

# Choroba niebieskiego języka – osiągnięcia i porażki

Zdzisław Gliński

z Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Lublinie

## Bluetongue disease – achievements and failures

Gliński Z., Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin

Bluetongue virus, BTV, (*Orbivirus; Reoviridae*), can infect many domesticated and wild ruminants including cattle, sheep, goats, various cervids and wildebeest. Bluetongue can be found on all continents except Antarctica. The virus is transmitted by the midges (*Culicoides*), the only significant natural transmitters of bluetongue. Multiple BTV serotypes can be found in many regions of the world. Serotypes 1, 8 and 26 can be transmitted between ruminants in close contact with blood and semen. Clinical cases of bluetongue occur mainly in sheep, while subclinical infections seem to predominate in most other species. Bluetongue virus can be found in blood from live animals and in spleen, lymph nodes or bone marrow samples collected at necropsy. RT-PCR tests are widely used to identify viral RNA in clinical samples, and identify the serotype. A variety of vaccination strategies are available for immunization of ruminant livestock against BTV infection. This article aims at presentation of achievements and failures in the worldwide efforts of bluetongue control.

**Keywords:** bluetongue, diagnostic tests, immunization, ruminants.

**G**roźne choroby zakaźne człowieka i zwierząt, które obecnie stanowią problem epidemiologiczny lub gospodarczy, mają stosunkowo krótką historię. Wiele pojawiło się z chwilą zapoczątkowania rolnictwa i hodowli zwierząt oraz powstania dużych skupisk ludzi związanych z rozwojem cywilizacji. Powstały więc rezerwuary mikroorganizmów, które mogły się szybko namnażać, mutować w zmieniającym się środowisku, przekraczać bariery międzygatunkowe i adaptować się do nowych gospodarzy – ludzi i różnych gatunków zwierząt. Niektóre z chorób zakaźnych pojawiły się niedawno. U człowieka dotyczy to m.in. grypy świńskiej oraz ptasiej, choroby Ebola, SARS, MERS, a ostatnio COVID-19, zaś u bydła choroby niebieskiego języka i choroby Schmallenberg<sup>1</sup>. Pierwsze przypadki choroby niebieskiego języka opisano u owiec przed około 130 latami w Afryce Południowej, zaś serotypy wirusa (*Orbivirus; Reoviridae*) wywołującego chorobę, na którą chorują zarówno domowe, jak i dzikie przeżuwacze, zidentyfikowano u owiec w Kalifornii w 1952 r. (1, 2). Wirus choroby Schmallenberg zidentyfikowano w 2011 r. jako przyczynę wrodzonych zaburzeń rozwojowych i rodzenia martwych płodów u bydła, owiec, krów i alpaka (3). W obydwu chorobach wektorem są owady kłująco-ssące z rzędu muchówek, rodzaju kuczmany (*Culicoides*; 4, 5).

## Epidemiologia

Dotychczas nie udało się eradykacja choroby niebieskiego języka na świecie pomimo działań o zasięgu ogólnosiwiatowym, w ramach Unii Europejskiej oraz

poszczególnych krajów. Choroba niebieskiego języka znajduje się w wykazie chorób zakaźnych zwierząt notyfikowanych do Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (OIE; 6), obejmują ją także akty normatywne Unii Europejskiej (7, 8) oraz prawa krajowego, w Polsce ustawa o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt (9, 10, 11). Szczepienia ograniczyły natomiast zachorowania. Dużym osiągnięciem są szczepionki inaktywowane, których użycie eliminuje transmisję wirusa szczepionkowego przez kuczmany, jego rewersję w kierunku zjadliwości, ujemny wpływ na płody i możliwość nabycia nowych cech w organizmie wektora lub szczepionego zwierzęcia w następstwie rekombinacji pomiędzy wirusem szczepionkowym i dzikimi (terenowymi) szczepami, które zakaziły wektory (12, 13). Ważnym osiągnięciem są szczepionki rekombinowane, w których wykorzystano ekspresję białek VP wirusa choroby niebieskiego języka na bakulowirusie i pokswirusach (14) oraz cała gama szczepionek nowych generacji i nowe strategie szczepień uwzględniające określone warunki terenowe (15, 16). Technika RT-PCR umożliwia szybkie rozpoznanie choroby, a także serotypowanie i topotypowanie wirusa (17), dzięki czemu na podstawie zależności pomiędzy serotypem wirusa i gatunkiem wektora poznano ekosystemy wirus – wektor (18).

Cechą charakterystyczną choroby niebieskiego języka jest sezonowość jej występowania, co ma ścisły związek z obecnością kuczmanów – wektorów wirusa. Ich występowanie i rozwój jest uzależniony od strefy klimatycznej i wiąże się z wilgotnością i temperaturą powietrza (13–39°C) i warunkami glebowymi. Ocieplenie klimatu spowodowało przesunięcie granicy występowania kuczmanów na północ Europy, co sprzyja szerzeniu się choroby na nowe tereny. Od 1998 r. r. notuje się w Europie inwazję różnych serotypów tego wirusa (19). Jednak w transferze serotypów BT25 i BT26 występujących u małych przeżuwaczy w Europie i na Środkowym Wschodzie nie muszą uczestniczyć kuczmany, ponieważ zakażenie może się szerzyć na drodze kontaktów bezpośrednich pomiędzy zwierzętami (20), a tym samym możliwość rozprzestrzeniania się choroby ulega znacznemu zwiększeniu (21). Zakażenie serotypem BT26 szerzy się drogą aerozolową (22). Istnieje także możliwość szerzenia się zakażenia serotypem BT8 drogą alimentarną u przeżuwaczy, udomowionych i dzikich zwierząt mięsożernych oraz u cieląt za pośrednictwem siary zakażonych matek (23). Pewne znaczenie w rozprzestrzenieniu choroby niebieskiego języka, zwłaszcza w Europie, odgrywały niedoceniane czynniki antropogeniczne. Nie jest w pełni wyjaśniony związek szczepień żywymi atenuowanymi szczepionkami, zwłaszcza zawierającymi serotyp BT8, przeciwko chorobie niebieskiego języka i pojawieniem się choroby w północnej i wschodniej Europie (20).

<sup>1</sup> Od redakcji. Choroba powinna się nazywać chorobą ze Schmallenbergu, ponieważ została pierwszy raz stwierdzona w okolicy miasta o tej nazwie w Niemczech.

