

Marek Niemiałtowski*, Lidia Szulc, Anna Boratyńska**, Lech Martyniszyn**,
Justyna Struzik**, Justyna Karandys****

Zakład Immunologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW,
ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Wpłynęło w listopadzie 2009 r.

1. Wstęp. 2. Ortopokswirusy oraz historia „wariolacji” i „wakcynacji” jako przykład roli intuicji i spostrzegawczości w badaniach naukowych. 3. Indukcja wrodzonej i nabytej odporności przeciwzakaźnej przez wirusowe zakażenia ośrodkowego układu nerwowego. 4. Ortopokswirus ospy myszy wartościowym modelem badawczym nad immunobiologią wirusa ospy ludzkiej. 5. Podsumowanie

Smallpox: looking back to Edward Jenner and even a little further

Abstract: The World Health Organization (WHO) announced on May 8 1980 that smallpox was the first human infectious disease eradicated from the environment. It was possible thanks to the spectacular success of the Intensified Smallpox Eradication Program initiated in 1967 by WHO. In this article, we summarize the fascinating history of smallpox variolation and vaccination. We also acknowledge Edward Jenner (1749–1823), the father of immunology and one of the world’s greatest scientific visionaries, who was many years ahead of his times. Since the studies on variola virus (VARV) are not accepted by the civilized countries, public opinion and scientific community, the progress in the immunobiology of VARV and the production of modern vaccines against smallpox will be not possible without model studies both *in vivo* and *in vitro*. Also, the lack of research would hinder the understanding of virus nature and the cellular and molecular mechanisms of the disease. For this reason, in our laboratory we are conducting studies on immunobiology of ectromelia virus (ECTV) and on mousepox pathogenesis as a substitute for VARV and smallpox.

1. Orthopoxviruses and history of variolation and vaccination as an example of intuition and quickness of perception in scientific research. 2. Induction of innate and acquired anti-infectious immunity by viral infections of central nervous system. 3. Mousepox orthopoxvirus as a valuable scientific model to study the immunobiology of variola virus. 4. Summary

Słowa kluczowe: wirus ektromelii, wirus ospy prawdziwej

Key words: ectromelia virus, variola virus

*Multi multa sciunt, nemo omnia
Wielu wie dużo, nikt wszystkiego*

1. Wstęp

Pomimo wielkiego postępu nauki, w tym biomedycyny, ludzkość jest ciągle zagrożona różnymi chorobami zakaźnymi, a czynniki je indukujące mogą wywoływać groźne zachorowania na większą (pandemie, epidemie) lub mniejszą skalę (ogniska endemiczne). Mogą też być użyte jako środki bojowe lub terrorystyczne. Opisuując współczesną wiedzę na temat różnych czynników zakaźnych i chorób, które wywołują, warto odwołać się do ich historii fascynującej nie tylko

pod względem naukowym, ale i cywilizacyjnym, społecznym, gospodarczym i militarnym.

Do takich, wartych opisanie, czynników zakaźnych należy z pewnością wirus ospy prawdziwej (variola virus, VARV) i choroba, którą wywołuje tj. ospa ludzka (zwana też prawdziwą lub czarną). Przedstawiony opis objawów klinicznych ospy ludzkiej oddaje wiernie jej obraz: cyt. „*Nieszczęśliwi chorzy umierali w strasznych męczarniach. Całe ciało, nie wyłączając głowy, pokryte było ropiejącymi pęcherzami. Głowa była tak obrzękła, że nie można było jej wprost rozpoznać. Oczy zamknięte, powieki obrzękłe, oddech w najwyższym stopniu utrudniony*” ... „*Po krótkich męczarniach śmierć przynosiła dopiero ukojenie. Ci zaś szczęśliwcy,*

Objaśnienia skrótów: CPXV – wirus ospy krowiej; ECTV – wirus ospy myszy (ektromelii); HSV-1/HHV-1 – wirus opryszczki; MPXV – wirus ospy małp; OUN – ośrodkowy układ nerwowy; VACV – wirus krowianki; VARV – wirus ospy ludzkiej (prawdziwej).

