

Ugotavljanje lisavirusov pri netopirjih v Sloveniji

Determination of bat lyssavirus in Slovenia

Peter Hostnik,¹ Danijela Rihtarič,¹ Primož Presetnik,² Monika Podgorelec,² Mirjana Stantič Pavlinič,³ Ivan Toplak¹

¹ Veterinarska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Enota za virologijo, Gerbičeva 60, 1115 Ljubljana

² Center za kartografijo favne in flore, Antoličeva 1, 2204 Miklavž na Dravskem polju

³ Zavod za zdravstveno varstvo Ljubljana, Zaloška 29, 1000 Ljubljana

Korespondenca/ Correspondence:

Peter Hostnik, Veterinarska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Enota za virologijo, Gerbičeva 60, 1115 Ljubljana, e-pošta: peter.hostnik@vf.uni-lj.si

Ključne besede:

evropski netopirski lisavirusi, netopirji, zoonoze, krvni vzorec, bris ustne votline, bris lobanjske votline

Izvleček

Izhodišča: V letu 2008 smo izvajali testiranje netopirjev, da bi ugotovili, ali so nosilci evropskih netopirskih lisavirusov (EBLV). Lov netopirjev je potekal po različnih predelih Slovenije. Živim netopirjem smo odvzeli vzorce krvi in bris ustne votline, pri poginulih netopirjih pa smo odvzeli bris iz lobanjske votline. Na prisotnost lisavirusnega genoma je bilo z metodo RT-PCR testiranih skupno 260 brisov ustne votline in 38 vzorcev brisov možganov poginulih netopirjev.

Rezultati: Z metodo FAVN smo na prisotnost protiteles proti virusu stekline pri istih netopirjih pregledali 216 vzorcev krvi. Virusne RNA nismo dokazali v nobenem od preiskovanih vzorcev, prav tako so bili vsi krvni vzorci negativni na prisotnost specifičnih protiteles.

Zaključki: Ne glede na rezultate te študije lahko virusi EBLV povzročijo okužbo s smrtnim izidom pri človeku, zato je potrebno vse netopirje, ki poškodujejo človeka, testirati na prisotnost EBLV. Da bi preprečili prenos lisavirusov z netopirjev na človeka, bo potrebno laboratorijsko osebe in vse ljudi, ki prihajajo v stik z netopirji, poučiti o nevarnosti lisavirusnih okužb in predlagati preventivno cepljenje proti steklini.

Abstract

Background: To study bats, as a reservoir for European bat lyssavirus (EBLV) in Slovenia, native bat samples were tested in year 2008. Bats were captured from different locations in Slovenia and blood samples, mouth and brain swabs were collected from live and dead bats. 260 samples of oral swabs and 38 brain samples were tested by specific RT-PCR assay to detect lyssavirus genome.

Results: 216 blood samples, collected from the same bats, were tested by FAVN (Fluorescent Antibody Virus Neutralization) test to detect the prevalence of lyssavirus antibodies among bats. Virus RNA was not detected in any of the samples, all blood samples were also negative for specific antibodies.

Conclusions: Despite the data from this study, EBL viruses can cause fatal infections in humans and all bats involved in contact incidents with humans should be tested to determine whether the victim was exposed to EBL virus. In order to prevent lyssavirus transmission from bats to humans, all bat handlers and laboratory personnel should be informed about the possible risk of lyssavirus exposure via bats and their vaccination against rabies is strongly recommended.

Key words:

European bat lyssavirus,
bats, zoonosis, blood
samples, oral swabs
samples, brain swabs

