav.) (Lembo et al., 2006). Tačiau šio histologinio tyrimo jautrumas yra daug mažesnis negu imunologinių tyrimo metodų, ypač tuo atveju kai yra mėginio autolizė (OIE, 2011). Dėl šios priežasties šis tyrimo metodas yra netinkamas pirminei diagnozei patvirtinti (OIE, 2011).

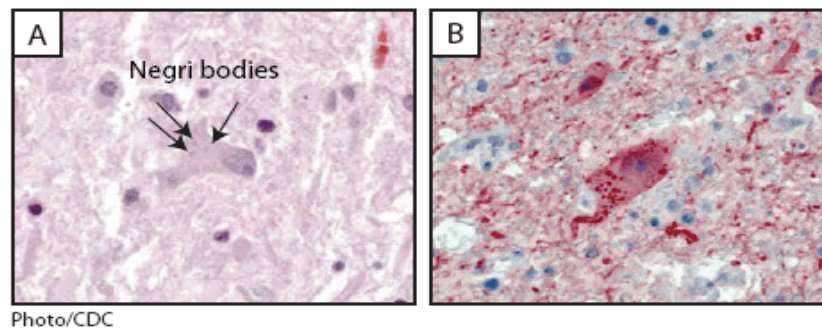
#### 2.5.2. Imunologiniai tyrimo metodai

Fluorescuojančių Ak (FAT) tyrimas yra pagrindinis metodas pasiutligės rutininei diagnostikai. Metodas rekomenduojamas PSO ir PGSO ir naudojamas tiesioginiams gyvūno ar žmogaus galvos smegenų audinių dalių: Amonio rago, smegenėlių, didžiųjų smegenų žievės ir smegenų kamieno, tyrimams. Smegenų audinių atspaudai dažniausiai yra fiksuojami šaltu acetonu arba ant ugnies ir dažomi su fluoresceino izotiocianatu žymėtais polikloniniais ar monokloniniais antikūnais. Pasiutligės FAT tyrimas vertinamas liuminescenciniu mikroskopu. Dėl specifinės antigeno ir antikūnų sąveikos bei fluorochromo švytėjimo ultravioletinėje spinduliuotėje nustatomas nukleokapsidinio baltymo specifinis darinys (OIE, 2011).

Taip pat, FAT gali būti taikomas patloginės medžiagos tyrimams, kuri buvo fiksuota glicerine. Jeigu patloginė medžiaga buvo fiksuota formalino tirpalu, FAT gali būti naudojamas tik medžiagą paveikus proteolitiniu

fermentu, tačiau dėl to metodo patikimumas būna žemesnio lygio, negu atliekant tyrimus su šviežia patologine medžiaga (Johnson et al., 1980, Metlin et al., 2007). Atliekant tyrimus FAT su šviežia patologine medžiaga rezultatai gaunami per kelias valandas su 99% jautrumu (Fooks et al., 2009). FAT jautrumas priklauso nuo patologinės medžiagos stovio, *Lyssavirus* rūšių, laboratorijos personalo kvalifikacijos. Jautrumas gali būti žemesnis mėginiuose iš vakcinuotų gyvūnų. FAT metodas yra labai jautrus pasiutligės viruso nustatymui smegenų ir seilių liaukų atspauduose ir infekuotų ląstelių kultūrose. Taip pat pasiutligės diagnostikai gali būti naudojami *intra vitam* odos biopsijos mėginiai (Johnson et al., 1980, 2000; Umoh et al., 1981; Barnard et al., 1982; Reid et al., 1983; Metlin et al., 2007).

Imunohistocheminis tyrimo metodas (IHC) yra smegenų tepinėlių, fiksuotų formalinu, mikroskopavimas Negri kūneliams nustatyti. Šis metodas yra jautresnis nei histologinis audinių dažymo metodas ir dažniausiai naudojamas histologiniams parafininiams pjūviams dažyti, ištirpinus parafiną ir rehidratuojant su proteolitiniais fermentais ( 2.5.1 pav.) (proteinaze K ir kt.) (Lembo et al., 2006).



**A. Hematoksilino ir eozino dažymas    B. Imunohistocheminis dažymas**

2.5.1 pav. CNS audinio nervinių ląstelių citoplazmoje nustatyti Negri kūneliai

Pastaba: pagal <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5913a3.htm>

Naudojami specifiniai antikūnai, kuriais aptinkami eozinofiliniai viruso intarpai. Antikūnai gali būti konjuguoti su fermentu, pvz., peroksidaze arba pažymėti fluorescuojančiu izotiocianatu (FITC). Naudojamos specialios

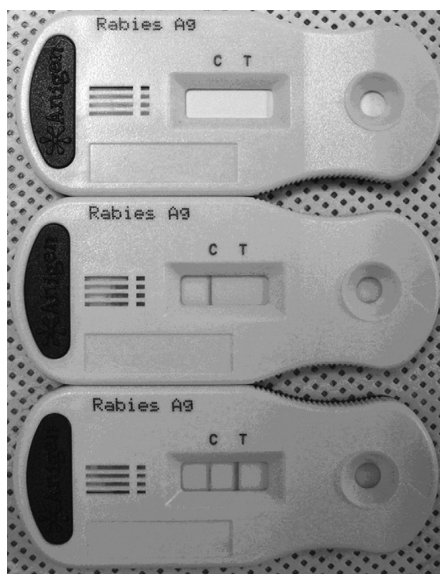
fermentais žymėtos sistemos didina metodo jautrumą. Specifiniam pasiutligės viruso Ag IHC dažymui paprastai naudojamas arba serumas nuo pasiutligės (angl. *anti-rabies serum*), arba specifinis pasiutligės viruso rūšiai serumas (angl. *anti-species serum*) ir įprasta peroksidazės dažymo procedūra (Bourgon ir Charlton, 1987; Sinchaisri, et al., 1992; Lembo et al., 2006; House et al., 2010).

Toks konjugatas gali būti naudojamas tiesioginei diagnostikai, kaip jautresnis FAT, bet reikia atkreipti dėmesį, kad padidėja rizika dėl nespecifinių teigiamų rezultatų (Lembo et al., 2006). Dėl šios priežasties šis tyrimo metodas yra netinkamas pirminei diagnozei patvirtinti (OIE, 2011), jį reikia atlikti su eile kitų tyrimo metodų.

Imunofermentinis tyrimo metodas (IFA) naudojamas pasiutligės viruso nukleoproteino (N) nustatymui galvos smegenų mėginiuose (nefiksuotuose formalinu). Šio tvirtafazio imunosorbcinio tyrimo principas yra specifiško „antikūnų-antigeno“ komplekso nustatymas. Mikroplokštelės padengtos specifiniais monokloniniais IgG antikūnais atpažįsta tiriamoje medžiagoje esantį pasiutligės antigeną. Tai greitas ir jautrus testas, tačiau nustatyta FAT ir IFA koreliacijos reikšmė – 96%, o atliekant rutininius laboratorinius tyrimus, šis testas nėra jautrus kitiems giminingiems pasiutligės virusams. Jis gali būti naudojamas tik moksliniais tikslais nustatant pirmą *Lyssavirus* genotipą (Perrin et al., 1992; Katayama et al., 1999; Xu ir kt. 2007).

Greito imunochromatografinio (angl. *Rapid Immunochromatographic Test*) (RIDT) tyrimo metodo principas yra greitas kokybinis ir vizualus pasiutligės tyrimas *in vitro* šunų, usūrinių šunų ir galvijų seilių ar smegenų mėginiuose. Membrana testo dalyje padengta specifiškais monokloniniais antikūnais, išdžiovintais juostelės paviršiuje. Atliekant tyrimą, seilės ar smegenys absorbento zonoje susimaišo su žymėtu antikūnų IgG2a konjugatu. Mišinys chromatografiškai juda juostele pagal kapiliarumo dėsnį. Esant teigiamam pasiutligės rezultatui, ant membranos testo ('T') dalyje pasirodo spalvota juostelė. Jei šios spalvotos juostelės nėra – rezultatas neigiamas.

Spalvota kontrolinė juostelė, nepriklausomai nuo viruso antigeno buvimo tiriamajame mėginyje, visada pasirodo kontrolinėje ('C') dalyje (2.5.2 pav.).



2.5.2 pav. **Greitasis imunochromatografinis tyrimas (RIDT)** (vidurinė juostelė Neigiama, o apatinė – Teigiama).

Pastaba: pagal [http://bionote.co.kr/File/Upload/2010/01/05/2010-01-05\(1\).pdf](http://bionote.co.kr/File/Upload/2010/01/05/2010-01-05(1).pdf)

Šio tyrimo kokybinis rezultatų patikimumas yra pakankamai tikslus lyginant su kitais PSO ir PGSO nurodytais FAT ir RTCIT tyrimo metodais (Kang et al., 2007; Servat et al., 2012).

Vakcinacijos kontrolei naudojami serologiniai tyrimo metodai. Serologinėmis reakcijomis nustatomas antikūnų titro didėjimas. Imuninio atsako stiprėjimo rodiklis yra tam tikrų kraujo serumo specifinių RV antikūnų titro didėjimas per 3-4 savaites po vakcinacijos. Antikūnų, kurių paprastai tiriamasis individas neturi, nustatymas vadinamas serokonversija. Šie metodai naudojami epidemiologinei priežiūrai ir laukinės faunos oralinės vakcinacijos nuo pasiutligės kontrolei ir efektyvumui, taip pat norint nustatyti vakcinuotų naminių gyvūnų antikūnų titrą kraujyje po vakcinacijos. Pagrindiniai serologiniai tyrimų metodai yra viruso neutralizacija (VN) ir imunofermentinė analizė (IFA). Šie metodai naudojami norint nustatyti laukinių ir naminių gyvūnų (kačių, šunų ir šėškų) pasiutligės antikūnus

kraujo serume po vakcinacijos nuo pasiutligės. Naudojant standartinį virusų neutralizacijos (“*gold standard*”) tyrimo metodą (VN) įvertinamas virusą neutralizuojančių antikūnų kiekis, kuris parodo susidariusį imuninį atsaką prieš pasiutligės virusą (Hooper et al., 1998). Kitas metodas yra netiesioginis IFA testas, kuriam atlikti nereikalingos specialios patalpos ir greitai gaunami tyrimo rezultatai. Siekiant išsiaiškinti kokie serologiniai metodai geriausiai tinka rutininiai diagnostikai, Europos šalių laboratorijose buvo atliekami plataus masto tyrimai. Juose dalyvavo nemažai Europos šalių referentinių laboratorijų. Daugelyje straipsnių yra pateikta tarp VN ir IFA tyrimo metodų gauta koreliacija ir jiems būdingi skirtumai (Servat et al., 2007). Lietuvoje apie taikomų pasiutligės VN ir IFA metodų specifiškumą ir jautrumą duomenų nėra.

### 2.5.3. Molekuliniai tyrimo metodai

Šiuo metu žmonių ir gyvūnų pasiutligės diagnostikai plačiai taikomi molekulinės biologijos metodai. Vienas iš jų yra pasiutligės viruso RNR nustatymas polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu. PGR yra viena iš plačiausiai naudojamų viruso nukleininės rūgšties nustatymo metodų. (Tordo et al., 1995; Tordo et al., 1996(b)). PGR metodu galima greitai (per 1–2 dienas) aptikti gyvų ir net žuvusių *lyssavirus* ribonukleorūgštį, taip pat galima nustatyti pasiutligės viruso genomą formaline fiksuotuose mėginiuose (Kulonen et al., 1999) ir diagnozuoti pasiutligę žmonėms iš seilių ir nugaros smegenų skysčio (Crepin et al., 1998). Tuo tarpu virusus identifikuojant patologinėje medžiagoje standartiniu metodu, tyrimui gali prireikti 1–3 persėjimų ląstelių kultūrose, o tai gali trukti keletą savaičių. Nors virusų išskyrimas ląstelių kultūrose laikomas standartiniu diagnostiniu metodu, PGR metodas gali būti netgi jautresnis, todėl šis metodas vis plačiau taikomas pasiutligės diagnostikai (OIE, 2011).

AT-PGR procedūra atliekama sekančiai: atliekamas RNR išskyrimas iš mėginio, cDNR sintezė su specifiniu pradmeniu, cDNR dauginimas su specifiniu pradmeniu ir vizualinis vertinimas horizontalios elektroforezės

agaro gelyje, dažant produktą etidžio bromidu (EtBr) ir vertinant UV šviesoje (Heaton et al., 1999). Šiuo metu AT-PGR plačiai yra naudojamas prieš- ir pomirtiniai pasiutligės diagnozei nustatyti, taip pat *Lyssavirus* genotipo nustatymui (Wakeley et al., 2005; Nagaraj et al., 2006; Saengseom et al., 2007). Pasaulyje pasiutligės diagnostikai ir skirtingų genomo dalių išaiškinimui plačiai naudojamas AT-PGR metodas N geno srityje (Kulonen et Boldina, 1993; Bourhy et al., 1993; Ito et al., 2003). AT-PGR metodu buvo nustatytas ir išaiškintas klasikinės pasiutligės virusas (1 genotipas), taip pat ir giminingas pasiutligei EBLV (5 ir 6 genotipai), taip pat nustatyti skirtumai tarp giminingų pasiutligės virusų genotipų (Black et al., 2000, 2002).

Pradmenys pasirenkami priklausomai nuo PGR taikymo tikslų: ar tyrimas atliekamas diagnostikai, ar nustatomos įvairių viruso genomo regionų sekos, ar atliekama molekulinė epidemiologija bei virusų sekvenavimas (Crepin et al., 1998; David et al., 2008). PGR metodais galima diferencijuoti RV epizootines ir vakcinines padermes, galima nustatyti, kokio tipo virusais individas užsikrėtęs. Be to, šie metodai gali būti taikomi *lyssavirus* genotipų diferenciacijai (Botvinkin et al., 2003, Picard-Meyer et al., 2004, Vasquez-Moron et al., 2006; Dietzscold et al., 2005; Kuzmin et al., 2010).

Lietuvoje pasiutligės virusų nustatymui nuo 2005 metų pradėta naudoti RTCIT metodika. Nors PGR metodas, nustatantis viruso ribonukleorūgštį, yra žymiai greičiau atliekamas, jis buvo taikomas iki 2005 metų Lietuvoje tik moksliniais tikslais. Tačiau, nuo 2006 metų kai Lietuvoje buvo pradėta vykdyti laukinių gyvūnų ORV nuo pasiutligės – PGR metodas buvo pradėtas taikyti rutininėje diagnostikoje.

#### 2.5.4. Pasiutligės viruso identifikavimas

Pelių užkrėtimo metodas (MIT) (angl. *Mouse inoculation test*) yra vienas iš pirmųjų pasiutligės viruso identifikavimo metodų. Intracerebraliai užkrečiamos šešios 3-4 savaičių amžiaus (12-14 g), ar tik gimusios 2-jų dienų laboratorinės baltos pelės. Užkrėtimui naudojamas homogenizuotos galvos smegenų medžiagos (smegenų žievė, Amonio ragas, smegenėlės)

supernatantas, paruoštos specialiaame tirpale su antibiotikais. Prieš užkrėtimą pelės užmigdomos. Pelės yra stebimos 28 dienas. Jei per pirmas 4 dienas nuo užkrėtimo pelės nugaišta – vertinama kaip nespecifica, vėliau kiekvienai gaišusiai pelei atliekamas FAT pasiutligei nustatyti (Koprowski, 1996, OIE, 2011). Jei po 28 dienų užkrėstos pelės nenugaišta arba iš nugaišusių pelių nebūna nustatyta pasiutligė, tvirtinamas neigiamas pasiutligės atvejis. Taip pat šis metodas gali būti naudojamas seilių liaukų ir seilių mėginiams tirti (Adeiga and Audu, 1996; Delpietro et al., 2001).

Audinių kultūrų infekavimo pasiutligės virusu metodas (RTCIT) yra plačiai naudojamas tyrimo metodas pasiutligės „lauko“ viruso identifikavimui. RTCIT metodo atlikimo technika daug paprastesnė ir pigesnė negu MIT, o svarbiausia, kad šiuo metodu žymiai greičiau gaunami tyrimo rezultatai. Įvairioms pasiutligės virusų padermėms auginti ir išskirti buvo tiriamos įvairios ląstelių kultūros (Crick et King, 1988). Iš pradžių pasiutligės „lauko“ virusą buvo bandyta išskirti naudojant BHK-21 ląstelių kultūras, tačiau gauti rezultatai buvo netikslūs, nes šių ląstelių jautrumas buvo mažesnis lyginant su MIT. Pasiutligės „lauko“ virusui išskirti buvo išbandytos ir kitos ląstelių kultūros: viščiuko embriono fibroblastų (CEF), McKoy, galvijų (CB3), pelių, kačių ir žmogaus glialinės, žmogaus monocitų U937 ir THP-1, pelės makrofagų IC-21, pelės monocitų WEHI-3BD ir PU5-1R, pelės monocitų P388D1 ir J774A, šikšnosparnio, skunko, šuns ir meškėno (Tollis et al., 1988), taip pat inkstų epitelio ląstelės iš Afrikos žaliosios beždžionės Vero ir McCoy (Smith et al., 1978; Clark, 1980; Celer et al., 1991; Ray et al., 1995, 1997; Nogueira, 2004). Tuo tarpu Tollis su kolegomis (Tollis et al., 1988) palygino MNA (angl. *Murine neuroblastoma*), BHK-21 ir šunų fibrosarkomos A-72 ląstelių jautrumą ir patvirtino, kad MNA yra jautriausios ląstelės pasiutligės „lauko“ viruso padermei. Dabar BHK-21 ląstelės yra naudojamos keletui serologinių tyrimų ir pasiutligės „fiksuoto“ viruso padermės tyrinėjimams. Šiuo metu pasiutligės „lauko“ viruso padermės išskyrimui yra naudojama pelių neuroblastomų ląstelių linija MNA, kuri yra pripažinta jautriausia iš visų kitų tyrimams naudotų ląstelių linijų (Rudd ir Trimarchi, 1989). Ląstelių



infekavimas RV yra nustatomas naudojant FAT testą. Testo rezultatai gali būti įvertinami ne anksčiau kaip po 18 valandų. Galutiniai rezultatai gaunami po 72 val. Rezultatai yra vertinami invertuotu liuminescenciniu mikroskopu. Šis testas yra jautresnis, negu MIT, tačiau reikalauja specialių laboratorinio darbo įgūdžių. Šį RTCIT metodą rekomenduoja PSO ir PGSO (Webster et al., 1996; OIE, 2011). Lietuvoje pasiutligės RTCIT nuo 2005 metų naudojama N2a ląstelių linija. Apie Lietuvoje naudojamo N2a ląstelių linijose RTCIT tyrimo metodo jautrumą ir specifiškumą duomenų nėra, nebuvo tyrinėti ir kokybiniai rodikliai.

## 2.6. Imunoprofilaktikos priemonės nuo pasiutligės

Vakcinacija – tai antigeno įvedimas į organizmą jo imuninės sistemos sužadimui, siekiant apsaugoti nuo užkrato arba susilpninti jo pasekmes. Vakcinacija laikoma pačiu veiksmingiausiu ir ekonomiškiausiu būdu užkirsti kelią infekcinėms ligoms. Pirmąją veiksmingą nuo pasiutligės gyvąją vakciną viruso nusilpninimo būdu 1885 metais pagamino prancūzų mokslininkas L. Pasteras (Pasteur, 1885). Jis buvo pirmasis, kuris, remdamasis tik jam vienam žinoma logika, nežinodamas virusų reprodukcijos, genetikos dėsnimų, pagamino veiksmingus skiepus žmonių pasiutligės imunoprofilaktikai (Dietzschold et al., 2003). Šiuo metu vakcinų nuo pasiutligės gamybai yra naudojamos šios nusilpnintų RV padermės: Pastero virusas (PV), Evelyn Rokitnicki Abelseth (ERA), Street Alabama Dufferin (SAD), 3aG, Fuezalida S-51 ir S-91, NI-CE (Nishigahara- Chimeric), SRV9, PM, Nishigahara, RC-HL, Kleev, Flury, “Shelkovo-51”, O-73 Uz-VGNKI”, RV-71”, Krasnopresninski-85 ir RV-97 padermės (Steck, 1982; Fodor et al., 1994; Gruzdev and Nedosekov, 2001; Ito et al., 2001; Borisov et al., 2002).

SAD padermė buvo išskirta iš pasiutlige sergančio šuns Alabamos valstijoje (JAV) 1935 metais, vėliau nusilpninta užkrečiant pelių galvos smegenų ląsteles ir po to žiurkėnų inkstų ląsteles (BHK ląsteles) (Steck, 1982). Tokiu pat būdu buvo sukurtos dar dvi pagrindinės RV padermės: ERA ir Vnukovo-32. SAD padermės yra keletas variantų: SAD-Berne, SAD B19,

SAD-P5/88, taip pat nevirulentiškos SAG-1 ir SAG-2. SAD grupės vakcinos yra plačiai naudojamos visame pasaulyje (Austin et Hughes, 2009).

Pasiutligės imunoprofilaktikai yra naudojamos kelios vakcinų rūšys: gyvosios susilpnintos, vektorinės rekombinantinės ir DNR vakcinos.

Gyvos susilpnintos vakcinos – vakcinoms gaminti RV yra apdorojamas sumažinant patogeniškumą, bet išlaikant imunogeniškumą bei galimybę replikuoti. Vakcinoms gaminti naudojamos virusų padermės, selekcijos būdu atrinktos iš laboratorijose gautų neoptimalioje aplinkoje kultivuotų virulentiškųjų, labai imunogeniškų variantų, kultivuojamų dirbtinėmis sąlygomis ir genotipiškai stabiliai praradusių savo virulentiškumą. Naudojant SAD Berne padermės nusilpnintus virusus klonuotose BHK ląstelėse gaminamos SAD B19 ir SAD P5/88 vakcinos (Impfsoffwerk Dessau-Tornau) (Schneider and Cox, 1983). Plačiausiai iš visų yra naudojama SAD B19 viruso padermės vakcina skirta oralinei vakcinacijai nuo pasiutligės, nes atlikti eksperimentiniai tyrimai parodė šios padermės aukštą imunogeniškumą ir saugumą (Vos et al., 2000; Neubert et al., 2001). Pasiutligės virusų padermės, gautos iš SAD Berne virusų padermės, gali būti sunkiai kontroliuojamos dėl patogeniškumo kitoms gyvūnų rūšims (EC, 2002). Bazių sekos pakitimai, įvykstantys replikacijos metu, yra vienas iš mutacijų-atsitiktinių pasikeitimų genuose – atsiradimo būdų. Kartkartėmis atsirandančios retos genų mutacijos yra naudingos, nes genetinis kintamumas yra evoliucijos proceso žaliava. Todėl tiesioginės geninės mutacijos būdu iš SAD padermės buvo gautos dvi modifikuotos vakcinų padermės SAG-1 ir SAG-2. SAG-1 turi vieną pakeistą nukleotidą, o SAG-2 turi du pakeitimus pasiutligės viruso glikoproteino aminorūgščių 333 pozicijoje (Follmann et al., 1996). Atlikti tyrimai parodė, kad naudojama oralinei imunizacijai SAG-2 vakcina nuo pasiutligės yra saugi ir efektyvi (Fekadu et al., 1996; Masson et al., 1996; Bingham et al., 1999; Lambot et al., 2001; Cliquet et al., 2006, 2007, 2008). Šių vakcinų naudojimas gyvūnams ir žmonėms yra paplitęs kai kuriose šalyse kaip imunoprofilaktikos priemonė nuo pasiutligės. Gyvos susilpnintos vakcinos taip pat plačiai naudojamos oralinei laukinių gyvūnų imunizacijai: SAD B19 ir

kitos SAD padermės, modifikuotos SAG1 ir SAG2 (Brohier et al., 1991; Vos et al., 2000; Austin and Hughes, 2009). Rusijoje vakcininė viruso RV-97 padermė naudojama vakcinos “Sinrab” gamybai. RV-97 buvo gauta iš RB-71 padermės Vitebske. Šių dviejų vakcininių virusų padermių prototipas buvo viruso padermė “Sheep”, gauta iš PV (Pastero viruso) padermės (Gruzdev et Nedosekov, 2001). RV-97 padermė yra pritaikyta kultivuoti BHK-21 ląstelių kultūrose (Borisov et al., 2002).

Rekombinantinių vektorių vakcinos. Virusinis vektorius - tai genų inžinerijos būdu gauti rekombinantiniai virusai, turintys patogeno antigeną koduojančią rekombinantinę DNR. Vakcinuojamasis yra infekuojamas vektoriumi, o patogeninė DNR yra transkribuojama ir transliuojama vakcinos virusuose arba ląstelėse (pvz., jei vektorius mielių ląstelės). Nesvarbu, kokia vektoriaus prigimtis, visi jie turi būti specifiški taikiniams (ląstelėms ar audiniams), genų ekspresijos trukmė turi būti pakankama, o svarbiausia, genų pernešimas ir ekspresija turi būti saugūs. Tam tikslui iš patogeninio mikroorganizmo nukleorūgšties genų inžinerijos metodais „iškerpamas“ segmentas, koduojantis vienos ar kitos medžiagos sintezę (Usonis, 2002). Šis segmentas perkeliamas į kito mikroorganizmo genomą ir toks genetiškai pakeistas mikroorganizmas gamina jam nebūdingas antigenines medžiagas. Kartu su reikiamaisiais terapiniais genais į vektorius gali būti įterpti ir indukuojami promotoriai, leidžiantys reguliuoti įterptų genų ekspresiją (Usonis, 2002).

Šios klasės vakcinos yra labai efektyvios bei saugios, tačiau joms kurti reikia labai modernių technologijų. Tuo tikslu gana plačiai naudojamas raupų vakcinos viruso (*vaccinia*) genomas (Bakienė, 2008). Tai rodo, kad raupų vakcinos virusas yra saugi priemonė kitų virusų antigenų raiškai, todėl tinka šių sudėtingų vakcinų gamybai. Raupų vakcinos-pasiutligės virusų rekombinantai naudojami kovai su pasiutlige Europos lapių populiacijoje (Bakienė, 2008). Viena iš tokių yra V-RG (angl. *Vaccinia-Rabies Glycoprotein*) vakcina (Kieny et al., 1984; Wiktor et al., 1984). Ji taikoma laukinių mėsėdžių imunizavimui: rudosioms lapėms, šunims ir usūriniais šunims. Vakcinoje naudojamo pasiutligės viruso glikoproteino

imunogeniškumas buvo ištirtas atliekant bandymus su rudosiomis lapėmis, šunimis ir usūriniais šunimis, arktinėmis lapėmis, šernais, Eurazijos bebrais, su įvairių rūšių pelėmis ir paukščiais – pelėsakaliais, juodosiomis varnomis, šarkomis ir kėkštais (Brochier et al., 1990, 1991, 1996; Desmettre et al., 1990, Lambot et al., 2001; Cliquet et al., 2006).

Inaktyvuotos (negyvos) vakcinos nuo pasiutligės – preparatai, gauti iš inaktyvuotų virusų arba jų apsauginių antigenų. Lyginant su nusilpnintomis gyvosiomis jos yra mažiau imunogeniškos, tačiau gali įjautrinti organizmą ir suteikti pakankama imunogeniškumo krūvį paskiepijus. Dažniausiai šos vakcinos yra naudojamos žmonių ir naminių gyvūnų imunopropilaktikai nuo pasiutligės (Dietzschold et al., 2003, WHO, 2010). Atliekant ORV su VRG vakcina tyrimus vampyriams šikšnosparniams, imuninis atsakas pasiutligei pastebėtas jau 18-30 d (Setien et al., 1998). Pavasarį didelę lapių populiacijos dalį sudaro lapiukai, kurie turi antikūnus prieš pasiutligės virusą. Tai įtakoja lapiukų vakcinacijos efektyvumą. V-RG vakcina yra pranašesnė už kitas vakcinas imunizuojant lapiukus, turinčius antikūnų prieš pasiutligės virusus. V-RG vakcinos visiškai nepavojingos žmonėms ir aplinkai, nors 1999 metais Jungtinėse Amerikos Valstijose V-RG vakcinos sukelta neigiama reakcija buvo nustatyta nėščiai moteriai, kuri pasveiko negydant (Rupprecht, 2001). Todėl tokiomis vakcinomis, pagamintomis raupų vakcinos viruso pagrindu, ne visada tikslinga skiepyti žmones, nes didžioji žmonių populiacijos dalis buvo skiepyta šiuo virusu ir tai gali duoti silpną imuninį atsaką į rekombinantinį virusą (Bakienė, 2008).

Literatūros šaltiniuose dažniausiai aprašomi virusiniai vektoriai – *Pox (vaccinia virus)*, *Adeno (AV)*, *Canine Herpes (CHV)* ir *Retrovirus (ŽIV)* virusai (Kieny et al., 1984; Wiktor et al., 1984). Tas pats vektorius gali būti naudojamas skirtingų vakcinų gamyboje. Pasiutligės vakcinose naudojamas pasiutligės viruso glikoproteinas. Laukinių gyvūnų oralinei imunizacijai sukurta V-RG vakcina raupų (*pox vaccinia*) viruso pagrindu ekspresuoja SAD padermės glikoproteiną (Wiktor et al., 1984; Winkler et al., 1992, Meslin et al., 1994). Adrab.gp vakcina - *Adeno* virusas ekspresuoja pasiutligės ERA

padermės viruso glikoproteiną sukeldamas imuninį atsaką šunims (Tims et al., 2000). Vakcinoje nuo pasiutligės sėkmingai naudojamas *Canine Herpes* virusas (CHV) ekspresuoja pasiutligės viruso glikoproteiną (Xuan et al., 1998). Atlikti bandymai su katėmis naudojant meškėnų raupų viruso (RCNV) rekombinantinę vakciną (divalentę) nuo kačių panleukopenijos (kačių marą) ir nuo pasiutligės (Hu et al., 1997). Taip pat yra sukurta rekombinantinė pasiutligės viruso vakcina iš dviejų identiškų glikoproteino (G) genų (SPBNGA-GA) (Faber et al., 2002). Literatūroje aprašomos mėšėdžių oralinės vakcinacijos, kur sukurta vakcinos SAD dIND1 prototipas su pašalintu fosfoproteino (P) genu, slopinant IFN- $\alpha$  indukciją, yra lyginamos su SAD B19 vakcinine paderme (Vos et al., 2011).

DNR vakcinos – tai naujos rūšies skiepai. Šiuos skiepus sudaro tik DNR molekulės, koduojančios reikiamus antigenus (kai kada papildomai – ir atsaką stiprinančias molekules, pvz., citokinus) (Bakienė, 2008). Šių vakcinų, dar vadinamų “genetinėmis vakcinomis” esmė tokia, kad tiesiogiai į recipiento ląstelę įskiepijama nesidauginanti plazmidė, kuri koduoja svetimo proteino sintezę, o pastarasis sukelia stiprų imuninį atsaką (Usonis, 2002). Naudojant keletą gyvūnų rūšių (peles, šunis ir beždžiones) buvo patikrintas DNR vakcinų efektyvumas ir nustatyta, jog jos sukelia panašų kiekį neutralizuojančių antikūnų ir apsaugo organizmą panašiai kaip ir inaktyvuotos vakcinos (Ray et al., 1997; Wang et al., 1998, Bahloul et al., 1998, Perrin et al., 1999; Lodmell, 1999; Osorio et al., 1999; Lodmell et al., 2000, 2002). Remiantis gautais tyrimų rezultatais su pelėmis nustatyta, kad vienintelė DNR vakcinos injekcija yra tokio pačio efektyvumo kaip mažiausiai penkios iš ląstelių kultūrų gautos vakcinos injekcijos (Bahloul et al., 2003).

