

LYSSAVIRUS SPP. – RABIES VIRUSES AS A STILL-PRESENT PROBLEM

Przemysław Gałązka¹, Patryk Kaczor^{2*}, Klaudyna Grzelakowska², Kamil Leis²

¹Department of General and Oncological Surgery for Children and Adolescents, Antoni Jurasz University Hospital No. 1 in Bydgoszcz, Ludwik Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń
²Faculty of Medicine, Ludwik Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń

Received in September 2018, accepted in April 2019

Abstract: The genus *Lyssavirus* spp. currently includes 14 species that are responsible for causing rabies, rabies-like and rabies-related diseases. The first symptoms of infection are similar to a cold and mainly include fever, headache and general fatigue. Then comes brain dysfunction and acute neurological symptoms, and ultimately – in most cases – death. Lyssaviruses are spread mainly through direct contact with the carrier that contains the viral reservoir. The gold standard in diagnostics is the method of direct immunofluorescence, through which viral antigens are detected – mainly in the saliva of a patient. Currently, rabies treatment is an experimental form of therapy according to the Milwaukee protocol.

1. Introduction. 2. Systematics. 2.1. *Lagos bat virus*. 2.2. *Mokola virus*. 2.3 *Duvenhage virus*. 2.4. *European bat 1 lyssavirus*. 2.5. *European bat 2 lyssavirus*. 2.6. *Australian bat lyssavirus*. 3. Characteristics. 3.1. Molecular structure. 3.2. Genome and gene expression. 3.3. Life cycle. 4. Pathogenicity. 4.1. Pathogenesis. 4.2. Rabies symptoms. 5. Prevention, prophylaxis, diagnostics, treatment. 5.1. Vaccinations. 5.2. Post-exposure prophylaxis. 5.3. Diagnostics. 5.4. Experimental treatment. 6. Summary

LYSSAVIRUS SPP. – WIRUSY WŚCIEKLIZNY JAKO WCIAŻ AKTUALNY PROBLEM

Streszczenie: Rodzaj *Lyssavirus* spp. obejmuje obecnie 14 gatunków, które odpowiedzialne są za wywoływanie wścieklizny oraz chorób wścieklizno-podobnych i wścieklizno-pokrewnych. Pierwsze objawy infekcji przypominają przeziębienie i obejmują głównie gorączkę, ból głowy i ogólne przemęczenie. Następnie dochodzi do dysfunkcji mózgu i ostrych objawów neurologicznych, a ostatecznie – w większości przypadków – do śmierci. Lyssawirusy rozprzestrzeniają się przede wszystkim przez bezpośredni kontakt ze zwierzęciem stanowiącym rezerwuuar wirusowy. Złotym standardem w diagnostyce jest metoda bezpośredniej immunofluorescencji, za pomocą której wykrywane są antygeny wirusowe, głównie w ślinie chorego. Obecnie, do leczenia wścieklizny stosuje się eksperymentalną terapię przeprowadzaną zgodnie z protokołem Milwaukee.

1. Wstęp. 2. Systematyka. 2.1. *Lagos bat virus*. 2.2. *Mokola virus*. 2.3 *Duvenhage virus*. 2.4. *European bat lyssavirus* typ 1. 2.5. *European bat lyssavirus* typ 2. 2.6. *Australian bat lyssavirus*. 3. Charakterystyka. 3.1. Budowa molekularna. 3.2. Genom i ekspresja genów. 3.3. Cykl replikacyjny. 4. Chorobotwórczość. 4.1. Patogeneza. 4.2. Objawy wścieklizny. 5. Prewencja, profilaktyka, diagnostyka, leczenie. 5.1. Szczepienia. 5.2. Profilaktyka po-ekspozycyjna. 5.3. Diagnostyka. 5.4. Leczenie eksperymentalne. 6. Podsumowanie

Key words: *Lyssavirus* spp., Milwaukee protocol, rabies-related viruses, rabies viruses, rabies

Słowa kluczowe: *Lyssavirus* spp., protokół Milwaukee, wirusy wścieklizno-podobne, wirusy wścieklizny, wścieklizna

1. Introduction

The genus *Lyssavirus* belonging to the family *Rhabdoviridae* (Rhabdoviruses) and the order *Mononegavirales*, includes the globally occurring rabies virus and some rabies-like and rabies-related virus species [29, 59, 65]. They cause a disease commonly referred to as “rabies”. This name is derived from the Latin *rabies* (this one, on the other hand, is derived from *rabhas* from the Indian language Sanskrit – “to use violence”), which is translated as “rage” because this disease is characterized by aggressiveness and a feeling of excitement. This pathology is also sometimes called “hydrophobia” from the Latin *hydrophobia*, which refers to one of the symptoms of this disease – involuntary muscle spasms at the sight or sound of water [45, 46].

In 1931 in the West Indies, six years before the first isolation of the *West Nile virus* (WNV) [49], Joseph Lennox Pawan discovered the Negri bodies in the brain of a bat exhibiting behaviour that deviated from the rest of mammals of the same species. A year later, he stated that infected vampire bats from the subfamily, *Desmodontinae*, can transmit rabies to humans and animals [38, 39]. This disease is an example of a classic zoonosis, which is transmitted to humans from animals in two cycles. The first of them, which is referred to as the urban cycle, is spread mainly by dogs. In turn, the so-called sylvatic cycle of rabies is transmitted by wild animals – mainly raccoons, skunks, bats, foxes, and badgers. The causative factor of aggressive behaviour in infected animals is *Lyssavirus*, which facilitates its further spread [32].

* Corresponding author: Patryk Kaczor, Faculty of Medicine, Ludwik Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, M. Skłodowskiej-Curie St. 9, 85-094 Bydgoszcz; tel. 52 585 40 15; e-mail: patryk.kaczor97@gmail.com

2. Systematics

As recently as 60 years ago the genus *Lyssavirus* was thought to only include one virus – RABV (*Rabies virus*), however, the polyclonal antibodies tests using the cross-seroneutralisation method indicated antigenic diversity of the viruses isolated from infected bats, which led to distinguishing 5 different serotypes [29, 65]. The information obtained through the introduction of molecular biology techniques into the research has allowed for differentiating specific genotypes of the genus *Lyssavirus*.

The new division was based primarily on the differences in the nucleotide sequence of the tested viruses, unlike the then current one which was based on the antigenic properties of isolated strains [29]. This allowed for identifying 7 genotypes within the genus *Lyssavirus*, (related to geographical distribution and specific hosts of viruses) (Table I) [3, 29, 48, 57, 65].

The existing division into genotypes served as the basis for the taxonomic division of the genus *Lyssavirus* into particular species [29]. Since 2016, 14 species have been listed. They have been discovered over the years both in Europe (Germany, Finland) and in Asia (Kyrgyzstan, Tajikistan, Eastern Russia), in Africa (Nigeria, Kenya, Tanzania) as well as in Australia. According to the order of identifying the species, these were: RABV – *Rabies virus*, LBV – *Lagos bat virus*, MOKV – *Mokola virus*, EBLV-1 – *European bat 1 lyssavirus*, DUVV – *Duvenhage virus*, EBLV-2 – *European bat 2 lyssavirus*, ARAV – *Aravan virus*, ABLV – *Australian bat lyssavirus*, KHUV – *Khujand virus*, IRKV – *Irkut virus*, WCBV – *West Caucasian bat virus*, SHIBV – *Shimoni bat virus*, IKOV – *Ikoma lyssavirus*, BBLV – *Bokeloh bat lyssavirus* [29]. In 2012, probably another virus of this type which was discovered in Spain – LLEBV – *Lleida bat lyssavirus*. However, it has not yet been officially classified as a *Lyssavirus* spp. species [10, 29].

There is also a different classification of the viruses of this genus, based on their genetic, immunogenic and pathogenic characteristics. Genotypes were divided into two phylogenetic groups. The phylogenetic

group I includes the genotypes 1, 4, 5, 6 and 7, while the phylogenetic group II includes the genotypes 2 and 3 [3, 29]. The viruses assigned to different phylogenetic groups differ also in their biological properties, such as pathogenicity, the ability to induce apoptosis or the recognition of cell receptors. In addition, the current results obtained from the research, among others on animals, indicate that the vaccines currently in use are not effective in preventing the infections caused by the viruses belonging to the phylogenetic group II [48].

In accordance with the current state of knowledge, the recognised division of lyssaviruses is the one proposed in 2018 by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Lyssavirus* spp. belongs to the phylum of *Negarnaviricota*, of the class *Monjiviricetes*, order *Mononegavirales* and family *Rhabdoviridae*, which consists of 17 other genera. 16 species and 2 others identified as unclassified belong to lyssaviruses (Table II) [20, 21, 59].

The selected species of the genus *Lyssavirus*, belonging to separate genotypes and phylogenetic groups are presented below.

2.1. *Lagos bat virus*

The virus of this species constitutes the genotype 2 of the genus *Lyssavirus* and belongs to the phylogenetic group II. When mammals are infected, it causes a rabies-like illness in them. It occurs in central and southern Africa. In 1956, in Nigeria, LBV was first isolated from the megabats of the family *Pteropodidae* originating from the island of Lagos. It was also the first discovery of a virus related to RABV. To date no cases of human infection with this species have been documented [7,28].

2.2. *Mokola virus*

Genotype 3 of the genus *Lyssavirus* includes MOKV, which at the same time belongs to the phylogenetic group II. It is isolated from mammals inhabiting the lands of sub-Saharan Africa [58], in which it causes

Table I
Division of lyssaviruses.

Genotype	Virus	Place of occurrence	Host
1	<i>Rabies virus</i> (RABV)	Whole world	Carnivorous terrestrial animals
2	<i>Lagos bat virus</i> (LBV)	Africa	Fruit-eating bats
3	<i>Mokola virus</i> (MOKV)	Africa	Shrews, cats, dogs and rodents
4	<i>Duvenhage virus</i> (DUVV)	Africa	Insectivorous bats
5	<i>European bat 1 lyssavirus</i> (EBLV-1)	Europe	Insectivorous bats
6	<i>European bat 2 lyssavirus</i> (EBLV-2)	Europe	Insectivorous bats
7	<i>Australian bat lyssavirus</i> (ABLV)	Australia and Oceania	Fruit-eating and insectivorous bats

Based on [3, 29, 48, 65].

Table II
Alphabetical list of *Lyssavirus* spp.

Virus	Abbreviation	Phylogroup
<i>Aravan virus</i>	ARAV	1
<i>Australian bat lyssavirus</i>	ABLV	
<i>Bokeloh bat lyssavirus</i>	BBLV	
<i>Duvenhage virus</i>	DUVV	
<i>European bat lyssavirus 1</i>	EBLV-1	
<i>European bat lyssavirus 2</i>	EBLV-2	
<i>Gannoruwa bat lyssavirus</i>	GBLV	
<i>Irkut virus</i>	IRKV	
<i>Khujand virus</i>	KHUV	
<i>Rabies virus</i>	RABV	
<i>Lagos bat virus</i>	LBV	2
<i>Mokola virus</i>	MOKV	
<i>Shimoni bat virus</i>	SHIBV	
<i>Ikoma lyssavirus</i>	IKOV	-
<i>Kotalahti bat lyssavirus</i> (unclassified)	KBLV	
<i>Lleida bat lyssavirus</i>	LLEBV	
<i>Taiwan bat lyssavirus</i> (unclassified)	TBLV	
<i>West Caucasian bat virus</i>	WCBV	

Based on [20, 21, 59]

symptoms similar to those induced by rabies. So far, the natural reservoir of this virus has not been identified, but it is assumed that small mammals, mainly cats, constitute it. So far, there have been only two recorded cases of human infection with a virus belonging to this species [14, 25].

2.3. *Duvenhage virus*

This species was discovered for the first time in 1970 in southern Africa in a bat-bitten man who subsequently died of a disease manifesting itself with rabies-like symptoms [55]. DUVV constitutes genotype 4 classified within the phylogenetic group I. In 2006, also in South Africa, the second mortality was documented, when a man was scratched by a bat [40], while in 2007, in Amsterdam, the first recorded mortality case in Europe because of infection with DUVV was recorded. The bats from the suborder *Microchiroptera* are the probable carrier of *Duvenhage virus* from which it has been isolated only twice [56].

2.4. *European bat 1 lyssavirus*

This virus, belonging to the genotype 5, was isolated in Spain from the bats of the species *Eptesicus serotinus*. The species is divided into EBLV-1a and EBLV-1b; it occurs throughout Europe – descriptions of infections

from France, the Netherlands and Russia are available in the literature. Its carriers are insectivorous bats. By 2000, 630 cases of infections with this virus had been documented and by 2010 – 959 [2, 29, 48, 50, 51, 65].

2.5. *European bat 2 lyssavirus*

The species was isolated in 1996 in the UK from a *Myotis daubentonif* bat. These viruses are found on the European continent, and the hosts, as in the case of *European 1 bat lyssavirus*, are insectivorous bats [3, 23, 29, 48].

2.6. *Australian bat lyssavirus*

The black fruit bats from the species *Pteropus alecto* constitute one of the five natural reservoirs of ABLV [5]. This virus belongs to the phylogenetic group I and constitutes genotype 7 of the genus *Lyssavirus*. It was first identified in 1995 in Australia [53], and a year later the first death resulting from ABLV infection was identified. So far, three deaths have been documented as being caused by the infection with ABLV. All these people developed rabies-like symptoms, after being scratched or bitten by the bats transmitting ABLV [16, 18].

3. Characteristics

3.1. Molecular structure

The genomic material of the viruses of the genus *Lyssavirus* consists of a negative- sense single-stranded RNA molecule which encodes 5 viral proteins. These are: nucleoprotein N, phosphoprotein P, glycoprotein G, polymerase L and core protein M [1, 15]. 4 additional peptides are available via alternative initiation [52]. The leader sequence consists of about 50 nucleotides, preceded by genes encoding the proteins of the virus [65].

The virions are described as “approximately bullet-shaped” with an average length of 100–300 nm, and average diameter of 75 nm. In contrast, their infectious particles have an approximately cylindrical model [1, 15]. They are composed of two structural and functional units. The first of them is enclosed in a lipid envelope covered with approximately 400 G glycoprotein spike-like protrusions (constituting trimers) [65] of 10 nm in length, responsible for the recognition of specific viral receptors on cell membranes. The protrusions constitute the main surface antigens, determining the adsorption and inducing the formation of neutralizing antibodies [32]. The second subunit is formed of an internal, helical ribonucleocapsid (which is a ribonucleoprotein core), twisted symmetrically and composed of genomic RNA, which is closely related to the

nucleoprotein (N protein), the L protein (RNA polymerase) and the RNA polymerase cofactor – the P protein.

The M, or core, protein located between the nucleocapsid and the lipoprotein envelope, which is responsible for the overall shape of the virus and is involved in budding – detachment of viral particles from host cells [65]. The N nucleoprotein is the main structural protein of the virus, protecting its RNA against ribonucleases, thus ensuring that it remains in the configuration allowing for transcription [32]. The virus structure is schematically shown in Fig. 1.

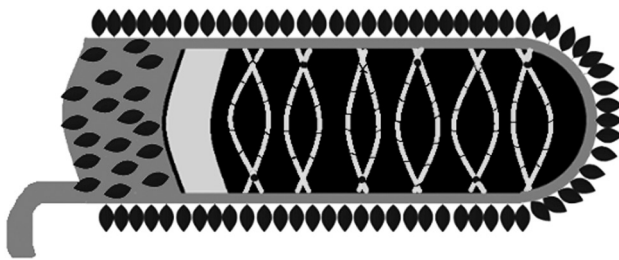


Fig. 1. The structure of viruses belonging to the genus *Lyssavirus* spp.

