

Vaccines against infectious myxomatosis of rabbits

Kwit E., Chrobocińska M., Bigoraj E.,
Department of Food and Environmental Virology,
National Veterinary Research Institute, Puławy

The aim of this paper was to present vaccines against infectious myxomatosis of rabbits. Myxomatosis, highly infectious generalized disease of European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), is caused by myxoma virus (MV), the poxvirus from *Leporipoxvirus* genus. It can be mosquito or flea or contact transmitted. Rabbit vaccination program and protection of animal colonies from arthropod vectors are widely used. Two types of vaccines are commercially available. They are prepared from Shope fibroma virus (SFV) and from the attenuated MV. Recently, a first recombinant vaccine against myxomatosis is introduced into European market. In Australia deleted vaccine has been developed. In Poland attenuated vaccine made from MV is used. Irrespective of the type of vaccine used, rabbits post-vaccinal immunity is highly variable. Revaccinations are necessary to support and prolong duration of protective immune response in rabbits.

Keywords: myxomatosis, rabbits, vaccines, control.

Myksomatoza królików jest wysoce zaraźliwą chorobą o etiologii wirusowej, występującą zarówno u królików domowych, jak i dziko żyjących. Wirus myksomatozy przenoszony jest głównie przez owady krwiopijne, zwłaszcza komary, muchy i pchły, a w związku z ich sezonowym występowaniem choroba notowana jest przede wszystkim w sezonie letnio-jesiennym, z największym nasileniem w Polsce w miesiącach: sierpień, wrzesień i październik (1). Myksomatoza królików znajduje się na liście Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (OIE) i w Polsce podlega obowiązkowi rejestracji. Podobnie jak w przypadku innych chorób wirusowych, w zapobieganiu i zwalczaniu myksomatozy stosowana jest zarówno profilaktyka czynna (szczepienia), jak również profilaktyka bierna (systematyczne odkażanie, zabezpieczenie klatek przed dostępem owadów, likwidacja owadów w hodowlach królików). Największe znaczenie ma czynne uodpornianie królików, zgodne z programami szczepień.

Szczepionki żywe

Szczepionki zawierające żywe atenuowane drobnoustroje są bardziej immunogenne od zawierających zabite drobnoustroje lub oczyszczone ich produkty. Zwykle po podaniu pojedynczej dawki uzyskuje się długotrwałą odporność. Duża immunogenność tych szczepionek jest związana z przejściowym namnażaniem się żywych wirusów

Szczepionki przeciw myksomatozie królików

Ewa Kwit, Marta Chrobocińska, Ewelina Bigoraj

z Zakładu Wirusologii Żywności i Środowiska Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

w organizmie, zawartością wielu antygenów stymulujących szeroki zakres odpowiedzi komórkowej i humoralnej, zwiększoną dawką i wydłużonym czasem obecności antygeny w organizmie (2). Na rynku dostępne są dwa rodzaje żywych szczepionek przeciw myksomatozie: heterologiczne i homologiczne. Szczepionki heterologiczne wytwarzane są w oparciu o bliskie pokrewieństwo antygenowe pomiędzy wirusem myksomatozy a mniej patogennym wirusem Shope'a (SFV), należącym również do rodzaju *Leporipoxvirus*. Natomiast szczepionki homologiczne zawierają atenuowany szczep wirusa myksomatozy (MV), otrzymany w wyniku wielokrotnych pasażów w hodowlach komórkowych bądź zarodkach kurzych, prowadzących do powstania zmian genetycznych, które powodują atenuację wirusa (3). Oba typy szczepionek mają zarówno swoje zalety, jak i wady. Szczepionki heterologiczne są słabo immunogenne i zapewniają jedynie krótkotrwałą ochronę, natomiast szczepionki homologiczne mogą powodować immunosupresję, szczególnie u młodych zwierząt (cyt. za 4), znane są też przypadki nawrotu wirulencji (cyt. za 5).