* Autor korespondencyjny: Zakład Immunologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; tel./fax. (22) 59 360 66; e-mail: marek_niemialtowski@sggw.pl

** Doktoranci z dziennego studium doktoranckiego „Ksenobiotyki oraz biologia czynników zakaźnych i inwazyjnych” przy Wydziale Medycyny Weterynaryjnej SGGW (kierownik studium i promotor: prof.dr hab. Marek Niemiałtowski)

kótrzy uchodzili cało z tej strasznej choroby, cierpieli pełnych dwanaście dni: potem dopiero pęcherze przysychały i zwolna zaczynały się goić, by wreszcie odpaść pozostawiając po sobie odrażające blizny”... „Śmierć kładła pokotem setki tysięcy osób, zwłaszcza dzieci. Reszta wracała do zdrowia. Pozostawała im na resztę życia odporność przeciw powtórnemu zachorowaniu i blizny na całym ciele” [10].

Ospa ludzka (w terminologii angielskiej nazywana „smallpox”) jest pierwszą w historii naszego gatunku chorobą zakaźną ludzi, która została całkowicie zwalczona dzięki zakończonej sukcesem w 1980 r. 10-letniej ogólnoswiatowej kampanii szczepień (Intensified Smallpox Eradication Program) przeprowadzonej w latach 1967–1977 XX wieku na masową skalę przez Światową Organizację Zdrowia (World Health Organization, WHO). Przed rozpoczęciem kampanii w 1967 r. na świecie występowało 10–15 milionów zachorowań rocznie, z czego 2 miliony chorych umierało. Ważną cechą różnych szczepów wirusa ospy ludzkiej, szczególnie dla produkcji skutecznych szczepionek, jest stabilność antygenowa wirusa, a brak jego rezerwuaru wśród zwierząt znacznie ułatwił zwalczenie choroby.

Ospa ludzka towarzyszyła naszemu gatunkowi od tysięcy lat, a na wirus ją wywołujący nie wpływały ani czynniki klimatyczne ani żadne inne ograniczające skutecznie rozprzestrzenianie się różnych chorób zakaźnych. Warto przypomnieć, że nie tylko sama choroba była zabójcza na masową skalę ale i, bardzo często, szczepienia pełniące z założenia rolę ochronną – na 100 szczepionych mogło umrzeć 10 i więcej osób! Zmarli po szczepieniach powinni być kremowani, zgodnie z procedurą obowiązującą w takich przypadkach, choć nie zawsze miało to miejsce [12].

Na dobrą sprawę nie mamy całkowitej pewności, czy doświadczenia z użyciem VARV wykonywane były po 1980 r. i czy prowadzone są obecnie, szczególnie w laboratoriach wojskowych, gdyby tak było to wymagałyby to zapewnienia: (i) szczególnie skutecznych warunków technicznych w laboratoriach o wyjątkowo wysokim poziomie zabezpieczenia (BL-4) oraz (ii) personelu naukowego zaszczepionego i wysoce wyspecjalizowanego w pracy z materiałem biologicznym szczególnie niebezpiecznym.

2. Ortopokswirusy oraz historia „wariolacji” i „wakcytacji” jako przykład roli intuicji i spostrzegawczości w badaniach naukowych

Wirus ospy ludzkiej rozprzestrzenia się, bez względu na wiek, płeć i rasę, głównie na drodze zakażenia kropelkowego lub przez kontakt bezpośredni osób nie zakażonych z zakażonymi, jak również przez rzeczy osób chorych, tj. ubrania, pościel i inne – przykłado-

wo, w wojnach toczących się w Ameryce północnej w latach 1754–1767 żołnierze angielscy, nic przecież nie wiedząc o wirusie, używali koce zakażone VARV w celu wywołania epidemii ospy wśród Indian, co im się skutecznie udało.

Ciekawą zależność zaobserwowano porównując śmiertelność z powodu ospy czarnej u szczepionych i nie szczepionych kobiet w ciąży. Stwierdzono, że 27% przypadków śmiertelnych występuje u zaszczepionych kobiet w ciąży w stosunku do 61% u kobiet nie szczepionych. Natomiast u kobiet szczepionych nie będących w ciąży stwierdzono tylko 6% przypadków śmiertelnych w przeciwieństwie do 35% u kobiet nie szczepionych.