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2010;
79: 265–271

Prispelo: 16. okt. 2009,
Sprejeto: 18. dec. 2009

Uvod

Med lisavirusi so gotovo najbolj poznani in raziskani virusi genotipa 1, ki povzročajo stekline. V zadnjih dveh desetletjih so pričeli podrobneje preučevati tudi steklini sorodne viruse, med katere spadajo lisavirusi genotipa 5 in 6, ki so jih najpogosteje ugotavljali pri netopirjih. Evropski netopirski lisavirusi (European Bat Lyssavirus, EBLV) so uvrščeni v družino *Rhabdoviridae*, v rod *Lyssavirus*. Genom virusa je enojnovijačna negativno polarna RNA. Rod *Lyssavirus* je po veljavni klasifikaciji razdeljen v 7 genotipov. V svetu je najbolj razširjen genotip 1, imenovan tudi virus stekline. V ta genotip je uvrščenih največ opisanih terenskih izolatov, laboratorijskih in vakcinalnih sevov klasičnega virusa stekline. V genotip 2, 3 in 4 spadajo netopirski virusi (virus Lagos, virus Mokola in virus Duvenhage), ki so bili ugotovljeni na afriški celini. Evropski netopirski lisavirusi so uvrščeni v genotip 5 (drugo ime je EBLV 1) in genotip 6 (drugo ime je EBLV 2). V genotip 7 so uvrščeni avstralski netopirski virusi stekline.¹ V centralni Aziji so pri netopirjih dokazali tudi lisaviruse (npr. seva Aravan in Khujand), ki se glede na nukleotidno zaporedje gena P in N močno razlikujejo od ostalih, zato so nekateri avtorji predlagali dopolnitev klasifikacije lisavirusov z dodatnim genotipom, ki naj bi se imenoval zahodnokavkaški netopirski genotip lisavirusa.^{2,3}

EBLV so dokazali pri več različnih vrstah netopirjev, vendar Greene (2006)⁴ domneva, da je dovzetnih še veliko vrst netopirjev, ki jih še niso pregledali. V Ameriki segajo prvi opisani primeri okuženih netopirjev z lisavirusi genotipa 1 v trideseta leta prejšnjega stoletja, vendar so filogenetske analize pokazale, da je virus pri netopirjih prisoten že dolgo. V severni in južni Ameriki so prisotnost virusa stekline ugotovili pri krvo-sesnih in žužkojedih netopirjih, vendar se virusi na genetski ravni med tema skupinama netopirjev razlikujejo, kar potrjuje dolgotrajno prisotnost in ločeni razvoj virusov pri obeh vrstah.⁵

V Evropi virus stekline (*lyssavirus* genotipa 1) pri netopirjih še ni bil ugotovljen. Prisotnost virusov genotipa EBLV 1 in EBLV

2 so potrdili pri domorodnih netopirjih v številnih državah Evrope, od Španije do Rusije.⁶ Vrsta netopirja, pri kateri so viruse EBLV 1 najpogosteje ugotavljali v Evropi, je pozni netopir (*Eptesicus serotinus*), genotip EBLV 2 pa je bil najpogosteje ugotovljen pri vrstah obvodnega netopirja (*Myotis daubentonii*) in močvirskega netopirja (*Myotis dasycneme*) ter nekaterih drugih vrstah.⁷ 95 % vseh okužb netopirjev z lisavirusi je bilo ugotovljenih pri vrsti pozni netopir, ugotovljeni virusi pa so spadali v genotip EBLV 1.⁸ V letih od 1977 do 2000 so v Evropi potrdili 630 pozitivnih primerov netopirjev, okuženih z virusom EBLV, največje število primerov je bilo ugotovljenih na Danskem, Nizozemskem, v Nemčiji in na Poljskem.⁹ V literaturi so opisani tudi primeri prenosa virusa EBLV z netopirjev na druge živalske vrste. Virus EBLV 1 so na Danskem ugotovili pri ovci,¹⁰ v Nemčiji pa pri jazbecu.¹¹ Na osnovi rezultatov eksperimentalnih okužb različnih vrst živali sklepajo, da sta se virusa EBLV 1 in EBLV 2 prilagodila na netopirja iz vrste poznega netopirja oz. rodu navadnih netopirjev *Myotis*, okužbe pri obeh vrstah se pojavljajo izjemoma. V eksperimentalnih pogojih so v primeru znotrajmišične okužbe lisic z virusom genotipa EBLV 1 ugotovili 14-odstotno smrtnost, pri eksperimentalni okužbi z virusom genotip EBLV 2 pa so vse lisice poskus preživele, medtem ko je znotrajmožganska okužba v obeh primerih izzvala 100-odstotno smrtnost.¹²

Ugriz netopirja, okuženega z virusom genotipa EBLV 1 in EBLV 2, lahko pri človeku povzroči klinično sliko stekline z encefalitisom, ki se konča s smrtnim izidom. V zadnjem desetletju so poznani štirje smrtni primeri, pri treh izmed njih so kot povzročitelja uspešno tipizirali EBLV.⁸ Prva poročila o smrtnem primeru človeka zaradi okužbe z virusi EBLV so iz Ukrajine leta 1977 in iz Rusije leta 1985, pri obeh je bil ugotovljen virus genotipa EBLV 1.¹³ Tretji primer okužbe človeka, tokrat z virusom EBLV 2, izvira iz leta 1986, ko je umrl biolog, ki je proučeval netopirje iz Švice in Malezije.¹⁴ Zadnji smrtni primer je spodbudil obširna proučevanja lisavirusnih infekcij pri netopirjih. Zaradi okužbe z virusom EBLV 2 je leta 2002 na