Laukinės faunos oralinė vakcinacija nuo pasiutligės. Tuo laikotarpiu kai nebuvo naudojamos oralinės vakcinos, laukinės faunos pasiutligės kontrolė buvo vykdoma tik sumažinant rūšių rezervuarą (Aubert, 1994). Šiuo metu pasiutligė yra vienintelė zoonozė, kuri laukinėje faunoje gali būti kontroliuojama oraline vakcinacija. Praeitame amžiuje atsirado sąvoka - aktyvios imunizacijos tvarkymas laukinėje faunoje (Baer et al., 1975). Tačiau

daug sunkumų buvo dėl vakcinės formos, išplitinimo metodų ir panaudojimo kontrolės, o svarbiausia dėl galimo neišaiškinto patogeniškumo pasireiškimo. Todėl kelios laboratorijos atliko praktinius tyrimus (Wandeler, 2000) su įvairiais išplitinimo metodais, įtraukiant ir vakcinės masalus, kurie buvo pažymėti patino vilna (Winkler and Bogel, 1992; Matter et al., 1998). Iš pradžių, prie plastikinio indo su vakcina buvo prikabinama vištos galva (Steck et al., 1982), bet pastaruoju metu yra gaminami ir tiriami įvairių tipų vakcinų masalai iš įvairių maisto mišinių (Linhart et al., 1997). Viena iš plačiausiai Europoje naudojamų vakcinų yra SAD B19 viruso padermės vakcina: 70 milijonų vakcinės masalų buvo panaudota tarp 1983-1988 (Vos et al., 2000). Tuo tarpu Vokietijoje ir Austrijoje per 1983-1986 metus lapių oralinei vakcinacijai nuo pasiutligės buvo panaudota 97 milijonai vakcinės masalų. Kaip vakcina buvo naudojamos SAD B19 (53,2%) ir SAD P5.88 (44,5%) padermės, ir nuo 2007 metų keliuose regionuose nebuvo nustatyta teigiamų pasiutligės atvejų (Muller et al., 2009). Keletas šalių yra laisvos nuo pasiutligės: Kipras, Danija, Graikija, Airija, Malta, Portugalija, Ispanija, Švedija ir Didžioji Britanija. Kitos šalys jau keletą metų neturi pasiutligės atvejų, todėl taip pat yra laisvos nuo pasiutligės, tačiau vykdo ORV programas: Austrija, Belgija, Estija, Čekijos respublika, Suomija, Prancūzija, Vokietija, Liuksemburgas, Olandija. Tačiau šalyse, kuriose atliekama pasiutligės ORV programa, pateikiami pranešimai apie pasiutligės atvejus iš endeminių vietų: Bulgarija, Vengrija, Italija, Latvija, Lietuva, Lenkija, Rumunija, Slovakija, Slovėnija (Cliquet et al., 2010).

ORV programa Lietuvoje pradėta 1995 metais ir atliekama pagal Nacionalinę pasiutligės prevencijos programą panaudojant žymėtąją SAG1 (Virbac, Prancūzija) vakciną iki 1997 metų (Milius et al., 2004). 1998 metais buvo naudojama kita žymėta SAD Bern (Lysvulpen, Bioveta, Čekija) vakcina, o 1999–2000 metais – pasiutligės susilpninta vakcina SAD P5/88 (Rabifox, Vokietija) (Milius et al., 2004). Pagal šią programą buvo vakcinuojama du kartus per metus (kovo – balandžio ir spalio – lapkričio mėnesiais), masalai su vakcina buvo skirstomi didesnėje nei 10 tūkst. kv. km

teritorijoje pagal standartinį jaukų mėtymo dažnumą (15-20 masalų/km<sup>2</sup>) (Milius et al., 2004).

Literatūros apžvalgoje pateikti duomenys rodo, kad pasiutligės atvejai yra vis dar registruojami kai kuriose Europos šalyse. Dėl šios priežasties rengiamos pagrindinės pasiutligės priežiūros priemonės gyvūnų populiacijose nustatčius pasiutligę. Pasiutligės diagnostikai naudojami patikimi antigeno ir viruso nustatymo metodai, nurodyti PSO (WHO, 2004) ir PSGO (Cliquet and Barat, 2008). Todėl pasiutligei diagnozuoti labai svarbu taikyti greitus, jautrius ir specifiskus diagnostikos metodus, kurie yra vienas iš kertinių pasiutligės likvidavimo elementų. PSO ir PSGO nuolat rengia ir atnaujina tarptautinius pasiutligės diagnostikos ir kontrolės priemonių reikalavimus (EC Commission, 2002). Kadangi pasiutligė yra nepagydoma liga, todėl labai svarbi šios infekcijos imunoprofilaktika. Pasiutligės vakcinų partijos kokybė ir saugumas prieš vakcinaciją turi būti tiriamas tarptautinėse pasiutligės referencinėse laboratorijose pagal PSO rekomendacijas ir PSGO standartus (WHO, 2004; OIE, 2004). Naudotų Lietuvoje vakcinų partijos kokybė ir saugumas prieš ORV, buvo tirama tarptautinėje pasiutligės referentinėje laboratorijoje Fridrich Loeffler institute, Vokietijoje. Pagal Europos farmakopėjos rekomendacijas vienos dozės vakcininis pasiutligės viruso titras, užtikrinantis 100% apsaugą, turi būti stabilus +25°C temperatūroje ne trumpiau kaip 7 dienas. Pasiutligės virusų ar glikoproteinų minimalus kiekis vakcinose sudėtyje turi būti 10 kartų didesnis už apsauginę dozę (Blancou et al., 1986). Virusų stabilumui labai svarbios yra vakcinų laikymo ir transportavimo sąlygos. Gyvū virusų modifikuotos vakcinose turi būti laikomos – 20°C temperatūroje (EC, 2002). Prieš atliekant ORV Lietuvoje 2006 metais buvo atliktas susilpnintos SAD Berne padermės vakcinose stabilumo įvertinimas nepalankiomis oro sąlygomis iki ji buvo suėsta gyvūno (Mačiulskis et al., 2008).

Pasiutligės epidemiologiniai duomenys Lietuvoje laukinių ir naminių gyvūnų populiacijose buvo analizuoti tik iki 2003 metų. Lietuvoje nuo 2006 metų buvo įgyvendinta pasiutligės laukinių gyvūnų imunoprofilaktikos priemonių programa ir, ES Komisijai koordinuojant, vakcinacija, vykdoma

visose Baltijos šalyse (Lietuvoje, Latvijoje ir Estijoje). Laukinių gyvūnų pasiutligės likvidavimo kampanija finansuojama iš 2003 metų PHARE projekto „Gyvūnų užkrečiamųjų ligų kontrolės stiprinimas Lietuvoje“ lėšų. Lietuvoje 2006–2011 metais laukinių gyvūnų imunizacijai nuo pasiutligės buvo naudotos gyvūnų nusilpnintų virusų vakcinos.

Pasiutligės imunoprofilaktikos priemonės 2006-2011 metais Lietuvoje buvo taikomos naminiams gyvūnams augintiniams (šunims, katėms ir šėškams) ir stambiems žemės ūkio gyvuliams naudojant inaktyvuotas pasiutligės virusų vakcinas. Aktyviai imunizacijai nuo pasiutligės buvo naudojama inaktyvuota Biocan R vakcina (Bioveta, Čekijos Respublika), skirta šunims, katėms, kailiniams žvėreliams, galvijams, arkliams, avims, ožkoms ir kiaulėms. Taip pat dažnai buvo naudojama inaktyvuota pasiutligės Pastero RV padermės vakcina Nobivac Rabies (Intervet International, Olandija) skirta šunims, katėms, galvijams, avims, ožkoms, lapėms, šėškams, arkliams. Naminiai gyvūnai (šunys, katės ir šėškai) buvo vakcinuojami pagal nustatytus gyvūnų sveikatos reikalavimus, nurodytus Europos Parlamento ir Tarybos reglamente (EB) Nr. 998/2003, taikomus nekomerciniam naminių gyvūnėlių judėjimui tarp Europos Sąjungos šalių. Be to, pagal šiuos reikalavimus prieš įvežant gyvūnus augintinius į nurodytų valstybių narių teritoriją būtinas pasiutligės vakcininių antikūnų titro nustatymas, siekiant patvirtinti pakankamą apsauginį pasiutligės vakcininių antikūnų lygį. Sušvirkšta vakcina, gyvūnų organizme aktyvina daugelį apsauginių organizmo mechanizmų (makrofagus, opsoninus, interleukinus, B limfocitus ir t. t.), todėl susidaro specifiniai vakcinoms antigeniniams komponentams antikūnai. Antikūnai neleidžia plisti patekusiems ligos sukėlėjams. Pagal PGSO ekspertų komiteto rekomendacijas (OIE, 2005), minimalus vakcininių pasiutligės antikūnų kiekis, apsaugantis nuo pasiutligės infekcijos, turi būti ne mažesnis kaip  $\geq 0,5$  TV/ml kraujo serumo (OIE, 2005). Lietuvoje 2006-2011 metais profilaktiškai nuo pasiutligės viruso buvo skiepijami naminiai gyvūnai (šunys, katės ir šėškai), per šį laikotarpį buvo suskiepyta virš 1 077 407 milijono



gyvūnų. Taip pat buvo skiepijami ir kiti stambūs naminiai gyvūnai: galvijai (254490), arkliai (4757), avys ir ožkos (2261) ir kiti gyvūnai (2186).

Šiuo metu yra svarbu atlikti laukinių ir naminių gyvūnų pasiutligės epidemiologinę analizę, nustatant nukentėjusių nuo laukinių ir naminių gyvūnų žmonių skaičių, vakcinacijos apimtį ir poveikį, įvertinant laukinių ir naminių gyvūnų pasiutligės vakcinacijos efektyvumą.

### 3. TYRIMO METODAI

Mokslinis tiriamasis darbas buvo atliktas 2008–2012 metais Vilniaus Universiteto Imunologijos institute (nuo 2009 12 23 Valstybiniame mokslinių tyrimų institute Inovatyvios medicinos centre Imunologijos departamente) ir Nacionalinio Maisto ir Veterinarijos rizikos vertinimo instituto Virusologinių tyrimų skyriuje. Kartu su Užkrečiamųjų ligų ir AIDS centro (ULAC) Imunoprofilaktikos skyriaus vedėja D. Razmuviene buvo atlikta žmonių pasiutligės epidemiologinės situacijos ir imunoprofilaktikos analizė ir įvertinimas. Visi tyrimai buvo atlikti laikantis 2009 01 22 Lietuvos Respublikos valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus įsakymu priimto įstatymo reikalavimų: dėl gyvūnų skirtų eksperimentiniams ir kitiems mokslo tikslams, laikymo, priežiūros ir naudojimo Nr. B1-639 (“Valstybės žinios”, 2009 01 22, Nr. 8-287).

#### 3.1. Tyrimų objektas ir schema

Per 9 metų (2003–2011) laikotarpį įvertinta pasiutligės epidemiologinė situacija, atlikti laukinių gyvūnų ir naminių gyvūnų pasiutligės atvejų tyrimai iš galvos smegenų audinių imunologiniais, virusologiniais ir molekulinės biologijos tyrimo metodais. 2006–2011 metais Lietuvoje buvo atliekama laukinių gyvūnų oralinė vakcinacija nuo pasiutligės naudojant SAD Bern Lysvulpen ir SAD B19 nusilpnintas vakcinas, taip pat buvo atlikti laukinių (rudųjų lapių, usūrinių šunų) ir naminių (šunų, kačių ir šėškų) gyvūnų serologiniai kraujo tyrimai ir įvertintas vakcinacijos efektyvumas.

Medžiaga imunologiniams, molekuliniais ir serologiniams tyrimams buvo renkama visoje Lietuvos teritorijoje radus kritusį ar įtariant pasiutlige sergantį laukinį ar naminį gyvūną. Kraujo serumo mėginiai buvo atsitiktinai atrenkami medžioklės metu, iš nušautų įvairaus amžiaus ir lyties rudųjų lapių ir usūrinių šunų.

Mėginiai buvo pristatomi laikantis griežtų pasiutligės mėginių paėmimo ir pristatymo reikalavimų (OIE, 2011). Laukiniai ir naminiai

gyvūnai buvo tirti iš visos Lietuvos teritorijos FAT metodu (n=17747) (OIE, 2011). Nuo 2005 metų atlikti pasiutligės FAT ir RTCIT metodų palyginamieji tyrimai usūrinių šunų (n=1181) ir rudųjų lapių (n=1587) populiacijose. Nuo 2007 metų nustatytiems FAT metodu teigiamiems pasiutligės mėginiams (n=75) buvo atlikti pasiutligės viruso identifikavimo (RTCIT) ir molekuliniai (AT-PGR) tyrimai (OIE, 2011). Tiriamasis darbas buvo atliktas pagal 3.1.1. *paveiksle* pateiktą schemą.

### I Etapas

**Laukinių ir naminių gyvūnų pasiutligės paplitimo analizė (2003-2011 m.)**

### II Etapas

**Pasiutligės paplitimo geografiniai ypatumai (2007-2011 m.)**

Pasiutligės tyrimai (FAT, RTCIT ir AT-PGR)

FAT ir RTCIT jautrumo ir specifiškumo nustatymas

### III Etapas

**Pasiutligės diagnostiniai tyrimai laukinių gyvūnų populiacijose (2003-2011 m.)**

### IV Etapas

**Pasiutligės viruso filogenetinė analizė (2007-2011 m.)**

(Laukinių gyvūnų 59 mėg., naminių gyvūnų 16 mėg.)

### V Etapas

**Pasiutligės serologinių tyrimo metodų įvertinimas (Rudųjų lapių 50 mėg.)**

Pasiutligės tyrimai (IFA ir FAVN)

IFA jautrumo ir specifiškumo nustatymas

### VI Etapas

**Pasiutligės FAT ir RTCIT tyrimo metodų įvertinimas**

(Usūrinių šunų ir rudųjų lapių - 2768 mėg.)

### VII Etapas

**Usūrinių šunų ir rudųjų lapių ORV nuo pasiutligės efektyvumo vertinimas IFA metodu (2006-2011 m.), (4122 mėg.)**

### VIII Etapas

**Imunoprofilaktikos priemonių analizė Lietuvoje (2006-2011 m.)**

3.1.1 pav. Bendra tyrimų schema

Lietuvoje 2006-2011 metais (jau 6 metai) du kartus per metus pavasarį ir rudenį, buvo vykdoma laukinių gyvūnų ORV, naudojant SAD Bern Lysvulpen nusilpnintą vakciną (Bioveta, Čekijos Respublika), o nuo 2011 metų pradėta naudoti nusilpnintą SAD B19 Fuchsoral vakcina (Impfstoffwerk, Vokietija). Vakcina – sudėta į kapsulę, padengtą masalu, kurios sudėtyje yra tetraciklino hidrochloridas. Laukiniam gyvūnui ėdant masalą, plyšta kapsulė, kuri sužeidžia burnos gleivinę. Per pažeistą gleivinę virusas patenka į organizmą ir aktyviai imunizuoja laukinį gyvūną nuo pasiutligės.

Naminių gyvūnų (šunų, kačių ir šėškų) 2006-2011 metais pasiuligės vakcinacijos efektyvumo įvertinimui FAVN tyrimo metodu (OIE 2011) kraujo serumo mėginiai buvo atrinkti ir tiriama pagal nustatytus gyvūnų sveikatos reikalavimus nurodytus Europos Parlamento ir Tarybos reglamente (EB) Nr. 998/2003, kuris taikomas nekomerciniam naminių gyvūnėlių judėjimui tarp Europos Sąjungos šalių.

Pasiutligės žmonių epidemiologinei situacijai ir imunoprofilaktikai Lietuvoje 2006–2010 metais įvertinti naudojant LR Sveikatos apsaugos ministerijos (SAM) reikalavimus buvo iširtas būtiniosios medicinos pagalbos teikimas bei epidemiologinės priežiūros tvarka išaiškinant pasiutligės židinius. Užkrečiamų ligų ir AIDS organizuoja žmonių pasiutligės epidemiologinę priežiūrą Lietuvoje, siekiant užkirsti kelią jos atsiradimui, įvežimui ir išplitimui. Žmonių pasiutligės epidemiologinė analizė buvo atlikta remiantis ULAC 2006-2010 m. pasiutligės stebėjimais, kuriuose nurodomas nukentėjusių asmenų skaičius, kokie gyvūnai juos sužalojo, kaip buvo atlikta imunoprofilaktika, kiek sunaudota pasiutligės vakcinų ir imunoglobulino. Remiantis pasiutligės imunoprofilaktikos ir būtiniosios medicinos pagalbos teikimo bei epidemiologinės priežiūros tvarka, vakcinacija nuo pasiutligės ir būtinoji medicinos pagalba teikiama visiems, kurie buvo sužaloti ar apseilėti žinomų ar nežinomų gyvūnų, taip pat tiems asmenims, kurie susižalojo teikdami veterinarinę pagalbą gyvūnams bei apdorodami skerdieną ar skrodsami nuo pasiutligės kritusius gyvūnus. Imunoprofilaktiškai buvo vakcinuojami tie žmonės, kuriems dėl profesinės veiklos buvo grėsmė užsikrėsti pasiutlige.

2006–2010 metais žmonių pasiutligės vakcinacijai buvo naudojama išvalyta, inaktyvuota pasiutligės vakcina Verorab® (Sanofi Pasteur, Prancūzija), vakcinuojant į rankos žasto raumenis. Verorab® vakcina yra pagaminta Vero ląstelių pagrindu (Wistar padermės Rabies PM/WI 38-1503-3M) ir yra rekomenduojama skiepyti žmones, kuriems yra didelė užsikrėtimo pasiutlige tikimybė. Profilaktinė arba prieš patenkant į sveikatai pavojingą aplinką vakcinacijos schema yra: pirminė vakcinacija – 3 injekcijos (0, 7, 28 dienomis); pirma kartotinė vakcinacija – po 1 metų; vėlesnis kartotinės vakcinacijos periodas – kas 5 metai.

Esant žmonių kontaktui su pasiutusiais gyvūnais suaugusių žmonių ir vaikų (neimunizuotų) skiepavimo schema yra: 5 kartus po 0,5 ml vakcinos dozės (0, 3, 7, 14 ir 28 dienomis). Imunoglobulinai ir vakcina nuo pasiutligės buvo naudojami nedelsiant sukandžiojimų ir nubrozdinimų kiauurai per odą atvejais. Nuo 2006 iki 2007 Lietuvoje buvo naudojamas imunoglobulinas Favirab (Sanofi Pasteur, Prancūzija), kurio sudėtyje yra arklių imunoglobulino nuo pasiutligės F(ab')<sub>2</sub> fragmentai. Šis imunoglobulinas naudojamas kai nustatoma daug įkandimų veido, galvos, kaklo, rankų srityse, kai laukinio ar naminio gyvūno negalima iširti arba jis įtariamas užsikrėtęs pasiutlige. Imunoglobulinas yra naudojamas kiek įmanoma greičiau po įkandimo 40 TV/kg kūno svorio kartu su pasiutligės vakcina, tačiau ne vėliau aštuntosios dienos po pirmos vakcinos dozės paskyrimo. 2007 iki 2010 metų buvo naudojamas imunoglobulinas Imogam®Rabies (Sanofi Pasteur, Prancūzija), kurio sudėtyje yra žmogaus pasiutligės IgG, kurių minimalus titras 150 TV. Jie skirti naudoti vaikams ir suaugusiems, 20 TV/kg kūno svorio dozė išvirkščiamą vieną kartą, tą pačią dieną kaip ir pirmoji pasiutligės vakcinos dozė. Jei anatomicai įmanoma, reikia kuo daugiau vaisto išvirkšti aplink žaizdas. Likusią dalį per vieną kartą išvirkšti į raumenis, geriausiai į deltinį raumenį, o vaikams – į išorinę šlaunies sritį, priešingą vakcinos injekcijos vietai. Dėl kokių nors priešasčių uždelsus profilaktikos pradžia, imunoglobulinas Imogam®Rabies suleidžiamas nepriklausomai nuo laikotarpio tarp kontakto ir profilaktikos pradžios, iki aštuntosios dienos po pirmos vakcinos dozės skyrimo.

### 3.2. Tiriamųjų mėginių surinkimas

Patologinė medžiaga pasiutligės FAT, RTCIT ir AT-PGR tyrimams buvo imama iš laukinių gyvūnų galvos smegenų, VMVT laboratorijose bei NMVRVI pataloginių anatominių ir histologinių tyrimų skyriuje laikantis darbo saugos su pasiutligės virusu reikalavimų. Atvėrus gyvūni galvos kaukolę smegenys buvo išimamos ir įdedamos į 0,5 litro talpos vienkartinį plastikinį indą su sandariu dangčiu, užrašant numerį ir informaciją apie mėginį. Pasiutligės FAT tyrimas buvo atliekamas iš karto gavus galvos smegenų mėginį, todėl iki tyrimo atlikimo pabaigos mėginys buvo laikomas +4°C temperatūroje. FAT tyrimo metodu rasti teigiami pasiutligės galvos smegenų mėginiai buvo laikomi -70°C temperatūroje iki kitų pasiutligę patvirtinančių RTCIT ir AT-PGR tyrimų atlikimo.

RTCIT tyrimui atlikti iš pasiutligei teigiamų galvos smegenų mėginių buvo ruošiama smegenų suspensija. Tam tikslui į sterilų 50 ml centrifuginį mėgintuvėlį įpilama 10 ml Dulbecco PBS ir 0,4 ml antibiotikų. Mėgintuvėlis buvo įdedamas į -20°C temperatūros šaldiklį. Išėmus mėgintuvėlį iš šaldiklio su jame esančiu sušalusiu ledu į jį buvo sudedamos smegenų dalys ir paruošiama smegenų suspensija: 1 dalis smegenėlių, 1 dalis pailgųjų smegenų, 1 dalis Amonio rago. Mėgintuvėlis buvo gerai supurtomas su jame esančiu sušalusiu Dulbecco PBS (Invitrogen) ir smegenų dalimis iki ištirpsta ledas. Po to mėgintuvėlis buvo centrifuguojamas 30 min. prie 3500 aps./min +4°C šaldomoje centrifūgoje (Eppendorf, Vokietija). Po centrifugavimo paimtas viršutinis suspensijos sluoksnis buvo įpilamas į sterilų 1,8 ml mėgintuvėlį, iš kurio suspensija buvo naudojama ląstelių inokuliavimui. Paruoštas mėginio supernatantas prieš inokuliavimą laikytas +4°C temperatūroje (ilgam saugojimui -70°C-80°C temperatūroje).

Laukinių gyvūnų kraujas ORV nuo pasiutligės serologiniams tyrimams buvo steriliai imamas iš tik nušauto gyvūno širdies venos į 10 ml vakuuminius mėgintuvėlius be antikoagulianto. Kad kraujas nehemolizuotų, kuo greičiau buvo atidaroma nugaišusio gyvūno krūtinės ląsta, paimamas kraujas ir mėginiai kiek įmanoma greičiau buvo siunčiami į laboratoriją tyrimams +18

+22°C temperatūroje. Laboratorijoje kraujo mėginiai buvo centrifuguojami 1500 aps./min. greičiu 15 minučių. Atskirtas kraujo serumas buvo išpilstomas į sterilius plastikinius mėgintuvėlius po 1 ml, mėgintuvėliai sunumeruojami ir iki tyrimo pradžios laikomi - 20°C temperatūroje.

Laukinių ir naminių gyvūnų pasiutligės epidemiologinei situacijai išaiškinti medžiaga laboratoriniams tyrimams buvo renkama iš visos Lietuvos teritorijos. Mėginiai buvo imami tokiais atvejais: a) gyvūną įtarus sergant pasiutlige, tai yra atsiradus būdingiems pasiutligei požymiams (pasikeitus gyvūno elgesiui, atsiradus agresyvumui, parezei, paralyžiui, laukiniam gyvūnui atėjus į sodybą, apsigyvenus ir pan.), b) gyvūnui staiga nugaišus, c) radus kritusį laukinį ar naminį gyvūną. Laukinių ir naminių gyvūnų epidemiologinei situacijai (2003-2011m.) Lietuvoje analizuoti ir įvertinti, NMVRVI Virusologinių tyrimų skyriuje buvo atliekamas pasiutligės viruso nustatymas FAT, RTCIT ir AT-PGR tyrimais.

### **3.3. Imunologiniai, virusologiniai ir molekuliniai tyrimai**

Pasiutligės diagnostika buvo atliekama laikantis biologinės saugos reikalavimų pasiutligės laboratorijoje (OIE, 2011). Tiriamieji pasiutligės galvos smegenų mėginiai bei referentinės biologinės medžiagos buvo ruošiami II klasės A lygio biologinės saugos laminare (Hera safe, Vokietija).

#### **3.3.1. Pasiutligės viruso antigeno nustatymas imunofluorescencijos tyrimo metodu**

Galvos smegenų mėginių tyrimams FAT metodu buvo naudoti komerciniai diagnostiniai pasiutligės virusui specifiniai polikloniniai antikūnai (Bioveta, Čekijos Respublika), chemiškai sujungti su fluoresceino izotiocianatu (FITC), toliau vadinami FITC konjugatu. Pasiutligės diagnostika FAT metodu buvo atliekama pagal standartizuotus PGSO ir PSO (OIE, 2011) reikalavimus. FAT metodas yra labai jautrus, padeda nustatyti mažą antigeno kiekį.

Šiam tyrimui buvo naudojamos galvos smegenų dalys: pailgųjų smegenų, smegenėlių, smegenų pusrutulių žievės ir Amonio rago. Vienam FAT tyrimui buvo naudojami 9 švarūs, nuriebalinti etilo spirito ir eterio mišinyje objektiniai stikleliai. Iš jų 6 stikleliai buvo dažomi pasiutligei specifiniu FITC žymėtu konjugatu, o likę 3 – neigiamu FITC žymėtu konjugatu. Objektiniai stikleliai su tiriamų smegenų atspaudais buvo džiovinami ore ir fiksuojami liepsna. Darbinis FITC konjugatų tirpalas, santykiu 1:7 buvo paruoštas, naudojant 20% sveikų baltų pelių smegenų suspensiją fosfatiniame buferiniame tirpale (PBS) pH 7,4. Pasiutligės Ag ir fluorescencijos specifiškumui nustatyti buvo naudoti ant objekcinio stikliuko fiksuoti smegenų atspaudai užpilti po 100µl konjugato: pasiutligei specifinis FITC konjugatas (teigiamas) + tiriamasis preparatas (galvos smegenys) ir nespecifinis FITC konjugatas (neigiamas) + tiriamasis preparatas (galvos smegenys). Po 30 min. inkubacijos termostate +37°C, objektiniai stikliukai plaunami 3 kartus po 10 min. PBS, pH 7,4, nuskalaujami distiliuotu vandeniu, ir džiovinami. FAT metodu nukleokapsidinio baltymo specifinę darinį identifikavome pagal jo švytėjimą. Pasiutligės FAT tyrimo rezultatai buvo vertinami stebint pro liuminescencinį mikroskopą su x40 objektyvo padidiniu (Nikon, Japonija).

Rezultatas laikomas teigiamu įvertinus specifiniu konjugatu nudažytų 6 objektinių stikliukų plotą ir aptikus nors vieną ar du specifinius pasiutligės virusų Ag darinius. Rezultatas laikomas neigiamas įvertinus specifiniu neigiamu FITC konjugatu nudažytų 3 objektinių stikliukų plotą ir neaptikus nei vieno specifinio pasiutligės virusų Ag darinio.

3.3.2. Ląstelių kultūrų infekavimas pasiutligės virusu ir jo identifikavimas tiesioginės imunofluorescencijos metodu.

RV identifikavimas buvo atliekamas RTCIT metodu infekuojant N2a CCL-131 ląstelių linijas teigiama pasiutligei galvos smegenų suspensija ir dažoma taikant tiesioginį FAT. RTCIT metodui buvo naudojamos referentinės medžiagos: N2a CCL-131 ląstelių linija ir laboratorinio pasiutligės CVS-11 ATCC VR 959 padermės virusas (ANSES, Prancūzija). Tiesioginiam FAT



dažymui naudoti komerciniai diagnostiniai pasiutligės virusui specifiniai monokloniniai antikūnai, žymėti FITC (Fujirabio, JAV) pagal gamintojo instrukciją.

Pasiutligės viruso identifikavimas tiesioginiu RTCIT metodu 96-šulinėlių plokštelėje.

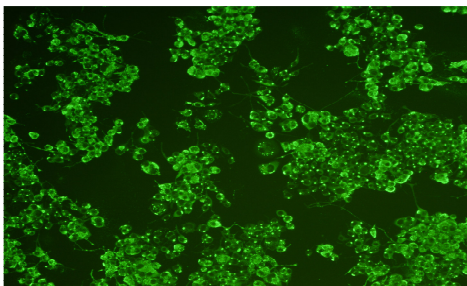
RTCIT tyrimas atliktas, naudojant 96-šulinėlių plokštelę, kurioje į kiekvieną šulinėlį įpilta po 200 µl paruoštos koncentracijos  $3 \times 10^5$ /ml N2a CCL-131 ląstelių suspensijos su DMEM auginimo terpe, į kurios sudėtį įeina 5% FVS (DMEM+5% FVS) (Invitrogen). Plokštelė uždengta dangteliu ir inkubuota +37°C su 5% CO<sub>2</sub> nuo 30 iki 60 min. Po inkubacijos N2a CCL-131 ląstelių linijos inokuliuotos po 100 µl gyvūnų galvos smegenų supernatantu praskiestu (1:10) su Dulbecco PBS (Invitrogen). Tiriamieji gyvūnų galvos smegenų mėginiai išpilstyti į keturis šulinėlius pagal schemą (3.3.2.1 pav).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Ląst .	Ląst .
B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Ląst .	Ląst .
C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Ląst .	Ląst .
D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Ląst .	Ląst .
E	11	1 2	13	Ir.t.t .							Ląst .	CV S
F	11	1 2	13	Ir.t.t .							Ląst .	CV S
G	11	1 2	13	Ir.t.t .							Ląst .	CV S
H	11	1 2	13	Ir.t.t .							Ląst .	CV S

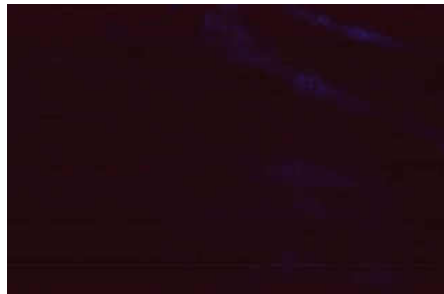
3.3.2.1 pav. Mėginių išpilstymo 96-šulinėlių plokštelėje schema.

RTCIT reakcijos patikimumui ir specifiškumui patvirtinti buvo naudojamas CVS-11 ATCC VR 959 padermės virusas, išpilstytas po 100 µl į keturis šulinėlius (3.3.2.1 pav.) ir toje pačioje plokštelėje palikta dvylika šulinėlių su neužkrėstomis N2a CCL-131 ląstelėmis stebėti jų gyvybingumą ir

dauginimasi. Inokuluota plokštelė uždengta dangteliu ir inkubuota 24 val. +37°C su 5% CO<sub>2</sub>. Po inkubacijos plokštelė išimama iš termostato, sena terpė nusiurbama ir pakeičiama šviežia terpe (DMEM+5% FVS), įpilant į kiekvieną šulinėlį po 300 μl. Terpė pakeista ir išpilstyta naudojant atskirą antgalį kiekvienam mėginiui ir kontrolei. Panaudoti antgaliai ir terpė buvo pamerkami į dezinfekcinį tirpalą (1% „Virkon“) mažiausiai 15 min, po to autoklavuota. Plokštelė su šviežia terpe (DMEM+5% FVS) uždengta dangteliu ir inkubuota 72 val. +37°C su 5% CO<sub>2</sub>. Po inkubacijos inokuluotos N2a CCL-131 ląstelės buvo fiksuojamos 80% acetonu 30 min., nupylus acetoną plokštelė buvo džiovinama ir dažoma FITC žymėtais specifiniais pasiutligės virusui monokloniniais antikūnais. Paruoštas darbinis konjugato tirpalas išpilstytas į kiekvieną plokštelės šulinėlį po 50 μl, plokštelė uždengta dangteliu ir inkubuota +37°C 30 min. drėgnoje kameroje. Po inkubacijos plokštelėje esantis visas konjugato turinys išpiltas į dezinfekcinį tirpalą, plokštelė buvo plaunama 2 kartus įpilant po 300 μl Dulbecco PBS tirpalo. Plokštelė gerai nusausinama popieriniu sugeriamuoju rankšluosčiu ir vertinama liuminescenciniu inversiniu mikroskopu. Infekuotos pasiutligės virusu ląstelės citoplazmos viduje esančios įvairių dydžių granulės fluorescuoja – švyti ryškia, žalio obuolio spalva.



a) Teigiamas rezultatas.



b) Neigiamas rezultatas.

### 3.3.2.2 pav. N2a CCL-131 ląstelių kultūroje pasiutligės viruso identifikavimas tiesioginiu FAT metodu.

Rezultatas teigiamas, kai įvertinus visą šulinėlio plotą radome vieną ar daugiau fluorescuojančių ląstelių (3.3.2.2 pav. a). Rezultatas – neigiamas, kai

įvertinus visą šulinėlio plotą neaptikome nei vienos fluorescuojančios ląstelės (3.3.2.2 pav. b). Neinfekuotos ląstelės atrodo pilkos spalvos.

