

Wirusowa krwotoczna choroba królików – nowe aspekty immunologiczne i anatomopatologiczne

Katarzyna Paździor, Iwona Otrocka-Domagala, Tadeusz Rotkiewicz, Agnieszka Drzewiecka

z Katedry Anatomii Patologicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Olsztynie

Wirusowa krwotoczna choroba królików została po raz pierwszy stwierdzona w 1984 r. w Chinach (1), dlatego nazywana była chińskim pomorem królików. Choroba jest szeroko rozpowszechniona na całym świecie, a szybkość jej rozprzestrzeniania się zależy od gęstości populacji królików oraz pory roku (2). Wraz z myszomatozą stanowi poważny problem ekonomiczny w hodowli królików użytkowych oraz ozdobnych i z tego względu podlega obowiązkowej urzędowej rejestracji.

Etiopatogeneza

Czynnikiem etiologicznym wirusowej krwotocznej choroby królików jest wirus oznaczany w skrócie jako RHDV – rabbit hemorrhagic disease virus, który łącznie z wirusem wywołującym wirusową krwotoczną chorobę zajęcy (European brown hare syndrome virus – EBHSV) należy do rodziny Caliciviridae, rodzaju *Lagovirus* (3). Wirus RHD jest pozbawiony otoczki, a jego materiał genetyczny stanowi pojedyncza nić (+)RNA (4). Pomimo występowania materiału genetycznego o dużej zmienności, jakim jest kwas rybonukleinowy, szczepki wirusa izolowane na różnych kontynentach wykazują znaczne podobieństwo antygenowe i wywołują powstawanie przeciwciał reagujących krzyżowo z każdym ze szczepów (5). Białka kapsydu (głównie VP60) są wykorzystywane w uzyskiwaniu szczepionek rekombinowanych (6). W obrębie rodziny Caliciviridae, u królików występuje również niepatogeny RCV (rabbit calicivirus), który replikuje się wyłącznie w jeliach i generuje powstawanie przeciwciał reagujących krzyżowo z RHDV (7). Badania Majer-Dziedzic i wsp. (8) wykazały obecność przeciwciał przeciwko RHDV w surowicy królików nieszczepionych, niewykazujących objawów chorobowych, pochodzących z polskich hodowli. Potwierdza to pośrednio występowanie RCV, działającego jak naturalna szczepionka, również na terenie naszego kraju (8).

Na zakażenie RHDV są podatne króliki w każdym wieku, jednak zaobserwowano, że zwierzęta do 8 tygodnia życia nie wykazują objawów chorobowych (9). U doświadczalnie zakażonych młodych

królików stwierdzono zmiany histopatologiczne w wątrobie, jednak ich nasilenie było słabe i nie wywoływały objawów klinicznych choroby (10). Badania Ferreira i wsp. (11) wykazały, że zmiany histopatologiczne w wątrobie młodych królików zakażonych RHDV były jakościowo identyczne, jak u zwierząt dorosłych, jednak dotyczyły niewielkiej liczby hepatocytów, co może tłumaczyć brak objawów chorobowych (11).

Do zakażenia wirusem dochodzi przede wszystkim drogą pokarmową (12). Okres inkubacji wynosi 24–48 godzin (maksymalnie 72 godziny; 13). Komórkami docelowymi dla RHDV są hepatocyty, makrofagi płucne, śledziony, węzłów chłonnych i komórki Kupffera oraz monocyty występujące w naczyniach wątroby, płuc, śledziony i węzłów chłonnych. Poza tym antygeny wirusowe stwierdzono w komórkach mezangium kłębuszków nerkowych i komórkach tkanki łącznej śródmiąższowej nerek (14, 15). W wyniku replikacji wirusa dochodzi do uszkodzenia wątroby i wielu innych narządów wewnętrznych oraz rozwija się rozsiane krzepnięcie wewnątrznaczyniowe (disseminated intravascular coagulation – DIC), które prowadzi do znacznego nasilenia zmian morfologicznych w płucach, śledzionie i węzłach chłonnych. W wyniku narastania uszkodzeń wielu narządów śmierć królików następuje w 90% przypadków w ciągu 48–72 godzin od zakażenia (16). Badania Jung (17) wykazały związek pomiędzy zakażeniem RHDV a apoptozą hepatocytów. Jedną z najczęściej badanych przyczyn piorunującego przebiegu tej choroby u królików jest spadek odporności mający miejsce tuż po zakażeniu RHDV. Wykazano, że zmiana aktywności neutrofilów oraz po części monocytów i makrofagów, a także limfocytów T (wraz z populacjami T_c, T_s, T_h) i B wpływa na dynamiczny przebieg RHD (18). Na poziomie molekularnym w zakażeniu RHDV zaobserwowano wzrost uwalniania reaktywnych form tlenu (reactive oxygen species – ROS), aktywację czynnika transkrypcyjnego NF-κB (nuclear factor κB), spadek ekspresji czynnika wzrostu hepatocytów (hepatocyte growth factor – HGF) oraz jego receptora c-met