3.2. Genome and gene expression

The genetic material of *Lyssavirus* is a single-stranded, linear, undivided negative-sense RNA, about 11–12 thousand nucleotides in size [37]. The expression of *Lyssavirus* genes occurs through RNA-dependent RNA polymerase, which binds the genome contained in the capsid in the leader region. Sequential transcription of each gene occurs through the recognition of start and stop signals contained in the viral genes. Next, the cap is attached to the mRNA and its polyadenylation by L proteins during synthesis takes place [52].

3.3. Life cycle

The rabies virus penetrates, multiplies and spreads along neural pathways. It is thus qualified as a member of neurotrophic viruses [36]. The viral replication cycle begins with the attachment of viral G glycoproteins to the host's specific nicotinic acetylcholine receptors or to the neural cell adhesion molecule. It initiates the infection process and allows clathrin-dependent endocytosis (pinocytosis) of the virus to host cells (internalization). Viruses accumulate in large cytoplasmic vesicles [32, 65]. Further, the virus's lipid envelope becomes attached to the host cell membrane, which enables the release of the ribonucleocapsid into the cytoplasm [52]. This process is called uncoating [65]. It is promoted by the acidic environment of the vesicle [32]. Both the replication and transcription itself occur in the cytoplasm in Negri bodies [27].

The next stage of replication is the transcription of viral RNA. Then the viral mRNA is translated on free

ribosomes in the cytoplasm leading to the synthesis of N, P, M and L proteins [65]. G protein is produced with the Golgi apparatus on ribosomes attached to the membrane, and then delivered, after incorporation into the membrane vesicles, to the cell surface [32]. The replication itself probably starts when there are enough nucleoproteins necessary to separate newly synthesized antigens from genomes [52]. The first stage is the synthesis of a full-length copy of the positive-sense viral genome. When it occurs, RNA transcription becomes continuous, thus ignoring the nucleotide sequences responsible for its possible interruption (STOP codons). Viral polymerase operates from the 3' end of the genome and continues until a full copy of the genome has been formed. Duplicate strands with positive sense constitute then a matrix for the synthesis of a complete strand with negative sense, which constitutes the viral genome [65].

The final stage of the viral replication cycle consists in the binding of ribonucleocapsid (which consists of the genome associated with the L protein polymerase protein and N protein) with the protein core at the cytoplasmic membrane, which then – after folding it into a condensed form – induces the formation of the form referred to as “approximately bullet-shaped”. Subsequently, with the participation of the host's ESCRT complexes in the plasma membrane, it is released by budding, thus leading to the disconnection of new virions after covering them with the ribonucleocapsid envelope [32, 52]. The replication cycle of the virus is shown in Fig. 2.

4. Pathogenicity

4.1. Pathogenesis

The infection occurs after the rabies virus enters a wound resulting from a bite, as well as after contact of contaminated saliva or infected brain of an animal with damaged skin, conjunctiva or mucous membranes. The virus does not penetrate undamaged skin. The most dangerous form of infection is the one effected through the nasal mucous membranes, as the olfactory nerve endings, located very close to the brain, occur therein, making its progress particularly fast. In rare cases, it is also possible to be infected by droplet-aerogenic [36] or iatrogenic routes of transmission [47]. There have also been isolated cases of infection through transplantation of various organs, i.e. lungs and liver, followed by the death of the recipient [48].

After entry, it replicates in tissues (in addition to the nervous tissue) or undergoes direct migration to peripheral nerves, thus penetrating into the central nervous system, to the dorsal root ganglia, through retrograde axioplasmatic transport. When the lyssavirus reaches

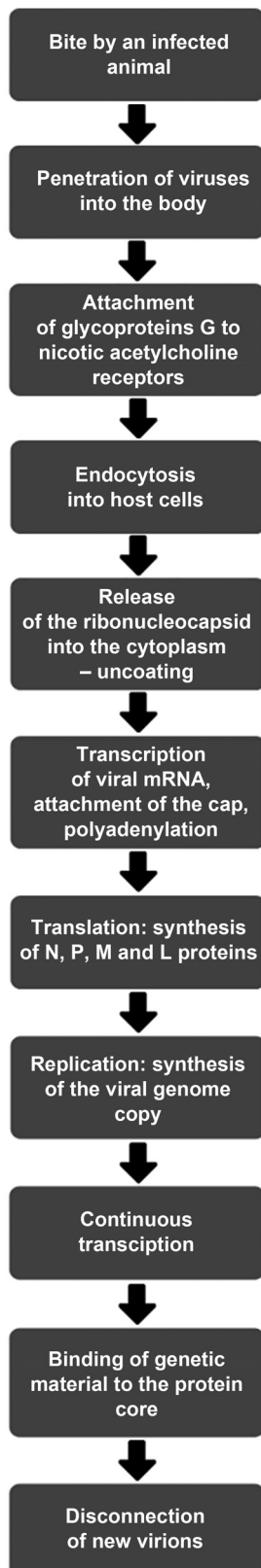


Fig. 2. The replication cycle of viruses belonging to the genus *Lyssavirus* spp.

the brain and spinal cord, a rapid progression of the infection follows, which includes the Purkinje cells of the cerebellum, brain stem, hippocampus and the cells of the nuclei in the gyri of the pons. Sensory and motor

fibres may be involved in this process, depending on the species of the animal [32]. In the case of bats these wounds are often very superficial (0.1–0.3 mm deep) and they only affect the epidermis, so that people exposed to contact very often do not associate infection with this bite. On the other hand, infected carnivorous animals cause infection through extensive deep wound bites [6]. The incubation period varies from 2 weeks to 6 years, but on average it is 2–3 months. It depends on the distance of the infection site from the brain, the extent of the wound, the dosage of the virus, age and the state of immunity. The estimated rate of virus migration, and thus the rate at which nerve infections progress, is 15–100 mm per day. The virus then travels through the afferent nerves of the peripheral nervous system from the central nervous system to highly-loosened areas (scalp, neck skin, nasal mucosa, renal parenchyma, pancreas lobules, retina, salivary gland, cornea, adrenocortical cortex), which also leads to infection of neighbouring tissues, i.e. secretory tissue of salivary glands [32].

In the pathogenesis of most viral infections, T CD8+ cells are involved, however, in the case of rabies, the virus enters the nerve cells which can lead to inflammation in the central nervous system and result in nerve damage and paralysis. The rabies virus has the features of a superantigen, which leads to the activation of a significant part of T lymphocytes. This indirectly leads to the body's defensive response to other antigens unrelated to the infection [19].

The rabies virus leads to significant neurological damage after entering the central nervous system. As a result of the infection, an increased expression of chemokines belonging to the cytokine family occurs. In the case of mice infected in laboratory conditions, excessive activity of these proteins leads to the induction of apoptosis of infected cells, increased inflow of inflammatory cells into the central nervous system, and also to the sealing of the blood-brain barrier. The inflammatory process which occurred in mice infected with a low dosage of the virus under laboratory conditions led to the complete elimination of the virus from the brain. In the case of infecting rodents with the rabies virus which did not take place under laboratory conditions, invasion of the central nervous system occurred without initiation of the organism's immune response [35].

At the time of the occurrence of the first clinical symptoms, whose bellwether example is, in most cases, neuropathic pain in the initial site of infection (caused by viral replication in the dorsal ganglion and *ganglionitis*), lyssavirus is already present throughout the organism. The main clinical symptoms are associated with the infection of the brain, cerebellum and spinal cord by the virus, and neuron degeneration [32]. Two main clinical pictures of rabies are distinguished: the

furious form and the paralytic one [65], where it often happens that the furious form (agitated) proceeds into the paralytic form. After experiencing a period of agitation, in the case of surviving another fit of convulsions by the infected one, paralysis follows, which then leads to inevitable death. One of the forms of the occurrence of the disease is the so-called "silent rabies", which runs without a form of craziness or is poorly expressed [36]. After approx. 7–10 days after the first symptoms of rabies, the patient enters a coma, after which they die from respiratory failure. After infection of the organism with the participation of *Lyssavirus* encephalitis occurs in about 80% of cases, which is a fatal agitated form of the disease. In the case of the development of mild paralytic rabies, paralysis is the dominant symptom [47].

In order to fully understand the way in which the organism is infected by the genus *Lyssavirus* spp., it is necessary to take into account the molecular mechanisms to which these viruses' impact. The P protein of lyssaviruses may lead to the inhibition of RIG-I (retinoic acid-inducible gene I), belonging to membrane pattern recognising receptors (PRR) involved in the recognition of viruses by the non-specific immune response. The inhibition of RIG-I by the rabies virus P protein prevents the initiation of the anti-virus, apoptotic and pro-inflammatory response of the organism to infection [24, 26, 30, 31]. The P protein of the rabies viruses is also an antagonist of type I interferon (IFN). The P protein of lyssaviruses prevents the phosphorylation and dimerization of IRF3, i.e. the 3rd regulator factor of the interferon responsible for the expression of some genes with antiviral activity [12, 42]. Viral phosphoprotein may also inhibit signalling the STAT-I antiviral pathway, blocking the transport of STAT dimers to the nucleus [9, 63]. In this way, the P protein is presumably the key antagonist of interferons during the infection with the rabies virus, allowing viruses to replicate viruses in infected cells [8, 43].

Another element influenced by rabies viruses, more specifically *Rabies virus* (genotype 1.) and *Mokola virus* (genotype 3.), are the light chains of LC8 dynein, or the protein complex responsible for the movement of cell organelles along the microtubules. LC8 is expressed in various cell types, and the P protein of lyssaviruses, through interaction with this protein, probably allows the virus to propagate through the long axons of peripheral nerves from the primary site of infection, eventually enabling it to reach the CNS. LC8 is probably the key molecular link in the pathogenesis of rabies viruses and allows for the interaction of lyssaviruses with the cellular transport of the organism. However, it is not directly responsible for the final entry of viruses into the CNS [41, 54].

Rabies viruses can probably also alter ion channels and occupy cell receptors, and thus modify neurotrans-

mission. In patients with rabies, a decrease of tetrahydrobiopterin (BH4) has been recorded, as well as a pathological decrease in serotonergic and dopaminergic relays associated with the loss of BH4. BH4 deficiency ultimately leads to a decrease in the fluency of serotonin and dopamine turnover in the brain, and thus to the loss of these neurotransmitters and generalized slowdown of electrical activity in the cerebral cortex. The synthesis of neurotransmitters proceeds with the participation of phenylalanine hydroxylase, tyrosine hydroxylase and tryptophan hydroxylase, the essential cofactor of which is BH4. The decrease in BH4 concentration results in a shortage of, among others, adrenaline, noradrenaline, serotonin, dopamine and melatonin [62].

Neuronal nitric oxide synthase is BH4-dependent, hence BH4 deficiency can also lead to potential brain ischemia as a result of impaired cerebral vascularity. In addition, in the case of the viral infection of macrophages, they may release pro-inflammatory factors, including chemokines, interleukins and cytokines as well as nitric oxide. The presence of the rabies virus in the cell also results in facilitating the production of nitric oxide. Increased synthesis of nitric oxide is probably part of the antiviral cell response to infection and is probably one of the factors of innate immune response contributing to the replication of viruses in the cell at an early stage of infection [33, 62].

In most documented cases of rabies in humans, specific antibodies against cells infected with the rabies virus were not detectable until the onset of acute symptoms of infection in the blood serum. Antibodies directed against viral glycoproteins were not detected in the cerebrospinal fluid either. On the other hand, in patients who were found to have antibodies in their serum, their concentrations were very low, described as almost undetectable. A case of a patient suffering from rabies and subjected to a pharmacologically induced coma is documented. This allowed for inducing the humoral response of the body and the generation of IgG antibodies detectable subsequently both in the blood serum and in the cerebrospinal fluid. This patient probably survived owing to the creation of specific antibodies by their body. The G glycoprotein of rabies viruses is the main antigen against which a protective immune system response is induced. There are also other elements, such as cytokines, which play a role in immunizing the organism against rabies. The induction of apoptosis probably correlates with the accumulation of G glycoprotein in infected cells. In turn, apoptosis and subsequent death of these cells results in a strong innate and acquired immune response of the body [13, 22].

Rabies viruses eventually lead to neuronal dysfunction which is probably caused by the destruction of the cytoskeleton integrity and synaptic neuron structures. Some pathogens of the genus *Lyssavirus* spp. are able to

introduce significant changes in the expression of cytoskeletal network proteins of neuronal cells, including tubulin and beta-tropomyosin and vimentin isoforms, as well as cytoskeleton regulatory proteins. The disruption of the cytoskeleton integrity is probably one of the elements of the pathogenesis of rabies viruses. Rabies viruses require the integrity of the cytoskeleton actin network in order to penetrate neurons. Lyssaviruses are additionally able to introduce structural changes in organelles in neurons, and may, after penetration into a neuronal cell, affect their actin cytoskeleton, which physiologically fulfils key neuronal functions [11, 66].

4.2. Rabies symptoms

The first symptoms of viral infection are similar to the common cold and include general weakness and fatigue, discomfort, fever, loss of appetite, nausea, vomiting and headache. They can last for up to several days. At the bite site prickling, tingling, pain or itching may also be felt. Other symptoms associated directly with the entry of the virus into the central nervous system may be brain dysfunction, elevated mood, anxiety and confusion. With the progression of infection, one may also experience insomnia, delirium, hallucinations and confusion. In the second phase of the disease, referred to as the paralytic form, acute neurological symptoms – dysarthria (speech disorders), dysphagia (swallowing difficulties), excessive production and salivation and nystagmus may also be observed.

The acute infection period usually ends after 2 to 10 days. At the time of the manifestation of the first symptoms of rabies, the disease will lead to death in most cases, and the symptomatic treatment is only intended to bring temporary relief to the patient. During the development of the full clinical picture of the disease, hydrophobia is also characteristic (20–50% of patients), which is manifested by the occurrence of swallowing muscle contractions and, in extreme cases, also by the whole-body convulsions at the sight or sound of pouring water, and aerophobia [48]. In addition, polyneuritis develops [32, 34, 36, 47].

5. Prevention, prophylaxis, diagnostics, treatment

5.1. Vaccinations

The prevention of rabies infections aims to create specific immunity. The development of active immunity comes as a result of a series of vaccinations – specific active prevention. The vaccine contains an inactivated virus, which is also a specific antigen designed to generate immune memory by stimulating the immune system. Prevention may also include the generation of

passive immunity by administering antibodies along with the injection of human immunoglobulin – specific active-passive prevention [17, 34]. The glycoprotein of the rabies virus (G protein) contains antigenic sites which are the target of both vaccine-induced antibodies and administered immunoglobulin [60].

The obligation to implement rabies vaccination applies to people exposed to infection as a result of contact with an animal infected or suspected of being infected, however, it is also recommended for people who plan to travel to the areas of the endemic occurrence of rabies [17].

Rabies vaccination schedules are constantly updated and published by the WHO. Currently, modern, intramuscularly or subcutaneously administered CCEEV vaccines (Cell Culture Vaccines and Embryonated Egg-based Vaccines) containing inactivated RABV viruses are recommended. They are to be used both in pre- and post-exposure measures in the form of a series of injections carried out according to the instructions of the manufacturer of the vaccine. The most frequently recommended schedules are 3 doses for prophylactic vaccination and 5 (on days 0, 3, 7, 14 and 28) or 4 doses (on days 0, 3, 7 and 21) for post-exposure vaccination. CCEEV are among the most immunogenic vaccines. They are characterized by safety of use and good tolerance by patients [60].