## Właściwości wirusa choroby niebieskiego języka

Wirion wirusa choroby niebieskiego języka (BTV) o kształcie dwudziestościanu o średnicy ok. 68–70 nm posiada dwuwarstwowy kapsyd i potrójny płaszcz białkowy. Genom tworzy 10-segmentowy 2-pasmowy RNA. Płaszcz białkowy składa się z 7 białek strukturalnych (VP1–VP7) i czterech białek niestrukturalnych (NS1–NS4; 24). Białka strukturalne kapsydu VP5 i VP2 odpowiadają za wiązanie wirusa z receptorami komórek ssaków, VP2 ponadto za przynależność do określonego serotypu, hemaglutynację i jest głównym antygenem neutralizującym, podczas gdy białko VP7 odpowiada za wiązanie wirionu BTV z receptorami błony komórkowej owada i jest głównym determinantem przynależności do określonej grupy serologicznej wykrywanej testem cELISA (25, 26). BTV replikuje się w cytoplazmie komórek, gdzie wytwarza ciała wtrętowe. Replikuje się w hodowli 11-dniowych zarodków kurzyc (27), liniach komórkowych *Culicoides variipennis*, *C. sonorensis*, hodowli komórek myszy, chomika (BHK-21), zielonej małpy afrykańskiej, komórek Vero i w hodowli komórek *Aedes albopictus* (28).

Wyodrębniono 27 serotypów BTV. Selekcja wirusa w łańcuchu transmisji pomiędzy zwierzętami wrażliwymi i wektorami, jakimi są kuczmany, jest głównym mechanizmem różnorodności genetycznej terenowych szczepów BTV. Występowanie określonego serotypu wirusa nie ogranicza się do danego obszaru, np. w USA występuje 13, a w Europie 8 serotypów BTV (29). Od 1999 r. ogniska choroby stwierdzano w południowej Europie (Grecja, Włochy, Bałkany, Korsyka), od 2007 r. w Niemczech, we Francji i w Wielkiej Brytanii. Epizootie w Europie w latach 2007–2008 spowodował głównie serotyp 8 (BTV8), który cechowała zdolność zakażenia płodu i jego mumifikacji, ronięcia w pierwszym trymestrze ciąży, rodzenie martwych cieląt i wiremia u noworodków. Serotyp 4 pojawił się na Bałkanach w 2014 r., skąd rozprzestrzenił się na północne Włochy, Węgry, Słowację i Słowenię. Serotyp 8 po raz pierwszy pojawił się w 2015 r. we Francji i był też przyczyną zachorowań w 2017 r. w Szwajcarii i w Niemczech w 2018 r. przyczyną choroby był serotyp 8 BTV. Istnieje przy tym wyraźne pokrewieństwo antygenowe pomiędzy niektórymi serotypami BTV i wirusem krwotocznej choroby zwierzyny płowej (EHD). W surowicach cieląt zakażonych wirusem EHD występują przeciwciała reagujące krzyżowo z BTV (30). Wirus ulega inaktywacji przy pH <6 i >8, w 50°C po 3 godz., w 60°C oraz pod wpływem środków odkażających zawierających β-propiolaktone, jodofory i związki fenolowe. Białka zapobiegają inaktywacji wirusa. W krwi w 20°C nie traci zdolności zakaźnych przez wiele lat.

## Patogeneza

Chorują: bydło, owce i kozy, a także sarny, jelenie, łosie, bawoły afrykańskie, antylopy, wielbłądy, alpaki, ryjówki i niektóre gatunki gryzoni (31). Przeciwciała przeciwko BTV stwierdza się u afrykańskich słoni (*Loxodonta africana*), nosorożców (*Diceros bicornis* and *Ceratotherium simum*), afrykańskich żyraf (*Giraffa camelopardalis*), kotów, gepardów, lwów, dzikich psów

(*Lycoan pictus*) i szakali. Klinikną postać choroby wywołuje serotyp 8 u euroazjatyckich rysy (*Lynx lynx*; 32). U psów BTV indukuje odpowiedź immunologiczną i chorobę, która często ma ciężki przebieg i kończy się śmiercią. Zakażenie następuje zarówno drogą pokarmową za pośrednictwem mięsa i produktów pochodzenia zwierzęcego, jak za pośrednictwem kuczmanów (33). Wirus nie zakaża człowieka, co oznacza, że mięso, mleko, skóry i wełna oraz inne produkty pochodzące od chorujących przeżuwaczy nie stanowią zagrożenia dla ludzi.

Kuczmany zakażają się podczas ssania krwi zwierząt z wiramią, a w gruczołach ślinowych kuczmanów wirus pojawia się po 6–8 dniach po zakażeniu i utrzymuje przez całe życie wektora. Szczyt wirerii w organizmie gospodarza przypada na pierwsze dwa tygodnie po zakażeniu, zanim pojawią się we krwi swoiste przeciwciała. U około 99% bydła czas trwania wirerii nie przekracza 9 tygodni, u większości innych gatunków wynosi poniżej 4 tygodni. Jednak, obecność RNA serotypu 25 BTV (Toggenburg orbivirus) wykazywano u kóz przez co najmniej 2 lata, zaś krew i nasienie było zakaźne przez 12–19 miesięcy (34).

Wirus wraz ze śliną wektora dostaje się do regionalnych węzłów chłonnych związanych z ukąszeniem, replikuje się w makrofagach, monocytach, śródbłonku naczyń krwionośnych płuc, śledziony i skóry. W dalszych etapach wirerii BTV występuje głównie w erytrocytach. Wirus uszkadza śródbłonek drobnych naczyń krwionośnych, co prowadzi do powstawania wewnątrznaczyniowych zakrzepów, obrzęków, wybroczyn pod osierdziem i opłucną, zmian zapalnych oraz martwicy mięśni szkieletowych i mięśnia serca, wybroczyn i owrzodzeń w jamie ustnej i górnych odcinkach przewodu pokarmowego, obrzęku płuc, tkanki podskórnej, mięśni szyi i ściany jamy brzusznej. Następstwem zakażenia we wczesnym okresie ciąży u krów jest śmierć zarodków lub płodów i zmiany rozwojowe w mózgu, natomiast w przypadku zakażenia w późnym okresie ciąży rodzą się noworodki z wiramią. Wirus występuje w nasieniu (35). Owce ciężarne ronią lub rodzą martwe jagnięta lub jagnięta ze zmianami rozwojowymi w ośrodkowym układzie nerwowym, siatkówce lub układzie kostnym. W zakażeniach w późnym okresie ciąży rodzą się zdrowe jagnięta (36).