Rabbit haemorrhagic disease (RHD) – recent immunological and pathological findings

Paździor K., Otrocka-Domagala I., Rotkiewicz T., Drzewiecka A., Department of Pathological Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury in Olsztyn

The aim of this paper was to present some recent findings on rabbit hemorrhagic disease (RHD). This is a highly contagious, fatal disease of European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), caused by RHD virus from genus *Lagovirus* of *Caliciviridae* family. RHD is a notifiable disease that has to be reported to the relevant authority in Poland. Characteristic gross necropsy lesions are enlargement of the liver and spleen. Viral replication occurs in hepatocytes and macrophages, leading to fulminant liver failure due to the massive organ necrosis which is believed to be the trigger for disseminated intravascular coagulation. In animals older than 8 weeks RHD manifests clinically with dyspnoea and neurological symptoms. The course of the disease is often rapid and leads to death. Rabbits less than 6 weeks of age are not susceptible for fatal disease. Severely damaged organ is the liver which shows lymphocytic infiltration, piecemeal necrosis and sometimes syncytial giant cell hepatitis. Diagnostic procedures require molecular biology methods. An effective vaccine is available.

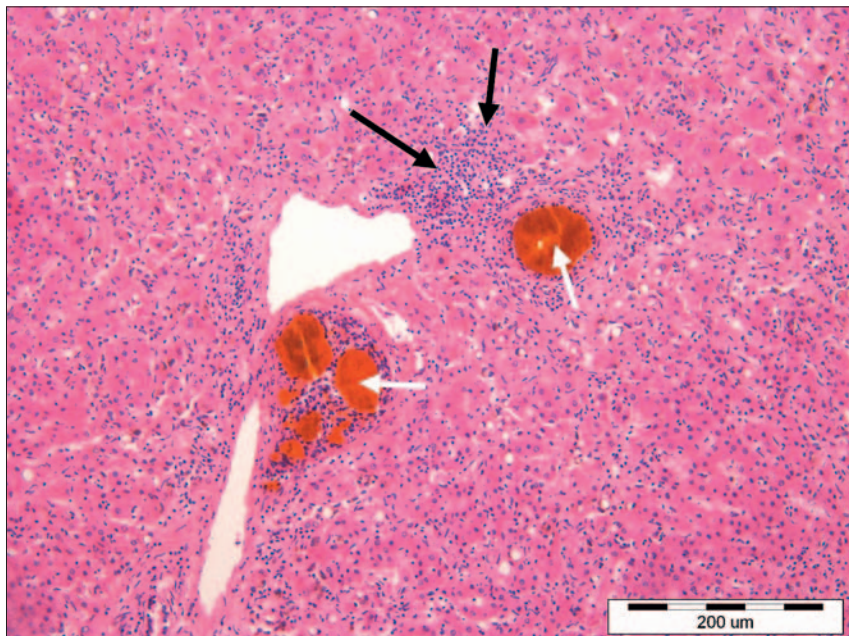
Keywords: RHDV, rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), fulminant liver failure, diagnostic procedures.

(hepatocyte growth factor receptor) oraz wzrost ekspresji transformującego czynnika wzrostu – β1 (transforming growth factor β1 – TGF-β1; 19). Wykazano, że aktywacja kinazy aktywowanej stresem (c-Jun N-terminal kinase – JNK) jest kluczowym mechanizmem powstawania uszkodzenia wątroby przy zakażeniu RHDV. Towarzyszy jej brak aktywacji czynnika transkrypcyjnego STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), przyczyniający się do zahamowania procesów regeneracyjnych wątroby (20).

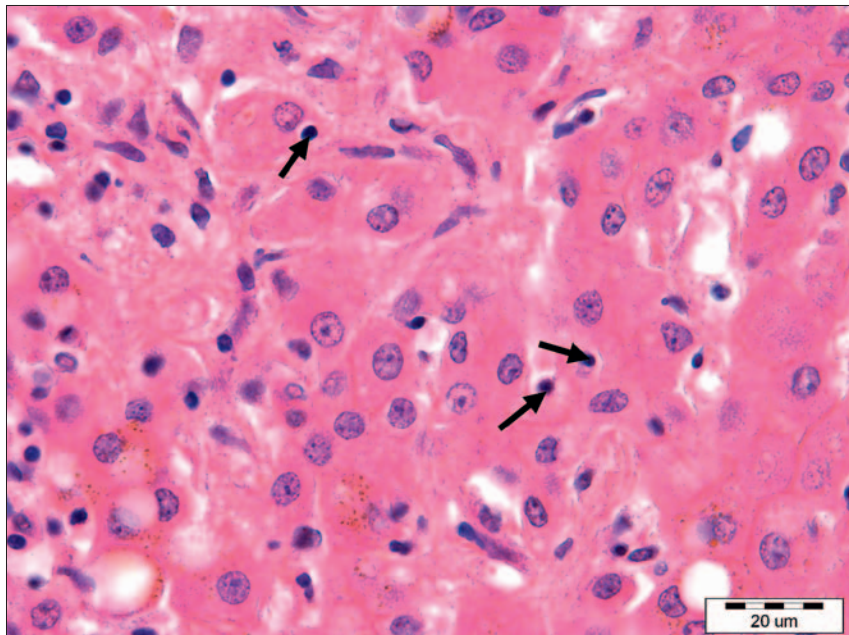
Zakażenie RHDV u królików służy jako model niewydolności wątroby o gwałtownym przebiegu w badaniu patogenetycznym wirusowych zapaleń wątroby u ludzi, jak również w ocenie działania substancji wykazujących działanie hepatoprotekcyjne (19, 21, 22).