Pasiutligės teigiamų mėginių patvirtinimas T25cm flakonuose ir identifikavimas tiesioginiu FAT metodu 96-šulinėlių plokštelėje.

Teigiamų mėginių patvirtinimui, kai RV po pirmo pasažo nebuvo identifikuotas RTCIT metodu 96-šulinėlių plokštelėje, buvo atliktas mėginių kultivavimas T25cm flakone. Pasiutligei teigiamo gyvūno galvos smegenų mėginio kultivavimui T25cm flakone naudota 20% smegenų suspensija DMEM terpėje su 5% FVS. Vienam mėginiui buvo naudoti 3 T25cm flakonai su N2a CCL-131 ląstelių linijomis: (vienas flakonas – mėginiui, antras – ląstelių kontrolei, trečias – CVS 11 kontrolei). Ląstelių padauginimui flakonai buvo inkubuojami 24 val. +37°C su 5% CO<sub>2</sub> termostate. Po 24 val. inkubacijos, šviesiniu invertiniu mikroskopu (Nikon, Japonija) įvertintas N2a ląstelių susiformavęs 80% monosluoksnis. N2a CCL-131 ląstelių monosluoksnis nuimtas su 2-3 ml tripsino/EDTA tirpalu (Invitrogen). Tripsinizacijos procesui sustabdyti įpilta 5-10 ml DMEM terpės be FVS ir su 5 ml sterilia pipete ląstelės suspenduotos (apie 20 kartų). Paruošta reikiamos 2x10<sup>6</sup>/ml koncentracijos N2a CCL-131 ląstelių suspensija sumaišoma lygiomis dalimis su teigiamu gyvūnų galvos smegenų mėginio 20% supernatantu (500 µl ląstelių suspensijos + 500 µl mėginio supernatanto) ir įpilama į T25cm flakoną. T25cm flakonas 30 min. inkubuojamas +37°C su 5% CO<sub>2</sub>, atsargiai 3 kartus sujudinant ląsteles inkubacijos metu. Po inkubacijos mėginys su ląstelėmis centrifuguojamas 1100 aps./min. greičiu 10 min. prie +4°C centrifugoje (Eppendorf, Vokietija). Po centrifugavimo viršutinis nereikalingas supernatanto sluoksnis nupiltas į dezinfekcinį tirpalą. Tyrimui naudotos likusios mėgintuvėlyje ląstelės, kurios buvo suspenduotos su 10 ml auginimo terpės DMEM+5% FVS ir po 8,8 ml suspensijos pernešta į sterilų T25cm flakoną. Likęs kiekis (1,2 ml ląstelių suspensijos) buvo išpilstomas po 300 µl į sterilios 96-šulinėlių plokštelės 4 kartotinius šulinėlius pagal schemą (3.3.2.1 pav.). Reakcijos patikimumui ir specifiškumui įvertinti tokia pačia procedūra buvo paruošta pasiutligės viruso CVS-11 ATCC VR 959

padermė ir išpilstyta po 300  $\mu$ l į keturis šulinėlius ir toje pačioje plokštelėje į dvylika šulinėlių išpilstyta po 300  $\mu$ l neinfekuotų N2a CCL-131 ląstelių suspensija stebėti jų gyvybingumui ir dauginimuisi. Tiriamieji mėginiai ir kontrolės T25 cm flakonuose ir 96-šulinėlių plokštelėje inkubuojami 72 val. +37°C su 5% CO<sub>2</sub>.

Pirmas 2 dienas mėginiai T25 flakonuose ir 96-šulinėlių plokštelėje vertinti šviesiniu inversiniu mikroskopu (Leica, Nikon). Tikrintas ląstelių citotoksinis efektas, kurį sukelia mėginyje esančių bakterijų toksinės medžiagos. Mėginiai, kuriems buvo nustatytas citotoksinis efektas toliau nebuvo kultivuojami.

Po 72 val. Inkubacijos +37°C su 5% CO<sub>2</sub> inokuliuotos N2a CCL-131 ląstelės 96-šulinėlių plokštelėje buvo fiksuotos 80% acetonu 30 min., nupylus acetoną plokštelė buvo džiovinama ir dažoma FITC žymėtais pasiutligei specifiniais monokloniniais antikūnais. Paruoštas darbinis FITC konjugato tirpalas įpilamas į kiekvieną plokštelės šulinėlį po 50  $\mu$ l, plokštelė uždengiama dangteliu ir inkubuojama +37°C 30 min. Po inkubacijos plokštelės šulinėliuose esantis turinys buvo išpiltas į dezinfekcinį tirpalą, plokštelė plaunama 2 kartus Dulbecco PBS tirpalu. Po to gerai nusausinama popieriniu sugeriamuoju rankšluosčiu ir vertinama liuminescenciniu inversiniu mikroskopu tamsiame kambaryje. Identifikuoti RV teigiami mėginiai su T25cm flakonais buvo patalpinti į šaldiklį -70°C 48val., po to atšildyti po šaltu tekančiu vandeniu. Atitirpusi mėginių suspensija perpilta į 15 ml centrifuginį mėgintuvėlį ir centrifuguota 3000 aps./min. greičiu 20 min. prie +4 °C. Po centrifugavimo viršutinis suspensijos sluoksnis įpiltas į sterilų 1,8 ml mėgintuvėlį ir padėtas saugojimui -70°C - -80°C temperatūroje.

Neigiami mėginiai buvo kultivuojami iki 4 pasažo atliekant tas pačias prieš tai aprašytas mėginio kultivavimo procedūras T25cm flakonuose ir lygiagrečiai naudojant 96-šulinėlių plokšteles.

### 3.3.3. Imunofermeninės analizės metodas

Rudųjų lapių ir usūrinių šunų ORV nuo pasiutligės efektyvumui nustatyti buvo naudojamas komercinis imunofermeninės analizės (IFA) Platelia™ Rabies II rinkinys (Bio-Rad, Prancūzija). Jis skirtas nustatyti ir titruoti antikūnus, specifinius RV glikoproteinui laukinių gyvūnų kraujo serume. Netiesioginis IFA metodas atliktas laikantis diagnostinio rinkinio gamintojo instrukcijos.

Rinkinio mikroplokštelė yra padengta pasiutligės glikoproteinu. Konjugatą sudaro proteinas A, išskirtas iš *Staphylococcus aureus*, sujungtas su peroksidaze. Atliekant IFA tyrimus buvo naudojamos papildomos referentinės teigiama ir neigiama kontrolės (ANSES, Prancūzija), kalibruotos pagal PSO standartus, leidžiančios kokybiškai ir kiekybiškai nustatyti antikūnų, specifinių pasiutligės virusui, titrą kraujo serume (Servat et al., 2007). Antikūnų kiekis lygus arba viršijantis 0,5 TV/ml PSO ir PGSO ekspertų yra laikomas tinkama apsauga nuo užsikrėtimo. Specifinių vakcininiam RV antikūnų kontrolė leidžia netiesiogiai įvertinti vakcinų efektyvumą oralinės laukinių gyvūnų vakcinacijos metu (Servat et al., 2007).

Tiriamieji kraujo serumo mėginiai bei teigiamos ir neigiamos rinkinio kontrolės ir referentinės kontrolės prieš tyrimą buvo gerai išmaišyti, atskiesti 1:100 su rinkinyje esančiu Tris/EDTA skiedimo buferiniu tirpalu ir išpilstomi po 100 µl į glikoproteinu padengtos mikroplokštelės šulinėlius. Per vieną inkubavimo valandą +37°C temperatūroje antikūnai prieš pasiutligės virusą, esantys mėginyje, susijungia su glikoproteinu, kuriuo padengti mikroplokštelės šulinėliai. Po inkubavimo nesusijungę antikūnai ir kiti serumo baltymai pašalinami 3 kartus plaunant su paruoštu naudoti Tris-NaCl (pH 7,2) plovimo tirpalu. Po plovimo buvo išpilstytas konjugatas po 100 µl į mikroplokštelės šulinėlius. Per antrą vienos valandos inkubavimą +37°C temperatūroje žymėti konjugato antikūnai susijungia su antikūnų prieš pasiutligės virusą ir antigeno kompleksais, prisitvirtinusiems mikroplokštelės šulinėliuose. Nesurištas konjugatas pašalintas 5 kartus plaunant Tris-NaCl (pH 7,2) plovimo tirpalu. Susidaręs imuninis kompleksas išryškėja įpylus 100 µl peroksidazės substrato -

TMB tirpalo. Po 30 min. inkubavimo tamsoje +18°C - +21°C temperatūroje buvo užpiltas 1 N sieros rūgšties tirpalas po 100 µl į kiekvieną šulinėlį ir atlikti matavimai prie 450 nm bangos ilgio automatinio mikroplokštelių analizatoriumi (Elx808, Bio-Tek, JAV). Tiriamų mėginių optinio tankio (OT) vertė palyginta su teigiamomis kontrolėmis. Mėginio titrai kiekybiniame tyrime gauti iš standartinės kreivės ir išreikšti ekvivalentiniais vienetais mililitre (EV/ml). Vienetas, ekvivalentiškas tarptautiniam vienetai (TV/ml), nustatytas serumo neutralizacija.

IFA duomenys apdoroti rinkinio Platelia™ Rabies II kompiuterine programa, nubraižant kreivę iš kontrolinių serumų OT parodymų, panaudojant „*smoothing spline*” funkciją.

#### 3.3.4. Pasiutligės viruso neutralizacijos fluorescuojančiais antikūnais metodas

Viruso neutralizacijos (VN) ląstelių kultūrose reakcija pagrįsta tuo, kad neutralizuojamas virusų aktyvumas, naudojant specialias audinių kultūras. Šio tyrimo metodo principas yra pasiutligės laboratorinio viruso neutralizacija *in vitro* prieš tai užkrėtus jautrias pasiutligės virusui ląsteles: BHK-21 (ATCC-CCL 10). Serumo titras yra praskiedimas, kuriame virusas yra 100% neutralizuojamas 50% duobučių. Šis titras išreiškiamas tarptautiniais vienetais mililitre (TV/ml).

FAVN tyrimui buvo naudojamos referentinės medžiagos: BHK-21 C13 (ATCC CCL-10) ląstelių linija, laboratorinis pasiutligės CVS-11 ATCC VR 959 padermės virusas, kontrolinis PGSO teigiamas serumas 0,5 TV/ml ir neigiamas referentinis serumas (ANSES, Prancūzija). Tiesioginiam FAT dažymui naudoti komerciniai diagnostiniai FITC žymėti pasiutligės virusui specifiniai monokloniniai antikūnai (Fujirabio, JAV).

FAVN reakcija atlikta mikrometodu naudojant 96-šulinėlių plokštelę, naudojant BHK-21 C13 ląsteles ir CVS-11 ATCC VR 959 su 100 AKID<sub>50</sub> (Cliquet et al., 1998). Prieš atliekant FAVN reakciją CVS-11 ATCC VR 959 padermės virusas buvo ištitruotas ir jo titras ląstelių kultūroje BHK-21 C13 siekė 10<sup>5,1</sup> AKID<sub>50</sub>/ml (50 % audinių kultūros infekcinės dozės).

Tiriamieji kraujo serumai prieš tyrimą buvo inaktyvuojami, kaitinant juos +56°C temperatūros vandens vonelėje 30 min. Mėginiai buvo titruojami 96-šulinėlių plokštelėje, DMEM+10% FVS (Invitrogen) ląstelių kultūrų terpę panaudojant kaip skiediklį. DMEM+10% FVS terpė išpilstyta į visus šulinėlius po 100 µl, o į 6-ąjį ir 12-ąjį po 200 µl. Tiriamasis serumas išpilstytas po 50 µl į keturis kartotinius plokštelės šulinėlius ir titruotas po 50 µl automatine daugiakanale pipete. Vienam mėginiui skiesti naudoti 6 šulinėliai serumus titruojant nuo 1:3, 1:9, 1:27, 1:81, 1:243, 1:6561. Į visus ištitruotus mėginių šulinėlius išpilstyta po 50 µl paruoštos CVS-11 viruso suspensijos su DMEM be FVS, naudojant 100 AKID<sub>50</sub> virusinių dalelių mėginiui. Plokštelė 60 min. inkubuojama termostate +37°C su 5% CO<sub>2</sub>. Po inkubacijos į kiekvieną šulinėlį įpilama po 50 µl paruoštos BHK-21 4x10<sup>5</sup> ląstelių suspensijos auginimo terpėje ir plokštelės 48 val. inkubuojamos +37°C temperatūroje su 5% CO<sub>2</sub>. FAVN reakcijos patikimumui ir specifiškumui patvirtinti buvo naudojama atskira 96-šulinėlių plokštelė, kurioje ištitruoti referentiniai teigiamas ir neigiamas serumai ir CVS-11 ATCC VR 959 padermės virusas koncentracijai nustatyti, palikti ir keturi šulinėliai su neužkrėstomis BHK-21 C13 ląstelėmis stebėti jų gyvybingumui ir dauginimuisi. Po 48 val. inkubacijos buvo išimtos plokštelės ir staigiu judesiu apvertus plokštelę sena terpė nupilta, o plokštelė 1 kartą praplauta įpilant po 300 µl Dulbecco PBS tirpalo. Po to 96-šulinėlių plokštelėje esančios BHK-21 C13 ląstelės buvo fiksuotos 80% acetonu 30 min. po fiksacijos acetonas nupiltas, plokštelė buvo džiovinama ir dažoma FITC konjugatu. Paruoštas darbinis konjugato tirpalas įpiltas į kiekvieną plokštelės šulinėlį po 50 µl, plokštelė uždengta dangteliu ir inkubuota +37°C 30 min., drėgnoje kameroje. Po inkubacijos plokštelėje esantis turinys išpiltas į dezinfekcinį tirpalą, plokštelė buvo plaunama 2 kartus įpilant po 300 µl Dulbecco PBS tirpalo ir gerai nusausinta popieriniu sugeriamuoju rankšluosčiu. Paruošta plokštelė buvo vertinama liuminescenciniu inversiniu mikroskopu tamsiame kambaryje.

Visų pirma buvo įvertinta kontrolių plokštelė ir nustatytas FAVN reakcijos patikimumas ir specifiškumas, kontrolių vertės statistiškai atitiko visų

ankstesnių gautų tyrimų verčių vidurkį. VN titru buvo laikomas mažiausias tiriamo serumo antikūnų ( $D_{50}$ ) kiekis, kuriame virusai yra neutralizuojami 50 % duobučių, t.y. kai visiškai sustabdomas CPE ir skaičiuojamas Spearman-Kärber metodu (Spearman, 1908), (Kärber, 1931). Serumo titras išreikštas tarptautiniais vienetais mililitre (TV/ml) palyginus su referentinių teigiamo ir neigiamo serumų titrais, gautais kiekviename tyrime.

### 3.3.5 Pasiutligės viruso neutralizacijos reakcijos vertinimas

Pasiutligės viruso neutralizacijos fluorescuojančiais antikūnais metodu buvo apskaičiuotas neutralizuojančių antikūnų kiekis su nustatyta pasiutligės viruso CVS 11 doze. Tiriamieji serumai buvo lyginami su PGSO teigiamais standartiniais serumais, kurių antikūnų kiekis yra nuo 0,5 TV/ml (OIE, 2011). Pasiutligės VN antikūnų titras ląstelėse buvo nustatytas naudojant FAT, dažant komerciniais diagnostiniais FITC žymėtais pasiutligei specifiniais monokloniniais antikūnais. Rezultatai buvo vertinami inversiniu liuminescenciniu mikroskopu.

CVS-11 padermės viruso titras buvo apskaičiuojamas Spearman-Kärber metodu (Spearman, 1908, Kärber, 1931, OIE, 2011). Virusų titras buvo išreiškiamas  $AKID_{50}$  ir apskaičiuojamas pagal formulę:

$$\log_{10} (AKID_{50}) = -\{x_0 - 2 + d \sum \frac{ri}{ni}\}$$

- $\log_{10} (AKID_{50})$  – kuriame nustatoma, logaritminis skiedimas 50% teigiamų duobučių, pagal 50% fluorescenciją
- $x_0$  – -(logoritminis skiedimas, mažiausias skiedimas visose neigiamose duobutėse sukiantis daugiau kaip 50 % ląstelių kultūrų CPE)
- $d$  –  $\log_{10}$  skiedimo žingsnis
- $ni$  – neigiamų duobučių skaičius
- $ri$  – kartotinių duobučių skaičius

Tai reiškia, kad:



$\log AKID_{50}$  serume = (n log<sub>10</sub> (50 skiedimas) = kuriame nustatoma logaritminis skiedimas 50% teigiamų duobučių, pagal 50% fluorescenciją.

$X0 = -(\log_{10}$  mažiausias skiedimas visose neigiamose duobutėse

$d = \log_{10}$ , skiedimo žingsnis

teigiamų duobučių skaičius/4x log skiedimo žingsnis  $-(\log$  skiedimo žingsnis/2)  
+ skiedimas log, kur nustatomas 4 neigiamose duobutėse.

### 3.3.6. Diagnostinių imunofermentinės analizės ir viruso neutralizacijos fluorescuojančiais antikūnais metodų vertinimas

Tyrimų eigoje buvo atliktas palyginamasis IFA ir standartinės FAVN metodų, naudojamų laukinių gyvūnų ORV nuo pasiutligės efektyvumo tyrime, įvertinimas. Surinkti rudųjų lapių kraujo serumo mėginiai (n=50) buvo tiriami 3.3.3 ir 3.3.4 skyriuose nurodytais metodais. FAVN reakcijoje buvo naudota CVS-11 ATCC VR 959 padermės 100 AKID<sub>50</sub> virusinių dalelių/0,1 ml. Duomenys, gauti skirtingais tyrimo metodais, buvo lyginami, įvertinant reakcijų jautrumą ir specifiškumą pagal PSGO (OIE, 2011).

IFA reakcijos specifiškumas ir jautrumas buvo nustatytas lyginant su FAVN reakcija, kuri pripažįstama standartine (“gold standard”). Reakcijos specifiškumas nusakomas kaip tikimybė, jog realiai rudosios lapės nesuėdusios susilpnintos SAD Bern vakcinos (t.y. nustatyta standartine FAVN reakcija) rodys neigiamą reakcijos rezultatą. Reakcijos jautrumas nusakomas kaip tikimybė, jog realiai turinčios susidariusį imuninį atsaką rudosios lapės (nustatyta standartine FAVN reakcija) rodys teigiamą rezultatą.

$$\text{Diagnostinio specifiškumo } \% = \frac{TN}{TN + NT} \times 100;$$

čia TN – tikrai neigiamų mėginių skaičius, standartinėje VN reakcijoje nereagavę. NT – netikrai teigiamų mėginių skaičius, t.y. teigiami tiriant lyginamojoje reakcijoje, bet neigiami tiriant standartine.

$$\text{Diagnostinio jautrumo } \% = \frac{TT}{TT + NN} \times 100;$$

čia TT – tikrai teigiamų mėginių skaičius, nustatytas standartine reakcija. NN – netikrai neigiamų mėginių skaičius, nustatytas lyginamojoje reakcijoje, bet teigiami tiriant standartine.

### 3.3.7. Pasiutligės viruso nustatymas atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandininės reakcijos metodu

Pasiutligės viruso RNR ekstrakcija iš galvos smegenų mėginių buvo atliekama naudojant komercinį rinkinį Rneasy Mini Kit (Qiagen) laikantis rinkinio gamintojo instrukcijos. Tam tikslui tiriamoji galvos smegenų medžiaga buvo homogenizuojama buferiniame lizės RLT tirpale (Qiagen) naudojant mechaninį audinių homogenizavimo prietaisą (TissueLyserII machine, Vokietija). RNR buvo išplauta su 70 µl vandens be RNazių PGR reakcijai. Išskirtas RNR kiekis buvo užšaldytas ir saugojamas –20°C iki tyrimų pradžios.

Pasiutligės viruso diagnostiniai AT-PGR tyrimai buvo atliekami naudojant vieno žingsnio AT-PGR rinkinį (Qiagen). Vienam reakcijos mėgintuvėliui buvo paruoštas PGR reakcijos mišinys susidedantis iš: 5µl vieno žingsnio AT-PGR buferio, 1µl dNTP mišinio iki 10mM koncentracijos, 1µl fermento mišinio ir po 1µl kiekvieno iš dviejų pradmenų – JW12 (5'-AT ATGTAACACCYCTACAATG-3') ir JW6DPL (5'-CAATTCGCACACATTTTGTG-3') iki 20mM koncentracijos, 11µl kokybiško PGR vandens ir 5µl tiriamosios RNR. Atvirkštinė transkripcija: +50°C 30 min., pirminė denatūracija +95°C 15 min., toliau PGR metu buvo atlikti 35 amplifikavimo ciklai su pirmine denatūracija +94°C 30 min., pradmenų prikibimas +49°C 30 s., DNR sintezė +72°C 1 min., DNR fragmentų užbaigimas +72°C 10 min. (Orlowska et al., 2008). Naudoti pradmenys susintetinti pagal literatūroje pateiktas sekas (Heaton et al., 1997). Amplifikuoto produkto nustatymas buvo atliekamas 1,5% agarozės gelyje. Gauti PGR produktai buvo gryninami naudojant 500 U SAP (angl. *Shrimp Alkaline Phosphatase*, Fermentas, Lietuva) ir 10 U ExoI (angl. *Exonuclease*, Fermentas, Lietuva) inkubuojant +37°C 15 min. ir inaktyvuojant fermentu

+85°C 15 min. Todėl PGR produktai buvo gryninami naudojant Centri-Sep greitas patvirtintas biosistemas. PGR metu buvo gautas 362 nukleotidų porų produktas. Sekvenavimas buvo atliekamas naudojant BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing rinkinį, pagal gamintojų biosistemų instrukciją (Applied Biosystems 3100 Avant, JAV).

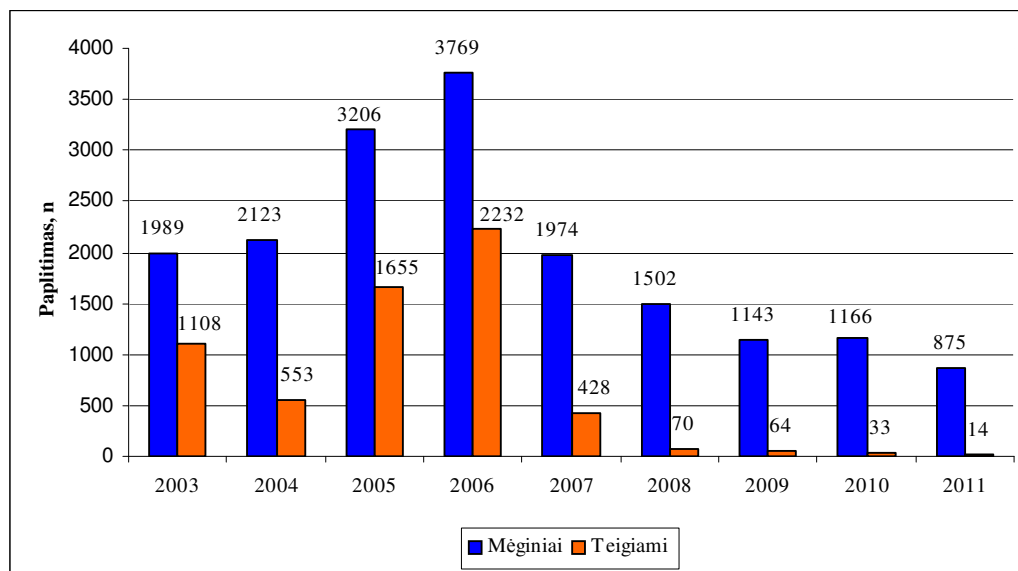
#### **3.4. Statistinė duomenų analizė**

Gautų rezultatų analizė buvo atliekama naudojantis statistine duomenų apdorojimo programa SPSS (angl. – *Statistical Package for the Social Science*) (16.00). Kokybiniai rodikliai aprašyti pateikiant jų procentinį pasiskirstymą. Duomenų statistiniam patikimumui bei sąsajoms tarp analizuojamų veiksnių įvertinti buvo naudojamas – Chi kvadrato testas. Skirtumai laikyti statistiškai reikšmingi, jeigu paklaidos tikimybės reikšmė  $p$  mažesnė nei 0,05. RV paplitimo gyvūnų tirtuose mėginiuose pasikliautinis intervalas (PI) ir paplitimo procento skirtumų patikimumas, esant 95% tikimybei, apskaičiuotas “Dimension Research”, Inc. programa.

## 4. TYRIMŲ DUOMENYS

### 4.1. Laukinių ir naminių gyvūnų pasiutligės paplitimo Lietuvoje analizė

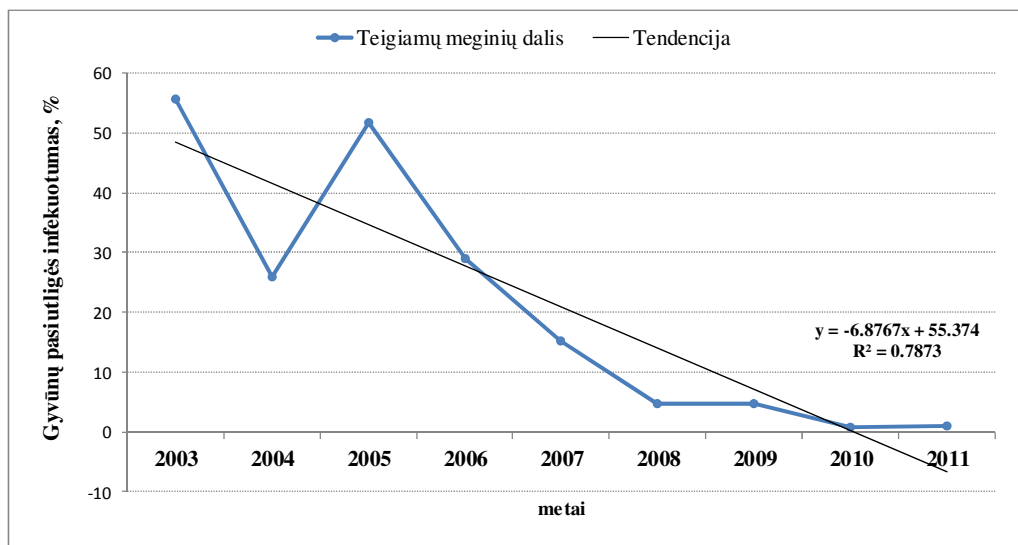
Lietuvoje 2003–2011 metų laikotarpyje buvo atlikti laukinių ir naminių gyvūnų pasiutligės tyrimai. Per šį laikotarpį iš viso buvo ištirta 17 747, iš jų 11 817 laukinių ir 5930 naminių gyvūnų iš įvairių Lietuvos regionų. Iš jų per 9 metų laikotarpį buvo nustatyta 4860 laukinių ir 1297 naminių gyvūnų infekuotų RV. Rezultatai, gauti tiriant bendrus gyvūnų galvos smegenų mėginius (4.1.1 pav.) parodė, kad RV infekuotumas laukinių ir naminių gyvūnų tirtuose mėginiuose skirtingas.



4.1.1. pav. Laukinių ir naminių gyvūnų pasiutligės atvejai Lietuvoje 2003-2011 metais.

Didžiausias infekuotųjų RV santykis yra laukinių gyvūnų grupėje – 41,13% (PI 40,24% – 42,02%), o naminių gyvūnų grupėje – 21,87% (PI 20,84% – 22,94%). Atlikta rezultatų statistinė analizė parodė, kad laukiniai gyvūnai sergantys pasiutlige infekavo naminius gyvūnus RV, nes buvo pastebėtas statistiškai reikšmingas RV padidėjimas ( $p < 0,05$ ). Mūsų atlikta statistinė analizė parodė, kad nuo 2003 iki 2011 metų gyvūnų pasiutligės infekuotumas

vidutiniškai mažėjo po 6,9 procentinius punktus per metus ( $p=0,001$ ) (4.1.2. pav.).



4.1.2. pav. Gyvūnų pasiutligės infekuotumo dinamika Lietuvoje 2003-2011 metais

Laukinių gyvūnų tiriamuose mėginiuose didžiausias pasiutligės viruso paplitimas buvo nustatytas usūrinių šunų 53,88%, rudųjų lapių 41,10%, barsukų 49,33%, kiaunių 30,69% ir vilkų 28,57% tarpe. Kitų laukinių gyvūnų tarpe pasiutligė pagal mūsų rezultatus buvo paplitusi ženkliai mažiau, tai yra nuo 20,0% iki 2,43% (4.1.1 lentelė). Taip pat, analizuojant duomenis nustatėme statistiškai reikšmingą laukinių gyvūnų rūšių infekuotumo vidurkių skirtumą ( $p=0,05$ ).

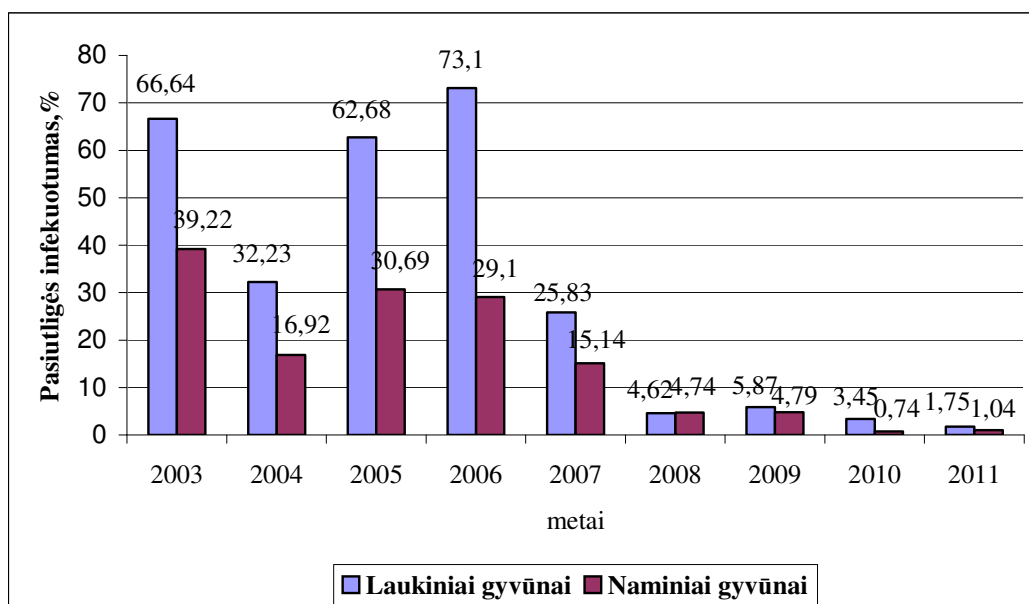
Analizuojant pasiutligės infekuotumą laukinių ir naminių gyvūnų tirtuose mėginiuose buvo nustatyta, kad 2003 – 2011 metų laikotarpyje pasiutligės infekuotumas buvo didžiausias laukinių gyvūnų populiacijoje. Didžiausias infekuotumas laukinių gyvūnų tarpe buvo nustatytas 2006 – 73,10% (PI 71,36% – 74,78%, lyginant su 2005 – 62,68% (PI 60,59% – 44,72%). Naminių gyvūnų tarpe RV infekuotumas nustatytas didesnis 2005 – 30,69% (PI 28,04% – 33,46%), o 2006 metais mažesnis 29,10% (PI 26,59% – 31,75%) (4.1.3 pav.). Mūsų atlikta duomenų analizė pagal laukinių ir naminių gyvūlių tirtų mėginių skaičių parodė, kad 2006 metais pasiutligės teigiamų atvejų skaičius pasiekė aukščiausią lygį – 2232 atvejai, tai yra 59,22% (PI 57,64% – 60,78%). Tačiau

nuo 2007 metų teigiamų atvejų skaičius mažėjo ir 2011 metais buvo nustatyti tik 14 pasiutligę užsikrėtusių gyvūnų, kas sudarė tik 1,6% (PI 0,96% – 2,67%) nuo tirtų gyvūnų skaičiaus (4.1.3 pav.).

4.1.1 lentelė. Laukinių gyvūnų skirtingų rūšių infekuotumas pasiutlige Lietuvoje 2003–2011 metais.