W Wielkiej Brytanii stosowana jest żywa szczepionka heterologiczna oparta o wirus fibromatozy Shope'a. Zdrowe króliki można szczepić od 6 tygodnia życia, podając pojedynczą dawkę szczepionki śródskórnie lub alternatywnie podskórnie. Zapewnia to ochronę przed zakażeniem wirusem myksomatozy przez 6 miesięcy. Wirus szczepionkowy może przenosić się na wrażliwe króliki przy kontakcie ze zwierzętami szczepionymi. We Francji podstawowy schemat szczepień królików obejmuje podanie zwierzętom szczepionki zawierającej wirus fibromatozy Shope'a, natomiast do rewakuacji stosuje się szczepionkę zawierającą atenuowany szczep SG33 wirusa myksomatozy. W 1977 r. we Francji Saurat i wsp. (3) uzyskali szczep SG33 pochodzący ze szczepu zjadliwego Lausanne, wyizolowanego w 1973 r. od dziko żyjącego królika. Szczep ten podano wielokrotnym pasażom w hodowlach komórkowych w celu jego atenuacji. Genom SG33 charakteryzuje delecja wielkości ok. 15 kb, obejmująca fragment przewoju TIR oraz region zawierający geny odpowiedzialne za wirulencję (6), jak białka

Serp2 należącego do rodziny inhibitorów proteazy serynowej (7). We Włoszech stosowane są szczepionki homologiczne zawierające atenuowane szczepy: SG33 lub Borghi wirusa myksomatozy. Szczep Borghi pochodzi z osłabionego szczepu kalifornijskiego MSD. Atenuację szczepu uzyskano w wyniku serii pasażów na zarodkach kurzych (161 pasaży), a następnie w hodowlach komórek nerki królika (RK13) – 40 pasaży (cyt. za 6). W innych krajach, gdzie wirus myksomatozy jest stale obecny w populacji królików, stosuje się szczepionki heterologiczne i homologiczne, zawierające żywe atenuowane szczepy wirusa myksomatozy.

W Polsce dostępna jest szczepionka homologiczna, zawierająca żywy atenuowany szczep MAV wirusa myksomatozy. Szczepionkę stosuje się u królików w wieku powyżej 4 tygodni życia, a odporność poszczepienna pojawia się po upływie około 2 tyg. i utrzymuje się przez 6 miesięcy. Po tym okresie szczepienie powinno być powtórzone. W rejonach sprzyjających zakażeniom, w stadach rodzicielskich powinno się przeprowadzać dwa szczepienia w roku: pierwsze wczesną wiosną (marzec–kwiecień), drugie – późnym latem (sierpień–wrzesień). Oprócz szczepionki jednoskładnikowej, dostępne są także szczepionki skojarzone zawierające atenuowany wirus myksomatozy i inaktywowany wirus krwotocznej choroby królików (pomór królików, rabbit haemorrhagic disease – RHD). Odporność po szczepieniu pojawia się w ciągu około 2 tyg. i utrzymuje przez 6–9 miesięcy w przypadku myksomatozy i przez 12 miesięcy w przypadku RHD. Producenci zalecają wykonywanie szczepień przypoiminających w zależności od zastosowanej szczepionki, co 6 lub 9 miesięcy.

Szczepionki nowej generacji

W ostatnich latach coraz częściej podejmowane są próby zastąpienia szczepionek tradycyjnych szczepionkami uzyskiwanymi przy użyciu metod biologii molekularnej i inżynierii genetycznej.

Żywe, atenuowane szczepionki delecyjne

Zawierają one żywe wirusowe szczepy szczepionkowe, z genomu których usunięto

przy użyciu technik molekularnych geny kodujące właściwości chorobotwórcze. Proces ten, określany jako delecja, prowadzi do osłabienia drobnoustroju, który jednak zachowuje zdolność wytwarzania antygenów indukujących u szczepionego zwierzęcia odporność przeciwzakaźną (8). W przypadku dużych wirusów DNA, do których należą pokswirusy, istnieje szereg potencjalnych genów, które mogą być usunięte bez szkodliwego wpływu na przebieg procesu replikacji wirusa *in vitro*, co jednak powoduje atenuację wirusa *in vivo*. Użycie takich szczepów prowadzi do indukcji silnej komórkowej i humoralnej odpowiedzi immunologicznej, zapewniając długotrwałą ochronę i jednocześnie nie wywołując zmian klinicznych u szczepionego zwierzęcia (9).