Numerous anti-rabies programs have been implemented over the years, including the application of highly immunogenic safe vaccines produced in cell culture conditions to people from risk groups, as well as vaccination of foxes and pets – dogs and cats. They have permitted a significant reduction in the incidence of rabies in humans in Europe [48]. Immunoglobulins against the rabies virus can be administered to pregnant and breast-feeding women. All post-exposure prophylaxis measures should be applied to any who qualify according to WHO recommendations. HIV patients who meet certain conditions may also receive a vaccine against rabies. In the case of travellers, the risk of exposure to the rabies virus should be assessed individually, taking into account primarily the presence of rabies at the destination and planned activities, such as being in caves where presence and direct contact with bats is possible [64].

The Main Sanitary Inspectorate in Poland in the Protective Vaccination Program for 2018 differentiates the way the vaccine is administered after a bite due to the type of contact and the animal's health condition [17].

5.2. Post-exposure prophylaxis

The relatively long incubation period of the rabies virus in the human body creates the possibility of avoiding clinical consequences even after direct exposure [60]. The slow development of rabies allows for

triggering an active immune response, thus providing protection against further infection [32]. This effect is possible only through the implementation of fast and effective post-exposure prophylaxis.

The first preventive step should be to wash the wound with soap and water or a substance which can inactivate the virus. Cleansing the wound leads to a reduction of the pathogen inoculum within it. Then administration of a series of vaccinations in order to provoke the organism to produce antibodies is recommended. Their presence reduces the risk of RABV entering the peripheral nerves. The next step in the preventive post-exposure measures is to administer immunoglobulin against the rabies virus in the wound area. It will provide necessary antibodies until the organism begins its production and will allow for neutralizing the virus at the site of its penetration [32, 60].

Until 2012, less than 10 cases of human recovery from rabies had been documented, and only in 2 of them previous pre- or post-exposure prophylaxis had been implemented [34]. In each case of contaminating the mucous membrane or open wound with saliva or brain tissue of an animal suspected of developing rabies, preventive measures should be applied [32]. When properly performed, immediate action after exposure to RABV shows 100% efficacy in the prevention of rabies. The disease and ultimately death therefrom mainly affects people who did not have access to fast, adequate post-exposure prophylaxis [60].

5.3. Diagnostics

In any case of the suspicion of rabies, it must be confirmed by laboratory tests. Magnetic resonance imaging may also help in the diagnosis, during which moderate signal amplification in the T2 sequence is observed within particular areas of the brain – the stem, hypothalamus, hippocampus, as well as white and grey matters. In patients being in the coma stage, the signal is amplified after using gadolinium. In differential diagnosis of rabies, computed tomography does not play any role.

In laboratory tests, a lyssavirus infection can be ascertained by detecting an antigen of the virus, specific neutralizing antibodies in the serum or cerebrospinal fluid. Another method is the isolation of the virus itself or its nucleic acid. A viral antigen is detected by the direct immunofluorescence method, which is called a “gold standard”. For this purpose, saliva, corneal impression preparations (sensitivity 46%) or material prepared after skin biopsy collected from the neck are primarily used. In the last case, the sensitivity of the method is 50–94% and increases with the duration of the infection. A similar sensitivity is also found in the detection of lyssavirus nucleic acid in saliva using the PCR method with reverse transcriptase.

None of the tests is 100% effective, reliable and sensitive, so in order to confirm the infection performing several tests at the same time is recommended. In post-mortem diagnosis, the same methods are applied as in the intravital one, but the test material is mainly the brain tissue [48]. In order to confirm or exclude rabies, tests are also performed to detect intracytoplasmic inclusion bodies in infected neurons. They contain Negri bodies, or aggregates of viral ribonucleocapsids. They occur in up to 90% of the examined brain tissues of infected people [32].

5.4. Experimental treatment

The Milwaukee protocol was developed by dr. Rodney Willoughby Jr. and constitutes a report on the experimental form of human rabies treatment in a 15-year-old girl from Wisconsin in the USA – Jeanny Giese, who developed rabies a month after having her left index finger bitten by a bat, which took place on 12 September 2004 [44]. Only 5 cases of people who did not die after being infected with the rabies virus had been known until this year. Each of these people underwent post-exposure prophylaxis in the form of administering a suitable vaccine. The girl from the USA, subjected to experimental therapy according to the Milwaukee protocol, was the first person who survived without immediate earlier post-exposure prophylaxis [4]. The wound was cleansed only with hydrogen peroxide. The first neurological symptoms were noticed after 37 days of the incident – the girl was admitted to a local hospital with high fever (39°C), speech disorders, left hand muscle contraction, double vision, nausea and vomiting, no other symptoms of flu or cold. The neurologist also established lack of mobility and bilateral paralysis of the abductor nerve in her. After diagnosing rabies by isolating antibodies against rabies (and not a live virus) during the second day of hospitalization, she was subjected to experimental treatment by being introduced into a coma and being kept in it for as long for as possible to protect the brain from further damage and thus enable the girl's immune system to produce antibodies necessary to fight the virus. She was administered ketamine, ribavirin, amantadine and midazolam [44]. Ketamine is an NMDA receptor antagonist with neuroprotective effects on strokes and brain injuries, with efficacy proven in animals. In the therapy of rabies, it was used as an experimental drug, with no proven effect on human models. Theoretically, it was supposed to protect the brain against the excitotoxicity of glutamic acid, the main neurotransmitter in the central nervous system, however, in the case of rabies, no efficacy has been demonstrated even on an animal model [67]. Ribavirin, showing limited possibilities of penetrating the central nervous system, was administe-

red in doses capable of increasing the level of proteins in the cerebrospinal fluid, and thus demonstrating the level of blood-brain barrier permeability [44]. Administering large doses of anaesthetics to the girl in order to introduce her into a pharmacological coma with a therapeutic effect was supposed to reduce the metabolic activity of her body and maintain the nerves in the best condition. This measure also had an experimental form, with efficacy confirmed only on animal models in the case of brain strokes and damage, as well as epileptic states. The coma was also supposed to prevent the instability of the autonomic nervous system occurring in the case of infection with the rabies virus [67].

After 8 days of hospitalization, signs of initiating a fight against the virus by the girl's immune system were observed after performing a lumbar puncture. An increased level of anti-rabies antibodies was demonstrated, which allowed for commencing her recovery from coma. On the 12th day of hospitalization, a flu that did not respond to standard treatment revealed itself. On the 15th day of treatment, the room temperature at which the patient stayed was lowered by 5.5°C, which resulted in a decrease of the girl's body temperature by 3.6°C. The patient was found to be free of the rabies virus after 31 days in the hospital, and there was no serious damage to her mental abilities after the illness and treatment. About 5 months after the hospitalization, the girl was aware and communicative, but she was diagnosed with dystonia (involuntary movements causing bending and twisting of individual parts of the body), dysarthria and ballism (sweeping, violent movements of the limbs, leading to unstable gait) [44].

The girl was probably infected with an extremely mild type of rabies virus transmitted by vampire bats of the subfamily *Desmodontinae* [61] or the bite occurred in a place far away from the central nervous system, which enabled her to survive rabies after the treatment planned according to the Milwaukee protocol. Consecutive 6 or more attempts at the treatment of symptomatic rabies with this type of treatment failed. On February 4, 2009 in Texas there was another successful therapy according to the Milwaukee protocol, also after a boy was bitten by a vampire bat [44].

The Milwaukee protocol has undergone many modifications since its creation. The last one was aimed at eliminating ribavirin and barbiturates from the pool of agents used to treat rabies with this method [61]. In addition, one of the side effects when using ribavirin may be a delay in the production of antibodies [4]. Only midazolam and ketamine have remained of the original medicines, which currently makes the Milwaukee protocol similar to a standard procedure in intensive care units around the world. In 2013, the World Health Organization officially announced that there is no confirmed, effective method of treating rabies [61]. One of

the theories of eliminating infection is the induction of the organism's inflammatory response with chemokines and IFN in the main role. It has found confirmation only in the case of mice infected with low doses of the virus under laboratory conditions, however, it was not confirmed for infections with *Lyssavirus* spp. under environmental conditions [35].

6. Summary

The genus *Lyssavirus* is still the object of research and has not been fully understood. Discovery and classification of new pathogens belonging to lyssaviruses is a continuous process (in 2012 in Spain probably another species was isolated), and the latest systematic distribution dates from 2016. The rabies virus occurs practically all over the world in the form of various species belonging to the same genus. In addition, there is ongoing work on the invention of effective treatment against the infection – for the time being the Milwaukee protocol constitutes an experimental form. People who have contact with wild animals are particularly exposed to infection. The methods of preventing and reducing the severity of the development of this disease include primarily vaccines and direct post-exposure prophylaxis. Thanks to well-developed diagnostic methods, it is also possible to effectively and, above all, quickly identify infections. The gold standard is the detection of a viral antigen by means of the direct immunofluorescence method.

Acknowledgements

The article was translated by EURO-ALPHABET from Polish into English under agreement 659 / P-DUN / 018 and funded by the Ministry of Science and Higher Education.

References

1. Albertini A.A.V., Schoehn G., Weissenhorn W., Ruigrok R.W.H.: Structural aspects of rabies virus replication. *Cell. Mol. Life. Sci.* **65**, 282–294 (2008)
2. Amengual B., Bourhy H., López-Roig M., Serra-Cobo J.: Temporal dynamics of European bat Lyssavirus type 1. and survival of *Myotis myotis* bats in natural colonies. *PLoS One*, **2**, e566 (2007)
3. Arai Y.T., Kuzmin I.V., Kameoka Y., Botvinkin A.D.: New lyssavirus genotype from the lesser mouse-eared bat (*Myotis blythi*), Kyrgyzstan. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 333–337 (2003)
4. Aramburo A., Willoughby R.E., Bollen A.W., Glaser C.A., Hsieh C.J., Davis S.L., Martin K.W., Roy-Burman A.: Failure of the Milwaukee protocol in a child with rabies. *Clin. Infect Dis.* (2011)
5. Banyard A.C., Hayman D., Johnson N., McElhinney L., Fooks A.R.: Chapter 12 – Bats and Lyssaviruses. *Adv. Virus. Res.* **79**, 239–289 (2011)
6. Begeman L., GeurtsvanKessel C., Finke S., Freuling C.M., Koopmans M., Müller T., Ruigrok T.J.H., Kuiken T.: Comparative

- pathogenesis of rabies in bats and carnivores, and implications for spillover to humans. *Lancet Infect. Dis.* **18**, e147–e159 (2018)
7. Boulger L.R., Porterfield J.S.: Isolation of a virus from Nigerian fruit bats. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **52**, 421–424 (1958)
 8. Brzózka K., Finke S., Conzelmann K.K.: Identification of the rabies virus alpha/beta interferon antagonist: phosphoprotein P interferes with phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J. Virol.* **79**, 7673–7681 (2005)
 9. Brzózka K., Finke S., Conzelmann K.K.: Inhibition of interferon signaling by rabies virus phosphoprotein P: activation-dependent binding of STAT1 and STAT2. *J. Virol.* **80**, 2675–2683 (2006)
 10. Ceballos N.A., Morón S.V., Berciano J.M., Nicolás O., López C.A., Juste J., Nevado C.R., Setién Á.A., Echevarría J.E.: Novel *Lyssavirus* in Bat, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 793–795 (2013)
 11. Ceccaldi P.E., Valtorta F., Braud S., Hellio R., Tsiang H.: Alteration of the actin-based cytoskeleton by rabies virus. *J. Gen. Virol.* **78**, 2831–2835 (1997)
 12. Choppy D., Detje C.N., Lafage M., Kalinke U., Lafon M.: The type I interferon response bridges rabies virus infection and reduces pathogenicity. *J. Neurovirol.* **17**, 353 (2011)
 13. Faber M., Pulmanasahakul R., Hodawadekar S.S., Spitsin S., McGettigan J.P., Schnell M.J., Dietzschold B.: Overexpression of the rabies virus glycoprotein results in enhancement of apoptosis and antiviral immune response. *J. Virol.* **76**, 3374–3381 (2002)
 14. Familusi J.B., Moore D.L.: Isolation of a rabies related virus from the cerebrospinal fluid of a child with “aseptic meningitis”. *Afr. J. Med. Sci.* **3**, 93–96 (1972)
 15. Finke S., Conzelmann K.K.: Replication strategies of rabies virus. *Virus Res.* **111**, 120–131 (2005)
 16. Francis J.R., Nourse C., Vaska V.L., Calvert S., Northill J.A., McCall B., Mattke A.C.: Australian Bat *Lyssavirus* in a Child: The First Reported Case. *Pediatrics*, **133**, e1063–e1067 (2014)
 17. Główny Inspektor Sanitarny: Komunikat Głównego Inspektora Sanitarnego w sprawie Programu Szczepień Ochronnych na rok 2018. *Dziennik Urzędowy Ministra Zdrowia*, **poz. 108**, Warszawa (2017)
 18. Hanna J.N., Carney I.K., Smith G.A., Deverill J.E., Botha J.A., Serafin I.L., Barrower B.J., Fitzpatrick P.F., Searle J.W.: Australian bat *lyssavirus* infection: a second human case, with a long incubation period. *Med. J. Aust.* **172**, 597–599 (2000)
 19. Hooper D.C.: The role of immune responses in the pathogenesis of rabies. *J. Neurovirol.* (2005)
 20. International Committee on Taxonomy of Viruses: Genus: *Lyssavirus*, https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negative-sense-rna-viruses/mononegavirales/w/rhabdoviridae/795/genus-lyssavirus (27.02.2019)
 21. International Committee on Taxonomy of Viruses: Taxonomy, <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (27.02.2019)
 22. Johnson N., Cunningham A.F., Fooks A.R.: The immune response to rabies virus infection and vaccination. *Vaccine*, **28**, 3896–3901 (2010)
 23. Johnson N., Selden D., Parsons G., Healy D., Brookes S.M., McElhinney L.M., Hutson A.M., Fooks A.R.: Isolation of European bat *lyssavirus* type 2 from Daubenton's bat in the United Kingdom. *Vet. Rec.* **152**, 387 (2003)
 24. Kell A.M., Gale Jr M.: RIG-I in RNA virus recognition. *Virology*, **479**, 110–121 (2015)
 25. Kgaladi J., Wright N., Coertse J., Markotter W., Marston D., Fooks A.R., Freuling C.M., Müller T.F., Sabeta C.T., Nel L.H.: Diversity and epidemiology of *Mokola virus*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, e2511 (2013)
 26. Kowalinski E., Lunardi T., McCarthy A.A., Loubser J., Brunel J., Grigorov B. i wsp.: Structural basis for the activation of innate immune pattern-recognition receptor RIG-I by viral RNA. *Cell*, **147**, 423–435 (2011)
 27. Lahaye X., Vidy A., Pomier C., Obiang L., Harper F., Gaudin Y., Blondel D.: Functional characterization of Negri bodies (NBs) in rabies virus-infected cells: Evidence that NBs are sites of viral transcription and replication. *J. Virol.* **83**, 7948–7958 (2009)
 28. Markotter W., Randles J., Rupprecht C.E., Sabeta C.T., Taylor P.J., Wandeler A.L., Nel L.H.: *Lagos Bat Virus*, South Africa. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 504–506 (2006)
 29. Marzec A., Smreczak M., Żmudziński J.F.: Taksonomia rodzaju *Lyssavirus*. *Med. Wet.* **72**, 281–283 (2016)
 30. Masatani T., Ito N., Shimizu K., Ito Y., Nakagawa K., Sawaki Y. *et al.*: Rabies virus nucleoprotein functions to evade activation of the RIG-I-mediated antiviral response. *J. Virol.* **84**, 4002–4012 (2010)
 31. Masatani T., Ozawa M., Yamada K., Ito N., Horie M., Matsuu A. *et al.*: Contribution of the interaction between the rabies virus P protein and I-kappa B kinase – to the inhibition of type I IFN induction signalling. *J. Gen. Virol.* **97**, 316–326 (2016)
 32. Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A.: *Mikrobiologia*, ed. Przondo-Mordarska A., Martirosian G., Szkaradkiewicz A., Elsevier Urban & Partner, Wrocław, 2011, p. 569–573
 33. Nakamichi K., Inoue S., Takasaki T., Morimoto K., Kurane I.: Rabies virus stimulates nitric oxide production and CXC chemokine ligand 10 expression in macrophages through activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *J. Virol.* **78**, 9376–9388 (2004)
 34. National Association of State Public Health Veterinarians, Compendium of Animal Rabies Prevention and Control Committee, Brown C.M., Slavinski S., Ettestad P., Sidwa T.J., Sorhage F.E.: Compendium of animal rabies prevention and control, 2016. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **248**, 505–517 (2016)
 35. Niu X., Wang H., Fu Z.F.: Role of Chemokines in Rabies Pathogenesis and Protection. *Adv. Virus Res.* (2011)
 36. Ostrowska J.D., Hermanowska-Szpakowicz T.: Wścieklizna i jej profilaktyka u ludzi. *Med. Wet.* **53**, 144–147 (1997)
 37. Pancer K., Gut W., Litwińska B.: Filowirusy – wirusy obecne od milionów lat – dlaczego teraz wybuchła tak wielka epidemia? *Post. Mikrobiol.* **55**, 205–214 (2016)
 38. Pawan J.L.: Rabies in the vampire bat of Trinidad, with special reference to the clinical course and the latency of infection. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **30**, 101–129 (1936)
 39. Pawan J.L.: The transmission of paralytic rabies in Trinidad by the vampire bat (*Desmodus rotundus murinus* Wagner, 1840). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **30**, 137–156 (1936)
 40. Paweska J.T., Blumberg L.H., Liebenberg C., Hewlett R.H., Grobelaar A.A., Leman P.A., Croft J.E., Nel L.H., Nutt L., Swanepoel R.: Fatal Human Infection with Rabies-related *Duvenhage Virus*, South Africa. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 1965–1967 (2006)
 41. Poisson N., Real E., Gaudin Y., Vaney M.C., King S., Jacob Y. *et al.*: Molecular basis for the interaction between rabies virus phosphoprotein P and the dynein light chain LC8: dissociation of dynein-binding properties and transcriptional functionality of P. *J. Gen. Virol.* **82**, 2691–2696 (2001)
 42. Rieder M., Brzózka K., Pfaller C.K., Cox J.H., Stitz L., Conzelmann K.K.: Genetic dissection of interferon-antagonistic functions of rabies virus phosphoprotein: inhibition of interferon regulatory factor 3 activation is important for pathogenicity. *J. Virol.* **85**, 842–852 (2011)
 43. Rieder M., Finke S., Conzelmann K.K.: Interferon in *lyssavirus* infection. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* **125**, 209–218 (2012)
 44. Rodney E., Rupprecht C.E. *et al.*: Survival after treatment of rabies with induction of coma. *N. Engl. J. Med.* **352**, 2508–2514 (2005)
 45. Rosner F.: Rabies in the Talmud. *Med. Hist.* **18**, 198 (1974)