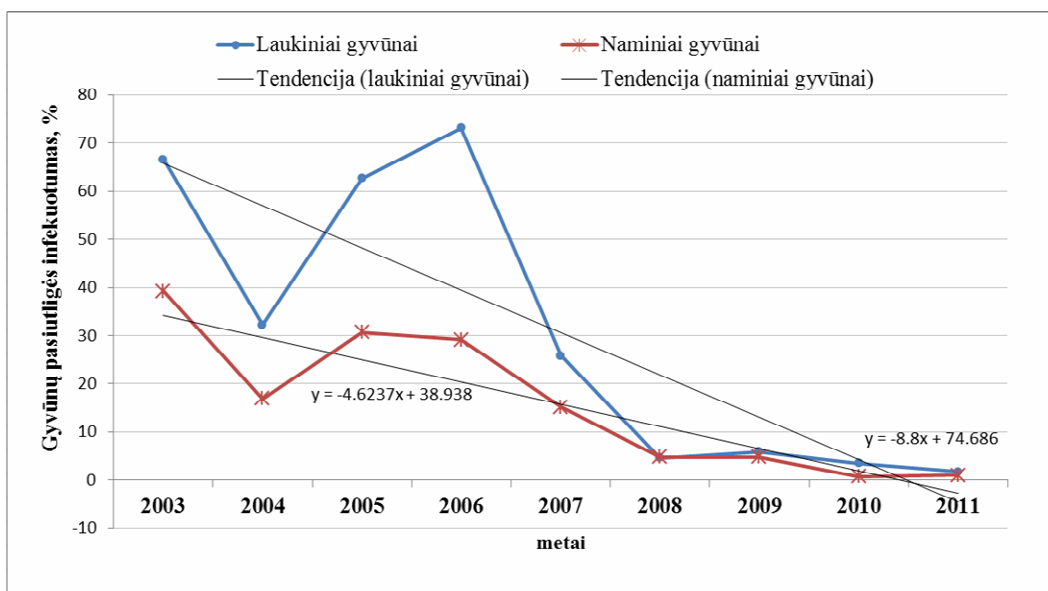
Gyvūnų rūšis	Tirtų gyvūnų skaičius, n	Teigiamų atvejų skaičius, n	Teigiami atvejai, %	PI, %
Rudosis lapės	4835	1987	41,10	39,73-42,50
Usūriniai šunys	4159	2241	53,88	52,39-55,41
Kiaunės	1323	406	30,69	28,26-33,23
Šėškai	660	132	20,00	17,13-23,22
Vilkai	7	2	28,57	8,22-64,11
Barsukai	75	37	49,33	38,33-60,40
Bebrai	91	10	10,99	6,08-19,06
Audinės	62	5	8,06	3,49-17,53
Ūdros	43	6	13,95	6,56-27,26
Briedžiai	18	1	5,56	0,99-25,76
Stirnos	250	24	9,60	6,54-13,89
Šernai	56	2	3,57	0,98-12,12
Ežiai	22	1	4,55	0,81-21,80
Voverės	23	2	8,70	2,42-26,80
Lūšys	3	2	66,67	20,77-93,85
Žiurkės	82	2	2,44	0,67-8,46
Kiti* gyvūnai	108	0	0	-
Iš viso:	11817	4860	41,13	40,24-42,02

Kiti\* laukiniai gyvūnai – kiškiai 29, pelės 26, ondatros 20, žebenkštys 17, elniai 7, kurmiai 7, šikšnosparnis 1, šermuonėlis 1.

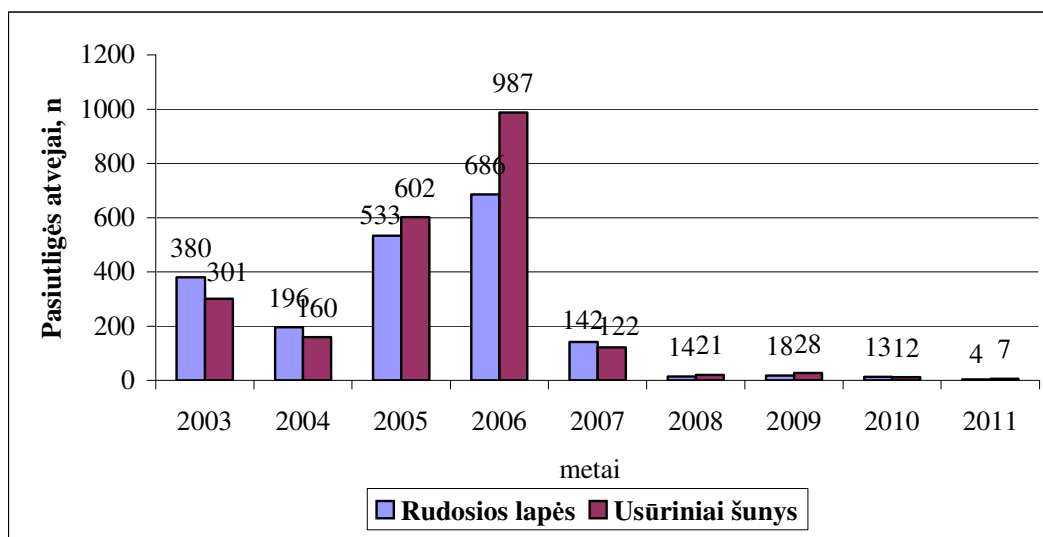


4.1.3 pav. Pasiutligės infekuotų laukinių ir naminių gyvūnų paplitimo procentas Lietuvoje 2003-2011 m.

Nuo 2003 iki 2011 metų laukinių gyvūnų pasiutligės infekuotumas vidutiniškai mažėjo po 8,8 procentinius punktus per metus ( $p=0,008$ ). Naminių gyvūnų pasiutligės infekuotumas nuo 2003 iki 2011 metų vidutiniškai mažėjo po 4,6 procentinius punktus per metus ( $p=0,002$ ). Tiek naminių, tiek laukinių gyvūnų pasiutligės infekuotumo dinamika yra labai panaši, statistinio skirtumo tarp kitimo tendencijų nėra ( $p=0,123$ ) (4.1.4 pav.).



4.1.4 pav. Pasiutligė infekuotų laukinių ir naminių gyvūnų paplitimo dinamika Lietuvoje 2003-2011 m.



4.1.5 pav. Rudųjų lapių ir usūrinių šunų pasiutligės infekuotumo dinamika Lietuvoje 2003-2011 metais.

Analizuojant pasiutligė infekuotų laukinių gyvūnų tyrimų duomenis, pateiktus 4.1.5 pav. matyti, kad 2003-2004 metais, 2007 metais didžiausią infekuotumą gamtoje sudarė lapės. 2004 metais infekuotų pasiutligės virusu lapių – 31,51% (PI 27,98%-35,27%), tačiau 2005-2006 metais ir 2008 – 2011 metais daugiau RV infekuotų atvejų nustatyta usūrinių šunų populiacijoje.



#### 4.2. Pasiutligės paplitimo geografiniai ypatumai

Įvertinus laukinių ir naminių gyvūnų infekuotumo pasiutlige dinamiką per 5 metų laikotarpį (2007–2011), nustatyti mažėjantys laukinių bei naminių gyvūnų pasiutligės atvejų skaičiai. Kartu nustatyta ir mažėjantys laukinių gyvūnų pasiutligės atvejų skaičiai: 2007 (25,83%); 2008 (4,62%); 2009 (5,88%); 2010 (3,46%.); 2011 (1,75%) (4.2.1 lentelė), bei mažėjantys sergančių pasiutlige naminių gyvūnų skaičiai: 2007 (15,14%); 2008 (4,74%); 2009 (4,79%); 2010 (0,74%); 2011 (0,074%) (4.2.1 lentelė).

4.2.1 lentelė. Pasiutligės infekuotumas laukiniuose ir naminiuose gyvūnuose Lietuvoje 2007 – 2011 metais.

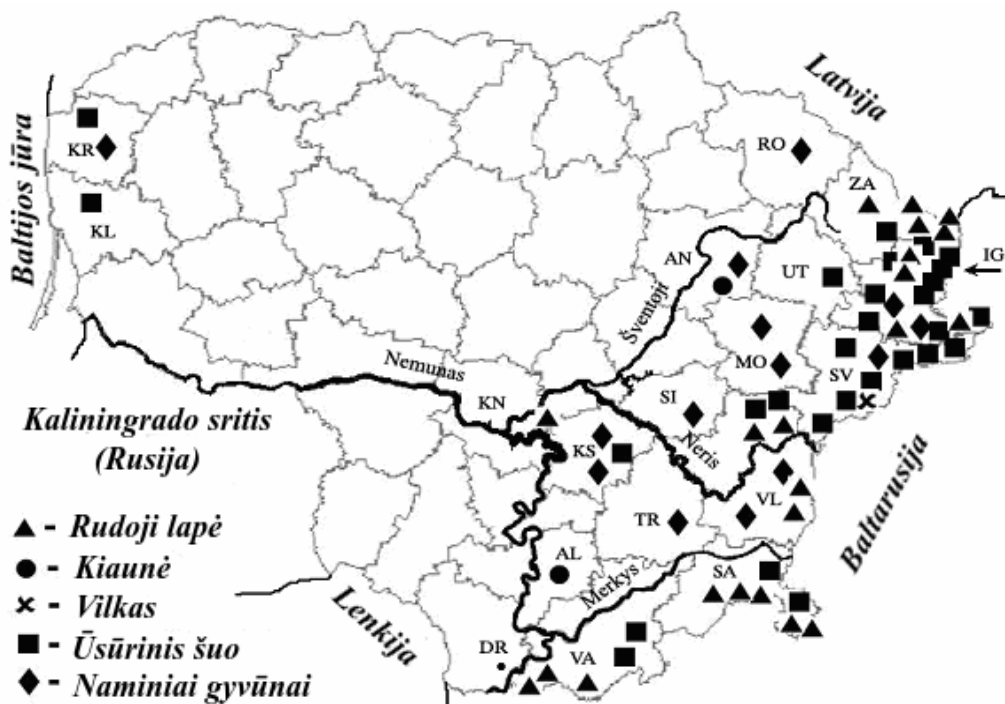
Metai	Laukinių gyvūnų infekuotumas			Naminių gyvūnų infekuotumas			p*
	Ištirta, n	Teigiamų, %	PI, %	Ištirta, n	Teigiamų, %	PI, %	
2007	1208	25,83	23,36 - 28,30	766	15,14	12,60 - 17,68	0,0001
2008	1038	4,62	3,34 - 5,90	464	4,74	2,81 - 6,67	0,9208
2009	851	5,88	4,30 - 7,46	292	4,79	2,34 - 7,24	0,4882
2010	897	3,46	2,26 - 4,66	269	0,74	-0,28 - 1,76	0,0186
2011	684	1,75	0,77 - 2,73	191	1,05	-0,40 - 2,50	0,4910

\*p skirtumas lyginant laukinius ir naminius gyvūnus (Chi testas).

Atlikta 2007 – 2011 metų analizė parodė, kad nagrinėjamu laikotarpiu didžiausias tiek laukinių, tiek naminių gyvūnų infekuotumas buvo nustatytas 2007 metais (laukinių beveik 26%, naminių - 15%), šis skirtumas tarp naminių ir laukinių gyvūnų buvo statistiškai reikšmingas ( $p < 0,05$ ). 2008 – 2009 metais buvo stebimas infekuotumo mažėjimas tiek laukinių, tiek naminių gyvūnų tarpe, statistiškai reikšmingo skirtumo tais metais nenustatyta ( $p > 0,05$ ). 2010 metais laukinių infekuotų gyvūnų buvo šiek tiek daugiau nei naminių, ir šis skirtumas buvo statistiškai reikšmingas ( $p < 0,05$ ). 2011 metais reikšmingų skirtumo tarp laukinių ir naminių gyvūnų nenustatyta.

Daugiausia pasiutligės atvejų buvo nustatyta Baltarusijos pasienyje su Lietuva, t.y. rytiniame Lietuvos pakraštyje, tuose rajonuose, kurie ribojasi su kaimynine Baltarusijos Respublika – Švenčionių, Šalčininkų, Varėnos, Zarasų (4.2.1 pav.). Lietuvos žemėlapyje (4.2.1 pav.) pažymėtas ištirtų skirtingų gyvūnų rūšių

geografinis pasiutligės atvejų išsidėstymas ir tiksliai mėginio vieta iš kur buvo paimtas mėginys. Geografiškai daugiausia pasiutligės atvejų buvo nustatyta Rytinėje ir Pietrytinėje Lietuvos dalyje – Baltarusijos pasienyje. Nustatyta, kad Lietuvos teritorijoje natūralus gamtinis barjeras yra upės.



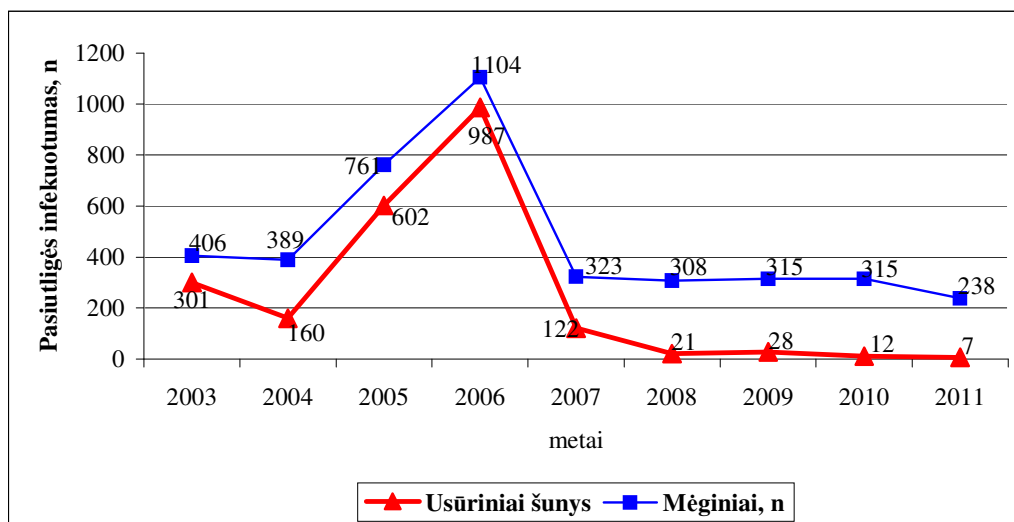
4.2.1 pav. Skirtingų gyvūnų rūšių pasiutligės atvejų geografinis išsidėstymas Lietuvoje 2007-2011 metais.

Santrumpos: Alytus-AL, Anykščiai-AN, Druskininkai-DR, Ignalina-IG, Kaunas-KN, Kaišiadorys-KS, Kretinga-KR, Molėtai-MO, Rokiškis-RO, Šalčininkai-SA, Širvintos-SI, Švenčionys-SV, Varėna-VA, Vilnius-VL, Trakai-TR, Zarasai-ZA.

Galima teigti, kad laukinių ir naminių gyvūnų pasiutligės registruotų atvejų geografinio išsidėstymo apibrėžta riba gali būti ties Nemuno upe, kuri skiria Lietuvos Pietinę dalį – Lenkijos pasienyje ir kiek mažesniu mastu ties Neris ir Šventosios upėmis, skiriančiomis Lietuvos Rytinę dalį – Baltarusijos pasienyje.

#### 4.3. Pasiutligės paplitimas usūrinių šunų populiacijoje.

2003-2011 metais pasiutligės FAT tyrimo metodu buvo ištirti 4159 usūrinių šunų galvos smegenų mėginiai. Vertinant epidemiologinę situaciją 2003–2011 metais Lietuvoje usūrinių šunų populiacijoje pastebėta, kad pasiutligės FAT teigiami atvejai šioje populiacijoje sudarė 53,88% (PI 52,39% – 55,41%). Mūsų atliktų tyrimų (2003-2011 m.) analizė parodė pasiutligės mažėjimo tendenciją – 2003 metais 74,14% (PI 69,84% – 78,36%), o 2004 – 41,13% (PI 36,21% – 45,99%,  $p < 0,05$  (Chi testas)).



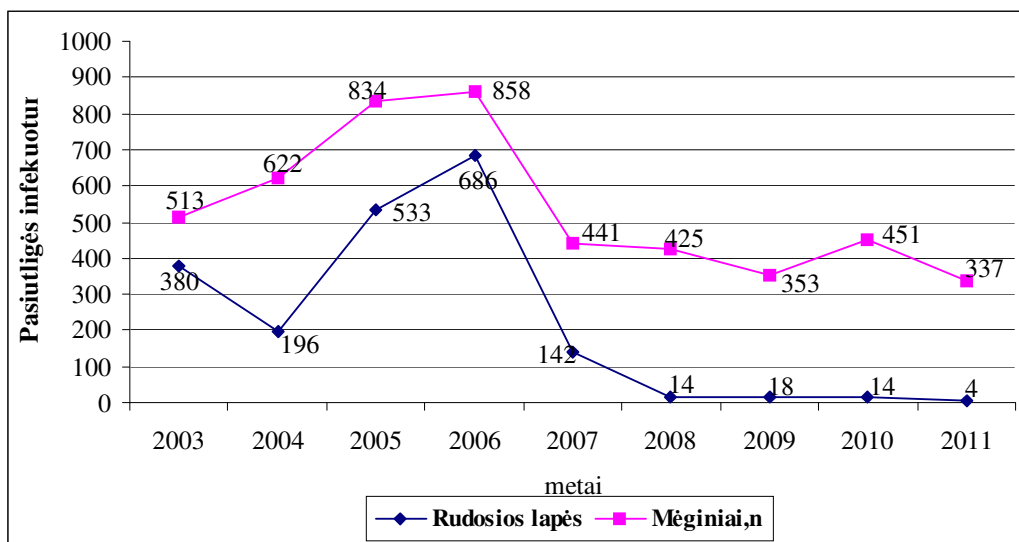
4.3.1 pav. Usūrinių šunų infekuotumo pasiutlige dinamika Lietuvoje 2003–2011 metais.

Atlikus tyrimų duomenų analizę pagal tyrimų atlikimo metus nustatyta, kad didžiausias usūrinių šunų infekuotumas pasiutlige buvo 2005 metais 79,11% (PI 76,21%–81,99%), 2006 metais – 89,40% (PI 87,58% – 91,22%). Tačiau analizuojant 2007 metais registruotus usūrinių šunų pasiutligės atvejus nustatyta, kad susirgimų sumažėjo iki 37,77% (PI 32,51% – 43,09%), 2008 – 6,81% (PI 3,99% – 9,61%), 2009 – 8,89% (PI 5,76% – 12,04%), 2010 – 4,13% (PI 1,91% – 6,29%). 2011 metais buvo nustatytas mažiausias usūrinių šunų infekuotumas – 2,94% (PI 0,77% – 5,03%), susirgimų (4.3.1 pav.). Nuo 2003 iki 2011 metų usūrinių šunų susirgimai pasiutlige vidutiniškai mažėjo po 10,3

procentinių punktų per metus, ši tendencija buvo statistiškai reikšminga ( $p=0,009$ ).

#### 4.4. Pasiutligės paplitimas rudųjų lapių populiacijoje

Per 2003-2011 metus pasiutligės FAT tyrimu buvo ištirti 4834 rudųjų lapių galvos smegenų mėginiai. Analizuojant rudųjų lapių epidemiologinę situaciją nuo 2003–2011 metų Lietuvoje pastebėta, kad pasiutligės FAT teigiami atvejai šioje populiacijoje sudarė 41,10% (PI 39,73% – 42,50%). Lyginant 2003 ir 2004 metus buvo stebima pasiutligės mažėjimo tendencija – 2003 metais 74,07% (PI 70,28% – 77,87%), o 2004 – 31,51% (PI 27,86% – 35,16%,  $p<0,05$  (Chi testas). Tačiau 2005 ir 2006 metais vėl buvo stebimas pasiutligės didėjimas: 2005 metais 63,91% (PI 60,59% – 67,10%), o 2006 metais buvo stebimas didžiausias rudųjų lapių infekuotumas pasiutlige per visą 2003-2011 metų laikotarpį – 79,95% (PI 77,14% – 82,50%). Toliau analizuojant 2007 metais registruotus rudųjų lapių pasiutligės atvejus nustatyta, kad susirgimų vėl mažėjo – 32,20% (PI 27,84% – 36,56%), o 2008 – 3,29% (PI 1,60% – 4,99%), 2009 – 5,10% (PI 2,80% – 7,39%), 2010 – 3,10% (PI 1,50% – 4,70%). 2011 metais buvo nustatytas mažiausias rudųjų lapių infekuotumas – 1,19% (PI 0,03% – 2,34%) susirgimų (4.4.1 pav.).

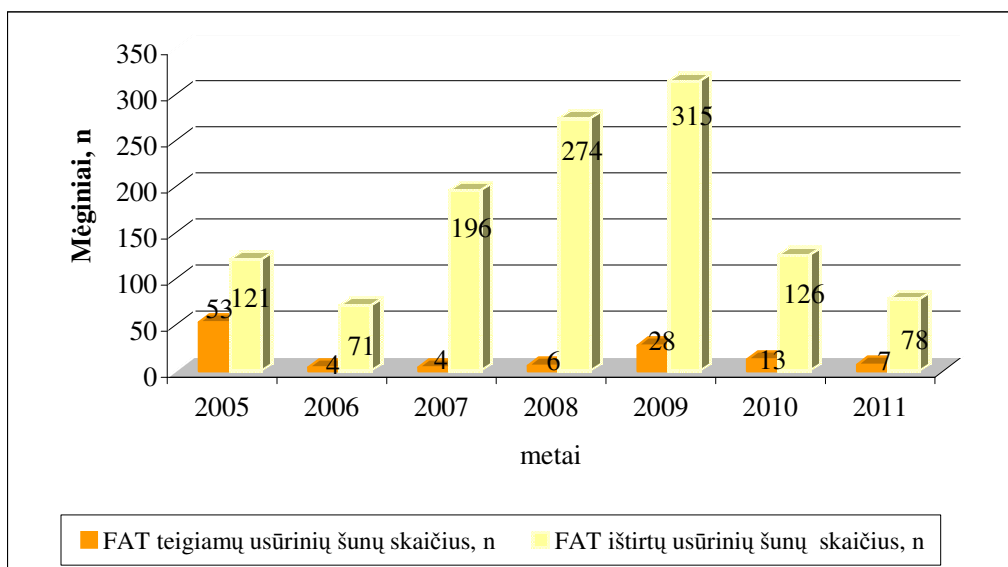


4.4.1 pav. Rudųjų lapių infekuotumo pasiutlige dinamika Lietuvoje 2003–2011 metais.

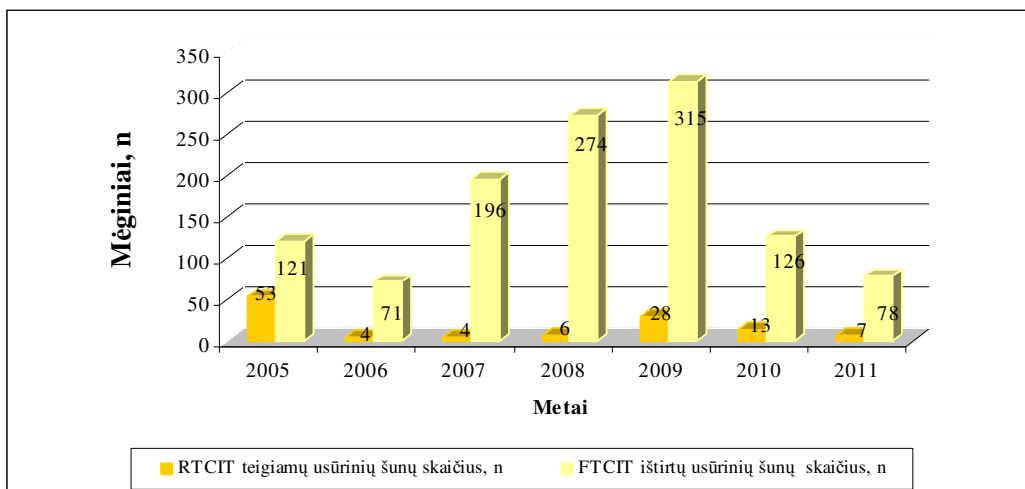
Apibendrinant galima teigti, kad nuo 2003 iki 2011 metų rudųjų lapių susirgimai pasiutlige turėjo tendenciją mažėti ir vidutiniškai mažėjo po 9,5 procentinių punktų per metus, ši tendencija buvo statistiškai reikšminga ( $p=0,009$ ).

#### 4.5. Pasiutligės viruso antigeno nustatymo fluorescuojančiais antikūnais ir viruso identifikavimo ląstelių kultūrose metodų palyginamasis įvertinimas

FAT ir RTCIT metodų palyginimui tyrimams buvo naudoti tie patys usūrinių šunų galvos smegenų mėginiai. FAT metodu buvo ištirta 1181 usūrinių šunų galvos smegenų mėginys, iš kurių 115 – 9,74% (PI 8,17% – 11,56%) nustatyta pasiutligė (4.5.1 pav. a).



a)

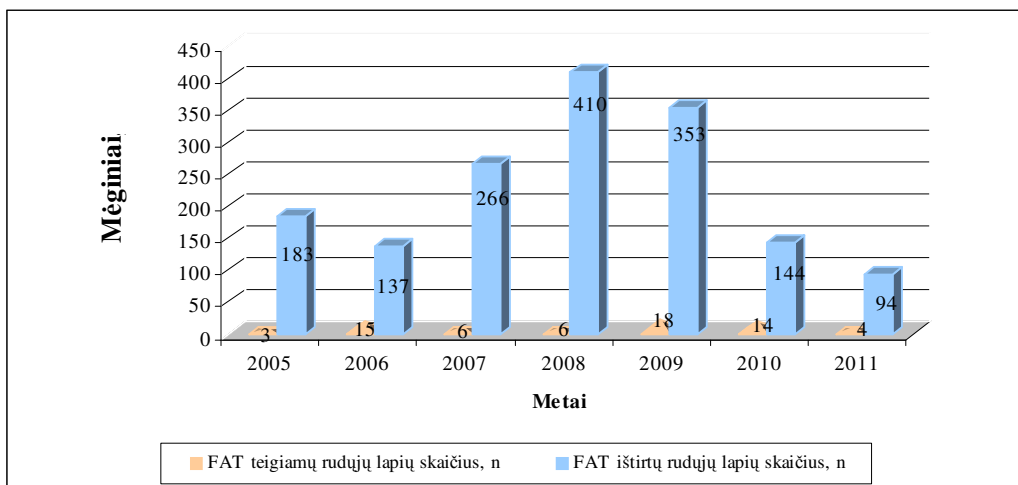


b)

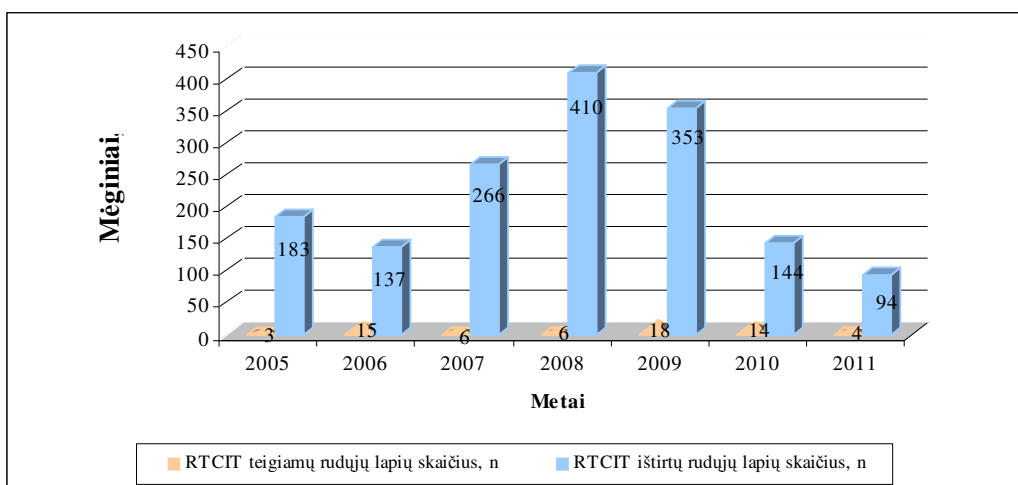
4.5.1 pav. Usūrinių šunų (n=1181), tirtų FAT ir RTCIT metodais, gautų rezultatų palyginimas. a) FAT metodo rezultatai; b) RTCIT metodo rezultatai.

Ištyrus tuos pačius (n=1181) usūrinių šunų galvos smegenų mėginius RTCIT metodu buvo gauti identiškai rezultatai, 115 mėginių nustatytas RV (4.5.1 pav. b).

Rudųjų lapių FAT ir RTCIT metodų palyginimui tyrimams buvo naudoti tie patys galvos smegenų mėginiai. FAT metodu buvo ištirti 1587 rudųjų lapių galvos smegenų mėginiai, iš kurių 66 – 4,16% (PI 3,28% – 5,26%,) nustatyta pasiutligė (4.5.2 pav. a).



a)



b)

4.5.2b pav. Rudųjų lapių (n=1587), tirtų FAT ir RTCIT metodais, gautų rezultatų palyginimas. a) FAT metodo rezultatai; b) RTCIT metodo rezultatai.

Ištyrus tuos pačius rudųjų lapių galvos smegenų mėginius RTCIT metodu gautas analogiškas rezultatas, 66 mėginiuose išskirtas RV (4.5.2 pav. b).

Mūsų atliktų tyrimų duomenų analizė parodė, kad tiek FAT, tiek RTCIT metodais buvo nustatytas statistiškai vienodas RV infekuotų usūrinių šunų ir rudųjų lapių skaičius.

#### 4.6. Pasiutligės serologinių tyrimo metodų palyginamasis įvertinimas

FAVN ir IFA metodais buvo iširtas vienodas tų pačių rudųjų lapių kraujo mėginių skaičius. Ak IFA tyrimo metodu buvo iširti 50 rudųjų lapių kraujo serumo mėginiai, iš kurių 28 kraujo serumo mėginiuose IFA metodu buvo nustatyti antikūnai. Tie patys 50 rudųjų lapių kraujo serumo mėginiai buvo tirti FAVN metodu, iš kurių 23 kraujo serumo mėginiuose buvo nustatyti antikūnai (4.6.1. lentelė).

4.6.1. lentelė. Pasiutligės antikūnų tyrimų duomenų pasiskirstymas lapių amžiaus grupėse priklausomai nuo taikyto diagnostinio metodo.

Rudųjų lapių grupė	Tirti lapių mėginiai, n	Teigiamų skaičius, n				p*
		FAVN		IFA		
		n	%	n	%	
< 1 metų	25	8	32,00	10	40,00	0,5557
> 1 metų	25	15	56,00	18	72,00	0,3705
Iš viso:	50	23	46,00	28	56,00	0,3172

\*p skirtumas lyginant FAVN ir IFA (Chi testas).

4.6.1 lentelėje pateiktų duomenų analizė parodė, kad FAVN ir IFA metodais buvo nustatytas nevienodas serologiškai reagavusių rudųjų lapių mėginių skaičius. Tiriant juos IFA metodu, buvo rasta daugiau serologiškai teigiamų rudųjų lapių (56%), nei tiriant standartiniu FAVN metodu (46%), tačiau šis skirtumas nėra statistiškai reikšmingas. Praktikoje tokie tyrimų rezultatų skirtumai gali turėti įtakos tyrimų kokybei, todėl siekdami išaiškinti kraujo serumų tyrimo rezultatų skirtumus, gautus standartine FAVN įvertinome IFA jautrumą ir specifiškumą. IFA diagnostinio jautrumo ir specifiškumo apskaičiavimo schemas, rekomenduojamos PGSO, gauti rezultatai, pateikti 4.6.2. lentelėje.



4.6.2. lentelė. IFA ir standartinės FAVN (100 AKID<sub>50</sub>) reakcijų lyginamieji duomenys

23	TT (tikrai teigiami) FAVN	NT (netikrai teigiami) IFA	1
1	NN (netikrai neigiami) IFA	TN (tikrai neigiami) FAVN	25

Remdamiesi (4.6.2. lentelė) pateiktais duomenimis, apskaičiavome IFA diagnostinį jautrumą:

$$\text{diagnostinio jautrumo proc.} = \frac{23}{23+1} \times 100 = 95,83$$

Tuo tarpu IFA specifiškumas buvo:

$$\text{diagnostinio specifiškumo proc.} = \frac{25}{25+1} \times 100 = 96,15 .$$

IFA parodė aukštą diagnostinį jautrumą ir specifiškumą, viršijantį 95%. Palyginus IFA ir FAVN metodus buvo nustatyti rezultatų neatitikimai gauti mėginiuose, kur buvo žemi antikūnų titrai: 1 rudosios lapės kraujo mėginio titras buvo 0,38 TV/ml arti 0,5 TV/ml, todėl klasifikuojamas kaip neigiamas. Daugiausia neatitikimų buvo dėl citotoksiškų lapių kraujo serumo mėginių, kurie atliekant FAVN reakciją slopina ląstelių augimą, tačiau kraujo serumo mėginių citotoksiškumas neturi reikšmės atliekant tyrimus IFA metodu. Todėl mes tolimesniuose serologiniuose laukinių gyvūnų ORV efektyvumo nustatymui tyrimuose naudojome būtent IFA tyrimą.