Australijscy naukowcy, w ramach badań nad osłabieniem zjadliwości wirusa myksomatozy poprzez usuwanie genów za nią odpowiedzialnych, sprawdzali właściwości uodporniające tak atenuowanych szczepów wirusowych. Adams i wsp. (9) opracowali szczepionkę delecyjną, biorąc pod uwagę trzy geny odpowiedzialne za wirulencję: M010L, M011L oraz M007L/R. Gen M010L koduje naskórkowy czynnik wzrostu (epidermal growth factor – EGF), wydzielany z zakażonych komórek (10). Gen M011L koduje białko błony mitochondrialnej, które hamuje apoptozę w limfocytach, monocytach i makrofagach zakażonych wirusem myksomatozy (11, 12). Ramki odczytu obu genów zachodzą na siebie, dzięki czemu geny te mogą być usunięte podczas jednego procesu. Gen M007L/R zlokalizowany jest w regionie TIR (terminal inverted repeat) genomu wirusa myksomatozy, występuje więc w dwóch kopiach (9). Koduje receptor dla γ -interferonu. Delecja genu M007L/R prowadzi do wystąpienia zaawansowanej odpowiedzi komórkowej, charakteryzującej się migracją limfocytów w kierunku miejsca zakażenia i szybkim usuwaniem wirusa (13). Wyniki przeprowadzonych przez Adams i wsp. badań wskazują, że najlepsze rezultaty powstają w przypadku delecji wszystkich trzech genów. Do badań wykorzystano szczep Uriarra (Ur) wirusa myksomatozy, który u królików laboratoryjnych wywołuje charakterystyczny przebieg kliniczny, chociaż padnięcia występują rzadko. W wyniku delecji wymienionych genów otrzymano wirus szczepionkowy Ur-TKO (Triple-Knock-Out), który nie powodował żadnych znaczących klinicznych zmian u dorosłych królików, oprócz zmian pierwotnych w miejscu inokulacji. Króliki były dostatecznie chronione przed zakażeniem. W przypadku młodych królików, szczepionych w wieku 8 lub 12 tyg., objawy kliniczne związane ze szczepieniem

były bardzo łagodne. Odporność na zakażenie wśród młodych królików była podobna lub nawet lepsza niż w przypadku dorosłych zwierząt. Co więcej, dawka wirusa szczepionkowego mogła być zmniejszona 100-krotnie, bez ujemnego wpływu na indukowany poziom odporności. Transmisja Ur-TKO jest mało prawdopodobna z powodu występowania jedynie przez kilka dni po szczepieniu pojedynczych, niewielkich zmian skórnych, które mogłyby stanowić źródło wirusa (9). Transmisja wirusa przez owady krwiopijne zależy od jego miana oraz zjadliwości, co skutkuje różnym czasem utrzymywania się wirusa w organizmie królika (1).