Objawy kliniczne

Choroba może występować w trzech postaciach klinicznych: nadostrej, ostrej i podostrej. W postaci nadostrej zwierzęta padają nagle bez objawów chorobowych. Taki przebieg choroby obserwuje się na początku epizootii w populacjach, które pierwszy raz stykają się z RHDV. Postać ostra pojawia się w populacjach,



Ryc. 1. Naciek licznych limfocytów wokół przestrzeni bramnej (czarne strzałki) oraz zastój żółci w kanalikach żółciowych (białe strzałki). Barwienie HE



Ryc. 2. Obraz mikroskopowy wątroby objętej martwicą kęсовą. Limfocyty widoczne w obrębie cytoplazmy hepatocytów (strzałki). Barwienie HE

w których RHD występuje enzootycznie i manifestuje się zróżnicowanymi objawami klinicznymi. Najczęściej obraz kliniczny jest mało charakterystyczny. Stwierdza się wzrost temperatury ciała powyżej 41°C, duszność, osłabienie, utratę łaknienia oraz gwałtowną biegunkę. Następnie dochodzi do objawów neurologicznych, jak ataksja, ruchy wiosłowe, opistotonus (23), opieranie czoła o podłoże, konwulsje i w końcu pojawia się śpiączka (16). Badaniem laboratoryjnym krwi stwierdza się limfopenię i trombocytopenię (23), obniżenie poziomu czynników krzepnięcia V i VII, wydłużenie czasu protrombinowego, wzrost aktywności aminotransferazy

asparaginianowej (AST), aminotransferazy alaninowej (ALT) i dehydrogenazy mleczanowej (LDH) oraz podwyższenie poziomu bilirubiny i hipoglikemię (16). Aktywność AST, ALT oraz LDH oraz stężenie bilirubiny wzrastają znacząco już 36 godzin po zakażeniu (19). Badania Ferreira i wsp. (11) wykazały, że do 18 godzin po zakażeniu nie obserwuje się zmian w obrazie morfologicznym krwi, natomiast 6 godzin przed śmiercią pojawia się ostra leukopenia, dotycząca zarówno heterofilów (neutrofilów), jak i limfocytów z trombocytopenią. Znaczny wzrost aktywności enzymów wątrobowych (AST, ALT, AP, GGT) stwierdza się 6-12 godzin przed śmiercią

(24). Badania Marques i wsp. (25) wykazały, że zmniejszenie ilości limfocytów T i B w śledzionie i wątrobie jest spowodowany apoptozą tych komórek, następująco szybko po zakażeniu i poprzedza wystąpienie uszkodzenia wątroby – stąd pod dyskusję poddaje się rolę tego zjawiska w patogenecie choroby (25). Postać podostra choroby jest rzadko obserwowana, głównie pod koniec epizootii (23) i charakteryzuje się słabo wyrażonymi objawami klinicznymi, podobnymi do objawów występujących w postaci ostrej. U młodych, a więc niezapadających na RHD królików po zakażeniu doświadczalnym wykazano ostrą, ale krótkotrwałą heteropenię oraz stały wzrost aktywności wątrobowych transaminaz (11).

