

### The problem with interpretation of bluetongue PCR and cELISA results in animals under intra community trade

Żmudziński J.F., Smreczak M., Orłowska A., Trębas P., Marzec A., Rola J., Department of Virology, National Veterinary Research Institute, Pulawy

This paper was aimed at the presentation of difficulties in the interpretation of bluetongue (BT) diagnostic RT-PCR results in cattle. The possible role of cattle vaccination with commercial vaccines in the yielding a number of positive, real time RT-PCR results was discussed. Also the relationship between the RT-PCR Ct value and the potential infectivity of an animal showing RT-PCR positive result was described to address the question of BT virus transmission between animals under intra-community trade. Even weakly positive RT-PCR result can cause the significant alarm in a country that is free from bluetongue. The persistence of BT virus in a host animal, versus the RT-PCR positive result, in relation to the time elapsed from natural infection or vaccination with inactivated vaccine, was highlighted.

**Keywords:** blue tongue, RT-PCR, cattle, international animals trade, European Union.

W sierpniu 2006 r. choroba niebieskiego języka (bluetongue – BT) pojawiła się w krajach Europy Północnej. Do 1 lutego 2007 r. zarejestrowano 2120 ognisk w Belgii, Holandii, we Francji, w Luksemburgu oraz w Niemczech. Przyczyną epizootii był serotyp 8 wirusa (BTV-8). Przed 2006 r. choroba niebieskiego języka występowała głównie w krajach basenu Morza Śródziemnego, gdzie stwierdzano serotypy 1, 2, 4, 9, 16. Lata 2007–2008 to okres dalszego szerzenia się BTV-8 oraz BTV-1 w Europie. W 2008 r. BTV-8 pojawił się u bydła w południowo-wschodnim regionie Zjednoczonego Królestwa, a w latach 2008–2009 ten sam wirus krążył w północnych Włoszech (1). Od 2007 do 2015 r. w Europie Zachodniej i Środkowej wykryto siedem serotypów BTV (2). Wiosną 2007 r. wiele krajów przystąpiło do masowych szczepień przeciwko BTV-8 i BTV-1 zwierząt wrażliwych. W 2009 r. w Belgii, Holandii i Niemczech zarejestrowano przypadki BT związane ze szczepieniami. W tym samym roku BTV-8 dotarł do Norwegii i Szwecji. Badania i obserwacje epidemiologiczne wskazywały, że obok kuczmanów (*Culicoides*), które są głównym wektorem szerzenia się wirusa, również wymiana handlowa i przemieszczanie (transport) zwierząt wrażliwych na zakażenie odgrywa określoną rolę w transmisji BTV do regionów wolnych od wirusa i choroby. Stąd rozporządzenie 1266/2007 wprowadzało

## Problemy z interpretacją wyników badań PCR i cELISA w kierunku wirusa choroby niebieskiego języka w obrocie wewnątrzspółnotowym

Jan F. Żmudziński, Marcin Smreczak, Anna Orłowska, Paweł Trębas, Anna Marzec, Jerzy Rola

z Zakładu Wirusologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

monitoring i nadzór nad występowaniem BTV, restrykcje w przemieszczaniu zwierząt wrażliwych oraz szczepienia jako główne elementy kontroli rozprzestrzeniania wirusa. Załącznik III rozporządzenia 1266/2007 zezwala na zwolnienie z zakazu opuszczania strefy zamkniętej zwierząt wrażliwych na zakażenie, jeśli zwierzęta podczas transportu do miejsca przeznaczenia zostaną zabezpieczone przed atakiem wektora (kuczmany), a także zostaną spełnione określone warunki. Regulacje zawarte w rozporządzeniu 1266/2007 są o tyle dotkliwe, że zwierzęta ze strefy zamkniętej mogą być zwolnione z zakazu opuszczania tej strefy po 2 latach od ostatniego przypadku.

Ogniska BT, a właściwie epizootia BT, która w 2009 r. wystąpiła we Francji, w Hiszpanii, Niemczech i Wielkiej Brytanii spowodowała ogromne straty ekonomiczne jako skutek śmiertelności zwierząt, obniżonej produktywności i zakazu przemieszczania zwierząt (3, 4). Zatem rola badań i szczepień zwierząt wrażliwych stanowiących warunki zwolnienia z zakazu opuszczania strefy zamkniętej była drogą do ograniczenia tych strat. Jak wykazują dotychczasowe doświadczenia zebrane w opinii naukowej Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA), szczepienia prowadzone nawet przez 3 lata nie eliminują choroby niebieskiego języka i może się ona pojawić ponownie (5, 6). Dyrektywa 2000/75/EC ustanawia strefę ochrony o promieniu 100 km wokół ogniska choroby i strefę nadzoru o głębokości 50 km, która wyznaczana jest na zewnątrz strefy ochrony. Artykuły 9 i 10 dyrektywy 2000/75/EC dopuszczały szczepienia tylko w strefie ochronnej. W tym czasie – lata 2008–2009 – na skutek wystąpienia ognisk choroby we wschodnich landach Niemiec 43 powiaty w Polsce wzdłuż granicy z Niemcami znalazły się w strefie ograniczenia przemieszczeń zwierząt wrażliwych. W wyniku wdrożonych przez Inspekcję Weterynaryjną działań Polska została uznana przez Komisję Europejską za kraj wolny od