Adams i wsp. (14) opracowali ponadto inną szczepionkę opartą na delecji genu M063 w szczepie Uriarra. Gen ten jest niezbędny do efektywnej replikacji wirusa *in vitro* w hodowlach pierwotnych i liniach ciągłych komórek królika (15). Delecja genu M063R powoduje upośledzenie tropizmu wirusa do komórek tak, że cykl replikacyjny w komórkach królików *in vitro*, jak i w organizmie zakażonych królików *in vivo* jest niekompletny (14). W zakażonych komórkach królików wirus z delecją genu M063R powoduje ekspresję wczesnych genów, natomiast zakażenie zostaje zwalczane przed wystąpieniem ekspresji późnych genów (15). Szczepienie zapewnia dobrą, ale krótkotrwałą ochronę przed zakażeniem i jest całkowicie bezpieczne. Jedyną obserwowaną reakcją poszczepioną było powstanie niewielkiego obrzęku w miejscu iniekcji, który ulegał całkowitej resorpcji w ciągu 3 tyg. od momentu szczepienia. Szczepione króliki produkowały niski poziom przeciwciał i wymagały rewakynacji, żeby zapewnić im ochronę przez co najmniej 10 tyg. Natomiast 35 tyg. po szczepieniu jedynie 5 z 12 królików utrzymywało dostateczny poziom odporności, a tylko u 1 królika wykryto przeciwciała neutralizujące, co stanowi słaby wynik w porównaniu z królikami, które przeżyły naturalne zakażenie. Te ostatnie wykazały obecność przeciwciał neutralizujących przez ponad 12 miesięcy i były skutecznie chronione przed zakażeniem doświadczalnym (14).

Opracowane szczepionki delecyjne zapewniały skuteczną ochronę przeciwko zakażeniu wirusem myksomatozy i były przede wszystkim bardzo bezpieczne. Delecja genów spowodowała jednak skrócenie okresu utrzymywania się przeciwciał w organizmie królika w porównaniu z bardziej zjadliwymi szczepami szczepionkowymi. Wirusy te nie były przenoszone na inne zwierzęta, co jest niezwykle istotne w przypadku ekosystemu Australii, gdzie myksomatoza stanowi element biologicznego zwalczania nadmiernej populacji królików dziko żyjących (9, 14).

Rekombinowane, żywe szczepionki wektorowe

Istotą szczepionek rekombinowanych jest włączenie do genomu wektora genów z drobnoustroju chorobotwórczego, które zaczynają kodować w nim antygeny ochronne przeciw chorobie wywoływanej przez drobnoustroj, z którego pochodzą. Jako wektory rekombinowanych, żywych szczepionek wektorowych używane są między innymi wirusy należące do rodziny *Poxviridae* (8).

Bertagnoli i wsp. opracowali rekombinowaną szczepionkę dwuwalentną przeciwko myksomatozie i krwotocznej chorobie królików (RHD), z użyciem atenuowanego szczepu SG33 wirusa myksomatozy jako wektora, który powoduje ekspresję białka VP60 wirusa RHD (16). Ponadto, żeby zwiększyć bezpieczeństwo szczepionki, autorzy dokonali inaktywacji wybranych genów zawartych w genomie szczepu SG33: TK (thymidine kinase), MGF (myxoma growth factor) i M11L, stanowiących czynniki zjadliwości. Przeprowadzone badania pokazały, że podanie śródskórne szczepionki rekombinowanej MV-RHDV chroni zwierzęta przed zakażeniem zarówno wirusem MV, jak i RHDV w równym stopniu, co szczepionki stosowane komercyjnie. Nie powoduje natomiast powstawania żadnych klinicznych zmian w przeciwieństwie do szczepionek żywych atenuowanych (16), stosowanych we Francji do rewakynacji (3) i zawierających szczep SG33, który może czasami wywoływać zmiany wśród młodych królików (cyt. za 16). Biorąc pod uwagę rozmieszczenie geograficzne wirusa MV, które jest podobne do RHDV, użycie rekombinowanej szczepionki przeciwko obu tym chorobom nie powoduje wprowadzenia do środowiska naturalnego innego wirusa niż ten, który już tam występuje (16, 17). Poza tym zastosowanie takiej szczepionki jest bezpieczne dla środowiska, gdyż wirus myksomatozy jest ściśle zaadaptowany do królików i w naturalnych warunkach nie jest patogenny dla innych gatunków zwierząt (16, 17, 18).