Zmiany anatomopatologiczne

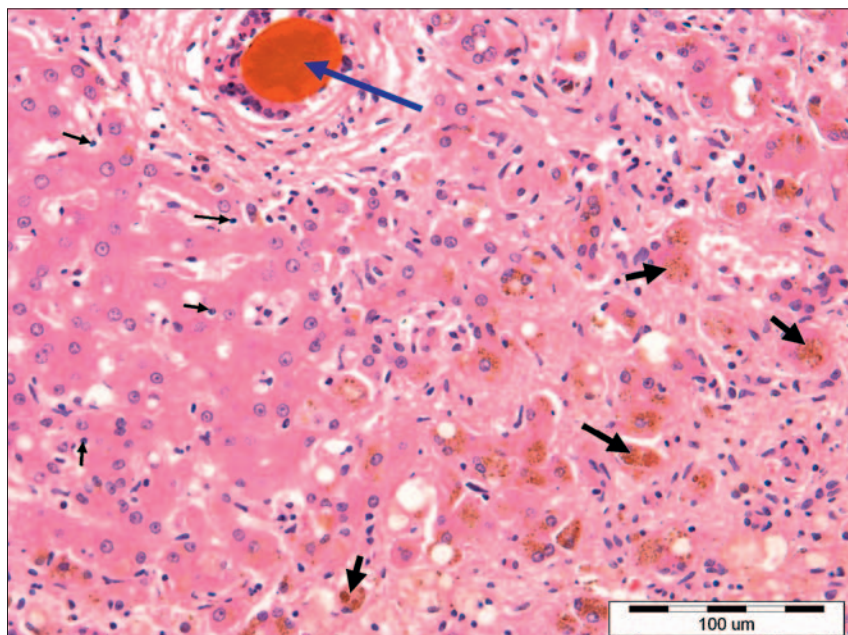
Z uwagi na gwałtowny przebieg choroby zwierzęta padają z reguły w dobrej kondycji, a wypełnienie przewodu pokarmowego treścią wskazuje na niedawne spożycie pokarmu. Makroskopowo stwierdza się największe uszkodzenie morfologiczne w wątrobie, która jest jasnobrunatna, czasami żółta lub szarobrunatna, przy ucisku krucha. Powierzchnia wątroby jest ziarnista, pomarszczona, usiana różnej wielkości guzkami. Na przekroju stwierdza się przekrwienie zastoinowe, wyraźną budowę zrazikową i brunatno-czerwone ogniska martwicy mięszu wątrobowego. W płucach stwierdza się liczne o różnej wielkości wynaczynienia krwi, które także mogą występować w wątrobie, nerkach i pod nasierdziem. Śledziona jest obrzęta i przekrwiona. U niektórych zwierząt można stwierdzić różne postaci zapalenia wysiękowego błony śluzowej tchawicy i płuc. Czasami stwierdza się żółtaczkę, krwiaki głównie w płucach, rzadziej w innych narządach. Wyjątkowo stwierdza się nieżytowe zapalenie błony śluzowej jelit.

W badaniu histopatologicznym stwierdza się drobnoogniskową, rozsianą martwicę skrzepową wątroby z wynaczynieniami i naciekiem komórek jednojądrzastych (**ryc. 1**). W niektórych przypadkach w hepatocytach występują cytoplazmatyczne, eozynofilne ciała wtrętowe. W śledzionie i węzłach chłonnych stwierdza się martwicę tkanki limfatycznej. Rzadziej występuje kłębuszkowe zapalenie nerek, limfocytarne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego oraz zapalenie nieżytowe błony śluzowej jelit (23). Na uwagę zasługuje bardzo charakterystyczna martwica komórek wątrobowych, która powstaje w przebiegu tego zakażenia. Martwica ta ma cechy tzw. martwicy kęсовej (piecemeal necrosis), w której limfocyty na drodze internalizacji powierzchniowych