46. Rupprecht C.E., Smith J.S., Fekadu M., Childs J.E.: The ascension of wildlife rabies: a cause for public health concern or intervention? *Emerg. Infect. Dis.* **1**, 107 (1995)
47. Rynans S., de Walthoffen S.W., Dzieciatkowski T., Młynarczyk G.: Wirusowe zakażenia ośrodkowego układu nerwowego. Część II: Wirusy RNA. *Post. Mikrobiol.* **4**, 349–354 (2013)
48. Sadkowska-Todys M.: Wścieklizna – aktualne problemy epidemiologiczne. *Pol. Przegl. Neurol.* **2**, 37–42 (2006)
49. Samorek-Salamonowicz E., Niczyporuk J.S.: Wirus Zachodniego Nilu oraz inne nowo pojawiające się zagrożenia zdrowia publicznego. *Post. Mikrobiol.* **3**, 187–190 (2010)
50. Schatz J., Freuling C.M. et al.: Bat rabies surveillance in Europe. *Zoonoses Public Health.* **60**, 22–34 (2013)
51. Serra-Cobo J., Amengual B., Abellán C., Bourhy H.: European bat lyssavirus infection in Spanish bat populations. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 413 (2002)
52. SIB Swiss Institute of Bioinformatics: *Lyssavirus*, ViralZone, <https://viralzone.expasy.org/22> (22.04.2018)
53. Speare R., Skerratt L., Foster R., Berger L., Hooper P., Lunt R., Blair D., Hansman D., Goulet M., Cooper S.: Australian bat lyssavirus infection in three fruit bats from north Queensland. *Commun. Dis. Intell.* **21**, 117–120 (1997)
54. Tan G.S., Preuss M.A., Williams J.C., Schnell M.J.: The dynein light chain 8 binding motif of rabies virus phosphoprotein promotes efficient viral transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 7229–7234 (2007)
55. Tignor G.H., Murphy F.A., Clark H.F., Shope R.E., Madore P., Bauer S.P., Buckley S.M., Meredith C.D.: Duvenhage Virus: Morphological, Biochemical, Histopathological and Antigenic Relationships to the Rabies Serogroup. *J. Gen. Virol.* **37**, 595–611 (1977)
56. van Thiel P.P.A.M., van den Hoek J.A.R., Eftimov F., Tepaske R., Zaaijer H.J., Spanjaard L., de Boer H.E.L., van Doornum G.J.J., Schutten M., Osterhaus A.D., Kager P.A.: Fatal case of human rabies (*Duvenhage virus*) from a bat in Kenya: the Netherlands, December 2007. *Eurosurveillance*, **13**, 1–2 (2008)
57. Vázquez-Morón S., Avellón A., Echevarría J.E.: RT-PCR for detection of all seven genotypes of Lyssavirus genus. *J. Virol. Methods* **135**, 281–287 (2006)
58. Von Teichman B.F., De Koker W.C., Bosch S.J.E., Bishop G.C., Meredith C.D., Bingham J.: *Mokola virus* infection: description of recent South African cases and a review of the virus epidemiology: case report. *J.S. Afr. Vet. Assoc.* **69**, 169–171 (1998)
59. Walker P.J., Blasdel K.R., Calisher C.H., Dietzgen R.G., Kondo H., Kurath G. i wsp.: ICTV virus taxonomy profile: Rhabdoviridae. *J. Gen. Virol.* **99**, 447–448 (2018)
60. WHO/Department of Control of Neglected Tropical Diseases: Rabies vaccines: WHO position paper – April 2018 – Weekly epidemiological record (2018)
61. Wilde H., Hemachudha T.: The “Milwaukee protocol” for treatment of human rabies is no longer valid. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **34**, 678–9 (2015)
62. Willoughby R.E., Opladen T., Maier T., Rhead W., Schmiedel S., Hoyer J., Drosten C., Rupprecht C.E., Hyland K., Hofmann G.F.: Tetrahydrobiopterin deficiency in human rabies. *J. Inherit. Metab. Dis.* **32**, 65–72 (2009)
63. Wiltzer L., Okada K., Yamaoka S., Larrous F., Kuusisto H.V., Sugiyama M. i wsp.: Interaction of rabies virus P-protein with STAT proteins is critical to lethal rabies disease. *J. Infect. Dis.* **209**, 1744–1753 (2013)
64. World Health O.: Rabies vaccines: WHO position paper, April 2018 – Recommendations. *Vaccine*, (2018)
65. World Health Organization: WHO expert consultation on rabies: first report. World Health Organization 2005, Geneva (2004)
66. Zandi F., Eslami N., Torkashvand F., Fayaz A., Khalaj V., Vaziri B.: Expression changes of cytoskeletal associated proteins in proteomic profiling of neuroblastoma cells infected with different strains of rabies virus. *J. Med. Virol.* **85**, 336–347 (2013)
67. Zeiler F.A., Jackson A.C.: Critical Appraisal of the Milwaukee Protocol for Rabies: This Failed Approach Should Be Abandoned. *Can. J. Neurol. Sci.* **43**, 44–51 (2015)

LYSSAVIRUS SPP. – WIRUSY WŚCIEKLIZNY JAKO WCIĄŻ AKTUALNY PROBLEM

Przemysław Gałązka¹, Patryk Kaczor^{2*}, Klaudyna Grzelakowska², Kamil Leis²

¹ Oddział Kliniczny Chirurgii Ogólnej i Onkologicznej Dzieci i Młodzieży, Szpital Uniwersytecki nr 1 im. dr Antoniego Jurasza, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

² Wydział Lekarski, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Wpłynęło we wrześniu 2018 r., zaakceptowano w kwietniu 2019 r.

Streszczenie: Rodzaj *Lyssavirus* spp. obejmuje obecnie 14 gatunków, które odpowiedzialne są za wywoływanie wścieklizny oraz chorób wścieklizno-podobnych i wścieklizno-pokrewnych. Pierwsze objawy infekcji przypominają przeziębienie i obejmują głównie gorączkę, ból głowy i ogólne przemęczenie. Następnie dochodzi do dysfunkcji mózgu i ostrych objawów neurologicznych, a ostatecznie – w większości przypadków – do śmierci. Lyssawirusy rozprzestrzeniają się przede wszystkim przez bezpośredni kontakt ze zwierzęciem stanowiącym rezerwuuar wirusowy. Złotym standardem w diagnostyce jest metoda bezpośredniej immunofluorescencji, za pomocą której wykrywane są antygeny wirusowe, głównie w ślinie chorego. Obecnie, do leczenia wścieklizny stosuje się eksperymentalną terapię przeprowadzaną zgodnie z protokołem Milwaukee.

1. Wstęp. 2. Systematyka. 2.1. *Lagos bat virus*. 2.2. *Mokola virus*. 2.3 *Duvenhage virus*. 2.4. *European bat lyssavirus* typ 1. 2.5. *European bat lyssavirus* typ 2. 2.6. *Australian bat lyssavirus*. 3. Charakterystyka. 3.1. Budowa molekularna. 3.2. Genom i ekspresja genów. 3.3. Cykl replikacyjny. 4. Chorobotwórczość. 4.1. Patogeneza. 4.2. Objawy wścieklizny. 5. Prewencja, profilaktyka, diagnostyka, leczenie. 5.1. Szczepienia. 5.2. Profilaktyka po-ekspozycyjna. 5.3. Diagnostyka. 5.4. Leczenie eksperymentalne. 6. Podsumowanie

LYSSAVIRUS SPP. – RABIES VIRUSES AS A STILL-PRESENT PROBLEM

Abstract: The genus *Lyssavirus* spp. currently includes 14 species that are responsible for causing rabies and rabies-like and rabies-related diseases. The first symptoms of infection are similar to a cold and include mainly fever, headache and general fatigue. Then comes brain dysfunction and acute neurological symptoms, and ultimately – in most cases – death. Lyssaviruses are spread mainly through direct contact with the carrier constituting the viral reservoir. The gold standard in diagnostics is the method of direct immunofluorescence, by means of which viral antigens are detected, mainly in the saliva of a patient. Currently, rabies treatment is an experimental therapy according to the Milwaukee protocol.

1. Introduction. 2. Systematics. 2.1. *Lagos bat virus*. 2.2. *Mokola virus*. 2.3 *Duvenhage virus*. 2.4. *European bat 1 lyssavirus*. 2.5. *European bat 2 lyssavirus*. 2.6. *Australian bat lyssavirus*. 3. Characteristics. 3.1. Molecular structure. 3.2. Genome and gene expression. 3.3. Life cycle. 4. Pathogenicity. 4.1. Pathogenesis. 4.2. Rabies symptoms. 5. Prevention, prophylaxis, diagnostics, treatment. 5.1. Vaccinations. 5.2. Post-exposure prophylaxis. 5.3. Diagnostics. 5.4. Experimental treatment. 6. Summary

Słowa kluczowe: *Lyssavirus* spp., protokół Milwaukee, wirusy wścieklizno-podobne, wirusy wścieklizny, wścieklizna

Key words: *Lyssavirus* spp., Milwaukee protocol, rabies-related viruses, rabies viruses, rabies

1. Wstęp

Rodzaj *Lyssavirus*, należący do rodziny *Rhabdoviridae* (Rabdowirusy) i rzędu *Mononegavirales*, obejmuje występującego globalnie wirusa wścieklizny oraz kilkanaście gatunków wirusów wścieklizno-podobnych i wścieklizno-pokrewnych [29, 59, 65]. Wywołują one chorobę powszechnie nazywaną „wścieklizną”. Nazwa ta wywodzi się od łacińskiego *rabies* (ta z kolei od *rabhas* z indyjskiego języka sanskryt – „stosować przemoc”), co tłumaczy się jako „wściekłość”, ponieważ chorobę tę cechuje agresja oraz uczucie podniecenia. Patologia ta nazywana jest także czasami „wodowstrętem” od łacińskiego *hydrophobia*, co nawiązuje do jednego z objawów

tej choroby – mimowolnych skurczów mięśni na widok lub dźwięk wody [45, 46].

W roku 1931 w Indiach Zachodnich, 6 lat przed pierwszym wyizolowaniem wirusa Zachodniego Nilu (WNV – *West Nile virus*) [49], Joseph Lennox Pawan w mózgu nietoperza przejawiającego zachowania odbiegające od reszty ssaków tego samego gatunku odkrył ciała Negriego. Rok później stwierdził on, że zainfekowane nietoperze-wampiry z podrodziny *Desmodontinae* mogą przenosić wściekliznę na ludzi oraz zwierzęta [38, 39]. Choroba ta stanowi przykład klasycznej zoonozy, która rozprzestrzenia się z udziałem zwierząt na ludzi dwiema drogami. Pierwszą z nich, stanowiącą typ tzw. miejski, roznoszą przede wszystkim psy.

* Autor korespondencyjny: Patryk Kaczor, Wydział Lekarski, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz; tel. 52 585-40-15; e-mail: patryk.kaczor97@gmail.com

Z kolei typ tzw. leśny rozprowadzany jest przez dziko żyjące zwierzęta – głównie szopy, skunksy, nietoperze, lisy i borsuki. Czynnikiem sprawczym agresywnego zachowania zainfekowanych zwierząt jest *Lyssavirus*, co ułatwia jego dalsze rozprzestrzenianie się [32].

2. Systematyka

Jeszcze około 60 lat temu do rodzaju *Lyssavirus* zaliczano tylko jednego wirusa wścieklizny – RABV (*Rabies virus*), jednak badania z użyciem przeciwciał poliklonalnych przy użyciu metody krzyżowej seroneutralizacji wskazały na zróżnicowanie antygenowe izolowanych od zakażonych nietoperzy wirusów, co doprowadziło do wyodrębnienia 5 odmiennych serotypów [29, 65]. Informacje uzyskane dzięki wprowadzeniu do badań technik biologii molekularnej pozwoliły na rozgraniczenie konkretnych genotypów rodzaju *Lyssavirus*.