4.7. Usūrinių šunų ir rudųjų lapių oralinės vakcinacijos nuo pasiutligės efektyvumo įvertinimas

2006–2011 metais Lietuvoje buvo atliekama laukinių gyvūnų oralinė vakcinacija. Usūrinių šunų ir rudųjų lapių ORV nuo pasiutligės efektyvumo įvertinimui buvo atliktas serologinis tyrimas. 2006–2011 metais pasiutligės IFA tyrimu buvo ištirti 4122 sumedžiotų usūrinių šunų ir rudųjų lapių kraujo

mėginiai (4.7.1 lentelė). Vertinant usūrinių šunų ir rudųjų lapių ORV nuo pasiutligės imuninį atsaką IFA metodu buvo nustatyti specifiniai vakcininiam RV antikūnai 2185 mėginiuose, efektyvumas – 53,01% (PI 51,48 % – 54,53%) (4.7.1 lentelė).

**4.7.1 lentelė. Usūrinių šunų ir rudųjų lapių oralinės vakcinacijos efektyvumas 2006–2011 metais Lietuvoje**

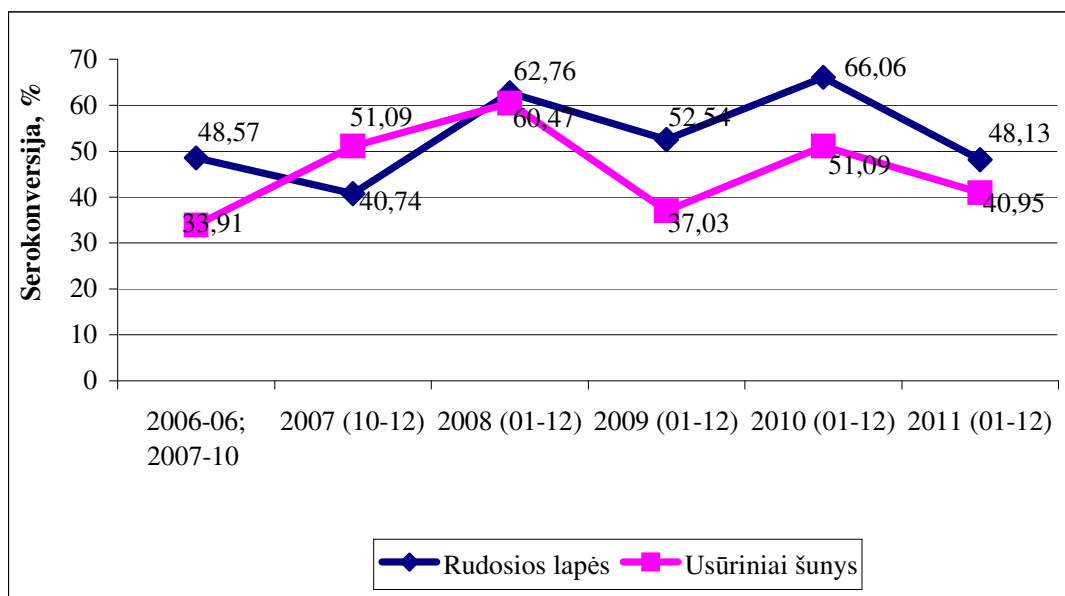
Apskritis	Ištirta, n	Teigiami, n	Efektyvumas, %
Alytaus	252	177	70,23
Kauno	404	166	41,08
Klaipėdos	280	133	47,50
Marijampolės	260	110	42,30
Panevėžio	272	135	49,63
Šiaulių	612	331	54,08
Tauragės	598	307	51,33
Telšių	531	310	58,38
Utenos	623	391	62,76
Vilniaus	290	125	43,10
Iš viso	4122	2185	53,01

Analizuojant atliktus usūrinių šunų kraujo serumų tyrimus buvo nustatyta, kad specifiniai vakcininiam RV antikūnai šioje populiacijoje sudarė 48,64% (PI 45,87% – 51,41%). Atlikta duomenų analizė tarp skirtingų usūrinių šunų amžiaus grupių (iki vienerių metų ir suaugusių > 1 metų) parodė nevienodą ORV efektyvumą (Chi testas,  $p=0,004$ ). Buvo ištirti 229 (iki vienerių metų) usūrinių šunų kraujo mėginiai. Iš jų 87 mėginiuose rasti specifiniai antikūnai (37,99%, PI 31,70% – 44,28%). Ištirtuose 1025 vyresnio amžiaus usūrinių šunų kraujo mėginiuose antikūnų rasta 523 (51,02%, PI 47,96% – 54,08%) (4.7.2 lentelė). Rudųjų lapių populiacijoje buvo ištirti 2868 kraujo mėginiai ir nustatyta, kad pasiutligės ORV efektyvumas šioje populiacijoje sudarė 54,92% (PI 53,10% – 56,74%). Buvo ištirti 382 (iki vienerių metų) rudųjų lapių kraujo mėginiai. Iš jų 191 mėginyje rasti specifiniai vakcininiam RV antikūnai (50,00%, PI 44,99% – 55,01%) (4.7.2 lentelė). Ištirtuose 2486 vyresnio amžiaus rudųjų lapių kraujo mėginiuose rasti specifiniai antikūnai 1384 mėginiuose (55,67%, PI 53,72% – 57,62).

4.7.2 lentelė. Usūrinių šunų ir lapių oralinės vakcinacijos nuo pasiutligės efektyvumo serologiniai tyrimai 2006-2011 metais

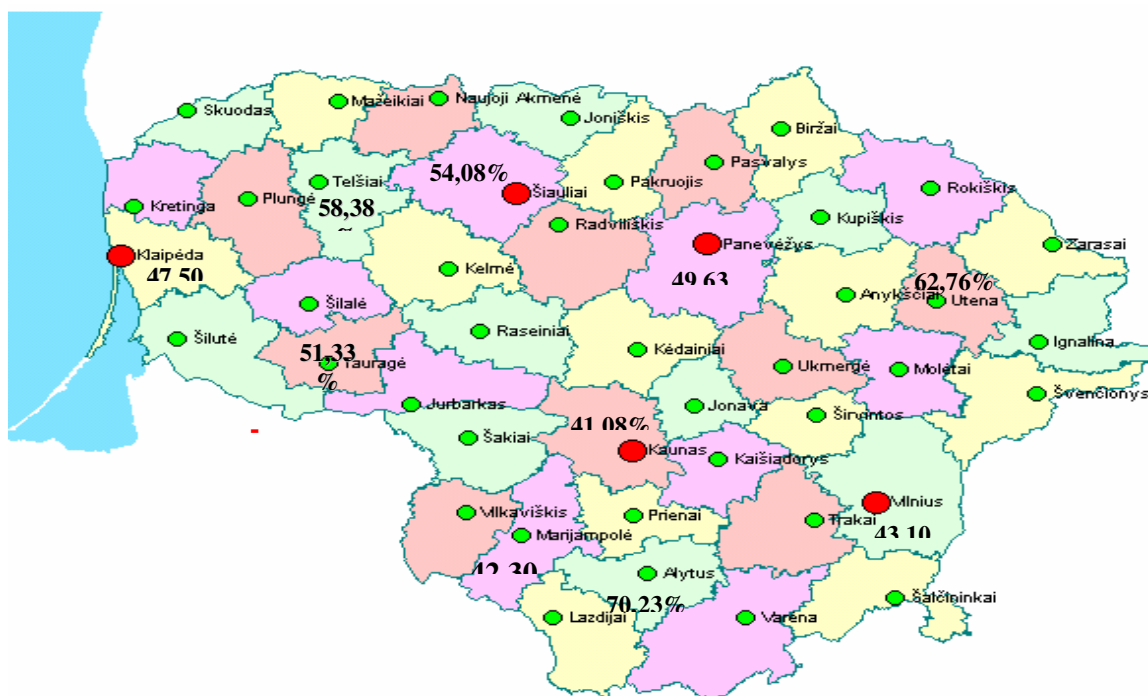
Metai (mėnesiai)	Amžiaus grupės	Usūriniai šunys			Rudosios lapės		
		Ištirta, n	Teigiamų, %	PI, %	Ištirta, n	Teigiamų, %	PI, %
2006 (06-12)	Jaunikliai <1 metų	25	8,00	-2,63-18,63	61	29,51	19,56 -41,89
2007 (01-10)	Suaugę >1 metų	90	41,11	30,94-51,28	429	51,28	46,55- 56,01
2007 (10-12)	Jaunikliai <1 metų	31	22,28	7,86-37,30	26	34,62	16,33 -52,91
	Suaugę >1 metų	198	55,56	48,64-62,48	136	41,91	33,62 - 50,20
2008 (01-12)	Jaunikliai <1 metų	18	61,11	38,59-83,63	49	59,18	45,42 - 72,94
	Suaugę >1 metų	149	60,40	52,55-68,25	464	63,15	58,76 - 67,54
2009 (01-12)	Jaunikliai <1 metų	5	40,00	-2,94-82,94	22	45,45	24,64 - 66,26
	Suaugę >1 metų	49	36,73	23,23-50,23	214	53,27	46,59 - 59,95
2010 (01-12)	Jaunikliai <1 metų	126	44,44	35,76-53,12	125	66,40	58,12 - 74,68
	Suaugę >1 metų	375	53,33	48,28-58,38	538	65,99	61,99 - 69,99
2011 (01-12)	Jaunikliai <1 metų	24	37,50	18,13-56,87	99	42,42	32,68 - 52,16
	Suaugę >1 metų	164	41,46	33,92-49,00	705	48,94	45,25 - 52,63
Viso		1254	48,64	45,87-51,41	2868	54,92	53,10- 56,74

Atlikta ORV efektyvumo duomenų analizė parodė, kad kaip ir tarp skirtingų usūrinių šunų amžiaus grupių (iki vienerių metų ir suaugusių > 1 metų) taip ir tarp skirtingų amžiaus rudųjų lapių grupių yra statistiškai reikšmingas skirtumas ( $p=0,0381$ ). Galime teigti, kad imuniteto susidarymas prieš pasiutligės virusą dažniau buvo efektyvesnis tarp vyresnio amžiaus gyvūnų nei jaunesnių.



4.7.1 pav. Rudųjų lapių ir usūrinių šunų ORV efektyvumas 2006-2011 metais.

Vakcinacijos efektyvumo dinamika pagal antikūnų nuo pasiutligės viruso susidarymą 2006-2011 metais statistiškai nereikšminga tarp rudųjų lapių ir usūrinių šunų (4.7.1 pav.).



4.7.2 pav. Usūrinių šunų ir rudųjų lapių ORV nuo pasiutligės efektyvumas % atskirose apskrityse 2006-2011 metais.

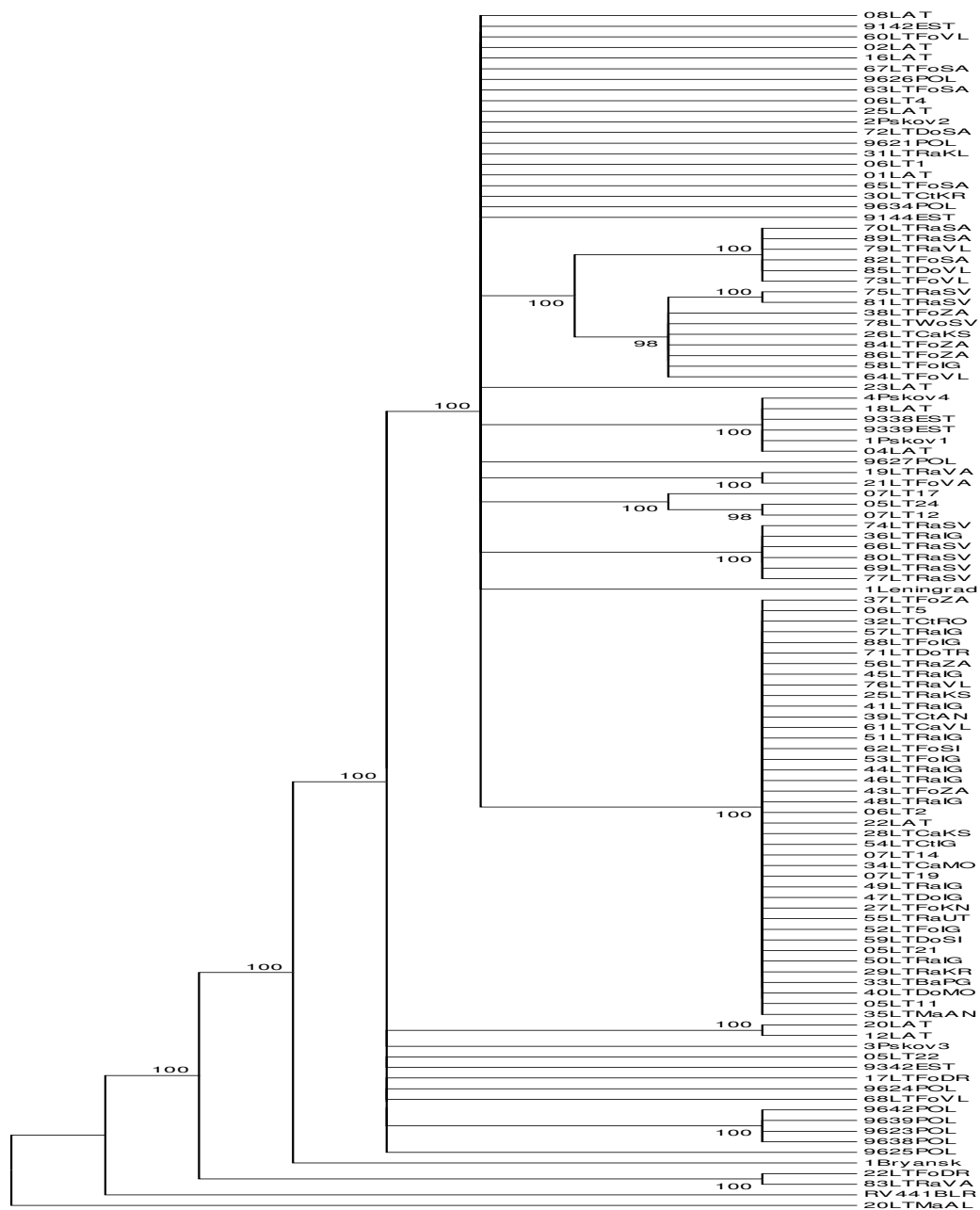
Remiantis 2006–2011 laukinių gyvūnų ORV duomenimis, žemėlapyje pažymėtas geografinis usūrinių šunų ir rudųjų lapių ORV nuo pasiutligės efektyvumas Lietuvoje pagal apskritis iš kur buvo paimti mėginiai (4.7.2 pav.).

#### 4.8. Pasiutligės viruso filogenetinė analizė

2007–2011 metais stebint laukinių ir naminių gyvūnų pasiutligės epidemiologinio proceso augimo tendenciją Lietuvos Baltarusijos pasienyje buvo atlikti pasiutligės virusų nukleoproteino (N) genetinių savybių filogenetiniai tyrimai.

Atliekant pasiutligės viruso nustatymą buvo naudoti pasiutligės FAT, RTCIT ir atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandininės reakcijos (AT-PGR) tyrimo metodai. Per 2007–2011 metus iš viso buvo atrinkti 75 teigiami pasiutligės galvos smegenų mėginiai, iš jų 59 laukinių ir 16 naminių gyvūnų mėginiai iš įvairių Lietuvos rajonų: rudųjų lapių (n=25), usūrinių šunų (n=31), vilkų (n=1), kiaunių (n=1), barsukų (n=1), šunų (n=7), kačių (n=4) ir galvijų (n=5). Pasiutligės FAT, RTCIT ir AT-PGR metodams palyginti buvo naudoti tie patys teigiami laukinių (n=59) ir naminių gyvūnų (n=16) galvos smegenų mėginiai. Gauti 2007-2011 metų laukinių ir naminių gyvūnų pasiutligės FAT, viruso identifikavimo RTCIT ir AT-PGR nustatyti nukleotidų sekos tyrimai parodė tuos pačius rezultatus – pasiutligės virusas.

AT-PGR produktų nukleotidų sekos nustatymui buvo naudoti JW12 ir JW6DPL pradmenys. AT-PGR metodu nustatėme 75 teigiamus pasiutligės rezultatus. Paskaičiavimai atlikti naudojant “Clustal W” programą, algoritmine išraiška atliktas sekų sugretinimas ir apskaičiuotas nukleotidų sekų procentinis identiškumas parodė, kad 2007-2011 metais Lietuvoje surinkti laukinių (rudųjų lapių, usūrinių šunų, vilkų, kiaunių) ir naminių gyvūnų (šunų, kačių ir galvijų) pasiutligės viruso mėginiai buvo genetiškai labai artimi (97-100%) (4.8.1 pav.). Geografiniam sekų palyginimui pasirinktos kaimyninėse šalyse cirkuliuojančių



4.8.1 pav. Filogenetinis medis: Lietuvos laukinių ir naminių gyvūnų populiacijoje paplitusio RV N geno 362bp filogenetinė analizė. Naudojant “Clustal W” ir MEGA4 buvo algoritmu atliktas sekų sugretinimas ir apskaičiuotas nukleotidų sekų procentinis identiškumas (Tamura, 2007). Medžiui pasirinkta 70% statistinė ribinė reikšmė. Santrumpos: LT-Lietuva; gyvūnų rūšys: Katė-Ca, Galvijai-Ga, Šuo-Do, Lapė-Fo, Kiaunė-Ma, Usūrinis-Ra, Vilkas-Wo; rajonas: Alytus-AL, Anykščiai-AN, Druskininkai-DR, Ignalina-IG, Kaunas-KN, Kaišiadorys-KS, Kretinga-KR, Molėtai-MO, Rokiškis-RO, Šalčininkai-SA, Širvintos-SI, Švenčionys-SV, Utena – UT, Varėna-VA, Vilnius-VL, Trakai-TR, Zarasai-ZA).

virusų sekos (Kissi et al., 1995; Vanaga et al., 2003; Mansfield et al., 2006; Larkin et al., 2007; Zienius et al., 2009).

Nustatyta, kad rudųjų lapių mėginių pasiutligės izoliatai N geno srityje taip pat yra filogenetiškai artimi kaip ir usūrinių šunų, vilko, kiaunės, šunų, kačių ir galvijų. Tyrimams buvo naudotos tapačios Baltarusijos, Lenkijos, Estijos, Latvijos ir Rusijos RV padermės (4.8.1 pav.). Filogenetinei analizei ir medžio konstravimui buvo panaudotos duomenų bazėje “GenBank” pateiktos Europoje paplitusios RV pogrupių nukleotidų sekos (Kissi et al., 1995; Vanaga et al., 2003; Mansfield et al., 2006; Larkin et al., 2007; Zienius et al., 2009).

#### 4.9. Žmonių, laukinių ir naminių gyvūnų imunoprofilaktikos priemonės nuo pasiutligės Lietuvoje

Remiantis statistiniais duomenimis buvo tirtas pasiutligės paplitimas ir vakcinacija žmonių, naminių bei laukinių gyvūnų populiacijose Lietuvoje. Pasiutligės paplitimo tarp žmonių ir jų vakcinacijos tyrimai buvo atlikti kartu su D. Razmuviene, Imunoprofilaktikos skyriaus vedėja, ULAC. Nustatyta, kad per pastaruosius penkis metus Lietuvoje kasmet nuo gyvūnų nukentėjo iki 7–10 tūkst. gyventojų. Dažniausiai žmones sužaloja šunys (kasmet anksčiau nukentėdavo 70–80%); 2006–2009 metais 23–30% žmonių nukentėjo nuo pasiutusių šunų, o 2010 metais tik 1,92%. Nuo gyvūnų nukentėję žmonės buvo vakcinuojami inaktyvuota pasiutligės vakcina Verorab® (Sanofi Pasteur, Prancūzija) ir leidžiami imunoglobulinai Imogam® Rabies (Sanofi Pasteur, Prancūzija), o nuo 2009-2007 metų apie vienus metus laiko buvo naudotas imunoglobulinas Favirab (Sanofi Pasteur, Prancūzija).

Tirtu laikotarpiu – 1960-2010 metais buvo užregistruoti 12 žmonių mirties atvejai nuo pasiutligės. Dažniausias infekcijų šaltinis buvo šunys ir lapės (4.9.1 lentelė). 2007 metais Lietuvoje buvo nustatytas žmogaus teigiamas pasiutligės atvejis, jis nebuvo skiepytas nuo pasiutligės, o keliaujant po Indiją jam įkando nežinomas šuo. Epidemiologinio tyrimo metu nustatyta, kad 2006 metų rudenį spalio-lapkričio mėnesiais 42 metų vyras kaip piligrimas, keliavo po Indiją.

Spalio mėnesio pradžioje į koją jam įkando nežinomas šuo, ligonis kreipėsi medicinos pagalbos Indijoje, tačiau liko neaišku kokia specifinė pagalba buvo suteikta. Grįžęs į Lietuvą ligonis dėl pasiutligės į sveikatos priežiūros įstaigas nesikreipė. Šeimos narių apie šuns įkandimą neinformavo. Praėjus mėnesiui po kelionės vyras pasijuto blogai, buvo hospitalizuotas, gydytas intensyvios terapijos skyriuje. Būklei blogėjant, situacija tapo kritiška, 2007 metų sausio pradžioje ligonis mirė. Mirusiojo artimieji nesutiko su siūlymu atlikti autopsiją, todėl 2007 sausio 5 d. kūnas buvo atiduotas artimiesiems. Pasiutligės diagnozė patvirtinta, kai ligonio seilių mėginiai buvo nusiųsti į Bernardo Nocho tropinės medicinos institutą Vokietijoje (Hamburge) ir gautas teigiamas atsakymas patvirtinus pasiutligės diagnozę PGR metodu.

4.9.1 lentelė. **Registruoti žmonių pasiutligės atvejai Lietuvoje 1960-2010.**

Rajonai	Metai	Teigiami, n	Užsikrėtimo šaltinis
Vilniaus miestas	1960	1	Šuo
Kaišiadorių rajonas	1962	1	Lapė
Švenčionių rajonas	1965	1	Usūrinis šuo
Kėdainių rajonas	1972	1	Barsukas
Trakų rajonas	1979	1	Lapė
Joniškio rajonas	1992	1	Usūrinis šuo
Trakų rajonas	1992	1	Šuo
Trakų rajonas	1993	1	Katė, šuo
Kėdainių rajonas	1997	1	Lapė
Pasvalio rajonas	2000	1	Lapė? Usūrinis šuo
Prienų rajonas	2004	1	Nenustatytas gyvūnas
Vilniaus miestas	2007	1	Šuo (Indijoje)

Įvertinta žmonių pasiutligės epidemiologinė situacija 2006–2010 metais Lietuvoje ir nustatyta, kad į sveikatos priežiūros įstaigas kasmet kreipėsi nuo 6923 iki 10790 nukentėjusių žmonių nuo įvairių naminių ir laukinių gyvūnų.



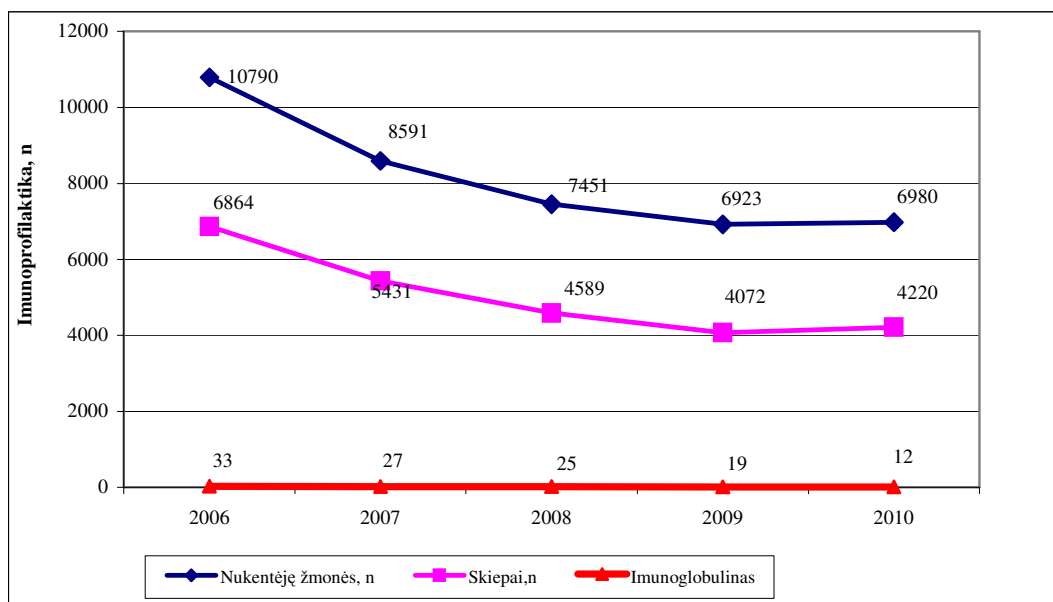
4.9.2 lentelė. Nukentėjusių žmonių pasiskirstymas pagal juos sužalojusių gyvūnų rūšį 2006-2010 metais.

Infekcijos šaltinis	Metai				
	2006	2007	2008	2009	2010
Šunys	7152	6562	5821	5430	5535
Katės	1458	1293	1139	1054	1111
Žiurkės	63	74	70	58	38
Galvijai	550	212	187	50	18
Kiti naminiai gyvūnai	175	46	66	85	67
Kiti laukiniai gyvūnai	1392	404	168	246	211
Iš viso	10790	8591	7451	6923	6980

Analizuoiant 2006-2010 metų ULAC ataskaitų duomenis nustatyta, kad 2006 metais į medikus kreipėsi 10790 žmonių, kurie nukentėjo nuo įvairių naminių ir laukinių gyvūnų, o 2007 – 8591, 2008 – 7451, 2009 – 6923, 2010 – 6980. Nustatyta, kad dažniau į sveikatos priežiūros įstaigas kreipėsi suaugę asmenys nei vaikai. 2006 – 2010 metais buvo registruoti 28 481 suaugęs ir 12 254 vaikai, kurie buvo sužaloti sveikų, įtariamų ar pasiutligę sergančių gyvūnų (4.9.2 lentelė).

Nustatyta, kad 2006-2010 metais dažniausiai Lietuvoje suaugę ir vaikai nukentėjo nuo šunų. Netvarkingai laikomi, benamiai ir turintys šeimininkus šunys apkandžiojo 20 485 suaugusius ir 10 015 vaikų. Šunys, kuriems buvo patvirtinta pasiutligė sužalojo 911 asmenų, jiems laiku buvo suteikta būtinoji medicinos pagalba ir paskirti skiepai nuo pasiutligės. Nuo kačių įkandimų, apdraskymų į medikus kreipėsi 6055 asmenys, iš kurių 461 žmogų sužalojo pasiutligę sergančios katės, 3314 asmenų sužalojo sveikos katės ir 2279 nežinomos katės. Kaimo gyventojai dažniausiai sužalojami galvijų ir jų prieauglio. Nustatyta, kad 2006–2010 metais medikų pagalbos prireikė 1017 kaimo gyventojų, iš kurių 844 asmenys buvo sužaloti pasiutligę sergančių galvijų, nuo sveikų galvijų nukentėjo 146 suaugę, o nuo nežinomų galvijų – 27 žmonės. Asmenys, kurie buvo sužaloti pasiutligę sergančių ar nežinomų galvijų bei jų prieauglio, laiku buvo vakcinuoti pasiutligės vakcina ir imunoglobulinu.

Statistiškai nustatyta, kad 2006–2010 metais pagalbos į medicinos įstaigas kreipėsi 2421 žmogus, nukentėjęs nuo įvairių laukinių gyvūnų, iš jų 1519 nukentėjo nuo pasiutligės sergančių, 158 – nuo sveikų ir 744 nuo nežinomų gyvūnų. 2006-2010 metais Lietuvoje poekspozicinei profilaktikai buvo taikoma pasiutligės vakcina ir imunoglobulinas, iš jų buvo suvakcinuoti 25 176 (61,80%) suaugę ir vaikai ir 116 (0,46 %) asmenų buvo skirtas imunoglobulinas (4.9.1 pav.). Pastaruosius penkerius metus (2006-2011 m.) yra stebima mažėjanti į gydymo įstaigas besikreipiančių asmenų, nukentėjusių nuo gyvūnų, tendencija. Besikreipiančiųjų ženkliai sumažėjo po 2006 m., kuomet mūsų šalyje pradėta vykdyti laukinių gyvūnų vakcinacija nuo pasiutligės.

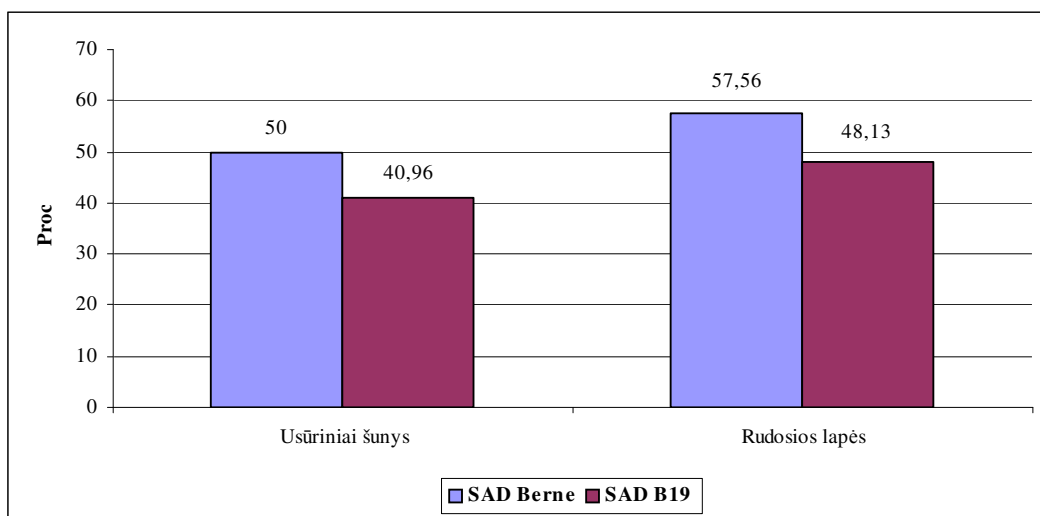


4.9.1 pav. Kontaktavusių ir paskiepytų žmonių nuo pasiutligės atvejų dinamika 2006-2010 metais.

Lietuvoje nuo 2006 metų du kartus per metus – pavasarį ir rudenį, buvo vykdoma laukinių gyvūnų ORV naudojant nusilpnintą SAD Berne vakciną, o 2011 metais nusilpnintą SAD B19 vakciną. Atlikta ORV naudotų dviejų nusilpnintų pasiutligės vakcinų efektyvumo analizė. Atlikus tyrimus nustatyta, kad po ORV SAD Berne ir SAD B19 vakcinomis, laukinių gyvūnų rūšyse seroteigiamų gyvūnų skaičius reikšmingai skyrėsi: usūrinių šunų ( $p=0,0222$ ) SAD Berne buvo 50,00% (PI 47,00% – 53,00%), o SAD B19 - 40,96% (PI

33,93% – 47,99%); rudųjų lapių ( $p=0,001$ ) SAD Berne buvo 57,56% (PI 55,42% – 59,68%), o SAD B19 - 48,13% (PI 44,68% – 51,58%) (4.9.2 pav.).

Siekiant sustabdyti pasiutligės viruso plitimą naminių gyvūnų tarpe, 2006–2011 metais visoje Lietuvoje buvo atliekama privaloma naminių gyvūnų (šunų ir kačių) vakcinacija nuo pasiutligės (4.9.3 lentelė). Analizuojant tyrimų duomenis nustatyta, kad didžiausią suvakcinuotų gyvūnų skaičių sudarė šunys – 887927, katės – 18940, galvijai – 254490, arkliai – 4757, avys ir ožkos – 2261, o kiti naminiai gyvūnai – 2186. Visi kiti naminiai gyvūnai buvo vakcinuojami po kontakto su sergančiais ar įtarius sergant pasiutlige gyvūnais šios ligos židiniuose.