## Objawy

Okres inkubacji choroby wynosi 2–10 dni, średnio tydzień. Klinikna postać choroby występuje głównie u owiec, natomiast u innych gatunków wrażliwych zwierząt dominują zakażenia subklinikne. U owiec przy zachorowalności dochodzącej do 100% śmiertelność wynosi 30–70%, u jeleni i antylop może sięgać 90%. Bydło rzadko choruje i przy zachorowalności, która zazwyczaj w Europie nie przekracza 5% pogłowia w stadzie, a w zakażeniu serotypem 8 śmiertelność nie przekracza 1% (37). U bydła jawną postać choroby cechuje gorączka (41–42°C), depresja, osłabienie, ślinotok, obfity wypływ z nozdrzy początkowo śluzowy, następnie śluzowo-ropny i krwawy oraz spadek mleczości. Wargi, powieki i uszy są obrzękłe,

silnie przekrwioną śluzówkę jamy ustnej pokrywają wybroczyny, pęcherze i owrzodzenia. Przekrwiony, obrzękły, sinej barwy język wystaje z jamy ustnej. Przekrwioną i obrzękłą błonę śluzową jamy nosowej pokrywają drobne wybroczyny. Wymioty mogą powodować zachłystowe zapalenie płuc. Często występuje biegunka, kał zawiera domieszkę krwi. Następstwem zapalenia mięśni, koronki i tworzywa racic kończyn tylnych jest kulawizna. Może wystąpić pęcherzykowe lub wrzodziejące, zapalenie i łuszczenie się chorobowo zmienionego naskórka. U krów mlecznych łuszczy się naskórek strzyków i na skórze wymienia tworzą się owrzodzenia, pęknięcia i strupy. Krowy ronią lub rodzą martwe potomstwo z deformacjami, dotyczącymi najczęściej głowy i ośrodkowego układu nerwowego. Bydło po przechorowaniu może stać się nosicielem wirusa, zaś występowanie przewlekłej wirerii umożliwia zakażenie kuczmanów i przeniesienie zakażenia na zdrowe zwierzęta. U buhajów może wystąpić przejściowa bezpłodność (29, 38).

U owiec w ostrej postaci choroby występuje gorączka do 42°C, ślinotok, duszność, początkowo klarowny później śluzowo-ropny wyciek z nozdrzy, który po wyschnięciu tworzy strupy wokół otworów nosowych. Przekrwiona i obrzękła jest śluzawica, wargi, często też powieki i uszy. Śluzówka jamy ustnej jest owrzodziała lub występują w niej ogniska martwicy, a obrzękły i często siny język wystaje z jamy ustnej. Obrzękłe i przekrwione, pokryte wybroczynami są koronki racic, pachwiny i krocze. Może dojść do utraty puszek racic. W ciężkich przypadkach występuje kręczy szyi. Efektem zapalenia skóry podszwy i mięśni jest kulawizna (35). Występują ronienia lub rodzą się jagnięta z zaburzeniami rozwojowymi. Może wystąpić zapalenie płuc. Owce padają w ciągu 8–10 dni, a u ozdrowieńców występuje utrata runa, jałowość i zahamowanie wzrostu. Następstwem uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego u noworodków jest brak odruchu ssania. W chorobie o łagodnym przebiegu następuje szybki powrót do zdrowia (39, 40).

U lam i alpак chorobę niebieskiego języka cechuje nadostry lub łagodny przebieg. W chorobie o nadostrym przebiegu występuje ciężka niewydolność oddechowa, zaleganie i zwykle zwierzęta padają (41). Czasem tym objawom towarzyszy kaszel, ślinotok, ronienia, porażenia, zaburzenie orientacji. W chorobie o łagodnym przebiegu występuje utrata apetytu, zapalenie spojówek, częste przyjmowanie pozycji leżącej lub zupełny brak objawów (42). Zakażenie dromaderów serotypem 1 przebiega bezobjawowo, natomiast bizona w USA zakażone serotypem 8 BTV chorują wśród objawów występujących u owiec (43). U jeleniowatych, za wyjątkiem jeleni wirginijskich, choroba przebiega subklinicznie. U jeleni wirginijskich występują albo nieswoiste objawy, albo objawy identyczne jak u owiec. U części zwierząt rozwija się ciężka niewydolność oddechowa, występują wybroczyny na błonach śluzowych i skórze, wyniszczająca obfita krwista biegunka lub silne krwawienia w miejscach uszkodzenia tkanek. Przebieg nadostry choroby cechuje się obrzękiem głowy i szyi, przebieg ostry cechuje wybroczynowość, kulawizna i duża śmiertelność.

## Zmiany anatomopatologiczne i histopatologiczne

W chorobie o nadostrym przebiegu występują silne obrzęki głowy, szyi, języka i płuc. W ostrej postaci choroby obrzękom towarzyszy przekrwienie, wybroczyny i owrzodzenia śluzówki jamy ustnej, tchawicy, przełyku, żołądka i jelit. Wątroba, nerki, śledziona, węzły chłonne i serce są powiększone. W przekrwionych płucach stwierdza się ostry obrzęk pęcherzyków płucnych i miąższu oraz pienisty wysięk w oskrzelach. Jamę opłucnej i pokryty wybroczynami worek osierdziowy wypełnia duża ilość płynu. Za zmianę patognomiczną uważa się obecność wybroczyn w warstwie środkowej podstawy tętnicy płucnej. U bydła może występować odoskrzelowe zapalenie płuc. Koronka racic i blaszki kopytowe są przekrwione.

W ostrym przebiegu choroby w zmianach histopatologicznych dominuje rozsiane zapalenie włóścinek, zatory i wybroczyny, wielonarządowe zwyrodnienie i martwica. W cytoplazmie komórek nabłonka naczyń krwionośnych są obecne kwasochłonne ciała wtrętowe. Typową zmianą w chorobie o ostrym przebiegu są wybroczyny i wylewy krwawe w ścianie tętnicy płucnej i ogniska martwicy w lewej komorze serca. Ogniska martwicy występują w obrzękłych, zwyrodniałych i pokrytych wybroczynami mięśniach (44).