Nowy podział opierał się przede wszystkim na różnicach w sekwencji nukleotydowej badanych wirusów, a nie – jak dotychczasowy – na właściwościach antygenowych izolowanych szczepów [29]. Pozwoliło to na wyodrębnienie 7 genotypów w obrębie rodzaju *Lyssavirus*, (związanych z rozmieszczeniem geograficznym i specyficznymi żywicielami wirusów) (Tabela I) [3, 29, 48, 57, 65].

Istniejący już podział na genotypy posłużył jako podstawa dla taksonomicznego podziału rodzaju *Lyssavirus* na poszczególne gatunki [29]. Od roku 2016 wyróżnia się 14 gatunków. Były one odkrywane na przestrzeni lat zarówno w Europie (Niemcy, Finlandia), jak i w Azji (Kirgistan, Tadżykistan, wschodnia Rosja), w Afryce (Nigeria, Kenia, Tanzania) oraz w Australii. Według kolejności wyodrębniania gatunków były to: RABV – *Rabies virus*, LBV – *Lagos bat virus*, MOKV – *Mokola virus*, EBLV-1 – *European bat lyssavirus* (typ 1.), DUVV – *Duvenhage virus*, EBLV-2 – *European bat lyssavirus* (typ 2.), ARAV – *Aravan virus*, ABLV – *Australian bat lyssavirus*, KHUV – *Khujand virus*, IRKV – *Irkut virus*, WCBV – *West Caucasian bat*

virus, SHIBV – *Shimoni bat virus*, IKOV – *Ikoma lyssavirus*, BBLV – *Bokeloh bat lyssavirus* [29]. W roku 2012 w Hiszpanii został odkryty prawdopodobnie kolejny wirus z tego rodzaju – LLEBV – *Lleida bat lyssavirus*. Nie został on jednak jeszcze oficjalnie zaklasyfikowany do *Lyssavirus* spp. [10, 29].

Wyróżnia się również inny podział wirusów tego rodzaju, który uwzględnia ich właściwości genetyczne, immunogenne oraz chorobotwórcze. Genotypy podzielono na 2 grupy filogenetyczne. Do grupy filogenetycznej I należą genotypy 1., 4., 5., 6. i 7., a do grupy filogenetycznej II – genotypy 2. i 3. [3, 29]. Wirusy przypisane do różnych grup filogenetycznych różnią się między sobą także właściwościami biologicznymi, takimi jak patogenność, zdolność wywoływania apoptozy czy rozpoznawanie receptorów komórkowych. Ponadto dotychczasowe wyniki uzyskane z prac badawczych, między innymi na zwierzętach, wskazują, że obecnie stosowane szczepionki nie są skuteczne w zapobieganiu zakażeniom wywołanym przez wirusy należące do grupy filogenetycznej II [48].

Zgodnie z obecnym stanem wiedzy obowiązującym podziałem lyssawirusów jest ten zaproponowany w roku 2018 przez ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) – Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów. *Lyssavirus* spp. należy do typu *Negarnaviricota*, klasy *Monjiviricetes*, rzędu *Mononegavirales* oraz rodziny *Rhabdoviridae*, składającej się z 17 innych rodzajów. Do lyssawirusów należy 16 gatunków oraz 2 określone jako niesklasyfikowane (Tabela II) [20, 21, 59].

Poniżej omówione zostały wybrane, najlepiej poznane do tej pory gatunki z rodzaju *Lyssavirus* spp., należące do odrębnych genotypów i grup filogenetycznych.

2.1. *Lagos bat virus*

Wirus tego gatunku stanowi genotyp 2. rodzaju *Lyssavirus* spp. i należy do grupy filogenetycznej II. Po zainfekowaniu ssaków wywołuje u nich chorobę wścieklizno-podobną. Występuje w centralnej i południowej Afryce. W roku 1956 w Nigerii po raz pierw-

Tabela I
Podział lyssawirusów

Genotyp	Wirus	Miejsce występowania	Żywiciel
1	<i>Rabies virus</i> (wirus wścieklizny)	Cały świat	Mięsożerne zwierzęta lądowe
2	<i>Lagos bat virus</i>	Afryka	Nietoperze owocożerne
3	<i>Mokola virus</i>	Afryka	Ryjówkowate, koty, psy i gryzonie
4	<i>Duvenhage virus</i>	Afryka	Nietoperze owadożerne
5	<i>European bat lyssavirus typ 1</i>	Europa	Nietoperze owadożerne
6	<i>European bat lyssavirus typ 2</i>	Europa	Nietoperze owadożerne
7	<i>Australian bat lyssavirus</i>	Australia i Oceania	Nietoperze owocożerne i owadożerne

Na podstawie [3, 29, 48, 65].

Tabela II
Alfabetyczne zestawienie członków rodziny *Lyssavirus* spp.

Wirus	Skrót	Grupa filogenetyczna
<i>Aravan virus</i>	ARAV	1
<i>Australian bat lyssavirus</i>	ABLV	
<i>Bokeloh bat lyssavirus</i>	BBLV	
<i>Duvenhage virus</i>	DUVV	
<i>European bat lyssavirus 1</i>	EBLV-1	
<i>European bat lyssavirus 2</i>	EBLV-2	
<i>Gannoruwa bat lyssavirus</i>	GBLV	
<i>Irkut virus</i>	IRKV	
<i>Khujand virus</i>	KHUV	
<i>Rabies virus</i> (wirus wścieklizny)	RABV	
<i>Lagos bat virus</i>	LBV	2
<i>Mokola virus</i>	MOKV	
<i>Shimoni bat virus</i>	SHIBV	
<i>Ikoma lyssavirus</i>	IKOV,	-
Kotalahti bat lyssavirus (niesklasyfikowany)	KBLV	
<i>Lleida bat lyssavirus</i>	LLEBV	
<i>Taiwan bat lyssavirus</i> (niesklasyfikowany)	TBLV	
<i>West Caucasian bat virus</i>	WCBV	

Na podstawie [20, 21, 59].

szy wyizolowano LBV u pochodzącego z wyspy Lagos nietoperza z rodziny rudawkowatych (*Pteropodidae*). Było to także pierwsze odkrycie wirusa pokrewnego do RABV. Nie stwierdzono do tej pory zainfekowania człowieka tym gatunkiem [7, 28].

2.2. Mokola virus

Genotyp 3. rodzaju *Lyssavirus* spp. obejmuje MOKV, który jednocześnie należy do grupy filogenetycznej II. Izolowany jest od ssaków, zamieszkujących tereny Afryki Subsaharyjskiej [58], u których wywołuje objawy podobne do wywoływanych przez wściekliznę. Do tej pory nie zidentyfikowano naturalnego rezerwuaru tego wirusa, jednak przypuszcza się, że stanowią go małe ssaki, głównie koty. Dotychczas udokumentowane zostały jedynie dwa przypadki zakażenia człowieka wirusem należącym do tego gatunku [14, 25].

2.3. Duvenhage virus

Gatunek ten odkryty został po raz pierwszy w roku 1970 w południowej Afryce u mężczyzny ugryzionego przez nietoperza, który następnie zmarł z powodu wystąpienia choroby manifestującej się wścieklizno-podobnymi objawami [55]. DUVV stanowi genotyp 4. i zaliczany jest do grupy filogenetycznej I. W roku 2006,

także w południowej Afryce, udokumentowany został drugi zgon, tym razem był to człowiek podrapany przez nietoperza [40], natomiast w roku 2007, w Amsterdamie, stwierdzono pierwszy przypadek śmierci w Europie z powodu infekcji wirusem tego gatunku. Prawdopodobnym nosicielem *Duvenhage virus* są nietoperze z podrzędu *Microchiroptera*, z których do tej pory udało się wyizolować DUVV jedynie dwa razy [56].

2.4. European bat lyssavirus typ 1

Wirus ten, należący do genotypu 5., został wyizolowany w Hiszpanii od nietoperzy *Eptesicus serotinus*. Gatunek dzieli się na EBLV-1a oraz EBLV-1b, występuje na terenie całej Europy – w piśmiennictwie dostępne są opisy zakażeń z Francji, Holandii czy Rosji. Nosicielami są nietoperze owadożerne. Do 2000 roku udokumentowano 630 przypadków zakażeń tym wirusem a do 2010 – 959 [2, 29, 48, 50, 51, 65].

2.5. European bat lyssavirus typ 2

Gatunek wyizolowano w 1996 roku w Wielkiej Brytanii od nietoperza *Myotis daubentonif*. Wirusy te występują na kontynencie europejskim, a żywicielami, podobnie jak w przypadku European bat lyssavirus typu 1, są nietoperze owadożerne [3, 23, 29, 48].

2.6. Australian bat lyssavirus

Czarne nietoperze owocożerne z gatunku *Pteropus alecto* stanowią jeden z pięciu naturalnych rezerwuarów ABLV [5]. Wirus ten zaliczany jest do grupy filogenetycznej I i stanowi genotyp 7. rodzaju *Lyssavirus* spp. Po raz pierwszy zidentyfikowany został w roku 1995 w Australii [53], a rok później stwierdzono pierwszą śmierć po infekcji ABLV. Do tej pory udokumentowane są trzy zgony spowodowane zakażeniem wirusem należącym do tego gatunku. U osób tych po podrapaniu lub ugryzieniu przez nietoperza przenoszącego ABLV rozwinęły się wścieklizno-podobne objawy [16, 18].

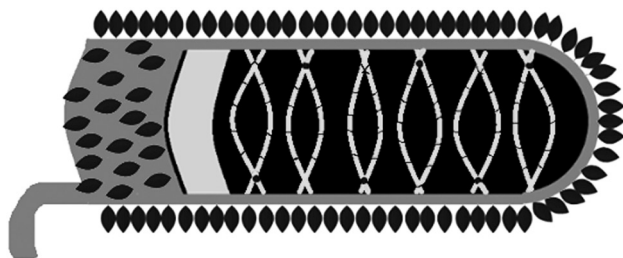
3. Charakterystyka

3.1. Budowa molekularna

Materiałem genetycznym wirusów z rodzaju *Lyssavirus* jest jednoniciowy RNA o ujemnej polarności, które koduje 5 białek wirusowych. Są to: nukleoproteina N, fosfoproteina P, glikoproteina G, polimeraza L i białko rdzenia M [1, 15]. 4 dodatkowe peptydy dostępne są poprzez alternatywną inicjację [52]. Sekwencja liderowa składa się z około 50 nukleotydów, poprzedzonych przez geny kodujące białka wirusa [65].

Wiriony mają długość 100–300 nm, średnicę 75 nm i kształt opisywany jako „zbliżony do pocisku”. Natomiast ich cząsteczki infekcyjne posiadają model zbliżony do cylindrycznego [1, 15]. Składają się one z dwóch strukturalnych i funkcjonalnych podjednostek. Pierwszą z nich stanowi zewnętrzna otoczka lipidowa (envelope) pokryta około 400, przypominającymi kolce o długości 10 nm, wypustkami glikoproteinowymi G (stanowiącymi trimery) [65], odpowiedzialnymi za rozpoznawanie specyficznych receptorów wirusowych na błonach komórkowych. Wypustki stanowią główne antygeny powierzchniowe i warunkują adsorpcję oraz indukują powstawanie przeciwciał neutralizujących [32]. Druga podjednostka utworzona jest z wewnętrznego, helikalnego rybonukleokapsydu (będącego rdzeniem rybonukleoproteinowym), skręconego symetrycznie i złożonego z genomowego RNA, które to jest ściśle związane z nukleoproteiną (białkiem N), białkiem L (polimerazą RNA) i z kofaktorem polimerazy RNA – białkiem P.

Rdzeń stanowi położone między rybonukleokapsydem a otoczką białko M, które odpowiada za ogólny kształt wirusa oraz bierze udział w uwalnianiu potomnych cząstek wirusowych z komórek gospodarza [65]. Nukleoproteina N stanowi główne białko strukturalne wirusa, chroniąc jego RNA przed rybonukleazami, zapewniając tym samym jego pozostanie w konfiguracji umożliwiającej transkrypcję [32]. Budowę wirusa przedstawiono schematycznie na Ryc. 1.



Ryc. 1. Schemat budowy wirusów należących do rodzaju *Lyssavirus* spp.

3.2. Genom i ekspresja genów

Materiał genetyczny *Lyssavirus* stanowi jednociowy, liniowy, niepodzielony RNA o ujemnej polarności, o wielkości około 11–12 tysięcy nukleotydów [37]. Ekspresja genów *Lyssavirus* zachodzi dzięki polimerazie RNA zależnej od RNA, która wiąże genom zawarty w kapsydzie w rejonie liderowym. Dochodzi do sekwencyjnej transkrypcji każdego genu poprzez rozpoznawanie sygnałów start i stop zawartych w genach wirusowych. Następnie do mRNA przyłączana jest czapeczka oraz dochodzi do jego poliadenylacji przez białka L w czasie syntezy [52].

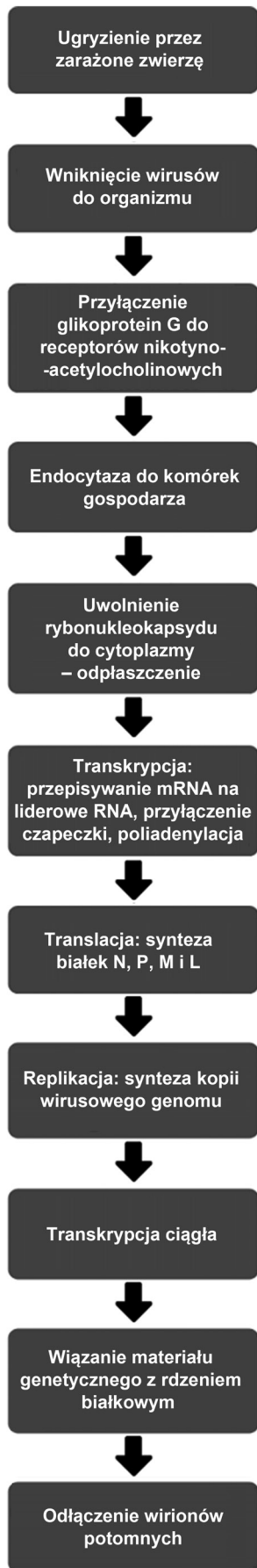
3.3. Cykl replikacyjny

Wirus wścieklizny wnika, namnaża się i rozprzestrzenia za pośrednictwem dróg nerwowych. Kwalifikuje go to do wirusów neurotropowych [36]. Cykl replikacyjny wirusa rozpoczyna się od przyłączenia wirusowych glikoprotein G do specyficznych receptorów nikotyno-acetylocholinowych gospodarza lub do cząsteczki adhezyjnej komórki nerwowej. Rozpoczyna to proces infekcji oraz umożliwia klatrynozęależną endocytozę (pinocytoza) wirusa do komórek gospodarza (internalizacja).

Wirusy gromadzą się w dużych pęcherzykach cytoplazmatycznych [32, 65]. Następnie dochodzi do połączenia otoczki lipidowej wirusa z błoną komórkową gospodarza, co umożliwia uwolnienie rybonukleokapsydu do cytoplazmy [52]. Proces ten nosi nazwę odplaszczania [65]. Sprzyja mu kwaśne środowisko pęcherzyka [32]. Zarówno replikacja, jak i sama transkrypcja zachodzą w cytoplazmie w ciałkach Negriego [27].