Wirusy ospy ludzkiej należą do rodziny *Poxviridae* grupującej duże wirusy o wielkości 220–450 nm × 140–260 nm. Mają one skomplikowaną strukturę dsDNA-wirusów (130–375 kb; G+C 35–40%). Dzielą się na dwie podrodziny: *Entomopoxvirinae* (pokswirusy owadów z 3 rodzajami: *Entomopoxvirus*: A, B, C) i *Chordopoxvirinae* (pokswirusy kręgowców) – do tej ostatniej zaliczamy osiem rodzajów wirusów: *Orthopoxvirus*, *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Yatapoxvirus* [8, 21, 28]. Białka ortopokswirusów uczestniczą w mechanizmach „ucieczki immunologicznej” wirusa przed mechanizmami obronnymi zakażonego organizmu – do białek tych należą, między innymi, produkty genów, które hamują mechanizmy efektorowe układu odpornościowego (np. inhibitory IFN i niektórych innych cytokin /L-1, TNF/ oraz szlaku aktywacji dopełniacza) lub też produkty genów indukujących replikację pokswirusów w zakażonych komórkach (np. kinaza tymidynowa /tk/ czy też homolog EGF /epidermal growth factor/) [27]. VARV może przetrwać 3 tygodnie w 35°C przy wilgotności względnej powietrza 65%, natomiast 8 tygodni w 26°C przy tej samej wilgotności powietrza i 12 tygodni przy wilgotności poniżej 10% – parametry te wpływają na długość bytowania wirusa w środowisku [12].

Ospa ludzka wyklęła się w Azji, gdzie od co najmniej kilku tysięcy lat, jako choroba głównie endemiczna, dziesiątkowała ludność Chin i Indii (w tych ostatnich czczono dwie boginie tej choroby – Mariatale i Patragali). Dopiero w następnej kolejności przeniesiona została w długim i skomplikowanym łańcuchu zdarzeń (związanym np. z migracją ludności, wyprawami wojennymi i handlowymi) do zachodniej Azji, Afryki i do Europy, w której już powszechnie zbierała śmiertelne żniwo w XVI w. [7, 9]. W apogeum zachorowań w Europie pod koniec XVIII w. umierało rocznie około 800 000 ludzi (a więc średnio 2192 osoby dziennie), a w Anglii zaczęto prowadzić ewidencję zachorowań ludzi na tę chorobę w tzw. „*The London Bills of Mortality*”, co pozwoliło stwierdzić, że na

przełomie XVII i XVIII w. tylko w Londynie 10% wszystkich przypadków śmiertelnych zachodziło każdego roku w wyniku zachorowania ludzi na ospę czarną, a choroba ta zbierała znacznie więcej ofiar w latach epidemicznych. Na naszym kontynencie na chorobę tę zmarli, między innymi, królowa Anglii, Szkocji i Irlandii Maria II Stuart (1662–1694), cesarz rzymsko-niemiecki Józef I (1678–1711), król Francji Ludwik XV (1710–1774) oraz car Rosji Piotr II (1715–1730). Ospa trafiła dzięki wyprawom konkwistadorów, kolonistów i misjonarzy oraz innym tego typu „misjom cywilizacyjnym” do obu Ameryk, w tym w 1520 r. do Meksyku i, następnie, Peru, Brazylii oraz innych krajów regionu. Indianie nazywali ospę ludzką, w tłumaczeniu na język angielski, „*the great leprosy*” dlatego, że ofiary były pokryte krostami przypominającymi zmiany kliniczne u trędowatych. Jako ciekawostkę można podać, że w 1775 r. George Washington opóźnił atak na Boston z powodu ospy w tym mieście, a kiedy wojska brytyjskie opuściły miasto rozkazał, żeby wkroczyło do niego „*tysiąc żołnierzy którzy przechorowali ospę ludzką*” – doskonale bowiem wiadano z wieloletnich obserwacji, że przechorowanie ospy prawdziwej zabezpiecza skutecznie przed ponownym zachorowaniem na tę chorobę. Wyprawy dalekomorskie z Europy i Ameryki rozprzestrzeniły chorobę do Afryki (np. Portugalczycy do Angoli) a Anglicy do Australii (ospa czarna przyczyniła się do masowego wymierania Aborygenów) i Nowej Zelandii [7].

Do rodzaju *Orthopoxvirus* należą też wirusy ospy bydła (cowpox virus, CPXV), wirusy krowianki (VACV, vaccinia virus), wirusy ospy małp (monkeypox virus, MPXV wywołujący u małp „*smallpox-like disease*” – wirusy te były uważane za wirusy „rodzicielskie” dla VARV, podobnie, jak SIV dla HIV), wirusy ektromelii (ECTV, wirus ospy myszy), wirusy ospy świń (swinepox virus, SWPV; świnię mogą wykazywać objawy choroby również po zakażeniu VACV), wirusy ospy wielbłądów (camelpox virus, CMLV), wirusy ospy koni (*contagious pustular dermatitis of horses virus/contagious pustular stomatitis of horses virus*) i inne ortopokswirusy [7, 8, 21].