## Rozpoznanie

Wstępne rozpoznanie choroby niebieskiego języka opiera się o objawy kliniczne, zmiany sekcyjne i sezonowości zachorowań. Podejrzenie choroby wymaga przeprowadzenia badań mających na celu izolację i identyfikację BTV oraz wykrycie seropozytywnych zwierząt. W technikach diagnostycznych wykorzystuje się metody biologii molekularnej i immunologii, co umożliwiło opracowanie całej gamy nowych testów diagnostycznych, które cechując się dużą czułością i swoistością, umożliwiają wykrycie zakażenia BTV, a także ocenę nasilenia odporności po zakażeniu naturalnym oraz po szczepieniu. Z tych względów coraz częściej oprócz testów zalecanych przez OIE oraz izolacji wirusa, identyfikacji genomu testem RT-PCR, testów serologicznych cELISA, odczynu immunodyszfuzji w żelu (AGID), seroneutralizacji (VN) i wiązania dopełniacza (CFT), stosuje się test IgM capture ELISA, test ICS (immunochromatographic strips), MIA (test immunologiczny z podwójnym antygenem w mikrosferze) i chipy białkowe (24).

Najodpowiedniejszym sposobem izolacji BTV jest zakażenie 8–12-dniowych zarodków jaja kurzego lub hodowli komórek, np. linii KC kuczmana *C. variipennis*, hodowli komórek owiec, BHK-21, Vero, AA (klon C6–36 *Aedes albopictus*). Efekt cytopatyczny pojawia się w jednonarstwowej hodowli komórek ssaków po pięciu dobach inkubacji w 37°C w atmosferze zawierającej 5% dwutlenku węgla. Najlepszym sposobem izolowania BTV jest dożylnie zakażenie 10–11-dniowych zarodków kurzych krwi lub zawiesina tkanek poddanych działaniu ultradźwięków (27). Do izolacji wykorzystuje się krew z antykoagulantem wiremicznych zwierząt, od padłych chorych zwierząt – śledzionę i węzły chłonne, czerwony szpik kostny przesłane w stanie schłodzenia do laboratorium diagnostycznego, a także kuczmany.



Testy stosowane do identyfikacji wirusa i odpowiedzi immunologicznej w chorobie niebieskiego języka wg. OIE są podane w tabeli 1.

Przeciwciała precypitujące i zobojętniające BTW pojawiają się we krwi po 7–14 dniach po zakażeniu i utrzymują się przez kilka lat, zaś przeciwciała wiążące dopełniacz pojawiają się po 14–21 dniach i zanikają po 4–18 miesiącach. Przeciwciała grupowo-swoiste dla wirusa BTW wykrywa się testem AGID, ELISA, cELISA i immunofluorescencji, podczas gdy w serotypowaniu wykorzystuje się test VN, redukcji łysinek i zahamowania tworzenia łysinek. Wadą testu AGID jest brak swoistości, ponieważ przy jego pomocy wykrywa się też przeciwciała dla innych orbivirusów, zwłaszcza dla wirusa krwotocznej choroby zwierzyny płowej. Z tych względów w przypadku reaktywnych surowic w teście AGID zakażenie wirusem choroby niebieskiego języka należy potwierdzić, stosując serotypowanie. Stwierdzenie samej serokonwersji nie wystarcza do postawienia rozpoznania, ponieważ może ona świadczyć wyłącznie o kontakcie zwierzęcia z BTW. RT-PCR umożliwia szybką identyfikację BTW w oparciu o jego genom. Dodatni wynik tego testu nie jest jednoznaczny z obecnością w badanym materiale zakaźnego wirusa. Multiplex PCR umożliwia jednocześnie wykrycie kilku serotypów BTW.

W teście ICS (paski immunochromatograficzne) do wykrywania grupowo-specyficznych przeciwciał wykorzystuje się rekombinowane białko VP7 BTW na błonach nitrocelulozowych oraz koloidalne cząsteczki złota związane z białkiem G paciorkowców. Swoistość testu wynosi 97,6%, czułość 100% w porównaniu do testu cELISA (45). Metodę chipów białkowych stosuje się do wykrywania przeciwciał dla VP7 BTW. Czułość metody wynosi 98,6%, a swoistość 94,8% (46). W tym samym celu stosuje się test aglutynacji lateksowej. Pozwala on szybko przebadać dużą liczbę próbek surowicy (47). Test MIA (test immunologiczny z podwójnym antygenem w mikrosferze) jest jednocześnie testem serogrupowo i serotypowo swoistym, ponieważ umożliwia wykrycie w surowicy przeciwciał dla VP2 i VP7 BTW. W przypadku VP7 swoistość testu jest porównywalna z testem cELISA, a w przypadku VP2 z VNT (48). Test IgM-cELISA umożliwia wykrycie przeciwciał dla antygeny VP7 BTW w początkowym okresie zakażenia (49).

W próbie biologicznej wykorzystuje się owce zakażone podskórnie krwią pobraną od chorych zwierząt w okresie gorączkowym. W okresie 28 dni po zakażeniu mierzy się temperaturę ciała w odstępach tygodniowych i wykonuje test cELISA. Wirus pojawia się we krwi zakażonych owiec w okresie 7–14 dni po zakażeniu.