Kolejnym etapem replikacji jest transkrypcja wirusowego RNA. Następnie wirusowe mRNA ulega translacji na wolnych rybosomach w cytoplazmie, prowadząc do syntezy białek N, P, M i L [65]. Białko G produkowane jest z udziałem aparatu Golgiego na związanych z błoną rybosomach, a następnie dostarczane, po wbudowaniu w pęcherzyki błonowe, na powierzchnię komórki [32]. Sama replikacja prawdopodobnie rozpoczyna się, gdy obecna jest wystarczająca ilość nukleoprotein niezbędnych do odgrodenia nowosyntezowanych antygenomów od genomów [52]. Pierwszym jej etapem jest synteza pełnej długości kopii wirusowego genomu o dodatniej polarności. Gdy do niego dojdzie, transkrypcja RNA staje się ciągła, ignorując tym samym sekwencje nukleotydowe odpowiedzialne za jej ewentualne przerwanie (kodony STOP). Polimeraza wirusowa działa od końca 3' genomu i postępuje aż do wytworzenia pełnej kopii genomu. Duplikaty nici o dodatniej polarności stanowią następnie matrycę do syntezy pełnej nici o ujemnej polarności, która stanowi wirusowy genom [65].

Końcowy etap cyklu replikacyjny wirusa polega na wiązaniu się rybonukleokapsydu (na który składa się genom związany z białkiem polimerazy L i z białkiem N) z rdzeniem białkowym przy błonie cytoplazmatycznej, co następnie – po jego zwijaniu do skondensowanej formy – indukują tworzenie kształtu określonego jako „zbliżony do pocisku”. Następnie przy udziale kompleksów ESCRT gospodarza w błonie plazmatycznej dochodzi do jego uwalniania przez pączkowanie, prowadząc tym samym do odłączenia nowych wirionów po pokryciu ich osłonką rybonukleokapsydu [32, 52]. Cykl replikacyjny wirusa został przedstawiony na Ryc. 2.



Ryc. 2. Schemat cyklu replikacyjnego wirusów należących do rodzaju *Lyssavirus* spp.

4. Chorobotwórczość

4.1. Patogeneza

Infekcja następuje po dostaniu się wirusa wścieklizny wraz ze śliną do rany na skutek ugryzienia, a także po kontakcie zanieczyszczonej śliny lub zakażonego mózgu zwierzęcia z uszkodzoną skórą, spojówkami lub błonami śluzowymi. Wirus nie przenika przez nieuszkodzoną skórę. Najgroźniejszą postacią infekcji jest ta, do której dochodzi przez błony śluzowe nosa, ponieważ występują tam zlokalizowane bardzo blisko mózgu zakończenia nerwu węchowego, przez co postępuje ona szczególnie szybko. W rzadkich przypadkach możliwe jest także zakażenie drogą kropelkowo-aerogenną [36] lub drogą jatrogenną [47]. Odnotowano również pojedyncze przypadki infekcji poprzez transplantację różnych organów, np. płuc i wątroby, po których nastąpił zgon biorcy [48].

Po wniknięciu dochodzi do jego replikacji w tkankach (oprócz tkanki nerwowej) lub bezpośredniej migracji do nerwów obwodowych, a tym samym przedostania się do centralnego układu nerwowego, do zwojów korzeni grzbietowych, na drodze wstecznego transportu aksoplazmatycznego. W momencie dotarcia lyssawirusa do mózgu i rdzenia kręgowego dochodzi do szybkiej progresji infekcji, która obejmuje komórki Purkiniego mózdzku, pień mózgu, hipokamp oraz komórki zwojów jąder mostu. W proces ten mogą być zaangażowane włókna czuciowe i ruchowe, w zależności od gatunku zwierzęcia [32]. W przypadku nietoperzy rany te często są bardzo powierzchowne (0,1–0,3 mm głębokości) i dotyczą jedynie naskórka, przez co narażeni na kontakt ludzie bardzo często nie wiążą infekcji z tym ugryzieniem. Z kolei zainfekowane zwierzęta mięsożerne powodują zarażenie poprzez rozległe, głębokie rany gryzione [6]. Okres inkubacji waha się od 2 tygodni do 6 lat, jednak średnio wynosi 2–3 miesiące. Zależy on od odległości miejsca infekcji od mózgu, zaległości rany, dawki wirusa, wieku oraz stanu odporności. Szacowana prędkość migracji wirusa, a tym samym prędkość, z jaką postępuje zakażenie nerwów, wynosi 15–100 mm na dzień. Następnie wirus przemieszcza się za pośrednictwem aferentnych nerwów obwodowych z centralnego układu nerwowego do silnie unerwionych miejsc (skóra głowy, skóra szyi, błona śluzowa nosa, mięsz nerek, komórki zrazików trzustki, siatkówka, ślinianki, rogówka, rdzeń kory nadnerczy), co prowadzi także do infekcji sąsiednich tkanek, np. tkanki wydzielniczej gruczołów ślinowych [32].

W patogenezie większości infekcji wirusowych biorą udział limfocyty T CD8+, jednakże w przypadku wścieklizny wirus dostaje się do komórek nerwowych co może prowadzić do indukcji zapalenia w ośrodkowym układzie nerwowym i skutkować zniszczeniem

nerwów i paraliżem. Wirus wścieklizny posiada cechy superantygeny, przez co prowadzi do aktywacji znacznej części limfocytów T. Prowadzi to pośrednio do reakcji obronnej organizmu na inne, niezwiązane z infekcją antygeny [19].

Wirus wścieklizny po dostaniu się do ośrodkowego układu nerwowego prowadzi do znacznych uszkodzeń neurologicznych. W wyniku infekcji dochodzi do zwiększonej ekspresji chemokin należących do rodziny cytokin. W przypadku myszy zarażonych w warunkach laboratoryjnych nadmierna aktywność tych białek prowadzi do indukcji apoptozy zakażonych komórek, zwiększonego napływu komórek zapalnych do ośrodkowego układu nerwowego, a ponadto uszczelnieniem bariery krew-mózg. Proces zapalny, który wystąpił u myszy zainfekowanych małą dawką wirusa w warunkach laboratoryjnych doprowadził do całkowitego wyeliminowania wirusa z mózgu. W przypadku zarażenia wirusem wścieklizny gryzoni nie przebiegającego w warunkach laboratoryjnych dochodziło do inwazji ośrodkowego układu nerwowego bez inicjacji reakcji odpornościowej organizmu [35].

W momencie wystąpienia pierwszych objawów klinicznych, z których sztanदारowym w większości przypadków jest ból neuropatyczny w pierwotnym miejscu infekcji (spowodowany replikacją wirusa w zwojach nerwowych korzeni grzbietowych oraz zapaleniem zwojów nerwowych – *ganglionitis*), lyssawirus obecny jest już w całym organizmie. Główne objawy kliniczne są związane z zakażeniem przez wirusa mózgu, mózdzku i rdzenia kręgowego oraz degeneracją neuronów [32]. Wyróżnia się dwa główne obrazy kliniczne wścieklizny: postać szałową i postać porażenną [65]. Przy czym często zdarza się, że postać szałowa (pobudzeniowa) przechodzi w postać porażenną. Po przebyciu okresu pobudzeniowego, w przypadku przeżycia przez zainfekowanego kolejnego napadu drgawek, dochodzi do porażen wiotkich, które następnie prowadzą do nieuchronnej śmierci. Jedną z form występowania choroby jest tzw. „cicha wścieklizna”, która przebiega bez postaci szałowej lub jest ona słabo wyrażona [36]. Po ok. 7–10 dniach od wystąpienia pierwszych objawów wścieklizny chory zapada w śpiączkę, po której umiera z powodu niewydolności oddechowej. Po zakażeniu organizmu z udziałem *Lyssavirus* dochodzi do wystąpienia zapalenia mózgu w około 80% przypadków, co stanowi śmiertelną postać pobudzeniową choroby. W przypadku rozwoju łagodnie przebiegającej wścieklizny porażennej dominującym objawem jest paraliż [47].

Aby w pełni zrozumieć sposób zakażenia organizmu przez rodzaj *Lyssavirus* spp. należy wziąć pod uwagę mechanizmy molekularne, na które wirusy te mają wpływ. Białko P lyssawirusów może doprowadzić do zahamowania RIG-I (retinoic acid-inducible gene I), należącego do błonowych receptorów rozpoznających

wzorce (PRR) zaangażowanych w rozpoznawanie wirusów przez nieswoistą odpowiedź odpornościową. Zablokowanie RIG-I przez białko P wirusów wścieklizny uniemożliwia zapoczątkowanie antywirusowej, apoptotycznej oraz prozapalnej odpowiedzi ustroju na zakażenie [24, 26, 30, 31]. Białko P wirusów wścieklizny stanowi także antagonistę interferonu typu I (IFN). Białko P lyssawirusów uniemożliwia fosforylację i dimeryzację IRF3, czyli 3. czynnika regulatorowego interferonu odpowiedzialnego za ekspresję niektórych genów o działaniu antywirusowym [12, 42]. Wirusowa fosfoproteina może także hamować sygnalizację szlaku przeciwwirusowego STAT-I, blokując transport dimerów STAT do jądra [9, 63]. W ten sposób, białko P jest przypuszczalnie kluczowym antagonistą interferonów w czasie infekcji wirusem wścieklizny umożliwiając wirusom replikację wirusów w zainfekowanych komórkach [8, 43].

Kolejnym z elementów, na który wpływ mają wirusy wścieklizny, a dokładniej *Rabies virus* (genotyp 1.) i *Mokola virus* (genotyp 3.), są łańcuchy lekkie LC8 dyneiny, czyli kompleksu białkowego odpowiedzialnego za ruch organelli komórkowych wzdłuż mikrotubuli. LC8 ulega ekspresji w różnych typach komórek a białko P lyssawirusów poprzez oddziaływanie z tym białkiem prawdopodobnie umożliwia rozprzestrzenianie się wirusa poprzez długie aksony nerwów obwodowych z pierwotnego miejsca infekcji, ostatecznie pozwalając na dotarcie do OUN. LC8 prawdopodobnie stanowi kluczowe ogniwo molekularne w patogenezie wirusów wścieklizny i umożliwia oddziaływanie lyssawirusów na komórkowy transport organizmu. Nie jest ono jednak bezpośrednio odpowiedzialne za ostateczne dotarcie wirusów do OUN [41, 54].

Wirusy wścieklizny prawdopodobnie mogą także zmieniać kanały jonowe oraz zajmować receptory komórkowe, a tym samym modyfikować neurotransmisję. U pacjentów chorych na wściekliznę stwierdzono spadek tetrahydrobiopteryny (BH4), a także patologiczny spadek przekaźników serotonergicznych i dopaminergicznych związany z utratą BH4. Niedobór BH4 prowadzi ostatecznie do zmniejszenia płynności obrotu serotoniny i dopaminy w mózgu, a tym samym strat tych neuroprzekaźników i uogólnionego spowolnienia aktywności elektrycznej w korze mózgu. Synteza neuroprzekaźników przebiega z udziałem m.in. hydroksylazy fenyloalaniny, hydroksylazy tyrozyny i hydroksylazy tryptofanu, których niezbędnym kofaktorem jest BH4. Spadek stężenia BH4 prowadzi w rezultacie do niedoboru m.in. adrenaliny, noradrenaliny, serotoniny, dopaminy i melatoniny [62].

Neuronalna syntaza tlenu azotu jest BH4-zależna, przez co niedobór BH4 może także prowadzić do potencjalnego niedokrwienia mózgu w wyniku upośledzenia unaczynienia mózgowego. Ponadto w przypadku

infekcji wirusowej makrofagów może dojść do uwolnienia z nich czynników prozapalnych, w tym chemokin, interleukin i cytokin oraz tlenu azotu. Obecność wirusa wścieklizny w komórce skutkuje ponadto ułatwieniem produkcji tlenu azotu. Zwiększona synteza tlenu azotu prawdopodobnie jest częścią antywirusowej odpowiedzi komórki na zakażenie i przypuszczalnie stanowi jeden z czynników wrodzonej odpowiedzi wpływający na replikację wirusów w komórce we wczesnym stadium infekcji [33, 62].

W większości udokumentowanych przypadków wścieklizny u ludzi do czasu wystąpienia ostrych objawów infekcji w surowicy krwi nie były wykrywalne swoiste przeciwciała przeciwko komórkom zainfekowanym wirusem wścieklizny. Także w płynie mózgowo-rdzeniowym nie wykryto przeciwciał przeciwko wirusowym glikoproteinom. Natomiast u pacjentów, u których w surowicy krwi stwierdzono obecność przeciwciał ich stężenia były bardzo niskie, określane jako prawie niewykrywalne. Udokumentowany jest przypadek pacjenta chorego na wściekliznę, którego wprowadzono w stan śpiączki farmakologicznej. Umożliwiło to indukcję odpowiedzi humoralnej organizmu oraz wytworzenie przeciwciał IgG wykrywalnych następnie zarówno w surowicy krwi, jak i w płynie mózgowo-rdzeniowym. Pacjent ten przeżył prawdopodobnie dzięki wytworzeniu przez jego organizm swoistych przeciwciał. Glikoproteina G wirusów wścieklizny stanowi główny antygen, przeciwko któremu indukowana jest ochronna odpowiedź układu odpornościowego ustroju. Istnieją także inne elementy, także jak cytokiny, które spełniają rolę w uodpornieniu organizmu na wściekliznę. Indukcja apoptozy koreluje prawdopodobnie z akumulacją glikoproteiny G w zainfekowanych komórkach. Z kolei apoptoza i następcza śmierć tych komórek skutkuje silną wrodzoną i nabytą odpornością organizmu [13, 22].

Wirusy wścieklizny prowadzą ostatecznie do dysfunkcji neuronalnej, która prawdopodobnie spowodowana jest zniszczeniem przez nie integralności cytoszkieletu i struktur synaptycznych neuronów. Niektóre patogeny z rodzaju *Lyssavirus* spp. są w stanie wprowadzić znaczące zmiany w ekspresji białek sieci cytoszkieletu komórek neuronalnych, w tym w izoformach tubuliny i beta-tropomiozyny oraz wimentyny, a także białek regulatorowych cytoszkieletu. Rozerwanie integralności cytoszkieletu stanowi prawdopodobnie jeden z elementów patogenezы wirusów wścieklizny. Wirusy wścieklizny wymagają do wnikięcia do neuronów integralności sieci aktynowej cytoszkieletu. Lyssawirusy dodatkowo są w stanie wprowadzić zmiany strukturalne organelli w neuronach, a także mogą już po wnikięciu do komórki neuronalnej wpływać na ich cytoszkielet aktynowy, który fizjologicznie pełni kluczowe funkcje neuronalne [11, 66].

4.2. Objawy wścieklizny

Pierwsze objawy infekcji wirusowej podobne są zwykłego przeziębienia i obejmują ogólne osłabienie i zmęczenie, dyskomfort, gorączkę, brak apetytu, nudności, wymioty i ból głowy. Mogą one trwać nawet kilka dni. W miejscu ugryzienia może być także odczuwalne klucie, mrowienie, ból lub swędzenie. Kolejnymi objawami związanymi bezpośrednio z przedostaniem się wirusa do ośrodkowego układu nerwowego mogą być dysfunkcja mózgu, podwyższony nastrój, niepokój i dezorientowanie. Wraz z progresją infekcji wystąpić mogą także bezsenność, majaczenie, halucynacje oraz dezorientacja. W drugiej fazie choroby, określanej jako postać porażenna, zaobserwować można ponadto ostre objawy neurologiczne – dyzartria (zaburzenia mowy), dysfagia (zaburzenia połykania), nadmierna produkcja i wydzielanie śliny oraz oczopląs.