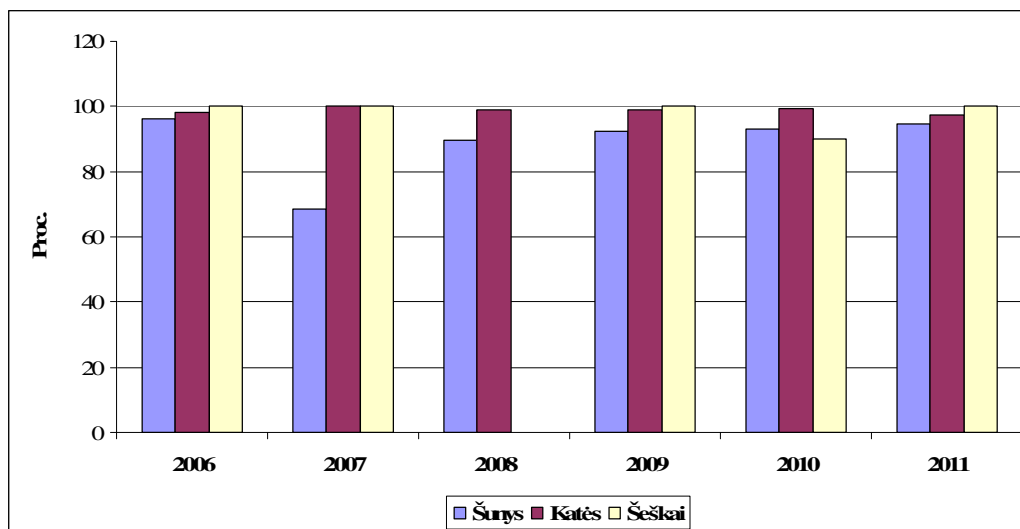
4.

9.2 pav. Nusilpnintų pasiutligės virusų SAD Berne ir SAD B19 vakcininės padermės vakcinų efektyvumas.

4.9.3 lentelė. Naminių gyvūnų vakcinacija nuo pasiutligės Lietuvoje 2006 – 2011 metais.

Metai	Šunys	Katės	Galvijai	Arkliai	Avys ir Ožkos	Kiti naminiai gyvūnai
2006	154470	32418	68459	1527	620	600
2007	141880	29475	55586	1094	644	114
2008	163202	35185	49367	850	383	552
2009	152558	33348	33452	632	430	310
2010	141884	29748	26821	391	119	307
2011	133933	29306	20805	263	65	303

2006–2011 metais buvo atlikti pasiutligės FAVN tyrimai. Vertinant FAVN rezultatus nustatyta, kad naminių gyvūnų (šunų, kačių ir šėškų) buvo iširta 5106, iš kurių 4837 buvo nustatyti specifiniai vakcininiam RV antikūnai  $>0,5\text{TV/ml}$  titre, tai sudarė 94,73% (PI 94,08% – 95,31%) (4.9.3 pav.).



4.9.3 pav. Naminių gyvūnų vakcinacijos nuo pasiutligės efektyvumas Lietuvoje.

Atlikus tyrimų duomenų analizę pagal naminių gyvūnų rūšis buvo nustatyti specifiniai vakcininiam RV antikūnai: šunims 93,86% (PI 93,08% – 94,55%), katėms 98,52% (PI 97,52% – 99,11%) ir naminiams šėškams 96,43% (PI 82,29% – 99,37%). Pritaikius tiesinės regresijos modelį. 2006 - 2011 m. naminių gyvūnų vakcinacijos nuo pasiutligės efektyvumo duomenimis, galima teigti, kad efektyvumas turi tendenciją mažėti (vidutiniškai po 0,52 procentinio punkto per metus,  $p=0,4610$ ), tačiau šis mažėjimas nėra statistiškai reikšmingas. Taigi galime daryti išvadą, kad naminių gyvūnų vakcinacijos nuo pasiutligės efektyvumas nagrinėjamame laikotarpyje buvo stabilus ir siekė 93-98%. Pagal 2006 - 2011 m. šunų vakcinacijos nuo pasiutligės efektyvumo tyrimų duomenimis, galima teigti, kad šis rodiklis nagrinėjamame laikotarpyje lieka stabilus, nors ir turi nežymią tendenciją mažėti (vidutiniškai po 0,62 procentinio punkto per metus,  $p=0,8046$ ). Lygiai tokią pat išvadą galima padaryti nagrinėjant ir kačių vakcinacijos nuo pasiutligės efektyvumo duomenimis: nors ir turi mažesnę tendenciją mažėti nei šunų efektyvumas (vidutiniškai po 0,13

procentinio punkto per metus,  $p=0,6573$ ), tačiau taip pat galima teigti, kad šis rodiklis nagrinėjamame laikotarpyje lieka stabilus. Apibendrinus FAVN tyrimo duomenis tarp skirtingų naminių gyvūnų rūšių galima teigti, kad Lietuvoje naminių gyvūnų pasiutligės imunoprofilaktikai naudojamos vakcinos yra efektyvios.

## 5. TYRIMŲ DUOMENŲ APIBENDRINIMAS

2003-2011 metų laikotarpiu laukinių ir naminių gyvūnų populiacijose pasiutligės paplitimas buvo registruotas visuose rajonuose. Atlikus tyrimus mes nustatėme, kad per šį laikotarpį 6157 laukiniai ir naminiai gyvūnai buvo užsikrėtę RV. Lyginant pasiutligės paplitimą laukinių ir naminių gyvūnų populiacijose buvo nustatyta, kad 2003–2011 metų laikotarpyje pasiutligės infekuotumas buvo didžiausias laukinių gyvūnų grupėje: laukiniai gyvūnai sudarė 41,13% visų pasiutligės atvejų, o naminių gyvūnų infekuotumas buvo mažesnis – 21,87%. Didžiausias pasiutligės paplitimas buvo nustatytas usūrinių šunų (53,88%) ir rudųjų lapių (41,10%) populiacijose. Pagal tyrimų rezultatus kitų laukinių gyvūnų tarpe pasiutligė buvo paplitusi mažiau, tai yra nuo 30,69% iki 2,44%, išskyrus barsukus, tarp kurių infekuotumas buvo gana aukštas (49,33%). Nuo 2003 iki 2006 laukinių ir naminių gyvūnų populiacijose registruotų pasiutligės atvejų Lietuvoje didėjo. Mūsų duomenų analizė parodė, kad 2006 metais pasiutligės teigiamų atvejų skaičius pasiekė aukščiausią lygį – 2232 atvejai, tai yra 59,22%. Didžiausias pasiutligės infekuotumas Lietuvos kaimyninėse šalyse 2006 metais buvo nustatytas: Baltarusijoje 1499, Rusijoje 1349, Latvijoje 472 (RBE, 2011). Lyginant registruotų pasiutligės atvejų skaičių su Lietuvos kaimynėmis tuo pačiu metu (2006 m.) Estijoje taip pat buvo nustatytas didžiausias pasiutligės atvejų pikas (Cliquet et al., 2012). 2007 – 2011 metų laikotarpyje pasiutligės teigiamų atvejų skaičius tolygiai mažėjo. Jeigu 2007 metais buvo registruoti 428 pasiutligės atvejai, tai 2011 metais buvo registruota tik 14 pasiutlige užsikrėtusių gyvūnų, kas sudarė tik 1,6% nuo visų mūsų tirtų gyvūnų skaičiaus. Apibendrinant 2007-2011 metų registruotus pasiutligės atvejus galime teigti, kad pasiutligės atvejų mažėjimas buvo pastebėtas net tik Lietuvoje, bet kaimyninėse šalyse, išskyrus Baltarusiją (RBE, 2011).

Lietuvoje 2003-2011 metų laikotarpiu mūsų atlikti pasiutligės laukinių gyvūnų tyrimai parodė, kad pagrindinis pasiutligės rezervuaras yra usūriniai šunys ir rudosios lapės. Šie tyrimų rezultatai atitinka kitų tyrėjų

duomenis, gautus 1995-2009 metų pasiutligės paplitimo usūrinių šunų ir rudųjų lapių populiacijose trijose Baltijos šalyse (Lietuvoje, Latvijoje ir Estijoje) (Robardet and Cliquet, 2010). Šiuose tyrimuose teigiama, kad trijose Baltijos šalyse nuo 1989 iki 2009 metų daugiausia pasiutligės teigiamų atvejų (7249, 48%) buvo rasta rudųjų lapių populiacijoje (n=15101), iš tokio pat ištirtų 15101 mėginių skaičiaus usūrinių šunų populiacijoje buvo rasta (5906, 39%) teigiamų atvejų (Robardet and Cliquet, 2010). Ir tik vienų metų laikotarpyje, t. y. 2000 metais buvo pastebėta tendencija, kad pasiutligė daugiausia vyravo usūrinių šunų populiacijoje. Atlikta tyrėjų rezultatų analizė parodė, kad 2000 metais Estijoje ir Lietuvoje nustatytas didesnis pasiutligės atvejų skaičius buvo usūrinių šunų populiacijoje, nei rudųjų lapių populiacijoje, skirtingai nuo Latvijos (Robardet and Cliquet, 2010).

Atlikus pasiutligės tyrimų FAT rezultatų analizę nustatėme, kad 4860 laukinių ir 1297 naminiai mėsėdžiai gyvūnai (lapės, usūriniai šunys, šunys, katės ir kt.) 2003-2011 laikotarpyje buvo pagrindinis pasiutligės užsikrėtimo šaltinis, todėl yra padidėjusi rizika užsikrėsti kitiems laukiniams žvėrimis (stirnomis, elniams, briedžiams, kiškiams, šernams ir kt.) ir naminiams gyvuliams (galvijams, arkliams, ožkoms ir kt.). Pasiutligės epidemiologinė būklė labiausiai yra susijusi su usūrinių šunų ir rudųjų lapių populiacijos didėjimu. Pasiutligės virusams infekuojant usūrinių šunų ir rudųjų lapių populiacijas individų skaičius jose ima mažėti iki slenkstinės imlių gyvūnų koncentracijos ploto vienetu, užtikrinančios pasiutligės persistentinį perdavimą (Toma, Andral, 1977). Lyginant rudųjų lapių populiacijos paplitimą 2003-2007 metų laikotarpiu, 2004 metais buvo nustatytas žymiai mažesnis populiacijos paplitimas (Robardet and Cliquet, 2010), o 2006 metais padidėjo. 2007-2009 metais populiacijos paplitimas buvo stabilus (Robardet and Cliquet, 2010). Analizuojant mūsų devynerių metų pasiutlige infekuotų rudųjų lapių populiacijoje tyrimų duomenis Lietuvoje, pastebėta, kad 2003 (74,07%) ir 2004 (31,51%) metais, taip pat 2007 metais (32,20%) didžiausią infekuotumą gamtoje sudarė rudosios lapės. Vertinant rudųjų lapių populiacijos augimą, galime teigti, kad mūsų nustatytam pasiutligės atvejų (n=686) padidėjimui 2006

metais galėjo turėti įtakos šių laukinių gyvūnų populiacijos padidėjimas. 2007-2011 metų laikotarpyje mes nustatėme, kad registruotų pasiutligės atvejų skaičius kasmet mažėjo ir šiam mažėjimui įtakos galėjo turėti ne tik prasidėjusi laukinių gyvūnų pasiutligės ORV, bet ir tai, kad 2007-2009 metais rudųjų lapių populiacijos padidėjimas nebuvo pastebėtas (Robardet and Cliquet, 2010).

Mūsų tyrimų duomenimis, 2005-2006 metų laikotarpiu (85,20%) buvo stebimas didesnis registruotų pasiutligės atvejų skaičius usūrinių šunų populiacijoje. Vertinant 2004 metų usūrinių šunų populiacijos paplitimo skirtumus su 2002-2003 metais, 2004 metais buvo nustatytas populiacijos mažėjimas (Robardet and Cliquet, 2010). Toliau 2005-2006 metais buvo nustatytas usūrinių šunų populiacijos didėjimas. Mūsų duomenimis, daugiausia usūrinių šunų pasiutligės registruotų atvejų buvo taip pat 2006 metais (n=987). 2007-2011 metų laikotarpyje mes nustatėme, kad registruotų pasiutligės atvejų skaičius usūrinių šunų populiacijoje kasmet mažėjo. Šiam mažėjimui įtakos galėjo turėti ne tik prasidėjusi laukinių gyvūnų pasiutligės oralinė vakcinacija, bet ir kitų tyrėjų duomenimis 2007-2009 metais Lietuvoje nustatytas vienodas usūrinių šunų skaičius populiacijoje.

Apibendrinant 5 metų (2007-2011) tyrimų laikotarpį pastebėjome, kad naminių ir laukinių gyvūnų pasiutligė atskiruose regionuose paplitusi tik Rytinėje ir Pietrytinėje Lietuvos dalyse. Geografiškai daugiausia pasiutligės atvejų nustatėme Rytinėje ir Pietrytinėje Lietuvos dalyje – Baltarusijos pasienyje. 2011 metais daugiausiai – 14 pasiutligės židinių buvo užregistruoti rytiniuose Lietuvos rajonuose, kurie ribojasi su Baltarusija. Manoma, kad pasiutligės virusas į mūsų šalį pateko iš kaimyninės šalies, kurioje laukinių gyvūnų vakcinacija nuo pasiutligės nebuvo vykdoma. Remiantis pasiutligės FAT rezultatais galime teigti, kad atlikus laukinių gyvūnų ORV pasiutligės atvejų kasmet mažėja.

Mūsų taikyti tyrimo metodai pasiutligės diagnozei nustatyti parodė pakankamą metodo specifiškumą ir patikimumą. Šiuo atveju buvo palyginti pasiutligės diagnostinis FAT metodas naudojant komercinius FITC žymėtus polikloninius antikūnus specifinius pasiutligės virusui ir RTCIT metodas



naudojant N2a CCL-131 ląstelių linijas identifikuojant komerciniais FITC žymėtais monokloniniais antikūnais. Atlikus tyrimus nustatėme, kad naudotas FAT metodas yra pakankamai jautrus ir specifiškas. Tyrimų duomenų analizė parodė, kad FAT ir RTCIT metodais buvo nustatytas vienodas pasiutligės infekuotų ir neinfekuotų usūrinių šunų ir rudųjų lapių mėginių skaičius. ES šalyse pasiutligės diagnostikai FAT metodu – galvos smegenų audinių dažymui naudojami šie pasiutligės virusui specifiniai FITC žymėti antikūnai: polikloniniai antikūnai (Bioveta), monokloniniai antikūnai (Biorad), monokloniniai antikūnai (Fujirebio), monokloniniai antikūnai (Millipore), monokloniniai antikūnai (SIFIN) (Robardet et al., 2012). Šiems penkiems aukščiau išvardintiems diagnostiniams preparatams skirtiems identifikuoti pasiutligės virusą, buvo atliekama kokybinė ir kiekybinė analizė. Tyrimus organizavo ES referentinė pasiutligės laboratorija ANSES Nancy, Prancūzijoje. Tyrimuose dalyvavo dvylika laboratorijų. Kiekvienai laboratorijai buvo atsiųsti paruošti užkoduoti liofilizuoti galvos smegenų mėginiai ir užkoduoti penki aukščiau minėti diagnostiniai preparatai, kurie jau buvo paruošti darbui. Atliktų tyrimų rezultatų analizė parodė, kad Fujirebio firmos FITC žymėti antikūnai jautriausi ir yra vieni iš 5 geriausių diagnostinių preparatų ir tinkamiausi pasiutligės diagnostikai. EBLV-1 rūšies virusui nustatyti tinkamiausias yra Millipore diagnostinis preparatas, taip pat jam lygiavertis yra Fujirebio firmos diagnostinis preparatas EBLV-2 ir ABLV rūšies virusams nustatyti (Robardet et al., 2012). Vertinant specifiškumą greta geriausių yra Millipore ir SIFIN firmų diagnostiniai preparatai (Robardet et al., 2012). Atlikti tyrimai parodė, kad geriausi yra Fujirebio ir Millipore diagnostiniai preparatai, nes jų sudėtyje yra monokloninių antikūnų mišinys (Robardet et al., 2012). Firmos Biorad diagnostinis preparatas yra greta kitų trečioje vietoje, jo sudėtyje yra trijų monokloninių antikūnų mišinys (Robardet et al., 2012). Vertinant pagal kokybės eiliškumą Bioveta ir SIFIN firmų diagnostiniai preparatai yra žemiausioje vietoje, nes jų sudėtyje yra polikloniniai antikūnai. Šie rezultatai parodė, kad efektyvumas susijęs su rūšiniais antikūnais, naudojami monokloniniai antikūnai parodė aukštesnius atitikimo rezultatus (Robardet et

al., 2012). Atliktų pasiutligės diagnostinių preparatų tyrimų analizė tik dar kartą patvirtino, kad mūsų atliekama pasiutligės diagnostika yra patikima, nes FAT tyrimų rezultatai buvo tvirtinami RTCIT ir AT-PGR metodais.

Šiuo metu pasiutligės diagnostikai plačiai taikomi molekulinės biologijos metodai. AT-PGR metodu pasiutligę 2007-2011 metais buvo diagnozuojama patvirtinant teigiamus pasiutligės atvejus ir atliekant pasiutligės virusų nukleoproteino (N) genetinių savybių filogenetinę analizę, kai prieš tai pasiutligę diagnozuojama FAT ir RTCIT metodais. Išanalizavus mūsų atliktų tyrimų rezultatus nustatėme, kad laukinių ir naminių gyvūnų RV padermės N geno sekoje kartu su kaimyninių šalių RV padermėmis filogenetiniuose medžiuose formuoja aiškiai apibrėžtas filogenetines šakas. Mūsų atlikta laukinių ir naminių gyvūnų populiacijoje paplitusio RV N geno 362bp filogenetinė analizė rodo, kad lietuviškos padermės patenka į Šiaurės Rytų Europos pogrupį – NEE. Kaimyninių šalių RV padermės grupuojasi kartu su lietuviškomis neparodant nei rūšinės nei aiškios geografinės priklausomybės, tuo patvirtinant ankstesnius stebėjimus. Laukinių ir naminių gyvūnų RV izoliatai tarpusavyje filogenetiškai buvo labai artimi nukleotidų sekų identiškumu (98%). Tai rodo tiesioginį viruso paplitimą tarp minėtų rūšių ir bendro sukėlėjo cirkuliaciją šiose populiacijose (Zienius et al., 2009). Nedideli nukleotidų skirtumai leidžia manyti, kad pasiutligės virusai nėra visiškai vienalyčiai rudųjų lapių ar usūrinių šunų bei kitų laukinių bei naminių gyvūnų populiacijose. Mūsų tyrimai parodė, kad tam tikras nukleotidų sekų heterogeniškumas pastebimas ir kitų laukinių bei naminių gyvūnų populiacijos viduje. Mūsų atliktų tyrimų N geno filogenetinė analizė patvirtino kitų autorių aprašytų tyrimų išvadas, kad visi Lietuvos pasiutligės virusai priklauso pirmam genotipui ir priskiriami Šiaurės Rytų Europos – NEE pogrupiui (McElhinney et al., 2008, Zienius et al., 2009), nepriklausomai nuo pasiutligės viruso izoliavimo datos (mėginiai buvo renkami 2007-2011 metais).

Iš filogenetinės analizės neįmanoma tiksliai nustatyti ar rudosios lapės buvo pasiutligės viruso šaltinis ir infekavo usūrinius šunis, ar atvirkščiai vėliau usūriniai šunys infekavo lapes (Bourhy et al., 1992, 1993). Šiaurės Rytų

Europos (NEE) geografinės grupės padermė yra randama tame regione, kuriame lapių populiacija yra didžiausia – parodo imlių šeiminių tankumą, kaip ir rūšies donoro artumą, o pagrindinis ekologinis faktorius nustatant pasiutligės virusą naujos rūšies šeimininke ir, taip pat, galbūt NEE padermė geriausiai prisitaiko prie šios rūšies nors tai yra klausimas, kurį reikia papildomai išanalizuoti (Bourhy et al., 1992, 1993). Atsižvelgdami į mūsų 2007-2011 atliktus tyrimus Lietuvoje ORV periodu galime daryti išvadą, kad filogenetinė N geno sekų analizė parodė tiesioginį glaudų geografinį ryšį tarp kaimyninių šalių: Estijos, Latvijos, Baltarusijos ir Lenkijos. Tiesioginį glaudų geografinį ryšį tarp šių šalių pastebėjo ir kiti mokslininkai (Kissi et al., 1995; Vanaga et al., 2003; Mansfield et al., 2006; Larkin et al., 2007; Zienius et al., 2009)

Analizuojant 2006-2011 metų usūrinių šunų ir rudųjų lapių infekuotumo pasiutlige dinamiką pastebėjome, kad susirgimų skaičius kasmet mažėjo dėl visoje Lietuvos teritorijoje atliekamos laukinių gyvūnų ORV nuo pasiutligės naudojant nusilpnintą SAD Berne vakciną (viruso padermė Lysvulpen) (Bioveta, Čekijos Respublika), o nuo 2011 metų – susilpnintą SAD B19 vakciną (viruso padermė Fuchsoral) (Vokietija). Naudojama nusilpninta ar inaktyvuota pasiutligės viruso vakcina sukianti imuninį atsaką individui nesukelia pasiutligės patogeninio viruso infekcijos (Wang et al., 2005; Franka et al., 2009). ORV nuo pasiutligės efektyvumas labai priklauso nuo virusų ir masalo stabilumo, nes pavasarį ir vasarą virusų kiekis vakcinoje greitai mažėja. Masalas greitai yra, esant aukštai aplinkos temperatūrai bei lyjant (EC, 2002). Nusilpninots SAD Berne padermės vakcinos gamintojo nurodytas titras buvo ne mažiau kaip  $10^{7.0}$  AKID<sub>50</sub>/dozė. Remiantis kitų tyrėjų bandymais buvo įrodyta, kad ORV efektyvumas lauke priklauso nuo dozės ir vakcinos viruso titro stabilumo, ir masalo apvalkalo. Atliktuose bandymuose parodyta, kad masalo apvalkalas buvo stabilesnis šešėlyje, negu saulės šviesoje, paveiktas kritulių masalo apvalkalas tapo minkštas. Esant sausoms oro sąlygoms nustatytas pakankamas pasiutligės vakcinos viruso titras, o esant drėgnoms oro sąlygoms buvo nustatytas sumažėjęs vakcinos viruso titras. Galima teigti, kad masalų dalijimas drėgnomis oro sąlygomis gali būti neefektyvus atliekant oralinės

pasiutligės vakcinacijos programą (Mačiulskis et al., 2008). Vos ir kt. (1999) autoriai tyrimams panaudojo 16 gyvūnų rūšių iš įvairių administracinių vietų ir išanalizavo SAD B19 vakcinės saugumą, kuriame teigiama, kad mažas patogeniškumo kiekis buvo nustatytas tik graužikų rūšiai, bet atlikus tyrimus iš seilių šešiams žinduoliams vakcinio viruso nenustatyta, o kontroliuojamiems kitiems gyvūnams vakcininis virusas nebuvo perduotas. Be to, genetinį vakcinės SAD B19 stabilumą parodė ir atliktas tiesioginis pasąžavimas naudojant šunų, lapių ir pelių nervinį audinį (Vos et al., 1999). Atliktų infekuotumo ir stabilumo tyrimų rezultatai parodė, kad SAD B19 vakciną galima naudoti mėšėdžių oralinei vakcinacijai nuo pasiutligės (Vos et al., 1999, 2002, 2011; Neubert et al., 2001; et al., 2008; Muller et al., 2009). Šiuo metu vakcinacijai nuo laukinių gyvūnų pasiutligės rekomenduojama naudoti VR-G ir Rabigen SAG2 vakcinas (EMA, 2010). Komercinė Raboral V-RG vakcina yra stabili aukštai temperatūrai, todėl ją galima naudoti ORV vasaros metu (Masson et al., 1999; EC, 2002).

Pasiutligės virusą neutralizuojantiems antikūnams nustatyti yra naudojami kiekybiniai serologinės neutralizacijos tyrimo metodai užkrečiant peles arba ląstelių linijas. PSO rekomenduojami metodai yra MNT (*angl. Mouse Neutralisation Test*) (Webster et al., 1996) ir RFFIT (*angl. Rapid Fluorescent Focus Inhibition*) (Smith et al., 1973). Atliekant MNT testą galima naudoti laboratorinius gyvūnus (peles), tačiau šis metodas turi trūkumą, nes yra ilga tyrimo trukmė (28d.). RFFIT teste naudojamos ląstelių linijos, o atlikimo technika labai panaši į FAVN (Cliquet et al., 2000). Virusų neutralizacijos tyrimas taip pat labai tinkamas šikšnosparnių pasiutligės epidemiologiniams tyrimams (Arguin et al., 2002; Lumlertdacha et al., 2005). Šis tyrimas atliekamas naudojant 96-duobučių mikroplokštes pagal pritaikytą metodą (Smith et al., 1996). Atlikti palyginamieji FAVN ir RFFIT metodų tyrimai parodė, kad abu metodai turi panašų jautrumą ir specifiškumą (Thomas, 1975; Zalana et al., 1979; Cliquet et al., 1998).

Šiuo metu ORV efektyvumui įvertinti yra naudojamas netiesioginės IFA taip pat leidžia atlikti kokybinį ir kiekybinį specifinių vakcininiam RV antikūnų

nustatymą individualiuose laukinių ir naminių gyvūnų kraujo serumuose. Šis tyrimo metodas dažniausiai yra naudojamas laukinės faunos oralinės vakcinacijos efektyvumo įvertinimui. IFA komerciniame rinkinyje yra paruoštos naudojimui pasiutligės viruso glikoproteinu padengtos plokštelės, o greita ir paprasta IFA atlikimo technika galima nustatyti pasiutligės antikūnų kiekį laukinės faunos mėginiuose (Mebatsion et al., 1989, Esterhuysen et al., 1995; Cliquet et al., 2000, 2003, 2004, 2007; Servat et al., 2007).

Specifiniams vakcininiams RV antikūnams nustatyti mes atlikome IFA ir FAVN metodų palyginimus. Atlikus tyrimus nustatėme, kad mūsų naudota IFA vakcininių antikūnų įvertinimui yra pakankamai jautri ir specifiška. Tiriant mėginius IFA metodu, buvo rasta daugiau serologiškai teigiamų mėginių, nei tiriant standartiniu FAVN metodu, nes 4 kraujo serumo mėginiai buvo citotoksiški mūsų tyrime naudojamai ląstelių kultūrai. Šie mūsų tyrimų rezultatai parodė, kad mūsų naudotas IFA metodas yra daug jautresnis ir neduoda nespecifinės reakcijos dėl prastos mėginio kokybės. Todėl usūrinių šunų ir rudųjų lapių ORV efektyvumui įvertinti mes pasirinkome IFA tyrimo metodą. Nustatant IFA metodo tinkamumą tyrimus atliko ir kitų šalių mokslininkai tyrėjai ir kai kuriais atvejais jų nuomonės išsiskiria, todėl šiuo klausimu vis dar vyksta įvairios mokslinės diskusijos, taip pat yra bandomi nauji įvairių gamintojų IFA rinkiniai (Cliquet et al, 2000, Servat et al. 2007, Knoop et al. 2010, Wasniewski and Cliquet, 2012). NMVRVI taip pat gavome pakvietimą dalyvauti ir šiuo metu mes dalyvaujame tolimesniuose tyrimuose ir diskusijose šiuo klausimu.

Usūrinių šunų ir rudųjų lapių ORV nuo pasiutligės efektyvumo nustatymui 2006–2011 metais Lietuvoje, mes taikėme IFA tyrimo metodą, kuriuo remdamiesi atlikome specifinių vakcininiam RV antikūnų duomenų analizę. Pagal PSO rekomendaciją po vakcinacijos antikūnų titras 0,5T V/ml yra riba, rodanti gerą apsaugą nuo pasiutligės usūriniams šunims ir rudosioms lapėms (Matouch et al., 2008). Kita vertus, specifinių vakcinių RV antikūnų nustatymas leidžia netiesiogiai įvertinti vakcinų efektyvumą laukinių gyvūnų ORV metu (Servat et al., 2007). Mūsų atliktų IFA tyrimų rezultatai parodė, kad

ištirtuose 229 usūrinių šunų jauniklių mėginiuose buvo nustatyti antikūnai (37,99%). Todėl manome, kad usūrinių šunų jaunikliai, nesuėdę masalo su vakcina, ir toliau lieka potencialūs pasiutligės viruso nešiotojai ir platintojai. IFA tyrimų analizė parodė, kad ištirtuose 382 (iki vienerių metų) rudųjų lapių kraujo mėginiuose buvo nustatyti specifiniai antikūnai (50%). Mūsų atlikta rudųjų lapių ORV efektyvumo duomenų analizė tarp gyvūnų skirtingų amžiaus grupių parodė, kad didelių skirtumų nėra. Išanalizavę usūrinių šunų serokonversijos duomenis pastebėjome, kad imuniteto susidarymas nuo pasiutligės viruso yra efektyvesnis vyresnio amžiaus usūrinių šunų populiacijoje, nei jaunesnių. Atlikti IFA tyrimai tik dar kartą patvirtino, kad ORV nuo pasiutligės programa yra efektyvus būdas kovojant su usūrinių šunų ir rudųjų lapių pasiutlige. Vertinant kitų šalių laukinių gyvūnų ORV efektyvumą, taip pat stebima pasiutligės atvejų mažėjimo tendencija. Pastebėta, kad Estijoje nuo 2005-2011 metų vykdant oralinę laukinių gyvūnų imunizaciją buvo sėkmingai išnaikinta pasiutligė, nuo 2008 metų buvo rasti tik 4 pasiutligės atvejai Pietrytiniame šalies pasienyje (Cliquet et al., 2012). Lapių ir usūrinių šunų oralinei imunizacijai Estijoje buvo naudojama 27 ES šalyse registruota SAG-2 vakcina (Rabigen, Virbac Laboratories, Carros, Prancūzija), sukianti specifinių antikūnų susidarymą nuo pasiutligės (Cliquet et al., 2012). Latvijoje 1992–2000 metais ORV programos metu buvo išdalinta 443,710 jaukų rankomis 4,000 km<sup>2</sup> (Vanaga et al., 2003). 2001-2003 metais ORV buvo tęsiama visoje Latvijos teritorijoje, o jaukų su vakcina dalijimas buvo atliekamas rankomis (Vanaga et al., 2003). Nuo 2005 metų ORV programa buvo vykdoma pavasarį ir rudenį dalijant jaukus su vakcina iš lėktuvo 23-25 jaukai/km<sup>2</sup> tankumu. Latvijoje per minėtą laikotarpį buvo naudojamos SAD Berne ir SAD B19 nusilpnintos vakcinos, o nuo 2009 metų tik SAD B19. 2011 metais pasiutligės atvejų Estijoje nebuvo užregistruota, o Latvijoje buvo registruotas tik vienas pasiutligės atvejis (Cliquet et al., 2012). Šie Latvijos bei kitų mokslininkų pateikti duomenys tik patvirtina išvadą, kad mūsų šalyje laukinių gyvūnų ORV metu naudojamos vakcinos yra pakankamai efektyvios.

Stiprėjant populiacijos imunitetui gausėja populiacija, t.y. padidėja imlių infekcijai gyvūnų skaičius, o ypač jauniklių grupėje vasaros metu (Niin et al., 2008). Lietuvoje laukinių gyvūnų pasiutligės oralinė vakcinacija atliekama du kartus per metus – pavasarį ir rudenį. Europos usūriniai šunys jauniklius atsiveda gegužę, nes jų ilgesnis neštumo laikotarpis negu lapių (Kauhala, 1996), o lapės – nuo balandžio 15 iki gegužės 15 (Llyod, 1980). Pastebėti skirtumai dėl maisto paėmimo tarp lapių ir usūrinių šunų jauniklių: lapės jaunikliai – ima maistą (jauką) dantimis (Mac Donald, 1987), o usūrinių šunų jaunikliai maisto neima (Llyod, 1980). Tai patvirtina mūsų tyrimų rezultatai – usūrinių šunų jauniklių tarpe nustatėme mažesni ORV efektyvumą nei suaugusiųjų tarpe, taip pat pastebėjome tendenciją, kad rudeninės ORV efektyvumas usūrinių šunų tarpe yra didesnis. Todėl reikia pastebėti, kad sėkminga laukinių gyvūnų ORV priklauso nuo kelių faktorių, t. y. aiškios vakcinacijos vietos, vakcinacijos laiko, išplatintos vakcinos (masalo) būdo ir jų skaičiaus, vakcinos savybių ir programos efektyvumo.