Škotskem umrl naravovarstvenik, ki se je ukvarjal z netopirji.¹⁵

Netopirji so edini sesalci, ki so zmožni aktivno leteti. V Sloveniji so do sedaj našli 30 vrst netopirjev,¹⁶ kar je tretjina od vseh vrst pri nas prostoživečih sesalcev. Netopirji so živali, ki so aktivne ponoči, vrste, živeče v Sloveniji, se v tem času prehranjujejo, večinoma z žuželkami in drugimi členonožci. Prednevijo v zatočiščih, kot so jame, skalne špranje in dupla. V kulturni krajini pa uporabljajo naključno ustvarjene nadomestke za dnevno počivanje, kot so podstrehe in kleti stavb, špranje za lesenimi opaži fasad ipd. Netopirji preživijo zimsko obdobje v zimskem spanju – hibernaciji, ko izrabljajo v tolšči shranjeno energijo, ki so si jo nabrali jeseni. Pri nas mnoge vrste prezimujejo v jamah in ostalih podzemnih prostorih.

Parijo se večinoma jeseni, pri nekaterih vrstah na posebnih pariščih, kamor samci vabijo samice s svojimi svatbenimi klici. Do oploditve pride pri večini vrst šele spomladi, samice pa skotijo enega, izjemoma dva mladiča v juniju ali v začetku julija. Mladiči lahko prvič samostojno letajo pri približno treh do štirih tednih starosti. Breje samice in samice z mladiči se pogosto združujejo v t.i. porodniške gruč. Netopirji so zelo pomične živali, odvisno od vrste so kotišča (mesta porodniških gruč) blizu prezimovališč ali parišč, lahko pa so oddaljena tudi nekaj deset do več sto kilometrov.¹⁷ Med nočnim prehranjevanjem se netopirji oddaljijo več kilometrov od svojih zatočišč.

Diagnostika okužb z lisavirusi temelji na dokazovanju prisotnosti virusa v možganih ali brisu ustne votline ter dokazovanju specifičnih protiteles v krvi netopirjev. Pri poginulih netopirjih je za preiskavo najprimernejši vzorec možganov, pri živih živalih pa se za preiskave najpogosteje uporabljajo vzorci brisov ustne votline in vzorci krvi.¹⁸ Večina študij razširjenosti okužb z lisavirusi znotraj populacije različnih vrst netopirjev temelji na metodah dokazovanja specifičnih protiteles in dokazu prisotnosti virusnega genoma.^{19, 20}

Raziskav na prisotnost virusov EBLV pri netopirjih v Sloveniji še ni bilo, zato je bil namen naše raziskave z aktivnim terenskim vzorčenjem ugotoviti epizootiološko stanje

pri različnih vrstah netopirjev. Ciljne vrste so bile zaradi višje stopnje možnosti okužbe pozni netopir in obvodni netopir (močvirski pri nas še ni bil zabeležen) ter dodatno še mali podkovnjak (*Rhinolophus hipposideros*), navadni netopir (*Myotis myotis*) in navadni mračnik (*Nyctalus noctula*), ki običajno tvorijo gruč in živijo v stavbah ter tako lahko pogosteje prihajajo v stik z ljudmi. V Sloveniji so netopirji uvrščeni med ogrožene živalske vrste, zato je vzorčenje omejeno le na bris ustne votline in odvzem vzorca krvi. Namen sedanje študije je ugotoviti stanje okužb z lisavirusi pri netopirjih v Sloveniji s specifičnimi metodami za dokazovanje virusa in protiteles ter strokovne skupine opozoriti na potrebne ukrepe, da zavarujemo osebe, ki je netopirjem najpogosteje izpostavljeno.