BT 1 czerwca 2010 r. W kontekście przedstawionych informacji, aktualnej sytuacji epizootycznej choroby niebieskiego języka w Europie, to jest wystąpienie BTV-4 w krajach południowo-wschodniej Europy oraz ponowne pojawienie się BTV-8 we Francji w 2015 r. – w celu zabezpieczenia Polski przed wprowadzeniem wirusa wykonywane są badania laboratoryjne zwierząt wrażliwych, które docierają do Polski w ramach handlu wewnątrzspółnotowego. Zgodnie z zapisami ust. 18 preambuły rozporządzenia 1266/2007 według opinii panelu naukowego ds. zdrowia i dobrostanu zwierząt EFSA z 24 kwietnia 2007 r. przemieszczanie zwierząt immunizowanych w następstwie stosowania szczepionki lub zwierząt, które nabyły odporność drogą naturalną, może być uważane za bezpieczne bez względu na krążenie wirusa w miejscu ich pochodzenia czy obecność wektora w miejscu przeznaczenia. Konieczne jest, aby zwierzęta poddane szczepieniu spełniały określone warunki przed opuszczeniem strefy zamkniętej, zawarte w załączniku III ust. 5 rozporządzenia 1266/2007. Zwierzęta powinny pochodzić ze stada, dla którego kompetentne władze zaakceptowały program szczepień, zwierzęta były szczepione szczepionką przeciwko określonemu serotypowi lub serotypom występującym bądź mogącym występować na określonym obszarze epidemiologicznym pochodzenia zwierząt, zwierzęta są w okresie odporności poszczepiennej gwarantowanej przez producenta szczepionki oraz zwierzęta te spełniają co najmniej jeden z następujących warunków:

- a) zostały poddane szczepieniom przynajmniej 60 dni przed datą przemieszczenia;
- b) były szczepione szczepionką inaktywowaną w terminie, który zapewnia wytworzenie skutecznej odporności, który to termin został określony w specyfikacji szczepionki zaaprobowanej do stosowania w danym programie szczepień, a zwierzęta poddano zgodnie z Podręcznikiem OIE testowi na obecność

czynnika, uzyskując wynik negatywny, a test wykonano przynajmniej 14 dni po wytworzeniu odporności, który to termin został określony w specyfikacji szczepionki użytej w zaakceptowanym programie szczepień;

- c) były wcześniej zaszczepione i poddane rewakcytacji szczepionką inaktywowaną w okresie trwania odporności gwarantowanym w specyfikacji szczepionki zaaprobowanej w programie szczepień;
- d) były utrzymywane w okresie wolnym sezonowo od wektora, określonym zgodnie z przepisami załącznika V, zwierzęta były trzymane od urodzenia lub przez okres co najmniej 60 dni w strefie sezonowo wolnej od choroby niebieskiego języka oraz zostały zaszczepione szczepionką inaktywowaną przed okresem niezbędnym do wytworzenia odporności określonym w specyfikacji szczepionki zaaprobowanej w programie szczepień.

Włochy dopuszczają import zwierząt wrażliwych ze stref zamkniętych Austrii i Francji już 10 dni po zakończeniu szczepień.

Od szczepionek BTV oczekuje się redukcji liczby przypadków klinicznych, indukcji przeciwciał neutralizujących wirus i, co najważniejsze, zapobiegania wirusowi, a przez to ograniczenie transmisji wirusa. Jednak, jak wskazują publikacje, wyniki badań wykonane zgodnie z zaleceniami Podręcznika OIE (7, 8) mogą powodować problemy z interpretacją statusu immunologicznego i epidemiologicznego przemieszczanych zwierząt szczególnie w kontekście szczepień, terminów i miejsca wykonania badań – przed wysyłką czy po przybyciu zwierząt do miejsca przeznaczenia. Przytoczone powyżej przepisy wskazują na reżim, w jakim stosowane są szczepienia, i stąd niezwykle ważną jest informacja, jaka towarzyszy danej przesyłce zwierząt. Nie wszystkie uodporniane zwierzęta są chronione przed zakażeniem/wiremiami i dlatego powinny być badane serologicznie i wirusologicznie przed wysyłką. Dodatkową trudność sprawia liczba serotypów BTV, bowiem wyniki uzyskiwane dla jednego serotypu nie powinny być odnoszone do innych serotypów BTV. Oprócz tego w obrębie tej grupy wirusów występują różne linie ewolucyjne lub topotypy w zależności od ich geograficznego pochodzenia. Umożliwia to różnicowanie wariantów BTV nawet w obrębie tego samego serotypu pochodzących z różnych źródeł (9, 10, 11, 12). Dlatego trudne jest określenie jednolitych zaleceń postępowania we wszystkich sytuacjach i należałoby stosować analizę ryzyka uwzględniającą wiele czynników mogących rzutować na status i sytuację

epidemiologiczną przemieszczanych i badanych zwierząt. Tak jak w przypadku wielu innych chorób zakaźnych real time RT-PCR (rtRT-PCR) jest stosowany także w diagnostyce choroby niebieskiego języka, dając możliwość bezpośredniego wykrycia wirusowego RNA w próbkach krwi od zwierząt wrażliwych.