## Szczepienia

Ze względu na fakt, że konwencjonalne sposoby profilaktyki i zwalczania choroby niebieskiego języka ze względu na istnienie zakażeń bezobjawowych, długotrzymującej się wiremii u bydła, krążenia BTW w populacji kuczmanów nie dają efektów, szczepienia stają się koniecznością. W ognisku choroby na terenie dzwiczym wywołanym przez jeden serotyp BTW stosuje się szczepionki monowalentne, natomiast na terenach endemicznych, gdzie często przyczyną choroby

**Tabela 1.** Testy stosowane do identyfikacji wirusa i odpowiedzi immunologicznej w chorobie niebieskiego języka wg OIE (12)

TEST	CEL					
	1	2	3	4	5	6
<b>IDENTYFIKACJA WIRUSA</b>						
RT-PCR	–	+++	–	+++	++	–
IZOLACJA	–	+++	–	+++	–	–
<b>NASILENIE ODPORNOŚCI</b>						
cELISA	++	+++	++	–	++	++
VN	++	+++	++	–	++	++
AGID	+	–	+	–	+	+
CFT	+	–	+	–	+	+

Objaśnienia: 1 – populacja wolna od zakażenia; 2 – zwierzę wolne od zakażenia przed transportem; 3 – zwierzęta przeznaczone do eliminacji; 4 – potwierdzenie postaci klinicznej choroby; 5 – występowanie zakażenia – nadzór; 6 – stan odporności u poszczególnych zwierząt lub populacji po szczepieniu; +++ test zalecany; ++ test wskazany; + test dozwolony do stosowania w określonych sytuacjach; – testu nie stosuje się; AGID – test immunodifuzji w żelu agarowym, cELISA – kompetycyjny test ELISA, VN – test neutralizacji wirusa, CFT – odczyn wiązania dopełniacza.

jest wiele serotypów, zdają egzamin szczepienia dające długotrwałą odporność przeciwko wszystkim serotypom wirusa wywołującym chorobę (50). Szczepienia są niekwestionowanym osiągnięciem w profilaktyce choroby niebieskiego języka. Wykorzystuje się szczepionki inaktywowane, żywe atenuowane oraz różne typy szczepionek rekombinowanych łącznie z prototypowymi szczepionkami opartymi o reasortant segmentu genu atenuowanego żywego wirusa (51). Zarówno inaktywowane, jak atenuowane szczepionki przeciwko chorobie niebieskiego języka są serotypowo-swoiste (52). Przeciwciała dla VP2 określonego serotypu neutralizują, ale w niewielkim stopniu, inne serotypy, co komplikuje strategię szczepień (53). Przeciwciała neutralizujące BTW (54) oraz limfocyty Tc odgrywają zasadniczą rolę w działaniu ochronnym w chorobie niebieskiego języka (55). Komórki Tc są głównie celem dla NS1 i VP2, mniejszą rolę w tym względzie odgrywają antygeny VP5, VP7 i NS3 (56).

Szczepionki monowalentne, zawierające żywy atenuowany wirus, importowane z Afryki Południowej stosuje się w Europie do szczepienia bydła i owiec. Cechują się one dużymi właściwościami immunogennymi, chronią przed zachorowaniem, a niepożądane działanie obserwuje się głównie u owiec w postaci gorączki, obrzęku części twarzowej głowy, kulawizny i spadku mleczności. Ronienia występują u <0,5% ciężarnych owiec. Wiremia po szczepieniu bydła i owiec nie przekracza 35 dni. Wyjątek stanowią szczepionki wieloważne oparte o serotypy BTW-2, -4, -9–16, gdy wiremia trwa co najmniej 78 dni. (57). Po podaniu dwóch dawek tych szczepionek rozwija się silna, długotrwała odporność i brak wiremii, podczas gdy po szczepieniu szczepionką opartą o serotyp BTW4 wiremia ulega tylko częściowemu zmniejszeniu po zakażeniu homologicznym serotypem BTW. Jednakże żywe atenuowane szczepionki dla serotypów BTW16 BTW4 u owiec mogą działać teratogennie (58). Jednym z niepożądanych skutków stosowania tych szczepionek jest możliwość reasortacji genomu wirusa

szczepionkowego ze szczepami terenowymi, czego następstwem może być pojawienie się reasortantu wirusa o całkiem nowych, nieprzewidywalnych właściwościach biologicznych (59). Alternatywą dla szczepionek atenuowanych są szczepionki zabite, których stosowanie zapobiegło nawrotom choroby niebieskiego języka w Europie po 2008 r. Ale żeby uzyskać silną odporność, szczepienia muszą być powtarzane (60).

Nowym osiągnięciem są będące nadal w sferze badań rekombinowane szczepionki wektorowe z ekspresją immunogennych białek strukturalnych BTV na różnych gatunkach wirusów: bakulowirusów, wirusów herpes, ospy owiec, ospy kanarków, krowiance, szczepionki DISC (z wyłączonym zakaźnym cyklem), szczepionki z reasortantem segmentu genu oparte na atenuowanym BTV-6. Najbardziej obiecujące są szczepionki zawierające białka strukturalne VP2, VP5, VP3 i VP7 dla serotypów BTV10 i BTV17. Indukują one u owiec wysokie miano przeciwciał i chronią przed zachorowaniem na zakażenie serotypem homologicznym oraz częściowo na zakażenie szczepami heterologicznymi (61).

W rekombinowanych szczepionkach wektorowych zawierają geny ma miejsce ekspresja antygenów BTV na wirusie ospy kanarków, krowiance i herpeswirusach. Ich stosowanie do minimum zmniejsza reasortację ze szczepami terenowymi BTV. Szczepionki z ekspresją VP2 indukują silną odpowiedź immunologiczną przeciwko homologicznemu serotypowi. W badaniach na myszach uzyskano zachęcające wyniki z rekombinowanymi wektorowymi szczepionkami z użyciem jako wektorów dla BTV8 herpeswirusa bydła lub koni (62). Szczepionki typu DISC (disabled infectious single cycle) są szczepionkami, w których wirus jest pozbawiony zdolności replikacji w zakażonej komórce gospodarza w następstwie letalnej mutacji jednego lub kilku genów. W przypadku BTV letalna mutacja dotyczy genu kodującego VP6 wirusa (63). W szczepionce przeznaczonej dla owiec w serotypie 1 BTV zastąpiono geny kodujące VP2 i VP5 genami z BTV8, uzyskując w ten sposób reasortant BTV1/8D1. Szczepionka zapobiegała wirerii odpowiednio po zakażeniu BTV1 i BTV1/8D1. Okazało się ponadto, że monowalentne i poliwalentne szczepionki typu DISC dla BTV2, BTV4 również zapobiegają u owiec i bydła wirerii i klinicznej postaci choroby (64). Zastąpienie w BTV1 i BTV8 segmentów 2 (VP2) i 6 (VP6) genu przez segmenty żywego atenuowanego BTV6 pozwoliło na uzyskanie szczepów szczepionkowych BTVac-1 i BTVac-8. Jedna dawka szczepionki indukuje odpowiedź humoralną przeciwko serotypowi homologicznemu (BTV1) i heterologicznemu (BTV8) przy braku objawów klinicznych choroby (65). Trójwalentna szczepionka dla serotypów 2, 4 i 8 po dwukrotnym szczepieniu w odstępie trzech tygodni chroni przez zakażeniem zjadliwymi BTV2, 4 i 8, zaś 6-walentna szczepionka dla serotypów 1, 2, 4, 8, 13 i 21 chroni przed zakażeniem BTV2, 4 i 8. Po dawce przypominającej indukuje ona przeciwciała zobojętniające dla wszystkich serotypów szczepionki (66, 67). Istnieją podstawy do wyprodukowania szczepionki opartej o mutant BTV pozbawiony białka strukturalnego NS4. Jest ono antagonistą INF- $\beta$  i głównym determinantem wirulencji. Mutant