Materiali in metode

Zbiranje in odvzem vzorcev

Dovoljenje za ujetje, vznemirjenje in začasen odvzem iz narave ter odvzem vzorcev je izdala Agencija Republike Slovenije za okolje z odločbo št. 35701-80/2004. Ciljne vrste netopirjev smo lovili v njihovih zatočiščih (npr. pozne in navadne netopirje, navadne mračnike in male podkovnjake), če pa teh nismo poznali, smo jih prestregli v njihovih prehranjevalnih habitatih ali na vhodih v njihova možna zatočišča. Vzorcna mesta smo razporedili čim bolj enakomerno po vsem območju pojavljanja posamezne tarčne vrste v Sloveniji. Na zatočiščih smo posamezne živali ulovili z roko ali v ročno mrežo, v prehranjevalnih habitatih pa smo razpeli tanke mreže, v katere so se ujeli tam letajoči netopirji. Netopirjev nismo lovili tik pred zadnjimi fazami brejosti netopirk in v času, ko mladiči še niso dovolj odrasli, da bi se začeli prehranjevati sami. Vse ujete netopirje smo stekali, izmerili dolžino podlakti ter določili vrsto, spol, starost, spolno zrelost ter jim odvzeli vzorce sline in krvi. Vse vzorčene netopirje smo obročkali, da bi osebe prepoznali v prihodnosti.

Odvzem brisov ustne votline je potekal pri živih netopirjih s pomočjo majhnih kr-

tačk, katerih terminalne dele smo shranili v prenosno tekočino, ki ohranja RNA (RNA-later, Qiagen, Nemčija). Pri mrtvih živalih pa smo s krtačko vzeli bris možganov iz notranjosti lobanjske votline. Vzorce krvi smo jemali iz interfemorale vene na repni opni.²¹ Pri odvzemu krvi smo upoštevali največje dopustne prostornine vzorca odvzete krvi, tako da je bila še sprejemljiva količina odvzema krvi pod 13 % celotne prostornine krvi oz. malo manj kot 1 % telesne mase.^{22, 21}

Metoda RT-PCR – dokazovanje genoma lisavirusov

Preiskali smo 298 vzorcev ciljnih vrst netopirjev s področja cele Slovenije, od tega je bilo 260 brisov slin iz ustne votline in 38 brisov možganov iz lobanjske votline.

Osamitev RNA je potekala v skladu z navodili proizvajalca komercialnega kompleta QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Nemčija). V vsako izvedbo testa smo vključili pozitivno in negativno kontrolo od začetka osamitve RNA dalje. Izolirano RNA smo do nadaljevanja postopka shranili pri -60°C . Reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (RT-PCR) sta potekali po že opisanem postopku z oligonukleotidnima začetnikoma BB2 (5' AAA CTT GTC CCC GGG TT 3') in JW6-E (5' CAG TTG GCA CAC ATC TTG TG 3').²³ Uporabili smo komercialni komplet One-Step RT-PCR Kit (Qiagen, Nemčija). Pričakovana velikost specifičnega produkta RT-PCR pri pozitivnem rezultatu je 506 baznih parov. Reakcija RT-PCR je potekala v celokupnem volumnu 25 μl . Reakcijska mešanica je vsebovala 5-kratni pufer PCR, 10 mM mešanice dNTP, 200 nM vsakega začetnega oligonukleotida, encimsko mešanico RT-PCR in 2 μl izolirane RNA. Pomnoževanje tarčnega odseka nukleinske kisline na genu za N protein je potekalo: 30 minut pri 50°C , 15 minut pri 95°C , 40 ciklov po 30 sekund pri 95°C , 30 sekund pri 54°C , 1 minuto pri 72°C in zaključno podaljševanje produktov PCR 10 minut pri 72°C . Za dokazovanje produktov RT-PCR smo uporabljali 1,8-odstotni agarozni gel, produkte pomnoževanja pa obarvali z etidijevim bromidom in njihovo velikost analizirali skupaj z markerjem gradientne lestvice, velikosti 100 bp, v UV transiluminatorju.