Dodatni wynik rtRT-PCR BTV wskazuje na obecność u zwierząt materiału genetycznego wirusa choroby niebieskiego języka. Pojawia się zatem pytanie o związek, zależność pomiędzy występowaniem u zwierząt wirusa choroby niebieskiego języka (zwierzęta „zakażone”) a obecnością materiału genetycznego (kwasu nukleinowego) wirusa choroby niebieskiego języka (zwierzęta „niezakażone”, pomimo dodatniego wyniku rtRT-PCR). W przypadku choroby niebieskiego języka występuje szczególne zjawisko, na które wskazują publikacje naukowe, że „okres zakaźny” przyjęty w Podręczniku OIE (2016), rozdz. 8.3. Infection with Bluetongue artykuł 8.3.1. wynosi 60 dni i nie pokrywa się z okresem, w którym można stwierdzić obecność materiału genetycznego wirusa choroby niebieskiego języka w teście rtRT-PCR (13, 14). Wyniki badań przedstawione w publikacjach wskazują, że materiał genetyczny BTV-8 może być wykrywany testem rtRT-PCR do ok. 157–180 dnia po zakażeniu eksperymentalnym (15, 16, 17), a według danych z literatury okres utrzymywania się wirusowi zależy od serotypu BTV, typu zakażenia (naturalne, eksperymentalne), wieku zwierzęcia i metody izolacji wirusa (18). W 2008 r. u kóz w rejonie Toggenburg w Szwajcarii wykryty został nowy serotyp BTV-25 (19, 20). Kozki nie wykazywały żadnych objawów klinicznych choroby, pomimo że wirus był obecny we krwi przez ponad rok. Pięć ze 110 kóz reagowało dodatnio na BTV-25 przez okres 19–25 miesięcy. Krwi tych kóz użyto do eksperymentalnego zakażenia kóz negatywnych i wykazano wzrastające poziomy wirusowego RNA. Autorzy uznali, że wyniki tego eksperymentu dostarczają dowodów na znacznie dłuższe utrzymywanie się w organizmie zwierząt zakażonych wirusa niż dotychczas sądzono na przykładzie innych serotypów BTV. Z punktu widzenia epizootologii BTV i analizy ryzyka jest to niezwykle istotna informacja, która każe z rozwagą interpretować wyniki uzyskiwanych badań. Badaczom nie udało się wyizolować tego wirusa ani w hodowli komórkowej, w zależnych jajach kurzych, ani poprzez zakażenie myszy. Dlatego metoda RT-PCR była jedyną metodą z wyboru wykrywania tego serotypu. W rozdziale 2.1.3. Podręcznika OIE (2014) w punkcie 1.3. Molecular methods – detection of nucleic acid zawarta jest

uwaga, że „Technika RT-PCR zapewnia szybką identyfikację wirusowego kwasu nukleinowego BT w krwi i innych tkankach zakażonych zwierząt”. Istotne jest to, że diagnostyka oparta na RT-PCR powinna być interpretowana z ostrożnością, ponieważ procedura RT-PCR będzie wykrywać specyficzny dla wirusa kwas nukleinowy, podczas gdy „żywy” wirus może już nie występować i nie dochodzi do ustanowienia nowego zakażenia u owadów (wektor) lub ssaków (gospodarz). Stąd dodatni wynik RT-PCR niekoniecznie wskazuje na obecność zakaźnego wirusa (21). W świetle najnowszych danych literaturowych przytoczonych powyżej ostatnia informacja wymaga komentarza. Albowiem nieprzypadkowo znalazło się tu słowo „niekoniecznie”. Według jednych autorów wartość Ct uzyskana w teście RT-PCR na poziomie 26–27 daje możliwość izolacji wirusa z takiej próbki, ale według innych przy Ct=30 można również wyizolować wirus BT. Zaskakujący był fakt stosunkowo długiego okresu, kiedy wysokie miano przeciwciał neutralizujących występowało równocześnie z wysokim mianem wirusa. Z próbek polskich przesłanych w 2012 r. do unijnego laboratorium referencyjnego dla BT (EU-RL), które miały Ct na poziomie 24–33, laboratorium w Pirbright wyizolowało BTV-14, którego sekwencja nukleotydowa genu kodującego białko VP2 w ponad 90% wykazywała podobieństwo do sekwencji nukleotydowej referencyjnego szczepu BTV wykorzystywanego w Republice Południowej Afryki do produkcji szczepionki przeciwko BTV. Jest oczywiste, że im system detektorowy jest czulszy, tym łatwiej wirus wyizolować. Najczulszym według danych literatury jest zakażenie owiec i taką metodę zastosowało EU-RL w Pirbright w stosunku do próbki przesłanej z Polski. Nie ma jednoznacznie określonej wartości Ct, od której można by stwierdzić brak zakaźnego wirusa w próbce krwi na podstawie wyniku badania RT-PCR. Ważny jest system, jaki zastosowano do izolacji wirusa BT (hodowle komórkowe, zależne jaja kurze, eksperymentalne zakażenie zwierząt wrażliwych). Nie mniej istotny jest serotyp wirusa BT, czego dowodem jest przytoczony powyżej serotyp BTV-25. Zarówno dodatni wynik testu izolacji wirusa BT, jak i stwierdzenie obecności jego materiału genetycznego wskazują na kontakt zwierzęcia z wirusem. Jednak należy zaznaczyć, że test RT-PCR może dawać wynik dodatni u zwierząt szczepionych szczepionką inaktywowaną przeciwko chorobie niebieskiego języka. W tym ostatnim przypadku wyniki badań różnych autorów znacznie odbiegają od siebie. Eschbaumer i wsp. (22) wykonali eksperymentalne zakażenie u owiec immunizowanych inaktywowaną