BTVNS4 u owiec indukuje przeciwciała zobojętniające wirus, nie wywołuje gorączki i objawów choroby, jednak rozwija się wiremia, która utrzymuje się przez 28 dni (68). Szczepionki DNA zawierają plazmid DNA z ekspresją białek BTV w organizmie zaszczepionych zwierząt. U myszy pozbawionych receptora dla INF zaszczepionych szczepionką z plazmidami z ekspresją VP2, VP7 i NS1 wirusa choroby niebieskiego języka uzyskano częściową protekcję na zakażenie BTV4. Otrzymano szczepionki dla pustych cząsteczek BTV (VLP, virus-like particles), nie tylko dla pojedynczych, ale również łącznie dla kilku serotypów jednocześnie (BTV1, 2, 10, 13 i 17), indukujące swoiste przeciwciała neutralizujące BTV i warunkujące działanie ochronne u owiec na zakażenie szczepami homologicznymi wirusa (69, 70).

Wyprodukowanie idealnej szczepionki w praktyce jest niemożliwe. Powinna ona indukować silną i długotrwałą odpowiedź immunologiczną komórkową i humoralną już po jednej dawce, chronić przed chorobą jawną i reinfekcją, być bezpieczną (brak rewersji do postaci zjadliwej), stabilną, taną, zapobiegać nosicielstwu, nie wpływać negatywnie na testy diagnostyczne i nie powodować reakcji niepożądanych (71). Z tych względów pomimo szeroko zakrojonych badań nad szczepionkami przeciwko chorobie niebieskiego języka opartych o osiągnięcia genomiki i proteomiki, a ostatnio i nanotechnologii, tylko nieliczne odpowiadają większości tych wymagań i są dostępne w handlu.

## Piśmiennictwo

1. Fernandes M.W.: Isolation and propagation of bluetongue virus in tissue culture. *Am. J. Vet. Res.* 1959, 20, 398–408.
2. Hardy W.T., Price D.A.: The history of bluetongue and a current global overview. *Vet. Ital.* 2004, 40, 31–38.
3. Beer M., Conraths F.J., Van der Poel W.H.M.: Schmallenberg virus – a novel orthobunnavirus emerging in Europe. *Epidemiol. Infect.* 2013, 141, 1–8.
4. OIE: Schmallenberg virus. *OIE Technical Fact Sheet* 2017 June, 1–5.
5. OIE, USDA: Bluetongue. 2015, 1–8. <http://www.cfsph.iastate.edu/Fact-sheets/pdfs/bluetongue.pdf>
6. OIE: OIE-Listed diseases, infections and infestations force in 2020. <https://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2020>.
7. Dyrektywa Rady 2000/75/WE z dnia 20 listopada 2000 r. ustanawiająca przepisy szczególne dotyczące kontroli i zwalczania choroby niebieskiego języka.
8. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1266/2007 z dnia 26 października 2007 r. w sprawie przepisów wykonawczych dotyczących dyrektywy Rady 2000/75/WE w odniesieniu do kontroli, monitorowania, nadzoru i ograniczeń przemieszczeń niektórych zwierząt należących do gatunków podatnych na zarażenie chorobą niebieskiego języka.
9. Ustawa z dnia 11 marca 2004 r. o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt. Dz.U. z dnia 20 kwietnia 2004 r.
10. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 12 października 2012 r. w sprawie zwalczania choroby niebieskiego języka.
11. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 20 stycznia 2017 r. w sprawie wprowadzenia programu wieloletniego wykrywania występowania zakażeń wirusem choroby niebieskiego języka na lata 2017–2019.
12. OIE: Bluetongue. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. *OIE, Paris*, 2018, 338–354.
13. Dungu B., Gerdes T., Smit T.: The use of vaccination in the control of bluetongue in Southern Africa. *Vet. Ital.* 2004, 40, 616–622.
14. Olfield S., Adachi A., Urakawa T., Hirasawa T., Roy P.: Purification and characterization of the major group-specific core antigen VP7 of bluetongue virus synthesized by a recombinant baculovirus. *J. Gen. Virol.* 1990, 71, 2649–2656.
15. Bhanuprakash V., Indrani B.K., Hosamani M., Balamurugan V., Singh R.K.: Bluetongue vaccines; past, present and future. *Expert. Rev. Vaccines* 2009, 8, 191–204.
16. McVey D.S., MacLachlan N.J.: Vaccines for prevention of bluetongue and epizootic hemorrhagic disease in livestock: A North American perspective. *Vector Borne Zoon. Dis.* 2015, 15, 385–396.
17. Potgieter A.C., Monaco F., Mangana O., Nomikou K., Yadin H., Savini G.: VP2- segment sequence analysis of some isolates of bluetongue