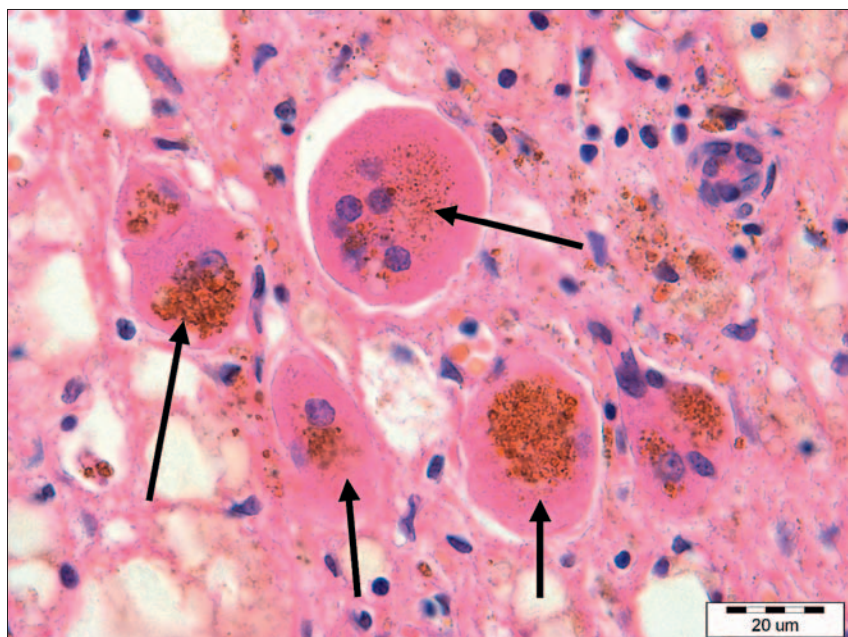
białek hepatocytów doprowadzają do ich stopniowego zaniku (26). Wyrazem morfologicznym tego procesu jest występowanie limfocytów w pobliżu i w cytoplazmie zakażonych hepatocytów (ryc. 2, 3). Może też występować olbrzymiokomórkowe zapalenie wątroby (syncytial giant cell hepatitis), które charakteryzuje się obecnością wielojądrowych komórek olbrzymich powstających w wyniku fuzji hepatocytów (27; ryc. 4). Alexandrov i wsp. (28) obserwowali obecność nacieków granulocytarnych w wątrobie oraz ciekawe zjawisko penetracji granulocytów w głąb cytoplazmy hepatocytów (*emperipolesis*). Ponadto opisali również w obrębie hepatocytów obecność barwników żółciowych, obrzmienie cytoplazmy oraz zmiany w jądrze komórkowym w postaci kariolizy i pyknozy, a także rozpad hepatocytów na ciała apoptotyczne. Ferreira i wsp. (29) wykazali, że u 4-tygodniowych królików po 48 godzinach od zakażenia wirusem naciek zapalny składał się głównie z limfocytów. U dorosłych królików (10-tygodniowych) w naciekach komórkowych w wątrobie dominują granulocyty. Stwierdzono zależność pomiędzy aktywnością AST we krwi a stopniem uszkodzenia hepatocytów. 20-krotny wzrost aktywności AST odpowiadał proliferacji gładkiej siateczki śródplazmatycznej oraz obrzękowi mitochondriów z zanikiem grzebieni mitochondrialnych. 150–200-krotnemu wzrostowi aktywności AST towarzyszyło zwyrodnienie hepatocytów, wakuolizacja cytoplazmy (ryc. 5) oraz uszkodzenie mitochondriów wraz z tworzeniem pęcherzyków autofagocytarnych. Przy ponad 1000-krotnym podwyższeniu aktywności AST macierz mitochondrialna wykazywała spadek gęstości, a wakuole cytoplazmatyczne, pękając tworzyły większe pęcherzyki. Dodatkowo zaobserwowano zmniejszenie ilości glikogenu wątrobowego (30). Wirusowy antygen VP60 stwierdzono immunohistochemicznie w hepatocytach, makrofagach oraz limfocytach królików dorosłych (31). W przebiegu podostrym choroby obserwowano żółtaczkę (ryc. 3) z martwicą pomostową hepatocytów strefy centralnej zrazików, wapnieniem, proliferacją okołobramnych hepatocytów oraz przewodów żółciowych. Dodatkowo stwierdzono utratę architektoniki narządu oraz włóknienie wraz z regeneracją oraz umiarkowanym stanem zapalnym, co składa się na obraz marskości wątroby (32).

Rozpoznawanie i zwalczanie

Nieswoistość objawów klinicznych oraz różnorodność zmian anatomopatologicznych rodzi konieczność przeprowadzania bardziej specyficznych metod



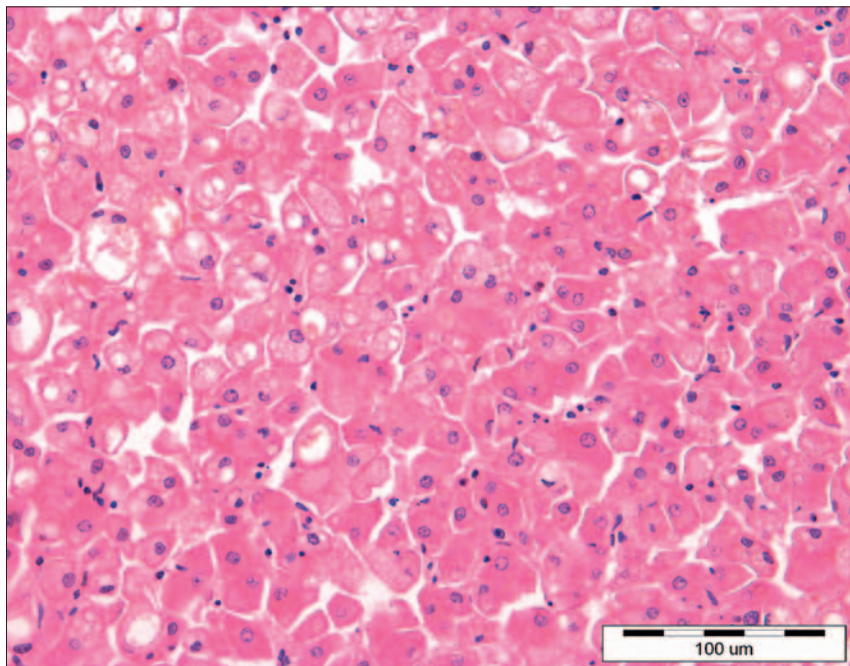
Ryc. 3. Zastój żółci w kanalikule żółciowym (niebieska strzałka), liczne hepatocyty zawierające barwniki żółciowe (grube czarne strzałki) oraz limfocyty w obrębie cytoplazmy hepatocytów (cienkie czarne strzałki). Barwienie HE