szczepionką BTV-8. Wirus do zakażenia kontrolnego pochodził z epizootii BT, która miała miejsce w Aachen w Niemczech w 2007 r. Spośród 17 zaszczepionych owiec dodatni wynik w badaniu serologicznym uzyskano u 16 zwierząt. Dla jednej z immunizowanych owiec uzyskano wynik dodatni w rtRT-PCR o wartości  $Ct=36$  (22). Jeśli tym immunizowanym owcom podano „żywy, zakaźny wirus BT” i u jednej stwierdzono dodatni wynik na poziomie  $Ct=36$ , to czy przy świadomości, że immunizowana owca zakażona została „żywym wirusem BT” można uznać, że wynik  $Ct$  na poziomie 36 nie stanowi ryzyka transmisji wirusa do innych zwierząt wrażliwych? I chociaż ten dodatni wynik rtRT-PCR wystąpił w 10 dniu, a kolejne pobrania były negatywne, to wydaje się, że ze względu na brak zakaźności BTV przy  $Ct$  powyżej 26 może być ryzykowna. W przytoczonym eksperymencie zarówno warunki immunizacji, jak i zakażenia eksperymentalnego podlegały ścisłej kontroli. Dodatkowo, jak podali Eschbaumer i wsp. (22), nieoczekiwanie jedna z kontrolnych, nieimmunizowanych owiec uległa serokonwersji, chociaż testem rtRT-PCR nie wykryto materiału genetycznego BTV. Świadczy to o możliwości transmisji wirusa użytego do zakażenia kontrolnego owiec immunizowanych do wrażliwych owiec kontrolnych. Zatem sugestia/twierdzenie, że zwierzęta immunizowane są „bezpieczne”, może nie do końca być słuszna.

Badacze włoscy Gialleonardo i wsp. (23), badając okres utrzymywania się wirerii u bydła zakażonego BTV-8 w zależności od dawki wirusa, wykazali, że wiremia występowała przez 39 dni po zakażeniu, natomiast test rtRT-PCR wykrywał wirusowe RNA do 151 dnia po zakażeniu. Autorzy ci dodają także, że nie wszystkie zwierzęta uodporniane są chronione przed wiracją będącą następstwem zakażenia i powinny być badane serologicznie i wirusologicznie przed wysyłką. Metodą, jaką zalecają, jest test rtRT-PCR jako najczulszy i wysoce specyficzny. Takie postępowanie powinno zapobiec wysyłce zwierząt zakażonych, które są głównym źródłem rozprzestrzenienia BTV. Ale też dodają, że w teście rtRT-PCR uzyskuje się wyniki dodatnie w dłuższym okresie niż trwa wiremia. Niestety, nie udało im się znaleźć korelacji pomiędzy wartością  $Ct$  a obecnością zakaźnego wirusa. Na początku eksperymentu BTV był izolowany z próbek o  $Ct=30$ , podczas gdy po 39 dniach od zakażenia nie było możliwe wyizolowanie wirusa, pomimo że stwierdzane wartości  $Ct$  wynosiły poniżej 30 (23).

Moulin i wsp. (24) immunizowali owce szczepionką BTV8 (MSD) i zakażali eksperymentalnie BTV-8. Wyniki badania

rtRT-PCR wykazały, że owce immunizowane miały niższe średnie wartości  $Ct$  niż owce kontrolne. U jednej z uodpornionych owiec rozwinęła się wiremia. Wartości  $Ct$  skategoryzowano wg następującego klucza:

- $Ct > 35$  – wiremia negatywna,
- $Ct 30 <= Ct < 35$  – wiremia wątpliwa,
- $Ct 30 <$  – wiremia dodatnia.

Oceniając wyniki RT-PCR według powyższego klucza, autorzy stwierdzili wiramię u jednej ze szczepionych owiec.