Test FAVN za dokaz specifičnih protiteles

Krvne vzorce smo v laboratorij dostavili v steklenih kapilarah z antikoagulantom. Zaradi pogosto majhnih količin seruma (od 5 do 50 μl) smo 2–4 vzorce netopirjev iz istih kolonij združevali ter jih nato inaktivirali 30 minut pri 56°C . V mikroplošče s 96 jamicami smo nanесли po 100 μl gojišča za celično kulturo BHK 21 (gojišče OptiMEM z dodatkom 5-odstotnega govejega fetalnega seruma). V prvo jamico kolone smo nanесли 50 μl preiskovanega vzorca in pripravili trikratne razredčine ter v vsako jamico dodali po 50 μl virusa stekline (referenčni sev CVS) v količini od 25 do 100 TCID₅₀ / 50 μl . Na enak način kot preiskovane vzorce smo pripravili razredčine pozitivnega seruma z vsebnostjo 0,5 I.E./ml protiteles proti virusu stekline (pozitivna kontrola testa). V vsak test smo vključili ustrezno število jamic za kontrolo titra virusa in za kontrolo celic. Mikroploščo smo inkubirali 1 uro pri 37°C ter nato v vse jamice nanесли po 50 μl suspenzije celične kulture BHK 21 v gostoti 300.000 celic/ml. Mikroplošče smo inkubirali 44 do 50 ur pri 37°C in nato celice fiksirali na dno mikroplošč s 85-odstotnim acetonom. Po spiranju s fosfatnim pufrom smo v vse jamice nanесли po 50 μl imunofluorescenčnega konjugata (s FITC označena monoklonalna protitelesa proti virusu stekline, BIO-Rad, Francija), inkubirali 60 minut pri 37°C , mikroplošče sprali in rezultate odčitali pod fluorescenčnim mikroskopom.

Rezultati

Ker lovljenje v mrežo ni vrstno specifična metoda, so se pri zbiranju vzorcev v mreže ujele tudi nekatere druge vrste netopirjev (Tabela 1).

Preiskali smo 260 vzorcev brisov ustne votline in 38 vzorcev brisov možganov. Vzorci so pripadali 11 različnim vrstam netopirjev (Tabela 1). V preiskanih vzorcih z metodo RT-PCR nismo ugotovili prisotnosti lisavirusov. Z metodo FAVN smo na

Tabela 1: Vrste ciljnih vzorčenih netopirjev (*Eptesicus serotinus*, *Rhinolophus hipposideros*, *Myotis myotis*, *Myotis daubentonii*, *Nyctalus noctula*) in ostalih vrst vzorčenih netopirjev s številom in vrsto odvzetih vzorcev ter rezultati dokazovanja virusne nukleinske kisline z metodo RT-PCR

Vrsta	Št. brisov ustne votline	Št. brisov lobanjske votline	Rezultati
Pozni netopir (<i>Eptesicus serotinus</i>)	61	0	61 x neg.
Mali podkovnjak (<i>Rhinolophus hipposideros</i>)	63	7	70 x neg.
Navadni netopir (<i>Myotis myotis</i>)	55	5	60 x neg.
Obvodni netopir (<i>Myotis daubentonii</i>)	21	0	21 x neg.
Navadni mračnik (<i>Nyctalus noctula</i>)	35	7	42 x neg.
Resasti netopir (<i>Myotis nattereri</i>)	1	0	1 x neg.
Skupina brkati netopirjev (<i>Myotis mystacinus</i> s. lat.)	5	0	5 x neg.
Dolgonogi netopir (<i>Myotis capaccinii</i>)	1	0	1 x neg.
Drobni netopir (<i>Pipistrellus pygmaeus</i>)	13	0	13 x neg.
Belorobi netopir (<i>Pipistrellus kuhlii</i>)	3	19	22 x neg.
Nathusijev netopir (<i>Pipistrellus nathusi</i>)	2	0	2 x neg.
Skupaj	260	38	298 x neg.

prisotnost protiteles proti virusu stekline pri istih netopirjih pregledali tudi 216 vzorcev krvi. V nobenem od vzorcev krvi nismo dokazali specifičnih protiteles.

Razpravljanje

Postavitev suma okužb z virusi EBLV je pri netopirjih težavna, ker netopirji običajno ne kažejo vidnih sprememb v obnašanju. Za spremljanje in ugotavljanje razširjenosti okužb pa je odvzem ustreznih vzorcev živim, še zlasti pa mrtvim netopirjem, izrednega pomena. Pri živih netopirjih je mogoče določati prisotnost virusne RNA v vzorcu slin ali pa določati protitelesa proti virusu EBLV v odvzetem vzorcu krvi. Stopnja ugotovljene seroprevalence se v posameznih študijah močno razlikuje. Iz Anglije poročajo o seroprevalenci, nižji od 4 %, ²⁴ medtem

ko v Španiji v posameznih letih ugotavljajo do 50 % serološko pozitivnih vzorcev. ²⁵