W Hiszpanii opracowano szczepionkę rekombinowaną zawierającą naturalnie atenuowany szczep wirusa myksomatozy 6918 oraz gen białka kapsydu wirusa RHD (19). Szczep 6918 jest niepatogenny i indukuje powstanie wysokiego poziomu specyficznych przeciwciał, chroniąc króliki przed zakażeniem zjadliwymi szczepami wirusa MV. Co więcej, szczep ten jest zdolny do rozprzestrzeniania się na drodze kontaktu bezpośredniego lub poprzez owady krwiopijne, zapewniając w ten sposób ochronę wśród królików nieszczepionych (5). Zdolność do transmisji szczepu szczepionkowego jest jego istotną cechą, gdyż atenuowane szczepy szczepionkowe

wirusa myksomatozy, otrzymane na drodze wielokrotnych pasażów w hodowlach komórkowych, są z reguły jej pozbawione. Dzieje się tak, ponieważ w trakcie pasażów wirusy te tracą niektóre swoje funkcje, które nie są istotne w procesie replikacji wirusa w hodowlach komórkowych, natomiast są niezbędne do rozprzestrzeniania się wirusa *in vivo* (3). Opracowana szczepionka 6918VP60-T2 zapewnia całkowitą ochronę przed zakażeniem zjadliwym wirusem zarówno po iniekcji podskórnej, jak i po podaniu doustnym. Badania wskazują, że przeciwciała przeciwko MV i RHDV były wykrywane co najmniej przez 8 miesięcy po szczepieniu. Opisano występowanie serokonwersji u królików nieszczepionych (20). Rozważano również problemy związane z terminem prowadzenia szczepień i zagęszczeniem zwierząt na określonym terenie (21).

Na początku września 2011 r. na rynku pojawiła się pierwsza dopuszczona do obrotu szczepionka rekombinowana przeciwko myksomatozie i pomorowi królików. Zawiera ona zmodyfikowany genetycznie żywy atenuowany wirus myksomatozy z wbudowanym genem kodującym białko kapsydu wirusa RHD. Dzięki temu króliki są uodpornione zarówno przeciwko wirusowi myksomatozy, jak również wirusowi krwotocznej choroby królików (22). Zgodnie z zaleceniami producenta szczepionkę podaje się podskórnie zdrowym królikom w wieku od 5. tygodnia życia. Odporność poszczepienna rozwija się w ciągu 3 tygodni i utrzymuje się przez rok. Szczepionki nie zaleca się stosować u samic w pierwszych 14 dniach ciąży, jak również u samców królików zarodkowych. Producent przestrzega również, że króliki szczepione uprzednio inną szczepionką przeciwko myksomatozie, a także króliki, które przeszły naturalne zakażenie szczepem terenowym wirusa MV, mogą po szczepieniu szczepionką rekombinowaną nie wytworzyć dostatecznej odporności przeciwko wirusowej krwotocznej chorobie królików. Z uwagi na fakt, że opisana szczepionka jest nowością na europejskim rynku, na razie brak danych literaturowych na temat jej skuteczności w terenie.

W niektórych krajach europejskich podejmowane są ponadto próby wprowadzenia profilaktyki czynnej do populacji królików dziko żyjących. Stanowi to jednak duży problem z uwagi na fakt, że zastosowanie na szeroką skalę komercyjnych szczepionek dla zwierząt wolno żyjących nie jest możliwe ze względu na konieczność indywidualnego ich podawania (19, 23). W krajach, gdzie populacja dziko żyjących królików jest bardzo duża i stanowi ważny element ekosystemu, prowadzi się szczepienia odłowionych królików. Szczepienia młodych zwierząt przeciwko

myksomatozie są uważane za prawie całkowicie skuteczne (24). W terenie szczepionki przeznaczone są dla zwierząt w każdym wieku. Chociaż szczepienia mogą być wykonywane przez cały rok, to najczęściej przeprowadza się je po okresie rozrodowym (późne lato). Często dziko żyjące króliki szczepi się ostatecznie tylko raz, bez względu na ich wiek czy status serologiczny (cyt. za 23) i bardzo rzadko są one szczepione ponownie. Taki program szczepień określany jest jako „ślepy” i mało jest danych na temat jego skuteczności (25).