Z kolei Oura i wsp. (25) uodporniali owce szczepionką BTV8 INTERVET, a następnie poddawali je zakażeniu kontrolnemu. W celu określenia, czy u zwierząt immunizowanych szczepionką BTV inaktywowaną wykrywa się wirusowe RNA, grupę 33 owiec uodporniano, a następnie badano testem rtRT-PCR w pierwszym i siódmym dniu po podaniu szczepionki. U żadnego z 33 zwierząt immunizowanych nie wykrywano wirusowego RNA. Grupę 7 owiec autorzy poddali zakażeniu kontrolnemu. U sześciu z siedmiu owiec uodpornianych wykrywano przeciwciała BTV w sELISA (sandwich double antygen) i SNT (test seroneutralizacji) w dniu zakażenia kontrolnego, ale nie wszystkie z nich reagowały dodatnio w teście cELISA (competitive ELISA). Zakażenie kontrolne wypadło negatywnie u 6 owiec – nie wystąpiły u nich objawy kliniczne ani nie wykrywano wirusowego RNA. U jednej owcy, u której nie wykrywano przeciwciał BTV, nie obserwowano objawów klinicznych BT, temperatura ciała była poniżej  $40^{\circ}C$ , ale rozwinęła się u niej wiremia utrzymująca się od 2 dnia po zakażeniu kontrolnym przez okres 21 dni (koniec obserwacji). U owcy tej wartości  $Ct$  były niższe w porównaniu do owiec kontrolnych (nieuodpornianych). Nie można wykluczyć sytuacji, że szczepienie tej owcy wykonano niewłaściwie, co skutkowało niepełną ochroną. Autorzy podkreślają słabą korelację pomiędzy wynikami cELISA (brak przeciwciał BTV u 3 owiec) a wynikiem zakażenia kontrolnego. Pomimo wyniku negatywnego cELISA owce te nie wykazywały objawów klinicznych BT i pozostały wirusologicznie negatywne po zakażeniu kontrolnym. Oura i wsp. (25) przytaczają obserwacje Unijnego Laboratorium Referencyjnego dla BT w Pirbright, które stwierdzało, że wiele z uodpornianych owiec w kampanii szczepień 2008 r. nie posiadało przeciwciał w teście cELISA. Pojawiło się zatem pytanie: czy wynik cELISA odzwierciedla niską immunogenność szczepionki, czy niską czułość testu cELISA? Wyniki badań Oury i wsp. (25) wykazały, że cELISA ma niższą czułość niż sELISA. Autorzy zalecają test sELISA do badania efektywności szczepień BTV.

Zagadnienie występowania dodatnich reakcji rtRT-PCR u owiec szczepionych przeciwko BTV-8 poruszane jest także w publikacji Steinrigl i wsp. (26). Autorzy podają, że od początku szczepień BTVPUR ALSap 8 w 2008 r., często rejestrowali dodatnie wyniki rtRT-PCR przy wysokich wartościach  $Ct$  wskazujące na obecność niskich koncentracji wirusowego RNA w próbkach od zwierząt. Typowe było, że badanie rtRT-PCR wypadło negatywnie dla próbek pobranych ponownie kilka dni do kilku tygodni później. Na tej podstawie postawiono hipotezę, że choć szczepionka przeciwko BTV-8 została podana podskórnie, to dostawała się do krwioobiegu i w konsekwencji wykrywana była w teście rtRT-PCR. Stąd badacze podzielili próbę eksperymentalnego potwierdzenia tej hipotezy. Badali oni za pomocą RT-qPCR (rtRT-PCR z analizą ilościową) obecność wirusowego RNA w próbkach krwi od pięciu owiec uodpornianych komercyjną, inaktywowaną szczepionką BTVPUR ALSap 8 (Merial, Francja). Każdej owcy podano jedną dawkę szczepionki – 1 ml podskórnie. Eksperyment wykonano w miesiącach lipiec–sierpień. U czterech owiec zarejestrowano łagodny wzrost temperatury ciała w 1–2 dniu po szczepieniu, a u trzech epizod ten powtórzył się pomiędzy 15 a 30 dniem obserwacji. Serokonwersja wystąpiła w dniu 5 i 7 po szczepieniu. Obecność wirusowego RNA badano metodą rtRT-qPCR w okresie 75 dni po szczepieniu, prowadząc amplifikację do 45 cyklu. Użyto trzech różnych zestawów do przeprowadzenia rtRT-qPCR w celu wykrycia obecności RNA pochodzącego ze szczepionki BTVPUR ALSap 8. U wszystkich owiec wynik rtRT-qPCR wypadł dodatnio w okresie do 7 dnia po szczepieniu, a wartości  $Ct$  wahały się w zakresie 31,9–43 (26). Pojedyncze owce reagowały dodatnio do 15 dnia po szczepieniu. U jednej owcy wynik dodatni rtRT-qPCR wystąpił jeszcze w 54 dniu po szczepieniu, ale już po 61 dniu od szczepienia nie wykryto dodatniej reakcji rtRT-PCR. Jest sprawą oczywistą, że czułość metody rtRT-PCR jest wysoka – wykrywa kilka kopii poszukiwanych sekwencji nukleotydowych. Autorzy austriaccy komentują, że o ile ta wysoka czułość rtRT-PCR jest korzystna z punktu widzenia jakości testu, to może ona prowadzić do wyników fałszywie dodatnich u zwierząt szczepionych i dodają, że test ten może wykrywać ślady kwasów nukleinowych pochodzących ze szczepionki i jest to stan przemijający (26). Autorzy dodają, że Austria była krajem wolnym od BT przed i w okresie trwania eksperymentu, a dodatni terenowy przypadek BT wystąpił w okresie 2 miesięcy po zakończeniu