Rezultati laboratorijskega testiranja na prisotnost virusa in protiteles proti virusu EBL pri netopirjih kažejo, da v Sloveniji v preiskovanih vzorcih nismo potrditi prisotnosti virusov EBL. Zaradi sorazmerno majhnega števila preiskovanih vzorcev na podlagi teh rezultatov prisotnosti okužb z virusi EBL pri netopirjih v Sloveniji ne moremo izključiti, vsekakor pa lahko predvidimo, da je razširjenost virusov EBLV v Sloveniji nizka, saj v nobenem vzorcu nismo ugotovili niti protiteles niti virusne nukleinske kisline. V nekaterih raziskavah so uporabljali postopek RT-PCR, ki mu je sledil postopek nested-PCR, in s tem povečali občutljivost testa. Poročajo tudi, da je aktivnih okužb sorazmerno malo. Predvsem v primeru okužbe z EBLV-1 in EBLV-2 se v slini iz-

loča nizka koncentracija virusa, pri čemer je občutljivost reakcije še toliko bolj pomembna.²⁶ Število ugotovljenih primerov okužb je odvisno od razširjenosti okužbe na nekem področju, pomemben pa je tudi način vzorčenja glede na tarčne vrste netopirjev ter aktivno odkrivanje in zbiranje poginulih netopirjev. Literatura opisuje prisotnost lisavirusov tudi pri selitvenih vrstah netopirjev, kot so navadni mračnik (*Nyctylus noctula*), Nathusijev netopir (*Pipistrellus nathusii*) in dvobarvni netopir (*Vespertilio murinus*).¹⁷ Omenjene selitvene vrste netopirjev lahko pričakujemo v Sloveniji v jesenskem obdobju s področja severne Evrope, od koder poročajo o netopirjih, pozitivnih na EBLV. V Nemčiji je bilo 92,5 % vseh ugotovljenih pozitivnih primerov EBLV pri vrsti pozni netopir.²⁷ V obdobju od 1977 do 2006 so pri netopirjih v Evropi ugotovili 831 primerov okužb z virusi EBLV 1, le pri 15 primerih pa so bili izolirani virusi uvrščeni v genotip EBLV 2.²⁸ Tako bo v prihodnje za natančnejšo oceno epizootiološke situacije pri nas potrebno v program vzorčenja vključiti tudi večje število selitvenih vrst netopirjev. Test FAVN bo potrebno prilagoditi majhni količini vzorca in v testu namesto CVS uporabiti virus EBL 1, ker nekateri poročajo, da do navzkrižne reakcije protiteles netopirjev s CVS ne pride vedno.²⁵ Več pozornosti bo potrebno nameniti tudi pasivnemu vzorčenju poginulih netopirjev, saj se okužba z lisavirusi lahko konča s smrtjo netopirja. Številni pozitivni primeri, ugotovljeni v Nemčiji, temeljijo predvsem na pasivnem vzorčenju.²⁷ Iz Združenih držav Amerike (ZDA) poročajo, da je z virusom stekline okužen manj kot 1 % vzorčenih živih netopirjev in 5–15 % naključno vzorčenih in najdenih poginulih netopirjev, vendar so v ZDA netopirji okuženi z lisavirusom genotipa 1, genotipov 5 in 6, kamor sta uvrščena EBLV 1 in EBLV 2, niso ugotovili.⁴ Virusi genotipov EBLV 1 in EBLV 2 v Ameriki niso bili nikoli potrjeni.³³ Večina strokovne literature s tematiko EBLV vključuje preiskave brisov lobanjske votline ali celo vzorcev možganov, ki so bili pozitivni na EBLV, zato bo v prihodnje potrebno tudi pri nas intenzivneje izvajati program pasivnega vzorčenja netopirjev.

Potrjeni primeri smrtnih okužb ljudi z virusi genotipov EBLV 1 in EBLV 2 v zadnjem desetletju opozarjajo na pomen preventivnih ukrepov ob stiku človeka z netopirji. Vsak ugriz netopirja je potrebno obravnavati takoj in ga jemati skrajno resno. Literatura kot preventivni ukrep navaja cepljenje proti steklini in po ugrizu zaščito z imunoglobulini.³⁴ Če je le mogoče, je potrebno na prisotnost EBLV testirati tudi netopirja. Vsekakor pa velja priporočilo, da mora biti osebe cepljeno proti steklini, če lahko pride v stik z virusom ob vzorčenju ali izvajanju laboratorijskih analiz.⁴

V Sloveniji izvajamo cepljenje proti steklini na podlagi Pravilnika in Letnega programa imunoprofilakse in kemoprofilakse.^{29, 30, 35} Pri strokovnih odločitvah upoštevamo tudi navodila različnih strokovnih ustanov po svetu, predvsem pa navodila, ki jih pripravlja Svetovna zdravstvena organizacija.³¹ Cepimo vse starostne skupine v skladu z indikacijami, ki jih postavi zdravnik specialist antirabične ambulate območnih Zavodov za zdravstveno varstvo. Cepiva in imunoglobulini, ki so na voljo v Sloveniji, ponujajo visoko zaščitno raven proti steklini.