Lietuvoje per pastaruosius 5 metus (2006-2010 m.) yra stebima mažėjanti į medikus besikreipiančių asmenų, nukentėjusių nuo gyvūnų, tendencija. Besikreipiančiųjų ženkliai sumažėjo po 2006 m., kuomet mūsų šalyje pradėta vykdyti laukinių gyvūnų vakcinacija nuo pasiutligės. Galime teigti, kad didelis 2006 metais pasiutligės atvejų skaičius Lietuvoje turėjo tiesioginį poveikį žmonių pasiutligės epidemiologijai, nes tais metais didelis skaičius žmonių nukentėjo nuo naminių gyvūnų, ypač nuo šunų ir kačių. Šis skaičius nuo 2007 metų mažėjo, tačiau išlieka ganėtinai didelis. Todėl mūsų nuomone, reikėtų stebėti ir intensyvinti benamių šunų ir kačių populiacijos kontrolę, tęsti ir intensyvinti švietėjišką darbą visuomenės tarpe apie tai kaip reikėtų elgtis su nežinomais ir benamiais gyvūnais bei kokie pavojai tame glūdi. Kelių žmonių susirgimams pasiutlige galima užkirsti tik naudojant imunoprofilaktikos priemones. Lietuvoje naudojama pasiutligės Verorab® vakcina yra labai efektyvi, o jos reaktogeniškumas yra nepalyginti mažesnis nei anksčiau naudotų vakcinų. Verorab® naudojama poekspozicinei profilaktikai į rankos žasto raumenis. Pagal WHO duomenis naudojant šią vakciną 100 šalių per 20 metų

laikotarpį nebuvo pastebėta jokių nepageidautinų simptomų (Toovey, 2007). Žmogus kontaktavęs su nežinomu naminiu ar laukiniu gyvūnu turi kuo skubiau pasiskiepyti nuo pasiutligės ir paskirto vakcinų kurso nenutraukti. Tačiau remiantis 2006-2010 metų rezultatais dėl pasiutligės skiepų galime daryti išvadą, kad yra nemaža dalis žmonių, kurie nutraukia paskirtą vakcinų kursą.

Išanalizavus vakcinacijos poveikį Lietuvoje žmonėms, laukiniams ir naminiams gyvūnams galima teigti, kad tai efektyvi profilaktikos priemonė. 2006-2011 metais nepasitaikė atvejų, kad vakcinuoti žmonės būtų mirę nuo pasiutligės, nors nukentėjusių nuo gyvūnų skaičius sudarė daugiau kaip 33 tūkstančius. Tai tik dar kartą galime patikinti, kad pasiutligės poekspozicinei profilaktikai nėra jokių kontraindikacijų, nes net ir galinčių pasitaikyti nepageidaujamų povakcininių reakcijų rizika nepalyginama su pasiutligės pavojumi. Pagal PSO rekomendaciją, povakcininis antikūnų titras 0,5 TV/ml yra riba, kuri parodo gerą apsisaugojimą žmonėms nuo pasiutligės (WHO, 2010). Tokia pati titro reikšmė 0,5TV/ml yra rekomenduojama ir vakcinuotiems naminiams ir laukiniams gyvūnams (Matouch, 2008). Šunys, katės, šėškai bei kiti pasiutligei imlūs naminiai gyvūnai turi būti vakcinuojami nuo pasiutligės ne rečiau kaip vieną kartą kas 12 mėnesių, jeigu kitaip nenurodyta vakcinų gamintojo instrukcijoje.

Apibendrinę 2006-2011 m. Lietuvoje kovos su pasiutlige rezultatus nustatėme, kad Lietuvos žmonės, o ypač gyvūnai dar nėra saugūs dėl pasiutligės, nors teigiamų pasiutligės atvejų kasmet užregistruojama vis mažiau. Tačiau kasmet registruoti pasiutligės atvejai Baltarusijos pasienyje kelia nerimą. Šiuolaikinės Lietuvoje naudojamos pasiutligės vakcinų yra itin efektyvios ir saugios, todėl kilus menkiausiam įtarimui dėl užsikrėtimo pasiutlige būtina pradėti poekspozicinį skiepijimą. Mūsų nuomone, atliekama laukinių gyvūnų ORV nuo pasiutligės duoda teigiamas rezultatus kovojant su šia pavojinga gyvūnų užkrečiamąja liga. Tačiau mūsų nuomone galbūt reikėtų dar labiau intensyvinti gyvūnų pasiutligės imunoprofilaktikos priemonių taikymą būtent tuose rajonuose, ypač pasienio rajonuose su Baltarusija, kuriuose šiuo metu vis dar nustatomi pasiutligės židiniai.



## 6. IŠVADOS

1. Analizuojant 2003-2011 metų laukinių ir naminių gyvūnų pasiutligės epidemiologinę situaciją Lietuvoje nustatyta, kad tiek laukinių tiek ir naminių gyvūnų pasiutligės infekuotumo dinamika yra labai panaši, statistinio skirtumo tarp kitimo tendencijų nėra, o gyvūnų pasiutligės infekuotumas tirtuose mėginiuose vidutiniškai mažėjo po 6,9% per metus.
2. Atliekant 2007 – 2011 metų pasiutligės geografinio paplitimo analizę buvo nustatyta, kad nagrinėjamu laikotarpiu didžiausias tiek laukinių, tiek naminių gyvūnų infekuotumas buvo nustatytas Lietuvos Rytinėje ir Pietrytinėje dalyje. Nustatyta, kad pasiutligės židiniai vis dar registruojami Švenčionių, Šalčininkų, Varėnos, Zarasų rajonuose, kurie ribojasi su kaimynine Baltarusijos Respublika, todėl būtina atsižvelgti ir į imunoprofilaktikos priemonių taikymą Lietuvos kaimyninėse šalyse.
3. Atliekant pasiutligės diagnostiką fluorescuojančių antikūnų tyrimo metodu nustatyta, kad nuo 2003 iki 2011 metų usūriniai šunys buvo pagrindiniai pasiutligės viruso nešiotojai. Remiantis statistinės analizės duomenimis susirgimai pasiutlige vidutiniškai mažėjo po 10,3% per metus, o rudųjų lapių po 9,5% per metus.
4. Atlikti pasiutligės fluorescuojančių antikūnų ir pasiutligės viruso identifikavimo audinių kultūrose metodų palyginimai parodė aukštą metodų specifiškumą ir patikimumą. Abiem metodais buvo nustatytas vienodas pasiutlige infekuotų usūrinių šunų ir rudųjų lapių mėginių skaičius.
5. Atlikus imunofermentinės analizės ir standartinio viruso neutralizacijos fluorescuojančiais antikūnais metodų palyginimus nustatyta, kad komercinis imunofermentinės analizės rinkinys pasižymi dideliu jautrumu (95,83%) ir specifiškumu (96,15%). Imunofermentinėje analizėje mėginio kokybė neturėjo įtakos tyrimo rezultatams, todėl šis metodas rekomenduotinas naudoti vakcinacijos nuo pasiutligės efektyvumo tyrimams.
6. Imunoprofilaktikos tyrimai rodo pakankamą vakcinų apsauginį efektyvumą usūriniam šunims (48,64%) ir rudosioms lapėms (54,92%). Nustatyta, kad

imuniteto susidarymas prieš pasiutligės virusą buvo patikimai efektyvesnis tarp vyresnio amžiaus gyvūnų nei jaunesnių. Nustatytas naminių gyvūnų (šunų, kačių ir šėškų) naminių gyvūnų vakcinacijos nuo pasiutligės efektyvumas nagrinėjamame laikotarpyje buvo stabilus apie 95%.

7. Atlikus laukinių ir naminių gyvūnų patogeninių pasiutligės viruso padermių filogenetinę analizę oralinės vakcinacijos periodu (2006-2011) pagal kintamosios N geno dalies nukleotidų sekas nustatyta, kad lietuviškos pasiutligės viruso padermės patenka į Šiaurės Rytų Europos grupę.
8. Atliekant laukinių gyvūnų oralinei pasiutligės vakcinacijai naudotų dviejų nusilpnintų pasiutligės vakcinų SAD Berne ir SAD B19 analizę nustatyta, kad laukinių gyvūnų rūšyse seroteigiamų gyvūnų skaičius reikšmingai skyrėsi. Nustatyta, kad naudojant SAD Berne vakciną laukinių gyvūnų ORV efektyvumo procentas (54,98%) yra aukštesnis, nei naudojant SAD B19 (43,77%).
9. Įvertinus nuo 2006 iki 2011 metų taikomas pasiutligės imunoprofilaktikos prevencijos priemones nustatyta, kad Lietuvos žmonės, o ypač gyvūnai dar nėra saugūs, nors teigiamų pasiutligės atvejų kasmet užregistruojama vis mažiau.

## 7. PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

**Jacevičienė I.,** Jacevičius E., Tamošiūnas V.A., Milius J., Lukauskas K., Pridotkas G. Lapių oralinės vakcinacijos prieš pasiutligę efektyvumo įvertinimas imunologiniais tyrimais. Veterinarija ir Zootechnika. 2008. T. 43(65). P. 30-37.

**Jacevičienė I.,** Jacevičius E., Tamošiūnas V.A., Pridotkas G., Milius J., Lukauskas K. Pasiutligės viruso ir oralinės vakcinacijos efektyvumo usūrinių šunų populiacijai imunologiniai tyrimai. Veterinarija ir zootechnika. 2010. T. 49(71). P. 37-43.

**Jacevičienė I.,** Tamošiūnas V., Jacevičius E., Morkūnas M., Milius J., Pridotkas G., Jurgelevičius V. Rabies virus detection and phylogenetic analysis in samples from wild and domestic animals of Lithuania in 2007-2010. Biologija. 2011. 57(1). P. 37-43.

**Jacevičienė I.,** Razmuvienė D., Čaplinskas S., Tamošiūnas V., Jacevičius E., Milius J. Vaccination of humans and domestic and wild animals against rabies in Lithuania 2006-2010. Biologija. 2011. 57(3). P. 121-129.

## 8. PRANEŠIMAI KONFERENCIJOSE

1. Tarptautinėje konferencijoje „1th Workshop for Rabies, ES Reference Laboratory for Rabies“, skaitytas pranešimas „Laboratory control of Rabies in Lithuania“, 2008 m. gruodžio mėn. 16-17 d. Afssa, Nancy, Prancūzija.
2. Tarptautinėje konferencijoje „2nd International Veterinary Laboratory Scientific and Applied Conference“, pristatytas stendinis pranešimas „Rabies diagnostics and effectiveness of oral vaccination of raccoon dogs in Lithuania“. 2009 m. rugpjūčio mėn. 27-28 d. Ryga, Latvija.
3. Tarptautinėje konferencijoje „14th International Congress of Immunology“, pristatytas stendinis pranešimas „The efficiency of fox and raccoon dog oral vaccination in Lithuania“. 2010 m. rugpjūčio mėn. 23 d. Kobė, Japonija.
4. Baltarusijos valstybinio veterinarijos centro organizuotame seminare „Pasiutligės profilaktika ir diagnostika“, skaitytas pranešimas „Pasiutligės laboratorinė diagnostika“ 2009 m. gruodžio mėn. 2-3 d. Gardinas, Baltarusija.
5. Tarptautinėje konferencijoje „4th Workshop for Rabies, ES Reference Laboratory for Rabies“, skaitytas pranešimas „Rabies situation and oral vaccination effectiveness of wild animals in 2006-2010 in Lithuania“. 2011 m. rugsėjo mėn. 21 d. Anses, Nancy, Prancūzija.
6. Dalyvauta ES pasiutligės referentinės laboratorijos organizuotose bendrose studijose „Evolution of Rabies in Raccoon dogs and Red foxes in Baltic country during the XXI century“ Nancy, Anses, Prancūzija. Report, 2010 m. gruodžio 15 d.
7. Dalyvauta ES pasiutligės referentinės laboratorijos bendrose studijose „Collaborative Study on anti-Rabies Conjugate Performance“ Nancy, Anses, Prancūzija. Report, 2012 m. sausio 6 d.

## 9. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Adamson P.B. (1977). The Spread of Rabies into Europe and the Probable Origin of this Disease in Antiquity, in: JRAS: 140-144
2. Adeiga A. A., Audu R. A. (1996). Detection of rabies virus in saliva of apparently healthy dogs. Biomed Lett 54: 207-212.
3. Albertini A.A.V., Wernimont A.K., Muziol T., Ravelli R.B.G., Clapier C.R., Schoehn G., Weissenhorn W., Ruigrok R.W.H. (2006). Crystal structure of the rabies virus nucleoprotein-RNA complex. Science. 313: 360-363.
4. Arai Y. T., Kuzmin I. V., Kameoka Y., Botvinkin A. D. (1997). Nucleoprotein gene analysis of fixed and street rabies virus variants using RT-PCR. Arch Virol 142: 1787-1796.
5. Arguin P. M., Murray – Lillibridge K., Miranda M. E., Smith J. S., Calaor A. B., Rupprecht C. E. (2002). Serological evidence of Lyssavirus infections among bats, the Philippines. Emerg. Infect. Dis 8: 258-262.
6. Artois M. (1992). Transmission of rabies and impact on a population of foxes (mammalian, *Vulpes vulpes* L.). Mesogil 52: 82.
7. Aubert A. M. (1994). Control of rabies in foxes: what are the appropriate measures? Vet Rec 134: 55-59.
8. Aubert A. M. (1995). Dualité dans le groupe de Grothendieck de la catégorie des représentations lisses de longueur finie d'un groupe reductif p-adique. Trans. Amer. Math. Soc. 347: 2179-2189.
9. Austin L., Hughes. (2009). Relaxation of purifying selection on the SAD lineage of live attenuated oral vaccines for rabies virus. Infection Genetics an Evolution V. 9. 5: 827-831.
10. Badrane H., Bahloul C., Perrin P., Tordo N. (2001). Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. J Virol 75: 3268-3276.

11. Bahloul C., Jacob Y., Tordo N., Perrin P. (1998). DNA bases immunization for exploring the enlargement of immunological cross-reactivity against the lyssaviruses. *Vaccine* 16: 417-425.
12. Bahloul C., Ahmed S. B., B'chir B. I., Kharmachi H., Hayouni A., Dallagi K. (2003). Post-exposure therapy in mice against experimental rabies: a single injection of DNA vaccine is as effective as five injections of cell culture-derived vaccine. *Vaccine* 22: 177-184.
13. Baer G. M., Abelseth M. K., Debbie J. G. (1975). Oral vaccination of foxes against rabies. *Am J Epidemiol* 93: 487-490.
14. Bakienė E. (2008). *Virusologijos pagrindai*. KTU: 1-150.
15. Ballard W. B., Follman E. H., Ritter D., Robards M. D., Cronin M.A. (2001). Rabies and canine distemper in an arctic fox population in Alaska. *J. Wildlife Dis.* 37: 133-137.
16. Baltrunaite L. (2002). Diet composition of the red fox (*Vulpes vulpes* L.), pine marten (*Martes Martes* L.) and raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides* Gray) in clay plain landscape. Lithuania. *Acta Zoologica Lituonica*. 12: 362-368.
17. Barnard B. J. H., Voges S. F. (1982). A simple techniques for the rapid diagnosis of rabies in formalin-preserved brain. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 49: 1993-1994.
18. Bingham J., Schumacher C. L., Hill F. W. G., Aubert A. (1999). Efficacy of SAG-2 oral rabies vaccine in two species of jackal (*Canis adustus* and *Canis mesomelas*). *Vaccine*. 17: 551-558.
19. Bingham J. (2005). Canine rabies ecology in southern Africa. *Emerg Infect Dis* 11: 1337-1342.
20. Black E. M., McElhinney L. M., Lowings J. P., Smith J., Johnstone P., Heaton P. R. (2000). Molecular method to distinguish between classical rabies and the rabies-related European bat lyssaviruses. *J. Virol. Meth.* 87: 123-131.
21. Black E. M., Lowings J. P., Smith J., Heaton P. R., McElhinney L. M. (2002). A rapid RT-PCR method to differentiate six established

- genotypes of rabies and rabies-related viruses using TaqMan technology. *J. Virol. Meth.* 105: 25-35.
22. Blancou J. (1994). Early methods for the surveillance and control of rabies in animals. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 13: 361-372.
  23. Blancou J. (2004). Rabies in Europe and the Mediterranean Basin: from antiquity to the 19<sup>th</sup> Century. In: King A. A., Fooks A. R., Aubert M., Wandeler A. I., (Eds.) *Historical perspectives of Rabies in Europe and the Mediterranean Basin*, OIE: 15-24.
  24. Borisov A. V., Toloknov A. C., Metlin A. E., Mikhalishin V. V., Rybakov S. S. (2002). Efficacy and safety testing of the viral vaccine "Sinrab" on the targeted species. *Scientific notes of Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine. Vitebsk, Belarus.* 38: 15-18.
  25. Botvinkin A. D., Poleschuk E. M., Kuzmin I. V., Borisova T. I., Gazaryan S. V., Yanger P., Rupprecht C. E. (2003). Novel Lyssavirus isolated from bats in Russia. *Emerg Inf Dis* 9: 1623-1625.
  26. Bourgon A. R., Charlton K. M. (1987). The demonstration of rabies antigen in paraffin-embedded tissues using peroxidase-antiperoxidase method: a comparative study. *Can J Vet Res* 51: 1170-120.
  27. Bourhy H., Kissi B., Lafon M., Sacramento D., Tordo N. (1992). Antigenic and molecular characterization of bat rabies virus in Europe. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2419-2426.
  28. Bourhy H., Kissi B., Tordo N. (1993) Molecular diversity of the Lyssavirus genus. *Virology* 194: 70-81.
  29. Brass D. A. (1994). Rabies in bats- natural history and public health implication. *Livia Press, Ridgefield*: 352.
  30. Brochier B., Thomas I., Bauduin B., Leveau T., Pastoret P. P., Languet B., Chappuis G., Desmettre P., Blancou J., Artois M. (1990). Use of a vaccinia-rabies recombinant virus for the oral vaccination of foxes against rabies. *Vaccine* 8: 101-104.
  31. Brochier B., Kieny M. P., Costy F., Coppens P., Bauduin B., Lecocq J. P., Languet B., Chappuis G., Desmettre P., Afiademanyo K., Libois R.,

- Pastoret P. (1991). Large-scale eradication of rabies using recombinant vaccinia-rabies vaccine. *Nature* 354: 520-522.
32. Brochier B., Aubert M. F. A., Pastoret P. P., Masson E., Schon J., Lombard M., Chappuis G., Languet B., Desmettre P. (1996). Field use of a vaccinia-rabies recombinant vaccine for the control of sylvatic rabies in Europe and North America. *Rev Techy off Int Epiz* 15: 947-970.
33. Celer V., Belay G. (1991). Kinetics of rabies virus replication in cell cultures. *Acta. Vet Brno* 60: 161-164.
34. Charlton K. M. (1994). The pathogenesis of rabies and other lyssaviral infections: recent studies. In: Rupprecht C. E., Dietzschold B., Koprowski H. (Eds). *Lyssaviruses*. Springer-Verlag. Berlin: 95-115.
35. Childs J. E., Colby L., Krebs J. W., Strine T., Feller M., Noah D., Drenzek C., Smith J. S., Rupprecht C. E. (1997). Surveillance and spatiotemporal associations of rabies in rodents and lagomorphs in the United States, 1985-1994. *J. Wild. Dis. J.* 33: 20-27.
36. Childs J. E., Curns A. T., Dey M. E., Real L. A., Feinstein L., Bjornstad O. N., Krebs J. W. (2000). Predicting the local dynamics of epizootic rabies among raccoons in the United States. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 13666-13671.
37. Clark H. F. (1980). Rabies serogroup viruses in neuroblastoma cells propagation, „Autointerference“, and apparently random back-mutation of attenuated viruses to the virulent state. *Infect. Immun.* 27: 1012-1022.
38. Cleaveland S. Kaare M., Tiringa P., Mlengeya, Barat J. (2003). A dog rabies vaccination campaign in rural Africa: impact on the incidence of dog rabies and human dog-bite injuries. *Vaccine* 21: 1965-1973.
39. Cliquet F., Aubert M., Sagne L. (1998). Development of a fluorescent antibody virus neutralization test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *J Immunol Methods* 212: 79-87.



40. Cliquet F., Sagne L., Schereffer J. L., Aubert M. F. (2000). ELISA test for rabies antibody titration in orally vaccinated foxes sampled in the fields. *Vaccine* 18: 3272-3279.
41. Cliquet F., Muller T., Mutinelli F., Geronutti S., Brocherier B., Selhorst T., Schereffer J. L., Kraft N., Burow J., Schameita A., Schuler H., Aubert M. (2003). Standardization and establishment of a rabies ELISA test in European laboratories for assessing the efficacy of oral fox vaccination campaigns. *Vaccine* 21: 2986-2993.
42. Cliquet F., McElhinney L. M., Servat A., Boucher J. M., Lowings J. P., Goddard T., Mansfield K. L., Fooks A. R. (2004). Development of a qualitative indirect ELISA for the measurement of rabies virus-specific antibodies from vaccinated dogs and cats. *J Virol Meth* 117: 1-8.
43. Cliquet F., Guiot A. L., Munier M., Bailly J., Rupprecht C. E., Barrat J. (2006). Safety and efficacy of the oral rabies vaccine SAG2 in raccoon dogs. *Vaccine* 24: 4386-4392.
44. Cliquet F., Gurbuxani J. P., Pradhan H. K., Pattnaik B., Patil S. S., Regnault A., Begouen H., Guiot A. L., Sood R., Mahl P., Singh R., Meslin F. X., Picard E., Aubert M. F., Barrat J. (2007). The safety and efficacy of the oral rabies vaccine SAG2 in Indian stray dogs. *Vaccine* 25: 3409-3418.
45. Cliquet F., Barrat J. (2008). Rabies. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). 6th ed. Paris: Office International des Epizooties: 304–322.
46. Cliquet F., Freuling C., Smreczak M., Van der Poel WHM., Horton D., Fooks A. R., Robardet E., Picard-Meyer E., Muller T. (2010). Development of harmonised schemes for monitoring and reporting of rabies in animals in the European Union. *Scientific Report EFSA*: 1-60.
47. Cliquet F., Robardet E., Must K., Laine M., Peik K, Picard-Meyer E., Guiot A.L., Niin E. (2012). Eliminating Rabies in Estonia. *PloS Negl Trop Dis* 6 (2) : e1535.

48. CNS audinyje nustatyti Negri kūneliai nervinių ląstelių citoplazmoje.  
Prieiga internete  
<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5913a3.htm>
49. Coleman P. G., Fevre E. M., Cleaveland S. (2004). Estimating the public health impact of rabies. *Emerging Infectious Diseases* 10: 140-142.
50. Crepin P., Audry L., Rotivel Y., Gacoin A., Caroff C., Bourhy H. (1998). Intravitam diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 36: 1117-1121.
51. Crick J., King A. (1988). Culture of rabies virus *in vitro*, In: Campbell J. B., Charlton K.M. eds *Rabies*. Boston, Kluwer Academic Publishers: 47-66.
52. Dacheux L, Reynes J-M, Buchy P, et al. (2008). A reliable diagnosis of human rabies based on analysis of skin biopsy specimens. *Clin Infect Dis.* 47, 11: 1410–17.
53. David D., Yakobson B., Rotenberg D., Dveres N., Davidson I., Stram T. (2008). Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brain. *Vet Microbiol* 87: 111-118.
54. Delpietro H. A., Larghi O. P., Russo R. G. (2001). Virus isolation from saliva and salivary glands of cattle naturally infected with paralytic rabies. *Preventive Vet Med* 48: 223-228.
55. Desmettre P., Languet B., Chappuis G., Brochier B., Thomas I., Lecocq J. P., Kieny M. P., Blancou J., Aubert M., Artois M., Pastoret P.P. (1990). Use of vaccinia rabies recombinant for oral vaccination of wildlife. *Vet Microbiol* 23: 227-236.
56. Dietzschold B., Lafon M., Wang H., Otvos L., Celis E., Wunner W. H., Koprowski H. (1987). Localization and immunological characterization of antigenic domains of the rabies virus internal N and NS proteins. *Virus Res* 8: 103-125.
57. Dietzschold B., Faber M., Schnell M. (2003). New approaches to the prevention and eradication of rabies. *Expert Rev Vaccines* 2: 89-96.

58. Dietzschold B., Schnell M., Koprowski H. (2005). Pathogenesis of rabies. *Curr Top Microbiol Immunol* 292: 45-56.
59. EMA (European Medicines Agency). (2010). European public assessment report (EPAR) RABIGEN SAG2. EPAR summary for the public. Prieiga internete 2011 m. sausio 9 d. <http://www.ema.europa.eu>
60. Ertl H. C., Dietzschold B., Gore M., Otvos L. J., Larson J. K., Wunner W. H., Koprowski H. (1989). Induction of rabies virus-specific-helper cells by synthetic peptides that carry dominant T-helper cell epitopes of the viral ribonucleoprotein. *J Virol* 63: 2885-92.
61. Esterhuysen J., Prehaud C., Thomos G. R. (1995). A liquid-phase blocking ELISA for the detection of antibodies to rabies virus. *J Virol Methods* 51: 31-42.
62. EU Commission.(2002). The oral vaccination of foxes against rabies. Report of the Scientific I on Animal Health and Animal Welfare: 1-55.
63. Faber M., Pulmanusahakul R., Hodawadekar S. S., Spitsin S., McGettigan J. P., Schnell M. J., Dietzschold B. (2002). Overexpression of the rabies virus glycoprotein results in enhancement of apoptosis and antiviral immune response. *J Virol* 76: 3374-3381.
64. Fekadu M., Nesby S. L., Shaddock J. H., Schumacher C. L., Linhart S. B., Sanderlin D. W. (1996). Immunogenicity, efficacy and safety of an oral rabies vaccine (SAG2) in dogs. *Vaccine* 14: 465-468.
65. Fevre E. M., Koboyo R. W., Persson V., Edelsten., Coleman P. G., Cleaveland S. (2005). The epidemiology of animal bite injuries in Uganda and projections of the burden of rabies. *Trop Med Int Health* 10(8): 790-798.
66. Finnegan C. J., Brookes S. M., Johnson N., Smith J., Manfield K. L., Keene V. L., McElhinney L., Fooks A. R. (2002). Rabies in North America and Europe. *J R Soc Med* 95: 9-13.
67. Flint S. J., Enquist L. W., Racaniello V. R., Skalka A. M. (2004). Principles of virology: Molecular biology, pathogenesis, and control of animal viruses. 2<sup>nd</sup> ed. Washington: ASM Press.

68. Fodor I., Grabko V. I., Khozinski V. V., Selimov M. A. (1994). Nucleotide and deduced amino acid sequences on the glycoprotein gene of rabies virus vaccine strain Vnukovo-32. *Arch. Virol* 135: 451-459.
69. Fooks A.R., Johnson N., Freuling C. M., Wakeley P. R., Ashley C., Banyard A.C., McElhinney L. M., Marston D. A., Dastjerdi A., Wright E., Weiss R. A., Muller T. (2009). Emerging Technologies for the Detection of Rabies Virus: Challenges and Hopes in the 21st Century. *PLoS Negl Trop Dis* 3(9): e530
70. Follmann E. H., Ritter D. G., Bear G. M. (1996). Evaluation of the safety of two attenuated oral rabies vaccines, SAG1 and SAG2, in six Arctic mammals. *Vaccine* 14: 270-273.
71. Forterre P. (2006). Three RNA cells for ribosomal lineages and three DNA viruses to replicate their genomes: A hypothesis for the origin of cellular domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (10): 3669–74.
72. Franka R., Wu X., Jackson F. R., Velasco-Villa A., Palmer D. P., Henderson H., Haayt W., Green D. B., Blanton J. D., Greenberg L., Rupprecht C. E. (2009). Rabies virus pathogenesis in relationships to intervention with inactivated and attenuated rabies vaccines. *Vaccine* 27: 7149-7155.
73. Freuling C. M., Beer M., Conraths F. J., Finke S., Hoffmann B., Keller B., Kliemt J., Mettenleiter T. C., Muhlbach E., Teifke J. P., Wohlsein T. C., Muller T. (2011). Novel Lyssavirus in Natterer's bat, Germany. *Emerg Infect Dis* 17(8): 1519-1522.
74. Gaudin Y., Ruigrok R. W., Tuffereau C., Knossow M., Flamand A. (1992). Rabies virus glycoprotein is a trimer. *Virology* 187: 627-632.
75. Gylys L., Chomel B. B., Gradner I. A. (1998). Epidemiological surveillance of rabies in Lithuania from 1986-1996. *Rev Sci. Tech. Off Int Epiz* 17: 691-698.
76. Gode G. R., Bhide N. K. (1988). Two rabies deaths after corneal grafts from one donor. *Lancet*, October 1: P. 791.

77. Goto H., Minamoto N., Ito N., Sugiyama M., Konjo T., Kawai A. (2000) Mapping of epitopes and structural analysis of antigenic sites in the nucleoprotein of rabies virus. *J Gen Virol* 81: 119-127.
78. Gould A. R., Hyatt A. D., Lunt R., Kattenbelt J. A., Hengstberger S., Blacksell S. D. (1998). Characterisation of a novel lyssavirus isolated from Pteropid bats in Australia. *Virus Res.* 54: 165-187.
79. Greitasis imunochromotografinis tyrimas (RIDT) (vidurinė juostelė Neigijama, o apatinė – Teigijama. *Prieiga*  
[http://bionote.co.kr/File/Upload/2010/01/05/2010-01-05\(1\).pdf](http://bionote.co.kr/File/Upload/2010/01/05/2010-01-05(1).pdf)
80. Gruzdev K.N., Nedosekov V. V. (2001). Rabies of animals. Moscow Akvarium pp.57.
81. Guyatt K. J., Twin J., Davis P., Holmes E. C., Smith G. A., Smith I. L., Mackenzie J. S., Young P. L. (2003). A molecular epidemiological study of Australian bat lyssavirus. *J Gen Virol* 84: 485-496.
82. Heaton P.R, Johnstone P., McElhinney L.M., Cowley R., O'Sullivan E., Whitby J.E. (1997). Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. *J Clin Microbiol* 35 : 2762–2766.
83. Heaton P.R., McElhinney L.M., Lowings J.P. (1999). Detection and identification of rabies and rabies related viruses using rapid-cycle PCR. *J. Virol. Meth.* 81: 63-69.
84. Hellenbrand W., Meyer C., Rasch G., Steffens I., Ammon A. (2005). Cases of rabies in Germany following organ transplantation. *Eur Surveill* 10 : E050224.6.
85. Hemachudha T. Rabies. *Curr. Opin. Neurol.* 1997. 10: 260-267.
86. Hemachudha T, Laothamatas J and Rupprecht CE.(2002). Human rabies: a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and a diagnostic challenge. *Lancet Neurol* 1: 101–109.
87. Hooper D. C., Morimoto K., Bette M., Weihe E., Koprowski H., Dietzschold B. (1998). Collaboration of antibody and inflammation in

- clearance of rabies virus from the central nervous system. *J Virol* 72: 3711-3719.
88. House J., Poe J., Humbaugh K., Drew C., Paddock C., Zaki S., Rupprecht C., Ritchey M., Petersen B. (2010). Human rabies-Kentucky/Indiana, 2009. *CDC* 59 (13): 393-396.
89. Hu L., Ngichabe C., Trimarchi C. V., Esposito J. J., Scott F. W. (1997). Raccon *poxvirus* live recombinant feline panleukopenia virus VP2 and rabies virus glycoprotein bivalent vaccine. *Vaccine* 15: 1466-1472.
90. ICTV (2011) (Tarptautinis virusų taksonomijos komitetas) Prieiga per internetą <http://www.ictvonline.org>
91. Ito N., Kakemizu M., Ito K., Yamamoto A., Yoshida Y., Sugiyama M., Minamoto N. (2001). A comparison of complete sequences of the attenuated RC-HL strain of rabies virus used for production of animal vaccine in Japan, and the parental Nishigahara strain. *Microbiol Immunol* 45: 51-58.
92. Ito M., Itou t., Shoj Y., Sakai T., Ito F.H., Arai I.T., Takasaki T., Kurane I. (2003). Discrimination between dog-related and vampire bat-related rabies viruses in Brazil by strain-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Virol.* 26: 317-330.
93. Jackson A. C. (1991). Biological basis of rabies virus neurovirulence in mice: comparative pathogenesis study using the immunoperoxidase technique *J Virol* 65: 537-540.
94. Jackson A. C. (2007). Pathogenesis. In: Jackson A.C., Wunner W.H., eds. *Rabies 2nd ed.* Amsterdam, Elsevier Academic Press 341-381.
95. Johnson P. K., Swoveland P. T., Emmons R. W. (1980). Diagnosis of rabies by immunofluorescence in trypsin-treated histological section. *J Am Med Assoc* 4: 41-43.
96. Johnson N., Mansfield K. L., Fooks A. R. (2002). Canine vaccine recipients recognize an immunodominant region of the rabies virus glycoprotein. *J Gen Virol* 83: 2663-2669.