eksperymentu i w miejscu oddalonym o 200 km, co w zasadzie wykluczało możliwość zakażenia owiec eksperymentalnych szczepem terenowym BTV. Ponadto stwierdzają, że wirusowe RNA stanowiące ekwiwalent 0,5 µl szczepionki (zastosowana dawka 1 ml) było wykrywane we krwi owiec w pierwszym dniu po szczepieniu BTVPUR AlSap 8 (ustalono na podstawie rozcieńczeń szczepionki). To sugeruje, że tylko bardzo minimalne ilości szczepionki dostają się do układu krążenia. Można to wyrazić jako równoważnik 0,03 µl szczepionki rozcieńczonej w 3 litrach krwi, co odpowiada owcy o masie 60 kg. Autorzy zaznaczają, że producent szczepionki nie podaje liczby cząstek wirusowych w dawce szczepionki (26).

Wyniki badań zespołu Steinrigl (26) pozostają w kontrowersji do wyników Oury i wsp. (25). Jednak nie można zastosować prostego porównania, ponieważ oba zespoły wykonały badania dla innych szczepionek i w odniesieniu do innego fragmentu genomu BTV oraz zastosowały inne protokoły rtRT-PCR. W przypadku Oury (25) była to szczepionka BTV-8 vaccine Intervet, Boxmeer, Holandia i segment 1 BTV w badaniu rt RT-PCR. Natomiast Steinrigl i wsp. (26) wykonali badania ze szczepionką BTVPUR AlSap 8 firmy Merial, Francja i w odniesieniu do segmentu 5 BTV techniką rtRT-qPCR.

Zientara i Sánchez-Vizcaino (27), omawiając epizootię BT w Europie, podkreślają, że serotyp BTV-8, który pojawił się w północnej Europie, był wysoce zjadliwy dla bydła, owiec i wielbłądów południowoamerykańskich, był w stanie przenikać barierę łożyskową, co nie było cechą typową dla szczepów BTV izolowanych dotąd w Europie. W celu ograniczenia strat Komisja Europejska zaakceptowała programy zwalczania epizootii BT poprzez stosowanie szczepionek i programów szczepień. W latach 2006–2013 użyto ponad 100 mln dawek szczepionki, uzyskując szybki spadek liczby ognisk choroby. W kolejnej publikacji Zientara i wsp. (28) przedstawiają trudności z interpretacją wyników badań testu RT-PCR we Francji. Ilościowo rtRT-PCR był i jest metodą diagnostyczną w programach nadzoru nad występowaniem choroby. W 2007 r. wykryto we Francji ponad 14 tys. przypadków BT, ponad 38 tys. w 2008 r., mniej niż 90 w 2009 r. i tylko jeden w 2010 r. W latach 2009–2010 ponad 80% pogłowia bydła, owiec i kóz zostało zaszczepione we Francji. Pozytywną diagnozę postawiono u zwierząt z niską wartością Ct (poniżej 25) i wykazujących jednocześnie objawy kliniczne sugerujące chorobę niebieskiego języka. Autorzy przedstawiają szereg przypadków (ok. 100) dodatnich wyników rt-RT-PCR wykrytych w okresie

2009–2010 z wysokimi wartościami Ct >33. Zwierzęta nie wykazywały objawów klinicznych choroby. Zakażenie zależonych jaj kurzych, hodowli komórkowych KC (owadzych) dało wynik negatywny. Ponowne badania w 15 dniu po pierwszym pobraniu próbek dały również wynik negatywny. Następnie w okresie od czerwca 2009 r. do grudnia 2010 r. wykryto 1792 dodatnie w rt-RT-PCR próbki dostarczone do laboratorium w ramach aktywnego monitoringu BT (28). Autorzy sugerują, że część tych dodatnich wyników była efektem krążenia wirusa w 2009 r., a część była następstwem szczepień. W 95% próbek nie udało się ustalić serotypu wirusa, ale wśród próbek, dla których ustalono serotyp, w 83% był to BTV-8, w 16,4% był to BTV-1, a w 0,6% był to równocześnie serotyp BTV-8 i BTV-1. W 2011 r. sytuacja ta się powtórzyła – dodatnie wyniki rt-RT-PCR wystąpiły w zimie, w pierwszych kilku miesiącach roku, kiedy nie było wektora, nie szczepiono zwierząt i nie stwierdzono kontaminacji laboratoryjnej próbek. Autorzy dodają, że trudno określić, czy te dodatnie wyniki rtRT-PCR wystąpiły jako skutek krążenia wirusa, utrzymywania się wirusowego RNA w organizmie zwierząt, czy może wykrywano genom BTV obecny w szczepionce inaktywowanej. Wyniki te spowodowały alarm w krajach, które doświadczyły epidemii BT i gdzie osiągnięto dobre efekty zwalczania choroby. Tak może się dzieć, gdy szczepienia i monitorowanie występowania choroby prowadzone są jednocześnie (28).