Cepljenje pred izpostavitvijo je obvezno za dijake in študente veterinarske stroke pred pričetkom praktičnega pouka, ki bi lahko bil združen z okužbo z virusom stekline. Cepljenje je obvezno tudi za poklicno izpostavljene osebe. Cepi se s 3 odmerki cepiva ter z 1 odmerekom po 1 letu v skladu s shemo za cepljenje pred izpostavitvijo. Cepljenje proti steklini priporočamo tudi potnikom, ki potujejo v dežele, kjer je tveganje za okužbo s steklino veliko. Cepljenje proti steklini po izpostavitvi je obvezno za osebo, ki jo je ugriznila ali kako drugače ranila stekla žival ali žival, za katero sumimo, da je stekla. Pougrizno zdravljenje lahko hkrati s prvim odmerkom cepiva vključuje tudi pripravek humanih imunoglobulinov proti steklini.

V Sloveniji nabiramo izkušnje tudi s cepljenjem proti steklini pred izpostavitvijo in po njej v primerih ugriza netopirja doma ali v tujini.³² Ocenjujemo, da je potrebno nadaljnje ozaveščanje prebivalstva in strokovne javnosti o morebitnem izpostavljanju steklini in možnosti učinkovite predizpostavitvene in poizpostavitvene zaščite proti tej bolezni.