Ryc. 4. Komórki olbrzymie wielojądrzaste zawierające barwniki żółciowe – cechy olbrzymiokomórkowego wirusowego zapalenia wątroby. Barwienie HE

diagnozowania choroby. Ostatecznym potwierdzeniem RHD jest znalezienie u danego zwierzęcia antygenu wirusa metodą hemaglutynacji (hemagglutination assay – HA), ELISA, RT-PCR (reverse transcriptase PCR), za pomocą mikroskopu elektronowego lub barwieniem immunohistochemicznym (33). Badania Yang i wsp. (34) wykazały, że metoda RT-PCR jest wysoce specyficzną metodą oraz wielokrotnie bardziej czułą niż HA, bowiem umożliwia wykrycie RHDV w tkankach, w wydzielinie z nosa oraz krwi (nie umożliwia wykrywania wirusa w kale), dlatego może być stosowana do badania diagnostycznego przyżyciowo, jak i pośmiertnie. Do wykrywania

przeciwciał anti-RHDV opracowano między innymi metodę kompetycyjnego testu ELISA (12). Fitzner i wsp. (38) dokonali oceny przydatności HA, ELISA, RT-PCR oraz n-PCR w wykrywaniu antygenu wirusowego po eksperymentalnym zakażeniu królików RHDV. Wykazali, że już po 7–9 godzinach od inokulacji wirusa, możliwa jest jego identyfikacja metodami RT-PCR oraz n-PCR w zakażonych narządach. Metodą ELISA oraz HA wirus jest wykrywalny po 26–39 godzinach od inokulacji (35). W 2001 r. została opracowana metoda IC-RT-PCR (immunocapture by reverse transcription-polymerase chain reaction) służąca wykrywaniu



Ryc. 5. Zwyrrodnienie wodniczkowe hepatocytów i martwica. Barwienie HE

(z czułością 10–100 razy wyższą niż ELISA) oraz dokładnej analizie genomowej wirusa RHDV (36).

W przypadku wybuchu RHD należy ograniczyć możliwości przeniesienia wirusa od zwierząt zakażonych na zdrowe. Do dezynfekcji klatek i pomieszczeń należy używać 1% podchlorynu sodu. Leczenia przyczynowego brak, w przypadku wybuchu choroby na jakiegokolwiek działaniu lekarskim jest już najczęściej za późno, dlatego tak ważna jest profilaktyka. Wszystkie nowo przybyłe zwierzęta należy poddawać kwarantannie, której długość jest dyskusyjna. W przypadku królików pochodzących z terenów enzootycznego występowania RHD kwarantanna powinna trwać 4 miesiące, gdyż tak długo może trwać siewstwo wirusa w kale u osobników, które przeżyły tę chorobę (23). Wydaje się jednak, że nawet kwarantanna trwająca 72 godziny (maksymalny okres inkubacji) pozwoliłaby uchronić resztę stada przed zakażeniem. Stosuje się również uodpornianie czynne. W Polsce dostępne są szczepionki zawierające inaktywowany wirus RHDV. W przypadku podejmowania szczepień królików dzikich stwierdzono, że najdogodniejszym okresem na szczepienia jest druga połowa okresu rozrodczego (37).

RHDV nie namnaża się *in vitro* w hodowlach komórkowych, a źródłem antygenów szczepionkowych są wyłącznie narządy wewnętrzne zakażonych zwierząt (3, 6, 38), co rodzi potrzebę opracowywania szczepionek rekombinowanych. Już w 1997 r. użyto rekombinowanego wirusa ospy kanarków wykazującego ekspresję białka kapsydu vCP309, uzyskując skuteczną szczepionkę przeciwko RHD

(39). Z myślą o ochronie dzikich królików opracowano rekombinowaną szczepionkę przeciwko myksomatozy i RHD, zawierającą wirus myksomatozy wykazujący ekspresję białka kapsydu VP60, mający zdolność horyzontalnej transmisji pomiędzy osobnikami (transmissible vaccine; 6, 40). Fitzner i wsp. (38) opracowali szczepionkę rekombinowaną, syntetyzując białko kapsydu VP60 w oparciu o system bakulowirusowy (38).