Spedicato i wsp. (29), badając na owcach skuteczność szczepionki BTVPUR AlSap 8, nie wykrywali wirusowego RNA w próbkach od zwierząt, które zakażano eksperymentalnie w 14 dniu po szczepieniu i wykrywali wirusowe RNA u 2 z 6 owiec zakażanych w 7 dniu po podaniu szczepionki. Autorzy sugerują, że owce mogą być wprowadzone do rejonu wolnego od BTV po 20–30 dniach (maksymalny okres wiremii u owiec uodpornianych i poddanych zakażeniu kontrolnemu), jeśli podano jedną dawkę szczepionki.

Najnowsza wersja opinii naukowej EFSA (marzec 2017 r.) podkreśla, że zakażenie BTV u przeżuwaczy utrzymuje się długo, ale nie jest ono trwałe. Długość okresu wremicznego w części zależy od okresu życia krwinek czerwonych. Zgodnie z opinią OIE, na podstawie analizy danych z prawdopodobieństwem >99% można przyjąć, że okres zakaźny trwa u przeżuwaczy 60 dni. U bydła dorosłego wiremii zanika przed 9 tygodniem. Ten 60-dniowy okres zakaźności jest znacznie krótszy niż okres do 7 miesięcy, a może i dużej, w którym kwas nukleinowy BTV może być wykrywany we krwi przeżuwaczy testem RT-PCR.

W konkluzji opinia naukowa EFSA stwierdza, że technika RT-PCR jest nadmiernie czuła w identyfikacji zwierząt „wirusowo dodatnich”.

Wobec przedstawionych powyżej danych z literatury, kontrowersyjnych w odniesieniu do interpretacji wyniku dodatniego PCR (rt-RT-PCR, rtRT-qPCR) u zwierząt uodpornianych szczepionkami komercyjnymi kwestia, czy zwierzęta takie mogą stwarzać niebezpieczeństwo transmisji i być źródłem wirusa choroby niebieskiego języka dla wektorów pomimo, że były szczepione przeciwko BTV – pozostaje otwarta. Osobną i chyba niezwykle ważną sprawą jest status kraju względem BT. Polska jest krajem wolnym od choroby niebieskiego języka od 1 czerwca 2010 r. i nie jest obojętne, czy na terytorium naszego kraju znajdują się zwierzęta zarówno RT-PCR, jak i serologicznie dodatnie (wyniki testów wskazują na kontakt z wirusem lub na zastosowanie szczepionki p-ko BTV). Należałoby nadmienić, że w latach 2007–2010, zgodnie z polityką Głównego Lekarza Weterynarii, był zakaz szczepień, a zwierzęta wprowadzane do Polski eliminowane były z hodowli, jeżeli którykolwiek z testów, czy to RT-PCR, czy badania serologiczne, wypadły dodatnio. Jednocześnie prowadzono i prowadzi się nadal program wykrywania występowania zakażeń wirusem choroby niebieskiego języka w stosunku do bydła rodzimego. Pomimo że rozporządzenie 1266/2007 uznaje zwierzęta szczepione szczepionką określonego typu za bezpieczne, to nawet dodatni wynik badania serologicznego również powinien być rejestrowany, ponieważ może wskazywać na krążenie wirusa w danym regionie.

## Piśmiennictwo

- Spedicato M., Lorusso A., Salini R., Di Gennaro A., Leone A., Teodori L., Cassacia C., Portanti O., Calistri P., Giovannini A., Savini G.: Efficacy of vaccination for bluetongue virus serotype 8 performed shortly before challenge and implications for animal trade. *Prev. Vet. Med.* 2017, **136**, 49–55.
- Martinelle L., Dal Pozzo F., Sarradin P., Van Campe W., De Leeuw I., De Clerq K., Thys C., Thiry E., Saegerman C.: Experimental bluetongue virus superinfection in calves previously immunized with bluetongue virus serotype 8. *Vet. Res.* 2016, **47**, 47–73 DOI 10.1186/s13567-016-0357-6.
- Zientara S., Sanchez-Vizcaino J.M.: Control of bluetongue in Europe. *Vet. Microbiol.* 2013, **165**, 33–37.
- Gialleonardo L.Di., Migliaccio P., Teodori L., Savini G.: The length of BTV-8 viremia in cattle according to infection doses and diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.* 2011, **91**, 316–320.
- EFSA Journal, March 2015, Vol.15 (3): 1–132 (DOI: 10.2903/j.efsa.2017.4698).
- EFSA z 08 marca 2017 (EFSA Journal 15, Issue 3, 2017).
- OIE – *Terrestrial Animal Health Code* 10/06/2016.
- OIE *Terrestrial Manual* 2014.
- Gould A.R.: The complete nucleotide sequence of bluetongue virus serotype 1 RNA3 and a comparison with other geographic serotypes from Australia, South Africa and United States of America, and other orbivirus isolates. *Virus Res.* 1987, **7**, 169–183.