- virus recovered in the Mediterrean basin during the 1998–2003 outbreak. *J. Vet. Med.* 2005, **52**, 372–379.
18. Daniels P.W., Sendow I., Pritchard L.I., Sukars I.H., Eaton B.T.: Regional overview of bluetongue viruses in South-East Asia: viruses, vectors and surveillance. *Vet. Ital.* 2004, **40**, 94–100.
  19. MacLachlan N.J., Zientara S., Wilson W.C., Richt J.A., Savini G.: Bluetongue and Epizootic hemorrhagic disease viruses: Recent developments with these globally re-emerging arboviral infections of ruminants. *Curr. Opin. Virol.* 2019, **34**, 56–62.
  20. MacLachlan N.J., Mayo C.E., Daniels P.W., Savini G., Zientara S., Gibbs E.P.J.: Bluetongue. *Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 2015, **34**, 329–340.
  21. Tabachnick W.J.: Culicoides and the global epidemiology of bluetongue virus infection. *Vet. Ital.* 2004, **40**, 145–150.
  22. Batten C., Darpel K., Henstock M., Fay P., Veronesi E., Gubbins S., Graves S., Frost L., Oura C.: Evidence for transmission of bluetongue virus serotype 26 through direct contact. *PLoS ONE* 2014, **9**, e96049
  23. Backx A., Heutink R., van Rooij E., van Rijn P.: Transplacental and oral transmission of wild-type bluetongue virus serotype 8 in cattle after experimental infection. *Vet. Microbiol.* 2009, **138**, 235–243.
  24. Rojas J.M., Rodriguez-Martin D., Martin V., Sevilla N.: Diagnostic bluetongue virus in domestic ruminants: current perspectives. *Vet. Med. (Auckl)*. 2019, **10**, 17–27.
  25. Roy P.: Bluetongue virus proteins and particles and their role in virus entry, assembly, and release. *Adv. Virus Res.* 2005, **64**, 69–123.
  26. Jenckel M., Bréard E., Schulz C., Saillieu C., Viarouge C., Hoffmann B., Höper D., Beer M., Zientar S.: Complete coding genome sequence of putative novel bluetongue virus serotype 27. *Genome Announc.* 2015;3(2):e00016–15.
  27. Clavijo A., Heckert R.A., Dulac G.C., Afshar A.: Isolation and identification of bluetongue virus. *J. Virol Methods.* 2000, **87**, 13–23.
  28. Mcholland L.E., Mecham J.O.: Characterization of cell lines developed from field populations of *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae). *J. Med. Entomol.* 2003, **40**, 348–351.
  29. Zientara S., Sánchez-Vizcaino J.M.: Control of bluetongue in Europe. *Vet Microbiol.* 2013, **162**, 33–37.
  30. MacLachlan N.J.: Bluetongue: history, global epidemiology, and pathogenesis. *Prev. Vet. Med.* 2011, **102**, 107–111.
  31. Henrich M., Reinacher M., Hamann H.P.: Lethal bluetongue virus infection in an alpaca. *Vet Rec.* 2007, **161**, 764–766.
  32. Alexander K.A., MacLachlan N.J., Kat P.W.: Evidence of natural bluetongue virus infection among African carnivores. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994, **51**, 568–576.
  33. Oura C.A.L., El Harrak M.: Midge-transmitted bluetongue in domestic dogs. *Epidemiol. Infect.* 2011, **139**, 1396–1400.
  34. Vögtlin A., Hofmann M.A., Nenniger C., Renzullo S., Steinrigl A., Loitsch A., Schwermer H., Kaufmann C., Thür B.: Long-term infection of goats with bluetongue virus serotype 25. *Vet. Microbiol.* 2013, **166**, 165–173.
  35. MacLachlan N.J., Drew C.P., Darpel K.E., Worwa G.: The pathology and pathogenesis of bluetongue. *J. Comp. Pathol.* 2009, **141**, 1–16.
  36. CFSPPH: Bluetongue. 2015, 1–8. [www.cfspph.iastate.edu](http://www.cfspph.iastate.edu)
  37. Dal Pozzo F., Saegerman C., Thiry E.: Bovine infection with bluetongue virus with special emphasis on Europe serotype 8. *Vet. J.* 2008, **182**, 142–151.
  38. De Diego A.C., Sánchez-Cordón P.J., Sánchez-Vizcaino J.M.: Bluetongue in Spain: from the first outbreak to 2012. *Transbound. Emerg. Dis.* 2014, **81**, 1–11.
  39. Ganter M.: Bluetongue disease – Global overview and future risk. *Small Rumin Res.* 2015, **118**, 79–85.
  40. Van der Slijs M.T., Schroer-Joosten D.P., Fid-Fourkour A., Smit M., Vrijenhoek M.P., Moulin V., de Smit A.J., Moormann R.J.: Transplacental transmission of BTV-8 in sheep: BTV viraemia, antibody responses and vaccine efficacy in lambs infected in utero. *Vaccine* 2013, **31**, 3726–3731.
  41. Ortega J., Crossley B., Dechant J.E., Drew C.P., MacLachlan N.J.: Fatal bluetongue virus infection in an alpaca (*Vicugna pacos*) in California. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2010, **22**, 134–136.
  42. Allen A.J., Stanton J.B., Evermann J.F., Fry L.M., Ackerman M.G., Barington G.M.: Bluetongue disease and seroprevalence in South American camelids from the northwestern region of the United States. *Vet. Diagn. Invest.* 2015, **27**, 226–230.
  43. Corbière F., Nussbaum S., Alzieu J.P., Lemaire M., Meyer G., Foucras G., Schelcher F.: Bluetongue virus serotype 1 in wild ruminants, France 2008–2010. *J. Wildl. Dis.* 2012, **48**, 1047–1051.
  44. Kostro K., Gliński Z. (red. nauk.): *Ochrona zdrowia i terapia chorób zakaźnych zwierząt gospodarskich. I. Choroby zakaźne bydła*. WUP w Lublinie, 2013.
  45. Yang J., Hua Q., Chen H., Lv J., Qin Z., Jin M., Tao H., Zeng S., Ruan Z., Chen B., Zhou X.: Development and evaluation of an immunochromatographic strip for the detection of serum antibodies against bluetongue virus. *J. Virol. Methods* 2010, **163**, 68–73.
  46. Xu Q.Y., Sun E.C., Feng Y.F., Li J.P., Lv S., Zhang Q., Wang H.X., Zhang J.K., Wu D.L.: Development of a novel protein CHIP for the detection of bluetongue virus in China. *J. Virol. Methods* 2016, **234**, 28–33.
  47. Yang J., Hua Q., Chen H., Lv J., Chen B., Ruan Z.: A rapid assay for detecting antibody against bluetongue virus with a latex agglutination test using recombinant VP7 antigen. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2010, **22**, 242–244.