Ostry okres infekcji kończy się zazwyczaj po 2 do 10 dniach. W momencie manifestacji pierwszych objawów wścieklizny w większości przypadków choroba doprowadzi do śmierci, a stosowane leczenie objawowe ma jedynie przynieść choremu tymczasową ulgę. W okresie rozwinięcia się pełnego obrazu klinicznego choroby charakterystyczny jest także wodowstręt (20–50% chorych), który objawia się występowaniem skurczów mięśni połykowych, a w skrajnych przypadkach także drgawkami całego ciała na widok lub sam odgłos lejącej się wody, oraz aerofobia [48]. Wykształca się ponadto zapalenie wielonerwowe [32, 34, 36, 47].

5. Prewencja, profilaktyka, diagnostyka, leczenie

5.1. Szczepienia

Prewencja zakażeń wścieklizną ma na celu wytworzenie odporności swoistej. Do wykształcenia odporności czynnej dochodzi w wyniku serii szczepień – swoiste zapobieganie czynne. Szczepionka zawiera inaktywowany wirus, który stanowi jednocześnie swoisty antygen mający na celu doprowadzenie do wytworzenia pamięci immunologicznej poprzez stymulację układu odpornościowego. Prewencja może obejmować dodatkowo wytworzenie odporności biernej poprzez podanie przeciwciał wraz z iniekcją ludzkiej immunoglobuliny – swoiste zapobieganie czynno-bierne [17, 34]. Glikoproteina wirusa wścieklizny (białko G) zawiera miejsca antygenowe będące celem działania zarówno przeciwciał indukowanych szczepieniami, jak i podanej immunoglobuliny [60].

Obowiązek stosowania szczepień przeciwko wściekliznie dotyczy osób narażonych na zakażenie w wyniku kontaktu ze zwierzęciem chorym lub podejrzanym o zakażenie, jednak są one również zalecane osobom,

które planują podróż do rejonów endemicznego występowania zachorowań na wściekliznę [17].

Protokoły szczepień przeciwko wściekliznie są stale uaktualniane i publikowane przez WHO. Aktualnie rekomendowane są nowoczesne, podawane domięśniowo lub podskórnie, szczepionki typu CCEEV (Cell Culture Vaccines and Embryonated Egg-based Vaccines), zawierające inaktywowane wirusy RABV. Mają być one stosowane zarówno w działaniach przed- jak i po-ekspozycyjnych w postaci serii iniekcji przeprowadzanych według wskazań producenta szczepionki. Najczęściej rekomendowane schematy to 3 dawki dla szczepienia profilaktycznego oraz 5 (w dni 0, 3, 7, 14 i 28) lub 4 dawki (w dni 0, 3, 7 i 21) dla szczepienia po-ekspozycyjnego. CCEEV są jednymi z najbardziej immunogennych szczepionek. Oznaczają się bezpieczeństwem stosowania i dobrą tolerancją wśród pacjentów [60].

Na przestrzeni lat wdrożono liczne programy zapobiegające wściekliznie, do których zalicza się m.in. stosowanie u osób w grupie ryzyka wysoce immunogennych, bezpiecznych szczepionek produkowanych w warunkach hodowli komórkowych, a także szczepienia lisów oraz zwierząt domowych – psów i kotów. Pozwoliły one na znaczne ograniczenie występowania wścieklizny u ludzi w Europie [48]. Immunoglobuliny przeciwko wirusowi wścieklizny mogą być podawane kobietom w ciąży oraz karmiącym. Wszelka profilaktyka po-narażeniowa powinna być zastosowana wobec wszystkich, którzy kwalifikują się według zaleceń WHO. Pacjenci chorzy na HIV spełniający określone warunki także mogą otrzymać szczepionkę na wściekliznę. W przypadku osób podróżujących należy ocenić ryzyko narażenia na zarażenie wirusem wścieklizny w sposób indywidualny, biorąc pod uwagę przede wszystkim występowanie wścieklizny w miejscu docelowym oraz planowane aktywności, np. przebywanie w jaskiniach, w których możliwa jest obecność i bezpośredni kontakt z nietoperzami [64].

Główny Inspektorat Sanitarny w Programie Szczepień Ochronnych na rok 2018 różnicuje sposób podawania szczepionki po ugryzieniu ze względu na rodzaj kontaktu oraz stan zdrowia zwierzęcia [17].

5.2. Profilaktyka po-ekspozycyjna

Względnie długi czas inkubacja wirusa wścieklizny w ludzkim organizmie stwarza możliwość uniknięcia konsekwencji klinicznych nawet po bezpośredniej ekspozycji [60]. Powolny przebieg wścieklizny pozwala na wywołanie aktywnej odpowiedzi immunologicznej, a tym samym zapewnienie ochrony przed dalszą infekcją [32]. Efekt ten jest możliwy jedynie poprzez wdrożenie szybkiej i efektywnej profilaktyki po-ekspozycyjnej.

Pierwszym krokiem zapobiegawczym powinno być przemycie rany wodą z mydłem lub substancją będącą

w stanie inaktywować wirusa. Oczyszczenie rany prowadzi do zmniejszenia inokulum patogenu w jej obrębie. Następnie zalecane jest podanie serii szczepień w celu sprowokowania organizmu do produkcji przeciwciał. Ich obecność zmniejsza ryzyko przedostania się RABV do nerwów obwodowych. Kolejnym krokiem w profilaktycznych działaniach po-ekspozycyjnych jest podanie w okolicę rany immunoglobuliny przeciwko wirusowi wścieklizny. Dostarczy ona niezbędnych przeciwciał do momentu rozpoczęcia ich produkcji przez organizm i umożliwi zneutralizowanie wirusa w miejscu jego wnikięcia [32, 60].

Do roku 2012 udokumentowano mniej niż 10 przypadków wyleczenia człowieka z wścieklizny, a jedynie w 2 z nich nie wdrożono wcześniejszej profilaktyki przed- lub po-narażeniowej [34]. W każdym przypadku zanieczyszczenia błony śluzowej lub otwartej rany śliną lub tkanką mózgową zwierzęcia podejrzanego o zachorowanie na wściekliznę należy zastosować profilaktykę [32]. Prawidłowo przeprowadzone, natychmiastowe działania po ekspozycji na RABV wykazują 100% skuteczność w zapobieganiu wściekliznie. Zachorowanie i ostatecznie śmierć z powodu choroby dotyczy przede wszystkim osób, które nie miały dostępu do szybkiej, właściwej profilaktyki po-ekspozycyjnej [60].

5.3. Diagnostyka

W każdym przypadku podejrzenia wścieklizny należy potwierdzić je za pomocą badań laboratoryjnych. W diagnostyce pomocny może być także rezonans magnetyczny, podczas którego obserwuje się umiarkowane wzmocnienie sygnału w sekwencji T2 w obrębie poszczególnych obszarów mózgu – pnia, podwzgórza, hipokampa oraz substancji białej i szarej. U pacjentów w fazie śpiączki wzmocnienie sygnału następuje po zastosowaniu gadoliny. W diagnostyce różnicowej wścieklizny tomografia komputerowa nie spełnia żadnej roli.

W badaniach laboratoryjnych infekcję lyssawirusem można stwierdzić poprzez wykrycie antygeny wirusa, swoistych przeciwciał neutralizujących w surowicy lub płynie mózgowo-rdzeniowym Inną metodą jest izolacja samego wirusa bądź jego kwasu nukleinowego. Antygen wirusowy wykrywa się za pomocą metody bezpośredniej immunofluorescencji, która stanowi tzw. „złoty standard”. Wykorzystuje się w tym celu przede wszystkim ślinę, preparaty odciskowe z rogówki (czułość 46%) lub materiał przygotowany po wykonaniu biopsji skóry pobranej z karku. W ostatnim przypadku czułość metody wynosi 50–94% i wzrasta wraz z czasem trwania infekcji. Podobną czułością cechuje się także test wykrywający kwas nukleinowy lyssawirusa w ślinie przy zastosowaniu metody PCR z odwrotną transkryptazą.

Żaden z testów nie cechuje się 100% skutecznością, wiarygodnością i czułością, więc w celu potwierdzenia infekcji zalecane jest wykonanie kilku testów jednocześnie. W diagnostyce pośmiertnej stosuje się takie same metody jak w przyżyciowej, lecz materiał badany stanowi głównie tkanka mózgowa [48]. W celu potwierdzenia bądź wykluczenia wścieklizny wykonywane są również testy wykrywania wewnątrzcytoplazmatycznych ciałek wtrętowych w zakażonych neuronach. Zawierają one ciała Negriego, czyli agregaty wirusowych rybonukleokapsydów. Występują one w nawet do 90% badanych tkanek mózgowych osób objętych infekcją [32].

5.4. Leczenie eksperymentalne

Protokół Milwaukee został opracowany przez dr. Rodneya Willoughby Juniora i stanowi raport z eksperymentalnej formy leczenia wścieklizny u człowieka, u 15-letniej dziewczynki z Wisconsin w USA – Jeanny Giese, u której wścieklizna rozwinęła się miesiąc po ugryzieniu przez nietoperza w lewy palec wskazujący, które to miało miejsce 12 września 2004 roku [44]. Do tego roku znane było jedynie 5 przypadków osób, które nie umarły po zainfekowaniu wirusem wścieklizny. Każda z tych osób była poddana profilaktyce po-ekspozycyjnej w postaci podania odpowiedniej szczepionki. Dziewczynka z USA poddana eksperymentalnej terapii według protokołu Milwaukee była pierwszą osobą, która przeżyła bez natychmiastowej, wcześniejszej profilaktyce po-narażeniowej [4]. Rana została przemyta jedynie wodą utlenioną. Pierwsze objawy neurologiczne zostały zauważone po 37 dniach od incydentu – dziewczynka została przyjęta do lokalnego szpitala z wysoką gorączką (39°C), zaburzeniami mowy, skurczem mięśni lewej ręki, podwójnym widzeniem, nudnościami i wymiotami, bez innych objawów grypy lub przeziębienia. Neurolog stwierdził u niej ponadto niezborność ruchową oraz obustronne porażenie nerwu odwodzącego. Po zdiagnozowaniu wścieklizny poprzez wyizolowane w 2. dniu hospitalizacji podczas badania przeciwciał przeciwko wściekliznie (a nie żywego wirusa) została ona poddana eksperymentalnemu leczeniu poprzez wprowadzenie w śpiączkę farmakologiczną i utrzymanie jej w niej jak najdłużej w celu uchronienia mózgu przed dalszym uszkodzeniem, a tym samym umożliwienia systemowi odpornościowemu dziewczynki wytworzenia przeciwciał niezbędnych do zwalczania wirusa. Podane zostały jej ketamina, rybawiryna, amantadyna i midazolam [44]. Ketamina jest antagonistą receptorów NMDA o udowodnionym na zwierzętach działaniu neuroprotektynym przy udarach i urazach mózgu. W terapii wścieklizny została zastosowana jako lek eksperymentalny, o braku udowodnionego działania na modelach

ludzkich. Teoretycznie miała ona chronić mózg przed ekscytotoksycznością kwasu glutaminowego, głównego neurotransmitera w ośrodkowym układzie nerwowym, jednak w przypadku wścieklizny uprzednio nie wykazano skuteczności nawet na modelu zwierzęcym [67]. Rybawiryna, wykazująca ograniczone możliwości wnikania do centralnego układu nerwowego, podawana była w dawkach będących w stanie podnieść poziom białek w płynie mózgowo-rdzeniowym, a tym samym wykazać poziom przepuszczalności bariery krew-mózg [44]. Podanie dziewczynce dużych dawek anestetyków w celu wprowadzenia jej w śpiączkę farmakologiczną o działaniu terapeutycznym miało doprowadzić do zmniejszenia aktywności metabolicznej jej organizmu oraz utrzymania nerwów w jak najlepszym stanie. Działanie to także miało formę eksperymentalną, o skuteczności potwierdzonej jedynie na modelach zwierzęcych w przypadku udarów i uszkodzeń mózgu oraz stanów padaczkowych. Śpiączka miała także zapobiegać niestabilności autonomicznego układu nerwowego, występującej przy zakażeniu wirusem wścieklizny [67].

Po 8 dniach pobytu w szpitalu zauważone zostały oznaki podjęcia walki z wirusem przez system odpornościowy dziewczynki po wykonaniu punkcji lędźwiowej. Wykazano zwiększony poziom przeciwciał przeciw wściekliznie, co pozwoliło na rozpoczęcie wyprowadzenia jej ze śpiączki. W 12. dniu hospitalizacji u dziewczynki ujawniła się grypa nie reagująca na standardowe leczenie. W 15. dniu leczenia zmniejszono temperaturę pokoju, w którym przebywała chora, o 5,5°C, co poskutkowało spadkiem o 3,6°C temperatury ciała dziewczynki. Pacjentka została uznana za wolną od wirusa wścieklizny po 31 dniach w szpitalu, a ponadto nie stwierdzono poważnego uszkodzenia zdolności umysłowych po przebytej chorobie oraz leczeniu. Około 5 miesięcy po hospitalizacji dziewczynka była świadoma i komunikatywna, ale stwierdzono u niej napadową dystonię (mimowolne ruchy powodujące wyginanie i skręcanie poszczególnych części ciała), dyzartrię oraz balizm (zamaszyste, gwałtowne ruchy kończyn, prowadzące do niestabilnego chodu) [44].

Dziewczynka zainfekowana była prawdopodobnie wyjątkowo łagodnym typem wirusa wścieklizny przenoszonego przez nietoperze-wampiry z podrodziny *Desmodontinae* [61] lub ugryzienie nastąpiło w miejscu bardzo oddalonym od ośrodkowego układu nerwowego, co umożliwiło jej przeżycie wścieklizny po zaplanowanym leczeniu według protokołu Milwaukee. Kolejnych 6 lub więcej prób leczenia objawowej wścieklizny z użyciem tego typu leczenia nie powiodło się. 4. lutego 2009 roku w Teksasie miała miejsce kolejna udana terapia według protokołu Milwaukee, także po ugryzieniu chłopca przez nietoperza-wampira [44].

Protokół Milwaukee od początku swojego powstania przechodził wiele modyfikacji. Ostatnia z nich miała na

celu eliminację rybowiryny oraz barbituranów z puli środków używanych w leczeniu wścieklizny tą metodą [61]. Ponadto, jednym z działań niepożądanych przy stosowaniu rybowiryny może być opóźnienie produkcji przeciwciał [4]. Z oryginalnych leków pozostały jedynie midazolam oraz ketamina, przez co obecnie protokół Milwaukee podobny jest do standardowego postępowania na oddziałach intensywnej terapii na całym świecie. W 2013 World Health Organization oficjalnie ogłosiła, że nie istnieje potwierdzona, skuteczna metoda leczenia wścieklizny [61]. Jedną z teorii eliminacji infekcji jest indukcja reakcji zapalnej organizmu z chemokinami i IFN w roli głównej. Znalazła ona potwierdzenie jedynie w przypadku myszy zakażonych małymi dawkami wirusa w warunkach laboratoryjnych, jednak nie została ona potwierdzona przy infekcji *Lyssavirus* spp. w warunkach środowiskowych [35].

6. Podsumowanie

Rodzaj *Lyssavirus* wciąż stanowi obiekt badań i nie został w pełni poznany. Nieprzerwanie ma miejsce odkrywanie i klasyfikowanie nowych patogenów należących do lyssawirusów (w roku 2012 w Hiszpanii wyizolowany został prawdopodobnie kolejny gatunek), a najnowszy podział systematyczny pochodzi z roku 2016. Wirus wścieklizny występuje praktycznie na całym świecie pod postacią różnych gatunków należących do tego samego rodzaju. Ponadto cały czas trwają prace nad wynalezieniem skutecznego leczenia przeciwko infekcji – formę eksperymentalną na dzień dzisiejszy stanowi terapia według protokołu Milwaukee. Na zakażenie szczególnie narażone są osoby mające kontakt z dziką zwierzyną. Do metod zapobiegania i zmniejszenia drastyczności przebiegu choroby zaliczane są przede wszystkim szczepionki oraz bezpośrednia profilaktyka po-ekspozycyjna. Dzięki dobrze opracowanym metodom diagnostycznym możliwa jest także skuteczna, a przede wszystkim szybka identyfikacja infekcji. Złoty standard stanowi wykrycie antygeny wirusowego za pomocą metody bezpośredniej immunofluorescencji.