Podsumowanie

Według danych Głównego Urzędu Statystycznego pogłowie królików (samic reprodukcyjnych) w Polsce w 2010 r. wyniosło 631,5 tys. sztuk. W porównaniu z wynikami powszechnego spisu rolnego z 2002 r. populacja tych zwierząt (samic) zmniejszyła się o 27,4%. Największy odsetek ferm stanowią małe fermy o liczebności do 4 sztuk samic królików, podczas gdy duże fermy (powyżej 20 sztuk) stanowią zaledwie kilka procent ogółu gospodarstw zajmujących się hodowlą królików (26, 27). Brak szczepień w stadach, zwłaszcza w mniejszych, powoduje, że ogniska myksomatozy notowane są co roku z różną częstotliwością. W przypadku pojawienia się choroby wśród zwierząt należy pamiętać, że istotne znaczenie odgrywa właściwe postępowanie lekarsko-weterynaryjne, tj. likwidacja źródła zakażenia, które stanowią króliki wykazujące objawy chorobowe, jak i podejrzane o chorobę. Bardzo ważna jest też właściwa dezynfekcja miejsca utrzymywania zwierząt. Króliki bez objawów klinicznych należy odizolować; w grupie tych zwierząt istnieje możliwość zastosowania szczepień interwencyjnych. W wielu krajach nieustannie prowadzone są badania nad opracowaniem szczepionek nowej generacji, należy sobie jednak zdawać sprawę, że, pomimo korzyści stosowania tego typu preparatów, stanowią one tylko jeden z elementów w procesie skutecznego zapobiegania i zwalczania myksomatozy królików.

Piśmiennictwo

1. Kwit E., Chrobocińska M., Bigoraj E.: Myksomatoza królików, problem nadal aktualny. *Życie Wet.* 2011, **12**, 956-960.
2. Gołab J., Jakóbski M., Lasek W.: *Immunologia*. Wyd. Naukowe PWN, 2002, s. 359.
3. Saurat P., Gilbert Y., Ganieri J. P.: Etude d'une souche de virus myxomateux modifié. *Rev. Med. Vet.* 1978, **129**, 415-451.
4. Marlier D., Mainil J., Boucraut-Baralon C., Linden A., Vindevogel H.: The efficacy of two vaccination schemes against experimental infection with a virulent amyxomatous or a virulent nodular myxoma virus strain. *J. Comp. Path.* 2000, **122**, 115-122.
5. Barcena J., Pages-Mante A., March R., Morales M., Ramirez M.A., Sanchez-Vizcaino, Torres J.M.: Isolation of attenuated myxoma virus field strain that can confer protection against myxomatosis on contacts of vaccinates. *Arch. Virol.* 2000, **145**, 759-771.
6. Cavadini P., Botti G., Barbieri I., Lavazza A., Capucci L.: Molecular characterization of SG33 and Borghi vaccines used against myxomatosis. *Vaccine* 2010, **28**, 5414-5420.