Piśmiennictwo

- Liu S.J., Xue H.P., Pu B.Q., Qian N.H.: A new viral disease in rabbits. *Anim. Husb. Vet. Med.* 1984, **16**, 253-255.
- Fa J.E., Sharples C.M., Bell D.J., DeAngelis D.: An individual-based model of rabbit viral haemorrhagic disease in European wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Ecol. Model.* 2001, **144**, 121-138.
- Matiz K., Ursu K., Kecskemeti S., Bajmocy E., Kiss I.: Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) strains isolated between 1988 and 2003 in eastern Hungary. *Arch. Virol.* 2006, **151**, 1659-1666.
- Capucci L., Frigoli G., Ronshold L., Lavazza A., Brocchi E., Rossi C.: Antigenicity of the rabbit hemorrhagic disease virus studied by its reactivity with monoclonal antibodies. *Virus Res.* 1995, **37**, 221-238.
- Berninger M.L., House C.: Serologic comparison of four isolates of rabbit hemorrhagic disease virus. *Vet. Microbiol.* 1995, **47**, 157-165.
- Barcena J., Morales M., Vazquez B., Boga J.A., Parra F., Lucientes J., Pages-Mante A., Sanchez-Vizcaino J.M., Blasco R., Torres J.M.: Horizontal transmissible protection against myxomatosis and rabbit hemorrhagic disease by using a recombinant myxoma virus. *J. Virol.* 2000, **74**, 1114-1123.
- Capucci L., Fallacara F., Grazioli S., Lavazza A., Pacciari M.L., Brocchi E.: A further step in the evolution of rabbit hemorrhagic disease virus: the appearance of the first consistent antigenic variant. *Virus Res.* 1998, **58**, 115-126.
- Majer-Dziedzic B., Szkucik K.: Serologiczna ocena poziomu przeciwciał przeciwko wirusowi krwotocznej choroby królików. *Medycyna Wet.* 2010, **66**, 206-209.
- Ferreira P.G., Dini M., Costa-e-Silva A., Aguas A.P.: Adult rabbits acquire resistance to lethal calicivirus infection by adoptive transfer of sera from infected young rabbits. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2008, **121**, 364-369.
- Mikami O.: Hepatic lesions in young rabbits experimentally infected with rabbit hemorrhagic disease virus. *Res. Vet. Sci.* 1999, **66**, 237-242.

- Ferreira P.G., Costa-e-Silva A., Monteiro E., Oliveira M.J.R., Aguas A.P.: Transient decrease in blood heterophils and sustained liver damage caused by calicivirus infection of young rabbits that are naturally resistant to rabbit haemorrhagic disease. *Res. Vet. Sci.* 2004, **76**, 83-94.
- Collins B.J., White J.R., Lenghaus C., Boyd V., Westbury H.A.: A competition ELISA for the detection of antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus. *Vet. Microbiol.* 1995, **43**, 85-96.
- Donnelly T.M.: Emerging viral diseases of rabbits and rodents: viral hemorrhagic disease and hantavirus infection. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 1995, **4**, 83-91.
- Ramiro-Ibanez F., Martin-Alonso J.M., Garcia Palencia P., Parra F., Alonso C.: Macrophage tropism of Rabbit hemorrhagic disease virus is associated with vascular pathology. *Virus Res.* 1999, **60**, 21-28.
- Kimura T., Mitsui I., Okada Y., Furuya T., Ochiai K., Umemura T., Itakura C.: Distribution of Rabbit haemorrhagic disease virus RNA in experimentally infected rabbits. *J. Comp. Path.* 2001, **124**, 134-141.
- Tunon M.J., Sanchez-Campos S., Garcia-Ferreras J., Alvarez M., Jorquera F., Gonzalez-Gallego J.: Rabbit hemorrhagic viral disease: Characterization of a new animal model of fulminant liver failure. *J. Lab. Clin. Med.* 2003, **141**, 272-278.
- Jung J.Y., Lee B.J., Tai J.H., Park J.H., Lee Y.S.: Apoptosis in rabbit haemorrhagic disease. *J. Comp. Path.* 2000, **123**, 135-140.
- Tokarz-Deptuła B., Deptuła W., Kęsy A.: Pomór królików ze szczególnym uwzględnieniem zjawisk odpornościowych. *Medycyna Wet.* 2002, **58**, 497-500.
- Sanchez-Campos S., Alvarez M., Culebras J.M., Gonzalez-Gallego J., Tunon M.J.: Pathogenic molecular mechanisms in an animal model of fulminant hepatic failure: Rabbit hemorrhagic disease. *J. Lab. Clin. Med.* 2004, **144**, 215-222.
- Garcia-Lastra R., San Miguel B., Crespo I., Jorquera F., Alvarez M., Gonzalez-Gallego J., Tunon M.J.: Signaling pathways involved in liver injury and regeneration in rabbit hemorrhagic disease, an animal model of virally-induced fulminant hepatic failure. *Vet. Res.* 2010, **41**, 2-10.
- San Miguel B., Alvarez M., Culebras J.M., Gonzalez-Gallego J., Tunon M.J.: N-acetyl-cysteine protects liver from apoptotic death in an animal model of fulminant hepatic failure. *Apoptosis* 2006, **11**, 1945-1957.
- Tunon M.J., San Miguel B., Crespo I., Jorquera F., Santamaria E., Alvarez M., Prieto J., Gonzalez-Gallego J.: Melatonin attenuates apoptotic liver damage in fulminant hepatic failure induced by the rabbit hemorrhagic disease virus. *J. Pineal Res.* 2011, **50**, 38-45.
- Belz K.: Rabbit hemorrhagic disease. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 2004, **13**, 100-104.
- Ferreira P.G., Costa-e-Silva A., Oliveira M.J.R., Monteiro E., Cunha E.M., Aguas A.P.: Severe leucopenia and liver biochemistry changes in adult rabbits after calicivirus infection. *Res. Vet. Sci.* 2006, **80**, 218-225.
- Marques R.M., Costa-e-Silva A., Aguas A.P., Teixeira L., Ferreira P.G.: Early acute depletion of lymphocytes in calicivirus-infected adult rabbits. *Vet. Res. Commun.* 2010, **34**, 659-668.
- Wang M.X., Morgan T., Lungo W., Wang L., Sze G.Z., French S.W.: "Piecemeal" necrosis: renamed trolox necrosis. *Exp. Mol. Pathol.* 2001, **71**, 137-146.
- Fimmel C.J., Linsheng G., Compans R.W., Brunt E.M., Hickman S., Perrillo R.R., Mason A.L.: A case of syncytial giant cell hepatitis with features of a paramyxoviral infection. *Am. J. Gastroenterol.* 1998, **93**, 1931-1937.
- Alexandrov M., Peshev R., Lasarova S., Doumanova L., Tchobanov A., BostandIeva R.: Heterophil emperipolesis in rabbit haemorrhagic disease. *Bulg. J. Vet. Med.* 2009, **12**, 43-53.
- Ferreira P.G., Costa-e-Silva A., Oliveira M.J.R., Monteiro E., Aguas A.P.: Leukocyte-hepatocyte interaction in calicivirus infection: differences between rabbits that are resistant or susceptible to rabbit haemorrhagic disease (RHD). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2005, **103**, 217-221.
- Ferreira P.G., Costa-e-Silva A., Monteiro E., Oliveira M.J.R., Aguas A.P.: Liver enzymes and ultrastructure in rabbit haemorrhagic disease (RHD). *Vet. Res. Commun.* 2006, **30**, 393-401.
- Prieto J.M., Fernandez F., Alvarez V., Espi A., Garcia Martin J.F., Alvarez M., Martin J.M., Parra F.: Immunohistochemical localization of rabbit haemorrhagic disease virus VP-60 antigen in early infection of young and adult rabbits. *Res. Vet. Sci.* 2000, **68**, 181-187.
- Teifke J.P., Reimann L., Schirrmeyer H.: Subacute liver necrosis after experimental infection with rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). *J. Comp. Path.* 2002, **126**, 231-234.