Piśmiennictwo

- Albertini A.A.V., Schoehn G., Weissenhorn W., Ruigrok R.W.H.: Structural aspects of rabies virus replication. *Cell. Mol. Life. Sci.* **65**, 282–294 (2008)
- Amengual B., Bourhy H., López-Roig M., Serra-Cobo J.: Temporal dynamics of European bat Lyssavirus type 1. and survival of *Myotis myotis* bats in natural colonies. *PLoS One*, **2**, e566 (2007)
- Arai Y.T., Kuzmin I.V., Kameoka Y., Botvinkin A.D.: New lyssavirus genotype from the lesser mouse-eared bat (*Myotis blythi*), Kyrgyzstan. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 333–337 (2003)
- Aramburo A., Willoughby R.E., Bollen A.W., Glaser C.A., Hsieh C.J., Davis S.L., Martin K.W., Roy-Burman A.: Failure of the Milwaukee protocol in a child with rabies. *Clin. Infect. Dis.* (2011)
- Banyard A.C., Hayman D., Johnson N., McElhinney L., Fooks A.R.: Chapter 12 – Bats and Lyssaviruses. *Adv. Virus. Res.* **79**, 239–289 (2011)
- Begeman L., GeurtsvanKessel C., Finke S., Freuling C.M., Koopmans M., Müller T., Ruigrok T.J.H., Kuiken T.: Comparative pathogenesis of rabies in bats and carnivores, and implications for spillover to humans. *Lancet Infect. Dis.* **18**, e147–e159 (2018)
- Boulger L.R., Porterfield J.S.: Isolation of a virus from Nigerian fruit bats. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **52**, 421–424 (1958)
- Brzózka K., Finke S., Conzelmann K.K.: Identification of the rabies virus alpha/beta interferon antagonist: phosphoprotein P interferes with phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J. Virol.* **79**, 7673–7681 (2005)
- Brzózka K., Finke S., Conzelmann K.K.: Inhibition of interferon signaling by rabies virus phosphoprotein P: activation-dependent binding of STAT1 and STAT2. *J. Virol.* **80**, 2675–2683 (2006)
- Ceballos N.A., Morón S.V., Berciano J.M., Nicolás O., López C.A., Juste J., Nevado C.R., Setién Á.A., Echevarría J.E.: Novel *Lyssavirus* in Bat, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 793–795 (2013)
- Ceccaldi P.E., Valtorta F., Braud S., Hellio R., Tsiang H.: Alteration of the actin-based cytoskeleton by rabies virus. *J. Gen. Virol.* **78**, 2831–2835 (1997)
- Chopy D., Detje C.N., Lafage M., Kalinke U., Lafon M.: The type I interferon response bridges rabies virus infection and reduces pathogenicity. *J. Neurovirol.* **17**, 353 (2011)
- Faber M., Pulmanusahakul R., Hodawadekar S.S., Spitsin S., McGettigan J.P., Schnell M.J., Dietzschold B.: Overexpression of the rabies virus glycoprotein results in enhancement of apoptosis and antiviral immune response. *J. Virol.* **76**, 3374–3381 (2002)
- Familusi J.B., Moore D.L.: Isolation of a rabies related virus from the cerebrospinal fluid of a child with “aseptic meningitis”. *Afr. J. Med. Sci.* **3**, 93–96 (1972)
- Finke S., Conzelmann K.K.: Replication strategies of rabies virus. *Virus. Res.* **111**, 120–131 (2005)
- Francis J.R., Nourse C., Vaska V.L., Calvert S., Northill J.A., McCall B., Mattke A.C.: Australian Bat Lyssavirus in a Child: The First Reported Case. *Pediatrics*, **133**, e1063–e1067 (2014)
- Główny Inspektor Sanitarny: Komunikat Głównego Inspektora Sanitarnego w sprawie Programu Szczepień Ochronnych na rok 2018. *Dziennik Urzędowy Ministra Zdrowia*, **poz. 108**, Warszawa (2017)
- Hanna J.N., Carney I.K., Smith G.A., Deverill J.E., Botha J.A., Serafin I.L., Barrower B.J., Fitzpatrick P.F., Searle J.W.: Australian bat lyssavirus infection: a second human case, with a long incubation period. *Med. J. Aust.* **172**, 597–599 (2000)
- Hooper D.C.: The role of immune responses in the pathogenesis of rabies. *J. Neurovirol.* (2005)
- International Committee on Taxonomy of Viruses: Genus: *Lyssavirus*, https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negative-sense-rna-viruses/mononegavirales/w/rhabdoviridae/795/genus-lyssavirus (27.02.2019)
- International Committee on Taxonomy of Viruses: Taxonomy, <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (27.02.2019)
- Johnson N., Cunningham A.F., Fooks A.R.: The immune response to rabies virus infection and vaccination. *Vaccine*, **28**, 3896–3901 (2010)
- Johnson N., Selden D., Parsons G., Healy D., Brookes S.M., McElhinney L.M., Hutson A.M., Fooks A.R.: Isolation of Euro-

- pean bat *lyssavirus* type 2 from Daubenton's bat in the United Kingdom. *Vet. Rec.* **152**, 387 (2003)
24. Kell A.M., Gale Jr M.: RIG-I in RNA virus recognition. *Virology*, **479**, 110–121 (2015)
 25. Kgaladi J., Wright N., Coertse J., Markotter W., Marston D., Fooks A.R., Freuling C.M., Müller T.F., Sabeta C.T., Nel L.H.: Diversity and epidemiology of *Mokola virus*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, e2511 (2013)
 26. Kowalinski E., Lunardi T., McCarthy A.A., Louber J., Brunel J., Grigorov B. i wsp.: Structural basis for the activation of innate immune pattern-recognition receptor RIG-I by viral RNA. *Cell*, **147**, 423–435 (2011)
 27. Lahaye X., Vidy A., Pomier C., Obiang L., Harper F., Gaudin Y., Blondel D.: Functional characterization of Negri bodies (NBs) in rabies virus-infected cells: Evidence that NBs are sites of viral transcription and replication. *J. Virol.* **83**, 7948–7958 (2009)
 28. Markotter W., Randles J., Rupprecht C.E., Sabeta C.T., Taylor P.J., Wandeler A.I., Nel L.H.: *Lagos Bat Virus*, South Africa. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 504–506 (2006)
 29. Marzec A., Smreczak M., Żmudziński J.F.: Taksonomia rodzaju *Lyssavirus*. *Med. Wet.* **72**, 281–283 (2016)
 30. Masatani T., Ito N., Shimizu K., Ito Y., Nakagawa K., Sawaki Y. i wsp.: Rabies virus nucleoprotein functions to evade activation of the RIG-I-mediated antiviral response. *J. Virol.* **84**, 4002–4012 (2010)
 31. Masatani T., Ozawa M., Yamada K., Ito N., Horie M., Matsuo A. i wsp.: Contribution of the interaction between the rabies virus P protein and I-kappa B kinase – to the inhibition of type I IFN induction signalling. *J. Gen. Virol.* **97**, 316–326 (2016)
 32. Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A.: *Mikrobiologia*, red. Przondo-Mordarska A., Martirosian G., Szkaradkiewicz A., Elsevier Urban & Partner, Wrocław, 2011, s. 569–573
 33. Nakamichi K., Inoue S., Takasaki T., Morimoto K., Kurane I.: Rabies virus stimulates nitric oxide production and CXC chemokine ligand 10 expression in macrophages through activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *J. Virol.* **78**, 9376–9388 (2004)
 34. National Association of State Public Health Veterinarians, Compendium of Animal Rabies Prevention and Control Committee, Brown C.M., Slavinski S., Ettestad P., Sidwa T.J., Sorhage F.E.: Compendium of animal rabies prevention and control, 2016. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **248**, 505–517 (2016)
 35. Niu X., Wang H., Fu Z.F.: Role of Chemokines in Rabies Pathogenesis and Protection. *Adv. Virus. Res.* (2011)
 36. Ostrowska J.D., Hermanowska-Szpakowicz T.: Wścieklizna i jej profilaktyka u ludzi. *Med. Wet.* **53**, 144–147 (1997)
 37. Pancer K., Gut W., Litwińska B.: Filowirusy – wirusy obecne od milionów lat – dlaczego teraz wybuchła tak wielka epidemia? *Post. Mikrobiol.* **55**, 205–214 (2016)
 38. Pawan J.L.: Rabies in the vampire bat of Trinidad, with special reference to the clinical course and the latency of infection. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **30**, 101–129 (1936)
 39. Pawan J.L.: The transmission of paralytic rabies in Trinidad by the vampire bat (*Desmodus rotundus murinus* Wagner, 1840). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **30**, 137–156 (1936)
 40. Paweska J.T., Blumberg L.H., Liebenberg C., Hewlett R.H., Grobelaar A.A., Leman P.A., Croft J.E., Nel L.H., Nutt L., Swanepoel R.: Fatal Human Infection with Rabies-related *Duvenhage Virus*, South Africa. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 1965–1967 (2006)
 41. Poisson N., Real E., Gaudin Y., Vaney M.C., King S., Jacob Y. i wsp.: Molecular basis for the interaction between rabies virus phosphoprotein P and the dynein light chain LC8: dissociation of dynein-binding properties and transcriptional functionality of P. *J. Gen. Virol.* **82**, 2691–2696 (2001)
 42. Rieder M., Brzózka K., Pfaller C.K., Cox J.H., Stitz L., Conzelmann K.K.: Genetic dissection of interferon-antagonistic functions of rabies virus phosphoprotein: inhibition of interferon regulatory factor 3 activation is important for pathogenicity. *J. Virol.* **85**, 842–852 (2011)
 43. Rieder M., Finke S., Conzelmann K.K.: Interferon in *lyssavirus* infection. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* **125**, 209–218 (2012)
 44. Rodney E., Rupprecht C.E. i wsp.: Survival after treatment of rabies with induction of coma. *N. Engl. J. Med.* **352**, 2508–2514 (2005)
 45. Rosner F.: Rabies in the Talmud. *Med. Hist.* **18**, 198 (1974)
 46. Rupprecht C.E., Smith J.S., Fekadu M., Childs J.E.: The ascension of wildlife rabies: a cause for public health concern or intervention?. *Emerg. Infect. Dis.* **1**, 107 (1995)
 47. Rynans S., de Walthoffen S.W., Dzieciatkowski T., Młynarczyk G.: Wirusowe zakażenia ośrodkowego układu nerwowego. Część II: Wirusy RNA. *Post. Mikrobiol.* **4**, 349–354 (2013)
 48. Sadkowska-Todys M.: Wścieklizna – aktualne problemy epidemiologiczne. *Pol. Przegl. Neurol.* **2**, 37–42 (2006)
 49. Samorek-Salamonowicz E., Niczyporuk J.S.: Wirus Zachodniego Nilu oraz inne nowo pojawiające się zagrożenia zdrowia publicznego. *Post. Mikrobiol.* **3**, 187–190 (2010)
 50. Schatz J., Freuling C.M. i wsp.: Bat rabies surveillance in Europe. *Zoonoses Public Health.* **60**, 22–34 (2013)
 51. Serra-Cobo J., Amengual B., Abellán C., Bourhy H.: European bat *lyssavirus* infection in Spanish bat populations. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 413 (2002)
 52. SIB Swiss Institute of Bioinformatics: *Lyssavirus*, ViralZone, <https://viralzone.expasy.org/22> (22.04.2018)
 53. Speare R., Skerratt L., Foster R., Berger L., Hooper P., Lunt R., Blair D., Hansman D., Goulet M., Cooper S.: Australian bat *lyssavirus* infection in three fruit bats from north Queensland. *Commun. Dis. Intell.* **21**, 117–120 (1997)
 54. Tan G.S., Preuss M.A., Williams J.C., Schnell M.J.: The dynein light chain 8 binding motif of rabies virus phosphoprotein promotes efficient viral transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 7229–7234 (2007)
 55. Tignor G.H., Murphy F.A., Clark H.F., Shope R.E., Madore P., Bauer S.P., Buckley S.M., Meredith C.D.: Duvenhage Virus: Morphological, Biochemical, Histopathological and Antigenic Relationships to the Rabies Serogroup. *J. Gen. Virol.* **37**, 595–611 (1977)
 56. van Thiel P.P.A.M., van den Hoek J.A.R., Eftimov F., Tepaske R., Zaaijer H.J., Spanjaard L., de Boer H.E.L., van Doornum G.J.J., Schutten M., Osterhaus A.D., Kager P.A.: Fatal case of human rabies (*Duvenhage virus*) from a bat in Kenya: the Netherlands, December 2007. *Eurosurveillance*, **13**, 1–2 (2008)
 57. Vázquez-Morón S., Avellón A., Echevarría J.E.: RT-PCR for detection of all seven genotypes of *Lyssavirus* genus. *J. Virol. Methods*, **135**, 281–287 (2006)
 58. Von Teichman B.F., De Koker W.C., Bosch S.J.E., Bishop G.C., Meredith C.D., Bingham J.: *Mokola virus* infection: description of recent South African cases and a review of the virus epidemiology: case report. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* **69**, 169–171 (1998)
 59. Walker P.J., Blasdel K.R., Calisher C.H., Dietzgen R.G., Kondo H., Kurath G. i wsp.: ICTV virus taxonomy profile: Rhabdoviridae. *J. Gen. Virol.* **99**, 447–448 (2018)
 60. WHO/Department of Control of Neglected Tropical Diseases: Rabies vaccines: WHO position paper – April 2018 – Weekly epidemiological record (2018)
 61. Wilde H., Hemachudha T.: The “Milwaukee protocol” for treatment of human rabies is no longer valid. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **34**, 678–9 (2015)

62. Willoughby R.E., Opladen T., Maier T., Rhead W., Schmiedel S., Hoyer J., Drosten C., Rupprecht C.E., Hyland K., Hofmann G.F.: Tetrahydrobiopterin deficiency in human rabies. *J. Inherit. Metab. Dis.* **32**, 65–72 (2009)
63. Wiltzer L., Okada K., Yamaoka S., Larrous F., Kuusisto H.V., Sugiyama M. i wsp.: Interaction of rabies virus P-protein with STAT proteins is critical to lethal rabies disease. *J. Infect. Dis.* **209**, 1744–1753 (2013)
64. World Health O.: Rabies vaccines: WHO position paper, April 2018 – Recommendations. *Vaccine*, (2018)
65. World Health Organization: WHO expert consultation on rabies: first report. World Health Organization 2005, Geneva (2004)
66. Zandi F., Eslami N., Torkashvand F., Fayaz A., Khalaj V., Vaziri B.: Expression changes of cytoskeletal associated proteins in proteomic profiling of neuroblastoma cells infected with different strains of rabies virus. *J. Med. Virol.* **85**, 336–347 (2013)
67. Zeiler F.A., Jackson A.C.: Critical appraisal of the Milwaukee protocol for rabies: this failed approach should be abandoned. *Can. J. Neurol. Sci.* **43**, 44–51 (2015)