Literatura

- Bourhy H, Kissi B, Tordo N. Molecular diversity of the Lyssavirus genus. *Virology* 1993; 194: 70–81.
- Kuzmin IV, Orciari AL, Arai YT, Smith JS, Hanlon CA, Kameoka Y, et al. Bat lyssaviruses (Aravan and Khujand) from Central Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences. *Virus Res* 2003; 97: 65–79.
- Arai YT, Kuzmin IV, Kameoka Y, Botvinkin AD. New lyssavirus genotype from the Lesser Mouse-eared Bat (*Myotis blythi*), Kyrgyzstan. *Emerging Infectious Diseases* 2003; 9: 1623–5.
- Greene CE, Rupprecht CE. Rabies and other lyssavirus infections. In: Greene CE. *Infectious diseases of the dog and cat*. 3rd ed. Philadelphia: Saunders; 2006. p. 167–83.
- Castilho JG, Canello FM, Scheffer KC, Achkar SM, Carrieri ML, Kotait I. Antigenic and genetic characterization of the first rabies virus isolated from the bat *Eumops perotis* in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2008; 50: 95–9.
- Badrane H, Bahloul C, Perrin P, Tordo N. Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. *J Virol* 2001; 75: 3268–76.
- Amengual B, Withby JE, King A, Serra-Cobo J, Bhoury H. Evolution of European bat lyssaviruses. *J Gen Virol* 1997; 78: 2319–28.
- Fooks AR, Brookes SM, Johnson N, McElhinney LM, Huston AM. European bat Lyssavirus: an emerging zoonosis. *Epidem Infect* 2003; 131: 1029–39.
- Vos A, Kaipf I, Denzinger A, Fooks AR, Johnson N, Müller T. European bat lyssaviruses – an ecological enigma. *Acta Chripterologica* 2007; 9: 283–96.
- Ronsholt L. A new case of European bat lyssavirus (EBL) infection in Danish sheep. *Rab Bull Europe* 2002; 2: 15.
- Müller T, Cox J, Peter W, Schafer R, Bodamer P, Wulle U, et al. Infection of a stone marten with European bat lyssa virus (EBL1). *Rab Bull Europe* 2002; 25: 9–11.
- Picard-Meyer E, Brookes SM, Barrat J, Litaize E, Patron C, Biarnais M, et al. Experimental infection of foxes with European bat lyssaviruses type-1 and -2. *Dev Biol (Basel)* 2008; 131: 339–45.
- Selimov MA, Tatrov AG, Botvinkin AD, Klueva EK, Kulikova LG, Khismatullina NA. Rabies-related Yuli virus; identification with a panel of monoclonal antibodies. *Acta Virol* 1989; 33: 542–5.
- Lumio J, Hillbom M, Roine R, Ketonen L, Haltia M, Valle M, et al. Human rabies of bat origin in Europe. *Lancet* 1986; 1: 378.
- Fooks AR, Finnegan C, Johnson N, Mansfield K, McElhinney L, Manser P. Human case of EBL type 2 following exposure to bats in Angus, Scotland. *Vet Rec* 2002; 151: 679.
- Presetnik P, Podgorelec M, Grobelnik V, Šalamun A. Monitoring populacij izbranih ciljnih vrst netopirjev. Ljubljana: Ministrstvo za okolje in prostor; 2007.
- Hutterer R, Ivanova T, Mayer-Cords C, Rodrigues L. Bat migrations in Europe. *NHBS* 2005; 28: 126–7.
- Picard-Meyer E, Barrat, Tissot E, Verdout A, Patron C, Barrat MJ, et al. Rabies Surveillance in France, from 1989 through May 2005. In: Dodet B, Schudel A, Pastoret PP, Lombard M, eds. *Rabies in Europe*. *Dev Biol* 2006; 125: 283–8.
- Echevarría JE, Avellón A, Juste J, Vera M, Ibáñez C. Screening of active lyssavirus infection in wild bat populations by viral RNA detection on oropharyngeal swabs. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3678–83.
- Vázquez-Morón S, Avellón A, Echevarría JE. RT-PCR for detection of all seven genotypes of Lyssavirus genus. *J Virol Methods* 2006; 135: 281–7.
- Wimsatt J, O'Shea TJ, Ellison LE, Pearce RD, Price VR. Anesthesia and blood sampling of wild big brown bats (*Eptesicus fuscus*) with an assessment of impacts on survival. *Journal of Wildlife Diseases* 2005; 41: 87–95.
- Hoff J. Methods of blood collection in the mouse. *Lab Animal* 2000; 29: 47–53.
- Black EM, McEllhiney LM, Lowings JP, Smith J, Johnstone P, Heaton PR. Molecular methods to distinguish between classical rabies and the rabies-related European bat lyssaviruses. *J Virol Meth* 2000; 87: 123–31.
- Brookes SM, Aegerter JN, Smith GC, Healy DM, Jolliffe TA, Swift SM, et al. European bat lyssaviruses in Scottish bats. *Emerging Infectious Diseases* 2005; 11: 572–8.
- Serra-Cobo J, Amengual B, Abellán C, Bourhy H. European bat lyssavirus infections in Spanish bat populations. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 413–20.
- Vos A, Müller T, Cox J, Neubert L, Fooks AR. Susceptibility of ferrets (*Mustela putorius furo*) to experimentally induced rabies with European Bat Lyssaviruses (EBLV). *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2004; 51 2: 55–60.
- Müller T, Johnson N, Freuling CM, Fooks AR, Selhorst T, Vos A. Epidemiology of bat rabies in Germany. *Arch Virol* 2007; 152: 273–88.
- Freuling C, Grossmann E, Conraths FJ, Schameitath A, Kliemt J, Auer E, et al. First isolation of EBLV-2 in Germany. *Vet Microbiol* 2008; 131: 26–34.
- WHO. WHO expert consultation on rabies: First Report. WHO Technical Report Series 931, 2005. Dosegljivo na: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_931_eng.pdf
- Stantič Pavlinič M, Grom J. Netopir v našem okolju. *Zdrav Vestn* 2005; 74: 245–7.
- Uredba o zavarovanih prosto živečih živalskih vrstah. *Ur. list RS* 46/2004, 109/2004, 84/2005, 115/2007.
- WHO. WHO expert consultation on rabies: First Report. WHO Technical Report Series 931, 2005. Dosegljivo na: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_931_eng.pdf
- De Serres G, Dallaire F, Côte M, Skowronski DM. Bat rabies in the United States and Canada from 1950 through 2007: human cases with and without bat contact. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 1329–37.
- Van der Poel WHM, Van der Heide R, Varstraten ERAM, Takumi K, Lina PHC, Kramps J. European bat lyssaviruses, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2005; 12 11: 1854–9.
- Pravilnik o določitvi programa imunoprofilakse in kemoprofilakse za leto 2009 *Ur. list*, 24/2009. Dosegljivo na: http://www.uradni-list.si/_pdf/2009/Ur/u2009024.pdf