97. Kärber G. (1931). Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologischer Reihenversuch. Arch Exp Pathol Pharmakologie 162: 480-483.
98. Kang B., Oh J., Lee C., Park B., Park Y., Hong K., Lee K., Cho B., Song D. (2007). Evaluation of a rapid immunodiagnostic test kit for rabies virus. J Virol Methods 145: 30-36.
99. Kauhala K. (1996). Introduced carnivores in Europe with special reference to central and northern Europe. Wildlife Biology. 2:197-204
100. Katayama S., Yamanaka M., Ota S., Shmizu Y. (1999). A new quantitative method for rabies virus by detection of nucleoprotein in virion using ELISA. J Med Sci 61: 411-416.
101. Kieny M. P., Lathe R., Drillien R., Spehner S., Skory D., Schmitt T., Wiktor T., Koprowski H., Lecocq J. P. (1984). Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. Nature 321: 163.
102. Kihm U., Flamand A., Pastoret P. P., Peterhans E. (1992). Round table on epidemiology and control of fox rabies. Vet Microbiol. 33:297-301.
103. King A. A. Fooks A. R., Aubert M., Wandeler I. (2004). Historical Perspectives of Rabies in Europe and the Mediterranean Basin. OIE, WHO 1-383.
104. Kissi B., Tardo N., Bourhy H. (1995). Genetic Polymorphism in the Rabies Virus Nucleoprotein Gene. Virology 209: 526-537.
105. Koprowski P. (1996). The mouse inoculation test. Laboratory techniques in Rabies. Messlin F. X, Kaplan M. M., Koprowski H. Geneva 85-93.
106. Knobel D. L., Cleaveland S., Coleman P. G., Fevre E. M., Meltzer M. I., Miranda M. E., Shaw A., Zinsstag J., Meslin F. X. (2005). Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. Bull World Health Organ 83(5): 360-368.
107. Knoop E. V., Freuling C. M., Kliemt J., Selhorst T., Conraths F. J., Muller T. (2010). Evaluation of a commercial rabies ELISA as a

- replacement for serum neutralization assays as part of the pet travel scheme and oral vaccination campaigns of foxes. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 123: 278-285.
108. Krebs J. W., Wilson M. L., Child J. E. (1995). Rabies – epidemiology, prevention, and future research. *J Mammalogy* 76: 681-694.
109. Krebs J. W., Wheeling J. T., Childs J. E. (2003). Rabies surveillance in the United States during 2002. *J. Amer Vet Med Assoc* 223: 1736-1748.
110. Krukonytė R., Grikinienė J., Ivaškevičius R., Sakalauskaitė L. (2007). Pasiutligės viruso sukeltas encefalitas. *Neurologijos seminarai*. 11(33): 161-168.
111. Kulonen K., Boldina I. (1993). Differentiation of two rabies strains in Estonia with reference to recent finish isolates. *J. Wildlife Dis.* 29: 209-213.
112. Kulonen K., Fekadu M., Whitfield S., Warner C.K. (1999). An evaluation of immunofluorescence and PCR methods for detection of rabies in archival varnøy-fixed, paraffin-embedded brain tissue. *J. Vet. Med.* 46: 151-155.
113. Kuzmin I. V., Orciari L. A., Arai Y. T., Smith J. S., Hanlon C. A., Kameoka Y., Rupprecht C. E. (2003). Central Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences. *Virus Res* 97: 65-79.
114. Kuzmin I. V., Hughes G. J., Botvinkin A. D., Orciari L. A., Rupprecht C. E. (2005). Phylogenetic relationships of Irkut and West Caucasian bat viruses the N gene sequences for lyssavirus genotip definition. *Virus Res* 111: 28-43.
115. Kuzmin I. V., Wu X., Tordo N., Rupprecht C. E. (2008). Complete genomes of Aravan, Khujand, Irkut and West Caucasian bat viruses, with special attention of the polymerase gene and non-coding region. *Virus Research* 136: 81-90



116. Kuzmin I. V., Mayer A. E., Niezgodá M., Markotter W., Agwanda B., Breiman R. F et all. (2010). Shimoni bat virus, a new representative of the Lyssavirus genus. *Virus Res* 149: 197-210.
117. Lambot M., Blasco E., Barrat J., Cliquet F., Brochier B., Renders C., Krafft N., Bailly J., Munier M., Aubert M. F., Pastoret P. P. (2001). Humoral and cell-mediated immune responses of foxes (*Vulpes vulpes*) after experimental primary and secondary oral vaccination using SAG2 and V-RG vaccines. *Vaccine* 19: 1827-1835.
118. Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J., Higgins D.G. (2007). ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
119. Lasinskaitė-Čerkašina A., Pavilionis A., Vaičiuvėnas V. (2005). *Medicinos mikrobiologija ir virusologijos pagrindai*. V L Kaunas P: 554-607.
120. Linhart S. B., King R., Zamir S., Naveh U., Davidson M., Perl S. (1997). Oral rabies vaccination of red foxes and golden jackals in Israel: preliminary bait evaluation. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 16: 874-880.
121. Lembo T., Niezgodá M., Velesco-Villa A., Cleaveland S., Ernest E., Rupprecht C. E. (2006). Evaluation of a direct, rapid immunohistochemical test for rabies diagnosis. *Emerg Infect Dis* 12: 310-313.
122. Lodmell D. L. (1999). Rabies DNA vaccine for protection and therapeutic treatment. *Expert Opin Investig Drugs* 8: 115-122.
123. Lodmell D. L., Ray N. B., Ulrich J. T., Ewalt L. C. (2000). DNA vaccination of mice against rabies virus: effects of the route of vaccination and the adjuvant monophosphoryl lipid A (MPL®). *Vaccine* 18: 1059-1066.
124. Lodmell D. L., Parnell M. J., Bailey J. R., Ewalt L. C., Hanlon C. A. (2002). Rabies DNA vaccination of non-human primates: post-exposure studies using gene gun methodology that accelerates induction of

- neutralizing antibody and enhances neutralizing antibody titers. *Vaccine* 20: 2221-2228.
125. Lloyd H. G.(1980). *The red fox*. London: Batsford B.T. P: 320.
  126. Loza-Rubio E., Rojas-Anaya E., Gomez Nieto L., Olivere Flores M. T. J., Gomez M. A. (2007). Development of an edible rabies vaccine maize, using Vnukovo strain. Towards the elimination Rabies in Eurasia. Joint OIE/ WHO/EU International Conference Paris, 27-30 May. Abstract Book P: 71.
  127. Lumlerdacha B., Boongird K., Wanghonga S., Wacharapluesadee S., Chanhom L., Khawplod P., Hemachudha T., Kuzmin I., Rupprecht C. E. (2005). Survey for bat lyssaviruses, Thailand. *Emerg Infect Dis* 11: 232-236.
  128. McElhinney L. M., Marston D., Johnson N., Black C., Matouch O., Lalosevic D., Stankov S., Must K., Smerczek M., Zmudzinski J. F., Botvinkin A., Aylan O., Vanek E., Cliquet F., Muller T., Fooks A. R. (2008). Molecular epidemiology of rabies viruses in Europe. *Dev Biol (Basel)* 125: 17-28.
  129. Mac Donald D.(1978). *Running with the fox*. London, Sydney: Unwin Hyman P: 224.
  130. McGettigan J. P., Pomeranz R. J., Siler C. A., McKenna P. M., Foley H. D., Dietzschold B., Schnell M. J. (2003). Second-generation rabies virus-based vaccine vectors expressing human immunodeficiency virus type 1 gag have greatly reduced pathogenicity but are highly immunogenic. *J. Virol* 77: 237-44
  131. Mačiulskis P., Lukauskas K., Milius J., Jacevičius E., Kiudulas V., Jokimas J., Počkevičius A. (2008). Intake and Stability of Rabies Vaccine. *Dev Biol* 131: 439-449.
  132. Mansfield K., L., Racloz V., McElhinney L. M., Marston D. A., Johnson N., Ronsholt L., Christensen L. S., Neuvonen E., Botvinkin A. D., Rupprecht C. E., Fooks A. R. (2006). Molecular epidemiological study

- of Arctic rabies virus isolates from Greenland and comparison with isolates from throughout the Arctic and Baltic regions *Virus Res* 116: 1-10.
133. Masson E., Cliquet F., Aubert M., Barrat J., Aubert A., Artois M., Schumacher C. I. (1996). Safety study of the SAG2 rabies virus mutant in several non-target species with a view to its future use for the immunization of foxes in Europe. *Vaccine* 14: 1506-1510
134. Masson E., Bruyere-Masson V., Vuillaume P., Lemoyne S., Aubert M. (1999). Rabies oral vaccination of foxes during the summer with the VRG vaccine bait. *Vet Res* 30: 5959-605.
135. Matouch O. (2008). The rabies situation in Eastern Europe. Towards the Elimination of Rabies in Eurasia. *Dev Biol Basel Karger V.* 131. P: 27-35.
136. Mebatsion T., Frost J.W., Krauss H. (1989). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using staphylococcal protein A for the measurement of rabies antibody in various species. *Zentralbl. Veterinarmed B.* 36: 532-536.
137. Mebatsion T., Weiland F., Conzelmann K. K. (1999). Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein. *J Virol* 73: 5673-5679.
138. Meslin F. X., Fishbein D. B., Matter H. C. (1994). Rationale and prospects for rabies elimination in developing countries. In: *Lyssaviruses* Rupprecht C. E., Dietzhold B., Koprovski H. (Eds.) Springer NY USA P: 1-26.
139. Metlin A. E., Rybakov S. S., Gruzdev K. N., Egorov A. A., Chepurkin A. V. (2007). Liquid-phase variant of the fluorescent antibody test for rabies diagnosis. *Veterinary* 7: 56-59.
140. Miah A. (2005). Bat rabies- the Achilles heel of a viral killer? *Lancet* 366: 876-877.

141. Milius J., Razmuvienė D., Jacevičius E., Tamošiūnas V., Lukauskas K., Pasiutligės epidemiologinė situacija Lietuvoje (1994-2003 metai). Veterinarija ir zootechnika. 2004. T. 27 (49). P: 11-18.
142. Muller T., Batza H. J., Beckert A., Bunzenthal C., Cox J. H., Freuling C. M., Fooks A. R., Frost L., Geue L., Hoeflechner A., Marston D., Neubert A., Neubert I., Revila –Fernandez S., Vanek E., Vos A., Wodak E., Zimmer K., Mettenleiter T. C. (2009). Analysis of vaccine-virus-associated rabies cases in red foxes (*Vulpes vulpes*) after oral rabies vaccination campaigns in Germany and Austria. Arch Virol 154: 1081-1091.
143. Nagaraj T., Vasanth J.P., Desai A., Kamat A., Madhusudana S. N., Ravi V. (2006). Ante mortem diagnosis of human rabies using saliva samples: Comparison of real time and conventional RT-PCR techniques. J. Clin Virol 36: 17-23.
144. Neubert A., Shuster P., Muller T. Vos A., Pommerening E. (2001). Immunogenicity and efficacy of the oral rabies vaccine SAD B19 in foxes. J Vet Med 48: 179-183.
145. Niin E., Laine M., Guiot A. L., Demerson J. M., Cliquet F. (2008). Rabies in Estonia: Situation before and after the first campaigns of oral vaccination of wildlife with SAG2 vaccine bait. Vaccine 26 : 3556-3565.
146. Nogueira Y. L. (2004). Estimate of validity of a new method for the isolation of rabies virus. Rev Saude Publica 38: 1-8.
147. OIE (Organisation of Animal Health), Multiannual animal diseases status. Europe/Rabies, 2002, 1–12.
148. OIE (Organisation of Animal Health), Manual of Diagnostics Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Rabies, 2008, 2.1.13, 304-323.
149. OIE (Organisation of Animal Health) Manual of diagnostics test. 2011. Available at: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
150. Orłowska A., Smreczak M., Trebas P., Zmudzinski J. F. (2008). Comparison of real-time PCR and heminested RT-PCR methods in the

- detection of rabies virus infection in bats and terrestrial animals. Bull Vet Inst Pulawy 52: 313-318.
151. Osorio J. E., Tomlinson C. C., Frank R. S., Haahes E. J., Rushlow K., Haynes J. R., Stinchcomb D. T. (1999). Immunization of dogs and cats with a DNA vaccine against rabies virus. Vaccine 17: 1109-1116.
152. Aktyvi replikacijos vieta pasiutligės virusinio antigeno nustatymui - neuronų citoplamos intarpai (Negri kūneliai): A ir B Prieiga internete:  
<http://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/histologic.html>
153. Pasiutligės virusais pažeistos smegenų dalys. Prieiga internete:  
<http://faculty.washington.edu/chudler/rabies.html>
154. Pasiutligės viruso patogenezė nuo gyvūno žmogui. Prieiga internete:  
<http://www.benhoc.com/content/1955-Chapter-188.-Rabies-and-Other-Rhabdovirus-Infections.html>
155. Pasiutligės viruso patogenezė nuo gyvūno gyvūnui. Prieiga internete:  
[http://www.northcentralanimalhospital.com/site/view/183737\\_RabiesInfo.pml](http://www.northcentralanimalhospital.com/site/view/183737_RabiesInfo.pml)
156. Pasiutligės viruso RNR genomas Prieiga per internetą  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8618/>
157. Pasiutligės viruso genomas. Prieiga per internetą:  
[http://www.virology.net/Big\\_Virology/BVRNArhabdo.html](http://www.virology.net/Big_Virology/BVRNArhabdo.html)
158. Pasiutligės viruso genomo struktūros schema.  
Prieiga  
[http://www.virology.net/Big\\_Virology/BVRNArhabdo.html](http://www.virology.net/Big_Virology/BVRNArhabdo.html)
159. Pasiutligės viruso Negri kūnelių susidarymas intarpuose, endoplazminiame nervinių ląstelių tinkle. A) Negri kūnelis. B) intarpuose gausu RNR baltymų. C) Pasiutligės viruso pumpuravimas.  
Prieiga per internetą:  
[http://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/electron\\_microscopy.html](http://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/electron_microscopy.html)
160. Pasiutligės viruso virionas. A) matomas kulkos formos virusas. B) RNR baltymas panašus į “bičių avilyje” išsidėsčiusius grivelius. C)

Matomas dvigubas glikoproteino smaigalys (C). Preiga per internetą:

[http://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/electron\\_microscopy.html](http://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/electron_microscopy.html)

161. Pasteur L. (1885). Methode pour prevenir la rage morsure. CT Acad Sci 101: 722-765.
162. Perrin P., Gontier C., Lecocq E. and Bourhy H., A. (1992). Modified rapid enzyme immunoassay for the detection of rabies and rabies related viruses: RREID-lyssa. Biologicals 20: 51-58
163. Perrin P. Jacob Y., Aguilar-Setien A., Loza-Rubio E., Jallet C., Desmezieres E., Aubert M., Cliquet F., Tordo N. (1999). Immunization of dogs with a DNA vaccine induces protection against rabies virus. Vaccine. 18: 479-486.
164. Picard-Meyer E., Bruyere V., Barrat J., Tissot E., Barrat M. J., Cliquet F. (2004). Development of a hemi-nested RT-PCR method for the specific determination of European Bat Lyssavirus 1 Comparison with other rabies diagnostic methods. Vaccine 22: 1921-1929.
165. Potzsch C. J., Kliemt A., Kloss D., Schroder R., Muller W. (2006). Rabies in Europe- trends and development. Rabies in Europe. Dev Biol Basel Karger V. 125. P. 229-240.
166. RBE (Rabies Bulletin Europe). (2011). Preiga per internetą pagal: [www.who-rabies-bulletin.org](http://www.who-rabies-bulletin.org).
167. Ray N. B. Ewalt L. C., Lodmell D. L. (1995). Rabies virus replication in primary murine bone marrow macrophages and in human and murine macrophage-like cell lines: implications for viral persistence. J Virol 69; 764-72.
168. Ray N. B., Power C., Lynch W. P., Ewalt L. C., Lodmell D.L. (1997). Rabies viruses infect primary cultures of murine, feline and human microglia and astrocytes. Arch Virol 142: 1011-1019.
169. Randall R. E., Goodbourn S. (2008). Interferons and viruses: an interplay between induction, signaling, antiviral responses and virus countermeasures. J Gen Virol 89 (1): 1-47.

170. Reid F. L., Hall N. H., Smith J. S., Baer G. M. (1986). Increased immunofluorescent staining of rabies-infected, formalin-fixed brain tissue after pepsin and trypsin digestion. *J Clin Microbiol* 18: 968-971.
171. Ribonukleoproteino (RNR) baltymas – gausiai pastebima susisukusių RNR. Prieiga per internetą pagal:  
[http://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/electron\\_microscopy.html](http://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/electron_microscopy.html)
172. Robardet E. and Cliquet F. (2010). Evolution of rabies in raccoon dogs and red foxes in Baltic countries during the XXI century. Report. EU Reference Laboratory for Rabies. Anses, Nancy France, Report: 1-12 p.
173. Robardet E., Andrieu S., Cliquet F. (2012). Collaborative study on anti-Rabies conjugate performance. Anses, Nancy France, Report: 1-27.
174. Rudd R. J., Trimarchi C.V. (1989). Development of an in vitro virus isolation procedures as replacement for the mouse inoculation test in rabies diagnosis. *J Clinical Microbiology* 27: 207-214.
175. Rupprecht C. E., Blass L., Smith K., Lillian A., Orciari M. S., Niezgodna M., Whitfield S. G., Gibbons R. V., Guerra M., A. Hanlon C. A. (2001). Human infection due to recombinant vaccinia-rabies glycoprotein virus. *N Engl J Med* 345: 582-586.
176. Rupprecht C. E. (2004). A tale of two worlds: public health management decisions in human rabies prevention. *Clinical Infectious Diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 39: 281-283.
177. Rupprecht C. E., Barrett J., Briggs D., Cliquet F., Fooks A. R., Lumlertdacha B., Meslin F. X., Muller T., Nel L. H., Schneider C., Tordo N., Wandeler A. I. (2008). Can rabies be eradicated? *Dev Biol* 131: 95-122.
178. Saengseesom W., Mitmoonpitak C., Kasempimolporn S., Sitprija V. (2007). Real-time PCR analysis of dog cerebrospinal fluid and saliva for antemortem diagnosis of rabies. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 1: 53-57.

179. Sacramento D., Bourhy H., Tardo N. (1991). PCR technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. *Mol Cell Probes* 5: 229–240.
180. Seif I., Coulon P., Rollin P. E., Flamand A. (1985). Rabies virulence: effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site II of the glycoprotein. *J Virol* 53: 926-34.
181. Servat A., Feysaguet M., Blanchard I., Morize J. L., Schereffer J. L., Boue F., Cliquet F. (2007). A quantitative indirect ELISA to monitor the effectiveness of rabies vaccination in domestic and wild carnivores. *J Immunol Methods* 318: 1-10.
182. Servat A., Picard-Meyer E., Robardet E., Muizniece Z., Must K., Cliquet F. (2012). Evaluation of rapid immunochromatographic test for the detection of rabies from brain material of European mammals. *Biol* 40(1): 61-66.
183. Setien A. A., Brochier B., Tordo N., De Paz O., Desmettre P., Peharpre D., Pastoret P. P. (1998). Experimental rabies infection and oral vaccination in vampire bats (*Desmodus rotundus*). *Vaccine* 16: 1122-1126.
184. Schneider L.G. & Cox J. H. (1983). Ein Feldversuch zur oralen Immunisierung von Füchsen gegen die Tollwut in der Bundesrepublik Deutschland. *Tierärztl Umsch* 38: 315-324.
185. Schneider L.G., Cox J.H. Bat lyssaviruses in Europe. (1994). *Lyssaviruses*, eds Rupprecht C.E., Dietzschold B., Koprowski H., Springer-Verlag, Berlin. P. 207-218.
186. Shankar V., Bowen R. A., Davis A. D., Rupprecht C. E., O’Shea T. J. (2004). Rabies in a colony of big brown bats (*Eptesicus fuscus*). *J Wildlife Dis.* 40: 403-413.
187. Sinchaisri T. A., Nagata T., Yoshikawa Y., Kai C., Yamanouchi K. (1992). Immunohistochemical and histopathological study of experimental rabies infection in mice. *J Vet Sci* 54: 409-416.



188. Smith J. S., Yager P. A., Baer G. C. (1973). A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. *Bull WHO* 48: 535-541.
189. Smith A. L., Tigor G. H., Emmons R. W., Woodie J. D. (1978). Isolation of Field rabies virus strains in CER and murine neuroblastoma cell cultures. *Intervirology* 9: 359-361.
190. Smith J.S., King A.A. (1996) Monoclonal antibodies for the identification of rabies and non-rabies lyssaviruses. In: Meslin F.X., Kaplan M. M., Koprowski H. (Eds). *Laboratory techniques in rabies*, WHO Geneva: 181-191.
191. Smith J. M., McDonald R. A. (2006) Emerging viral infection in transplantation. *Pediatr Transplant* 10: 838-843.
192. Spearman C. (1908). The method of right and wrong case (constant stimuli) with Gauss formulae. *Br J Psychol* 2: 227.
193. Sureau P., Rollin P., Wiktor T. J. (1983). Epidemiological analysis of antigenic variations of street rabies virus: detection by monoclonal antibodies. *American J of Epidemiology* 117 (5): 605–609.
194. Steck F., Wandeler A., Bischel P., Capt S., Schneider L. (1982). Oral immunisation of foxes against rabies. *Zbl Vet Med B* 29: 372-396.
195. Svičiulis A., Vaičiuvėnas V., Tilindis B. (1989). *Imunologija*. Vilnius: Mokslas: 10–14.
196. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599.
197. Tepsumethanon V., Wilde H., Meslin F. X. (2005). Six criteria for rabies diagnosis in living dogs. *J Med Assoc Thai* 88: 419-422.
198. Thomas J. B. (1975). The serum neutralization, indirect fluorescent antibody and rapid fluorescent focus inhibition test. In: Baer G.M. *The natural history of rabies*. Academic Press 1: 417-433.
199. Tims T., Briggs D. J., Davis R. D., Moore S.M., Xiang Z., Ertl H. C., Fu Z. F. (2000). Adult dogs receiving a rabies booster dose with a

- recombinant adenoviruses expressing rabies virus glycoprotein develop high titers of neutralizing antibodies. *Vaccine* 18: 2804-2807.
200. Toovey S. (2007). Preventing rabies with the Verorab vaccine: 1985-2005 Twenty years of clinical experience. *Travel medicine and infectious disease*. 5(6): 327-48.
201. Tollis M., Buonavoglia C., Trani L., Vignolo E. (1988). Sensitivity of different cell lines for rabies virus isolation. *J. Vet. Med. B*. 35: 504-508.
202. Toma B., Andral L. (1972). Epidemiology of fox rabies. In: Laufer MA, Bang FB, Maramoroch K., Smith K. M, editors. *Advances in virus research*. New York: Academic Press 21: 1-36.
203. Tordo N., Poch O., Ermine A., Keith G., Rougeon F. (1986). Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? *Proc Natl Acad Sci* 83: 3914-3918.
204. Tordo N., Poch O. (1988(a)). Structure of rabies virus. In: Campbell J. B., Charlton K.M. (Eds.) *Rabies Boston*: 25-45.
205. Tordo N., Poch O., Ermine A., Keith G., Rougeon F. (1988(b)). Completion of the rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains among the L (polymerase) proteins of unsegmented negative-strand RNA viruses. *Virology* 165: 565-576.
206. Tordo N. (1996(a)). Characteristics and molecular biology of rabies virus. In: Meslin F. X., Kaplan M.M, Koprowski H. (Eds). *Laboratory Techniques in Rabies*. Geneva: 28-53.
207. Tordo N., Sacramento D., Bourthy H. (1996(b)). The polymerase chain reaction (PCR) technique for diagnosis, typing epidemiological studies of rabies. In: Meslin F. X., Kaplan M. M., Koprowski H. (Eds). *Laboratory Techniques in Rabies*. Geneva: 157-170.
208. Tordo N. Bahloul C., Jacob Y., Jallet C., Perrin P., Badrane H. (2006). Rabies: Epidemiological tendencies and control tools. *Developments in Biologicals* 125: 3-13.

209. Tortora G. J., Funke B. R., & Case, C. L. (2010). *Microbiology: An Introduction*. San Francisco, CA: Pearson Benjamin Cummings. 2010; 622-23.
210. Umoh J. U., Blendon D. C. (1981). Immunofluorescent staining of rabies virus antigen in formalin-fixed tissue after treatment with trypsin. *Bull WHO* 59: 737-44.
211. Vanaga S., van der Heide R., Joffe R., Vander Poel WH. (2003). Rabies in wildlife in Latvia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 3: 117-24.
212. Vazquez-Moron S., Avellon A., Echevarria J. E. (2006). RTPCR for detection of all seven genotypes of Lyssavirus genus. *J Virol Methods* 135: 281-287.
213. Vos A., Neubert A., Aylan O., Schuster P., Pommerening E., Muller T., Chai Chivatsi D. (1999). An update on safety studies of SAD B19 rabies virus vaccine in target and non target species. *Epidemiol Infect* 123: 165-175.
214. Vos A., Muller T., Schuster P., Schluter H., Neubert A. (2000). Oral vaccination of foxes against rabies with SAD B19 in Europe, 1983-1998: *Review Vet Bull* 70: 1-6.
215. Vos A., Pommerening E., Neubert L., Kachel S., Neubert A. (2002). Safety studies of the oral rabies vaccine SAD B19 in striped skunk (*Mephitis mephitis*). *J Wild Dis* 38(2): 428-31.
216. Vos A. Kaipf I., Denzinger A., Fooks A. R., Johnson N., Muller T. (2007). European bat lyssaviruses- an ecological enigma. *Acta Chiropterologica* 9: 283-296.
217. Vos A., Conzelman K.K., Finke S., Muller T., Teike J., Fooks A. R., Neubert A. (2011). Immunogenicity studies in carnivores using rabies virus construct with site-directed deletion in the phosphoprotein. *Adv Prev Med*: 898171.
218. Wakeley P. R., Johnson N., McElhinney L. M., Marston D., Sawyer J., Fooks A. R. (2005). Development of a Real-Time, Taqman Reverse

- Transcription-PCR Assay for Detection and Differentiation of Lyssavirus Genotypes 1, 5, and 6. *J Clin Microbiol* 43: 2786-2792.
219. Wandeler A. I. (2000). Oral immunization against rabies: afterthoughts and foresight. *Swiss Arch Vet Med* 124: 455-462.
220. Wandeler A. I. (2008). The rabies situation in Western Europe Towards the Elimination of Rabies in Eurasia. *Dev Biol Basel Karger V* 131: 19-25.
221. Wang Y., Xiang Z., Pasquini S., Ertl H. C. (1998). Effect of passive immunization or maternally transferred immunity on the antibody response to a genetic vaccine to rabies virus. *J Virol* 72: 1790-1796
222. Wang Z. W., Sarmiento L., Wang Y., Li X., Dhingra V., Tseggai T., Jiang B., Fu Z. F. (2005). Attenuated rabies virus activates, while pathogenic rabies virus evades, the host innate immune responses in the central nervous system. *J. Virol* 79: 12554-12565.1.
223. Wasniewski M., Cliquet F. (2012). Evaluation of ELISA for detection of rabies antibodies in domestic carnivores. *J Virol Methods* 179 (1): 166-75
224. Webster W. A. & Casey G. A. (1996) Virus isolation in neuroblastoma cell culture. In: Meslin F.-X., Kaplan M. M., Koprowski H. 4eds. *Laboratory techniques in rabies*. Geneva WHO: 9-27.
225. WHO (2004) Expert Consultation on Rabies. First Report. Geneva WHO Technical Report Series No.931.
226. WHO (2010) position paper on rabies vaccines. *Weekly Epidemiological Record* 85: 673-677.
227. Whitby J. E., Heaton P. R., Black E. M., Wooldridge M., McElhinney L. M., Johnstone P. (2000). First isolation of a rabies-related virus from a Daubenton's bat in the United Kingdom. *Vet Rec* 147: 385-388.
228. Wiktor T. J., Mac Farlan R. I., Reagan K., Dietzschold B., Curtis P., Wunner W. H., Kieny M. P., Lathe R., Lecocq J. P., Mackelt M., Moss B., Koprowski H. (1984). Protection from rabies by a vaccinia virus

- recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. *Proc Natl Acad Sci* 81: 7194.
229. Winkler W. G., Bogel K. (1992). Control of rabies in wildlife. *Scientific Am* 266: 56-62.
230. Wu X., Franka R., Velasco-Villa A., Rupprecht C. E. (2007). Are all lyssavirus genes equal for phylogenetic analyses? *Virus Res.* 129: 91–103.
231. Wunner, W.H. (2007). Rabies virus. In: Jackson A. C., Wunner W. H. eds. *Rabies*, 2 nd ed. Amsterdam, Elsevier Academic Press: 23-68.
232. Xu G., Weber P., Hu Q., Xue H., Audry L., Li C., Wu J. & Bourhy H. (2007). A simple sandwich ELISA (WELYSSA) for the detection of lyssavirus nucleocapsid in rabies suspected specimens using mouse monoclonal antibodies. *Biologicals*, 35: 297–302.
233. Xuan X., Tuchi K., Sato I., Nishikawa Y., Onoderaz, Y., Takashima Y., Yamamoto A., Katsumata A., Iwata A., Ueda S., Mikami T., Otsuka H. (1998). Biological and immunogenic properties of rabies virus glycoprotein expressed by canine herpesvirus vektor. *Vaccine* 16: 969-976.
234. Zalana E., Wilson C., Pukitis D. (1979). A microtest for the quantitation of rabies virus neutralizing antibodies. *J Biol Standart* 7: 213-220.
235. Zienius D. (2004). Retrospektyviniai pasiutligės prevencijos ir kontrolės aspektai Lietuvos laukinių gyvūnų populiacijoje 1995–2002 metais. *Veterinarija ir zootechnika*. T. 27. 49: 34–40.
236. Zienius D., Sajute K., Zilinskas H., Stankevicius A. (2009). Phylogenetic Analysis of the Rabies Virus N-coding Region in Lithuanian Rabies Isolates. *Acta Vet Brno* 78: 273–280.

## PADĖKA

Norėčiau visiems padėkoti, kurie prisidėjo prie šio darbo. Darbas būtų nepavykęs be šių žmonių paramos.

Ypatingą padėką reiškiu vadovui prof., hab. dr. V. A. Tamošiūnui už per doktorantūros studijas suteiktas nuoširdžias, labai atsakingas bei vertingas mokslines konsultacijas, už patarimus ir pasiūlymus bei nuolatinį skatinimą tobulėti.

Taip pat nuoširdžiai dėkoju disertacijos recenzentams atidžiai perskaičius disertaciją ir suteikusiems daug vertingų patarimų bei naudingų kritinių pastabų. Dėkoju dr. Jonui Miliui už paskatinimą imtis mokslinio darbo ir suteiktas galimybes bei sąlygas.

Dėkoju Užkrečiamųjų ligų ir AIDS centro (ULAC) Imunoprofilaktikos skyriaus vedėjai D. Razmuvienei už pagalbą įgyvendinant straipsnio idėją ir surenkant duomenis apie žmonių pasiutligės epidemiologinę situaciją ir imunoprofilaktiką Lietuvoje.

Bendradarbiams už nuoširdžią pagalbą ruošiant šį darbą bei kolegoms už kritinį mąstymą bei vertingas pastabas. Taip pat dėkoju visiems artimiesiems ir draugams už jų paramą, supratingumą ir palaikymą.

Nuoširdžiai dėkoju savo vyrui Eugenijui, sūnums Pauliui ir Mantui už jų didelę kantrybę, nuolatinį palaikymą, supratimą.