7. Petit F., Boucraut-Baralon C., Py R., Bertagnoli S.: Analysis of myxoma virus genome using pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* 1996, **50**, 27-32.
8. Truszczyński M., Pejsak Z.: Szczepionki nowej generacji. *Medycyna Wet.* 2006, **62**, 855-859.
9. Adams M.M., Leeuwen van B.H., Kerr P.J.: Construction and evaluation of live attenuated myxoma virus vaccines with targeted virulence gene deletions. *Vaccine* 2008, **26**, 5843-5854.
10. Upton C., Macen J. L., McFadden G.: Mapping and sequencing of a gene from myxoma virus that is related to those encoding epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *J. Virol.* 1987, **61**, 1271-1275.
11. Macen J. L., Graham K. A., Fong Lee S., Schreiber M., Boshkov L. K., McFadden G.: Expression of the myxoma virus tumor necrosis factor receptor homologue and M11L genes is required to prevent virus-induced apoptosis in infected rabbit T lymphocytes. *Virology* 1996, **218**, 232-237.
12. Everett H., Barry M., Lee S. F., Sun X., Bleackley R. C., McFadden G.: M11L: a novel mitochondria-localized protein of myxoma virus that blocks apoptosis of infected leukocytes. *J. Exp. Med.* 2000, **191**, 1487-1498.
13. Mossman K., Nation P., Macen J., Garbutt M., Lucas A., McFadden G.: Myxoma virus M-T7, a secreted homolog of the interferon-gamma receptor, is a critical virulence factor for the development of myxomatosis in European rabbits. *Virology* 1996, **215**, 17-30.
14. Adams M. M., Leeuwen van B.H., McFadden G., Kerr P. J.: Construction and testing of a novel host-range defective myxoma virus vaccine with the M063 gene inactivated that is non-permissive for replication in rabbit cells. *Vet. Res.* 39, 2008, 60-73.
15. Barrett J. W., Shun Chang C., Wang G., Werden S. J., Shao Z., Barrett C., Gao X., Belsito T. A., Villeneuve D., McFadden G.: Myxoma virus M063R is a host range gene essential for virus replication in rabbit cells. *Virology* 2007, **361**, 123-132.
16. Bertagnoli S., Gelfi J., le Gall G., Boilletot E., Vautherot J.-F., Rascchaert D., Laurent S., Petit F., Boucraut-Baralon C., Milon A.: Protection against myxomatosis and rabbit viral hemorrhagic disease with recombinant myxoma viruses expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *J. Virol.* 1996, **70**, 5061-5066.
17. Torres J. M., Ramirez M. A., Morales M., Barcena J., Vazquez B., Espuna E., Pages-Mante A., Sanchez-Vizcaino J. M.: Safety evaluation of a recombinant myxoma-RHDV virus inducing horizontal transmissible protection against myxomatosis and rabbit hemorrhagic disease. *Vaccine* 2001, **19**, 174-182.
18. Stanford M.M., Werden S.J., McFadden G.: Myxoma virus in the European rabbit: interactions between the virus and its susceptible host. *Vet. Res.* 2007, **38**, 299-318.
19. Barcena J., Morales M., Vazquez B., Boga J. A., Parra E., 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** (3), 1114-1123.
20. 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.
21. Guittion J.-S., Devillard S., Guenezan M., Fouchet D., Pontier D., Marchandeu S.: Vaccination of free-living juvenile wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) against myxomatosis improved their survival. *Prev. Vet. Med.* 2008, **84**, 1-10.
22. Spibey N., McCabe V.J., Greenwood N.M., Jack S.C., Sutton D., Waart L. van der: Novel bivalent vectored vaccine for control of myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease. *Vet. Rec.* 2012, **10**, 1-4.
23. Ferreira C., Ramirez E., Castro E., Ferreras P., Alves P.C., Redpath S., Villafuerte R.: Field experimental vaccination campaigns against myxomatosis and their effectiveness in the wild. *Vaccine* 2009, **27**, 6998-7002.
24. Rosell J.M.: Health status of commercial rabbitries in the Iberian Peninsula. A practitioner's study. *World Rabbit Sci.* 2003, **11**, 157-169.
25. Calvete C., Estrada R., Villafuerte R., Osacar J.J., Lucientes J.: Epidemiology of viral haemorrhagic disease and myxomatosis in free-living population of wild rabbits. *Vet. Rec.* 2002, **150**, 776-782.
26. „Powszechny spis rolny 2002. Gospodarstwa rolne – grupy obszarowe a kierunki produkcji 2002” oparty na danych Głównego Urzędu Statystycznego. www.stat.gov.pl/gus.
27. „Powszechny Spis Rolny 2010. Raport z wyników” oparty na danych Głównego Urzędu Statystycznego. www.stat.gov.pl/gus.

Lek. wet. Ewa Kwit, Zakład Wirusologii Żywności i Środowiska, Państwowy Instytut Weterynaryjny, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy, e-mail: ewa.kwit@piwet.pulawy.pl