10. Gould A.R., Pritchard L.I.: Relationships amongst bluetongue viruses revealed by comparison of capsid and outer coat protein nucleotide sequences. *Virus Res.* 1990, **17**, 31–52.
11. Jimenez-Clavero M.A., Aguero M., Miguel E.S., Mayoral T., Lopez M.C., Ruano M.J., Romero E., Monaco F., Polci A., Savini G., Gomez-Tejedor C.: High throughput detection of bluetongue virus by a new real-time fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction: Application on clinical samples from current Mediterranean outbreaks. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2006, **18**, 7–17.
12. Toussaint J.F., Sailleau C., Breard E., Zientara S., De Clercq K.: Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCR targeting two different genomic segments. *J. Virol. Methods* 2007, **140**, 115–123.
13. Gialleonardo L.Di., Migliaccio P., Teodori L., Savini G.: The length of BTV-8 viremia in cattle according to infection doses and diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.* 2011, **91**, 316–320.
14. EFSA z 8 marca 2017 (EFSA Journal 15, Issue 3, 2017)
15. Gialleonardo L.Di., Migliaccio P., Teodori L., Savini G.: The length of BTV-8 viremia in cattle according to infection doses and diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.* 2011, **91**, 316–320.
16. Martinelle L., Dal Pozzo F., Sarradin P., Van Campe W., De Leeuw I., De Clercq K., Thys C., Thiry E., Saegerman C.: Experimental bluetongue virus superinfection in calves previously immunized with bluetongue virus serotype 8. *Vet. Res.* 2016, **47**, 47–73 DOI 10.1186/s13567-016-0357-6.
17. EFSA z 8 marca 2017 (EFSA Journal 15, Issue 3, 2017).
18. Gialleonardo L.Di., Migliaccio P., Teodori L., Savini G.: The length of BTV-8 viremia in cattle according to infection doses and diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.* 2011, **91**, 316–320.
19. Hofmann M.A., Renzullo S., Mader M., Chaignat V., Worwa G., Thuer B.: Genetic Characterization of Toggenburg Orbivirus, a New Bluetongue Virus, from Goats, Switzerland. *Emerg. Infect. Dis.* 2008, **12**, 1855–1861; doi: 10.3201/eid1412.080818.
20. Voegtlin A., Hofmann M.A., Nenniger C., Renzullo S., Steinrigl A., Loitsch A., Schwermer H., Kaufmann C., Thur B.: Long-term infection of goats with bluetongue virus serotype 25. *Vet. Microbiol.* 2013, **166**, 165–173; doi: 10.1016/j.vetmic.2013.06.001.
21. *OIE Terrestrial Manual* 2014.
22. Eschbaumer M., Hoffmann B., Konig P., Tiefke J.P., Gethmann J.M., Conthras F.J., Probst C., Mettenleiter C., Beer M.: Efficacy of three inactivated vaccines against bluetongue virus serotype 8 in sheep. *Vaccine* 2009, **27**, 4169–4175.
23. Gianleonardo L.Di., Migliaccio P., Teodori L., Savini G.: The length of BTV-8 viremia in cattle according to infection doses and diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.* 2011, **91**, 316–320.
24. Moulin V., Noordegraaf C.V., Makoschey B., Van der Sluis M., Veronesi E., Darpel K., Mertens P.P.C., De Smit H.: Clinical disease in sheep caused by bluetongue virus serotype 8, and prevention by an inactivated vaccine. *Vaccine* 2012, **30**, 2228–2235.
25. Oura C.A.L., Wood J.L.N., Sanders A.J., Bin-Tarif A., Henstock M., Edwards L., Floyd T., Simmons H., Batten C.A.: Seroconversion, neutralising antibodies and protection in bluetongue serotype 8 vaccinated sheep. *Vaccine* 2009, **27**, 7326–7330.
26. Steinrigl A., Revilla-Fernández S., Eichinger M., Koefler J., Winter P.: Bluetongue virus RNA detection by RT-qPCR in blood samples of seep vaccinated with a commercially available inactivated BTV-8 vaccine. *Vaccine* 2010, **28**, 5573–5581.
27. Zientara S., Sánchez-Vizcaíno J.M.: Control of bluetongue in Europe. *Vet. Microbiol.* 2013, **165**, 33–37.
28. Zientara S., Amat J.P., Sailleau C., Viarouge C., Desprat A., Vitour D., Bréard E.: Difficulties in the interpretation of bluetongue RT-PCR results in France. *Vet. Rec.* 2017, doi: 10.1136/vr.100485, 1–2
29. Spedicato M., Lorusso A., Salini R., Di Gennaro A., Leone A., Teodori L., Casaccia C., Portanti O., Calistri P., Giovannini A., Savini G.: Efficacy of vaccination for bluetongue virus serotype 8 performed shortly before challenge and implications for animal trade. *Prev. Vet. Med.* 2017, **136**, 49–55.