33. OIE (The World Organisation of Animal Health): *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 2009, Vol.2 Part.2 Chapter 2.6.2: Rabbit haemorrhagic disease.
34. Yang L., Wang F., Hu B., Xue J., Hu Y., Zhou B., Wang D., Xu W.: Development of an RT-PCR for rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) and the epidemiology of RHDV in three eastern provinces of China. *J. Virol. Methods* 2008, **151**, 24-29.
35. Fitzner A., Kęsy A., Niedbalski W., Paprocka G.: Wykrywanie wirusa krwotocznej choroby królików u chorych zwierząt. *Medycyna Wet.* 2000, **56**, 43-47.
36. Le Gall-Recule G., Zwingelstein F., Portejoie Y., Le Gall G.: Immunocapture-RT-PCR assay for detection and molecular epidemiology studies of rabbit haemorrhagic disease and European brown hare syndrome viruses. *J. Virol. Methods* 2001, **97**, 49-57.
37. Calvete C.: The use of immunization programs in wild populations: modeling effectiveness of vaccination campaigns against rabbit hemorrhagic disease. *Biol. Conserv.* 2006, **130**, 290-300.
38. Fitzner A., Gromadzka B., Kęsy A., Brycka E., Szewczyk B.: Zastosowanie rekombinowanego białka VP60 wirusa RHD do immunizacji królików. *Medycyna Wet.* 2005, **61**, 706-710.
39. Fisher L., Le Gros F.X., Mason P.W., Paoletti E.: A recombinant canarypox virus protects rabbits against a lethal rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) challenge. *Vaccine* 1997, **15**, 90-96.
40. Torres J.M., Sanchez C., Ramirez M.A., Morales M., Barcena J., Ferrer J., Espuna E., Pages-Mante A., Sanchez-Vizcaino J.M.: First field trial of a transmissible recombinant vaccine against myxomatosis and rabbit hemorrhagic disease. *Vaccine* 2001, **19**, 4536-4543.

Lekarz wet. Katarzyna Paździor, Katedra Anatomii Patologicznej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, ul. Oczapowskiego 13, 10-719 Olsztyn