  48. Breard E., Garnier A., Despres P., Blaise Boisseau S., Comtet L., Viarouge C., Bakkali-Kossimi L., Pourquier P., Hudelet P., Vitour D., Rossi S., Belbis G., Saillieu C., Zientara S.: Development-antigen microsphere immunoassay for simultaneous group and serotype detection of bluetongue virus antibodies. *Transb. Emerg. Dis.* 2017, **64**, 1837–1847.
  49. Zhou E.M., Ridd D., Riva J., Fernando L., Clavijo A.: Development and evaluation of an IgM-capture ELISA for detection of recent infection with bluetongue viruses in cattle. *J. Virol. Methods* 2001, **91**, 175–182.
  50. Feenstra F., van Rijn P.A.: Current and next-generation bluetongue vaccines: Requirements, strategies, and prospects for different field situations. *Crit. Rev. Microbiol.* 2017, **43**, 142–155.
  51. Calvo-Panilla E., Castillo-Olivares J., Jabbar T., Ortego J., la Plaza F., Marin-López A.: Recombinant vaccines against bluetongue virus. *Virus Res.* 2014, **182**, 78–86.
  52. Zientara S., MacLachlan N.J., Calistri P., Sanchez-Vizcaino J.M., Savini G.: Bluetongue vaccination in Europe. *Vaccines* 2010, **9**, 989–991.
  53. Maan N.S., Maan M.N., Belaganahalli M.N., Ostlund E.N., Johnson D.J., Nomikou K., Mertens P.P.: Identification of the twenty six bluetongue virus serotypes by RT-PCR amplification of the serotype-specific genome segment 2. *PLoS One* 7 (2) (2012), p. e32601
  54. Jeggo M.H., Wardley R.C., Taylor W.P.: Role of neutralizing antibody in passive immunity to bluetongue infection. *Res. Vet. Sci.* 1984, **36**, 81–86.
  55. Jeggo M.H., Wardley R.C., Brownlie J.: A study of the role of cell-mediated immunity in bluetongue virus infection in sheep, using cellular adoptive transfer techniques. *Immunology* 1984, **52**, 403–410.
  56. Janardhana V., Andrew M.E., Lobato Z.I., Coupar B.E.: The ovine cytotoxic T lymphocyte responses to bluetongue virus. *Res. Vet. Sci.* 1999, **67**, 213–221.
  57. Savini G., MacLachlan N.J., Sanchez-Vizcaino J.M., Zientara S.: Vaccines against bluetongue in Europe. *Comp. Immunol. Infect. Dis.* 2008, **31**, 101–120.
  58. Veronesi E., Darpel K.E., Hamblin C., Carpenter S., Takamatsu H.H., Anthony S.J., Elliott H., Mertens P.P., Mellor P.S.: Viremia and clinical disease in Dorset Poll sheep following vaccination with live attenuated bluetongue virus vaccines serotypes 16 and 4. *Vaccine* 2010, **28**, 1397–1403.
  59. Batten C.A., Maan S., Shaw A.E., Mann N.S., Mertens P.P.: European field strain of bluetongue virus derived from two parental vaccine strains by genome segment reassortment. *Virus Res.* 2008, **137**, 56–63.
  60. Gethmann J., Huttner K., Heyne H., Probst C., Ziller M., Beer M., Hoffmann B., Mettenleiter T.C., Conraths F.J.: Comparative safety study on three inactivated BTV-8 vaccines in sheep and cattle under field conditions. *Vaccine* 2009, **27**, 4118–4126.
  61. Roy P., Bishop D.H., Le Blois H., Erasmus J.: Long-lasting protection of sheep against bluetongue challenge after vaccination with virus-like particles: evidence for homologous and partial heterologous protection. *Vaccine* 1994, **12**, 805–811.
  62. Franceschi V., Capocefalo A., Calvo-Pinilla E., Redaelli M., Mucignat-Caretta C., Mertens P., Ortego J., Donofrio G.: Immunization of knock-out alpha/beta interferon receptor mice against lethal bluetongue infection with a BoHN-4-based vector expressing BTV-8 V/2 antigen. *Vaccine* 2011, **29**, 3074–3082.
  63. Matsuo E., Celma C.C., Boyce M., Viarouge C., Saillieu C., Dubois E., Breard E., Thiery R., Zientara Z., Roy P.: Generation of replication-defective virus-based vaccines that confer full protection in sheep against virulent bluetongue virus challenge. *Virology* 2011, **85**, 10213–10221.
  64. Celma C.C., Boyce M., van Rijn P.A., Eschbaumer M., Wernike K., Hoffmann B., Beer M., Haegemon A., de Cerg K., Roy P.: Rapid generation of replication-deficient monovalent and multivalent vaccines for bluetongue virus: protection against virulent virus challenge in cattle and sheep. *Virology* 2013, **87**, 9856–9864.
  65. Van Gennip R.G., van der Water S.G., Maris-Veldhuis M., van Rijn P.A.: Bluetongue viruses based on modified-live vaccine serotype 6 with exchange outer shell proteins confer full protection in sheep against virulent BTV8. *PLoS One*, 7 (9) (2012), e44619.
  66. Rijn P.A.: Prospects of next-generation vaccines for bluetongue. *Front. Vet. Sci.*, 21 November 2019 | <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00407>
  67. Celma C.C., Stewart M., Wernike K., Eschbaumer M., Gonzalez-Molenda L., Beard E., Schulz C., Hoffman B., Haegemon A., de Clerq K., Zientara S., van Rijn P.A., Beer M., Roy P.: Replicant-deficient particles: new insight into the next generation of Bluetongue virus vaccines. *J. Virol.* (2017) 91:e01892–16.
  68. Ratnien M., Shaw A.E., Barry G., Gu Q., di Galleonardo L., Janowicz M., Varela M., Randall R.E., Caporale M., Palmarini M.: Bluetongue virus NS4 protein is an interferon antagonist and a determinant of virus virulence. *J. Virol.* 2016, **90**, 5427–5439.
  69. Roy P., Boyce M., Noad R.: Prospects for improvement bluetongue vaccines. *Nat. Rev. Microbiol.* 2009, **7**, 120–128.
  70. Niedbalski W., Fitzner A.: New generation vaccines against bluetongue virus. *Med. Weter.* 2018, **74**, 377–382.
  71. Ada G.L.: The ideal vaccine. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 1991, **7**, 105–108.

Prof. zw. dr hab. mgr Zdzisław Gliński, e-mail: [zgliński@o2.pl](mailto:zgliński@o2.pl)