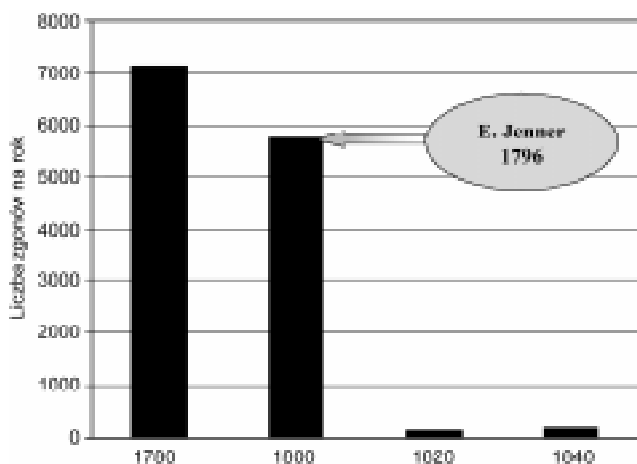
Pierwszego opisu objawów klinicznych ospy ludzkiej dokonał Galen (Claudius Galenos, 130–200 A.D.; autor, między innymi, „*Techne iatrikē*” / „*Sztuka lekarska*” /, słynny lekarz Marka Aureliusza i jego następców), a od dawien dawna wiadano, że przechorowanie ospy chroni na całe życie przed powtórny zachorowaniem, dlatego też do powszechnych należała praktyka kontaktu osób jeszcze zdrowych, w tym szczególnie dzieci, z osobami, które przechorowały lub rzeczami, z którymi się stykali, szczególnie wtedy, kiedy szczyt zachorowań minął. I chociaż metoda ta była wyjątkowo ryzykowna to, mimo wszystko, empirycznie potwierdzała coś, o czym faktycznie dowie-

dzieliśmy się dopiero na przełomie XIX/XX w. oraz w XX w., to jest istnienia antygenowej swoistości reakcji immunologicznej oraz pamięci immunologicznej będących podstawą szczepień przeciwzakaźnych.

Do imponującego rozwoju szczepień w XIX i XX w. przyczynił się Edward Jenner (1749–1823), „*dobroczyńca ludzkości*”, członek Królewskiego Kolegium w Londynie (przyjęty w poczet członków za pracę o kukułkach!) [7]. Edward Jenner urodził się w Berkeley, w hrabstwie Gloucestershire w zachodniej Anglii w rodzinie pastora. I chociaż od dawna wiadano, że osoby stykające się z krowami chorymi na ospę nie zapadają na ospę ludzką to dopiero E. Jenner użył po raz pierwszy w dniu 14 maja 1796 r. prostą, ale skuteczną, szczepionkę przeciwko ospie ludzkiej – w skład szczepionki („*the vaccine*” od łacińskiego słowa „*vacca*” – krowa) wchodził CPXV uzyskany ze zmian ospowych (szarych pęcherzyków) obecnych na rękach dojarki Sarah Nelmes. Poddanym szczepieniu był syn ogrodnika E. Jennera 8-letni James Phipps, który po roku od zaszczepienia CPXV przeżył kontakt z VARV podanym mu przez E. Jennera, czym dobitnie potwierdził przewidywania co do skuteczności uodpornienia ludzi CPXV [7]. E. Jenner, znany uczonec i lekarz, był zatem przy okazji twórcą immunologii i dokonał tego na 100 lat przed odkryciem nie tylko wirusów, ale i podstawowych praw rządzących immunologią wyprzedzając swoim geniuszem i intuicją epokę, w której żył (*Fortes fortuna adiuvat!*)*. Był wielokrotnie uhonorowany przez współczesnych, w tym, między innymi, specjalnym medalem przez Napoleona (w 1804 r.) oraz przez Indian północno-amerykańskich, którzy również byli, jak już wspomniano, ofiarami ospy prawdziwej podczas prowadzonego podstępnie i planowo ludobójstwa. Mało znanym faktem jest, że w 1774 r., a więc na 22 lata przed E. Jennerem, inny Anglik, Benjamin J e s t y, inokulował CPXV swoje dzieci, ale nie odniósł takiego sukcesu, jaki osiągnął Jenner – tak więc od starożytności, krok po kroku, ludzkość walczyła z ospą aż do przełomowego 1796 r., który stał się kamieniem milowym dla osiągnięcia końcowego sukcesu w 1980 r.

Przez wiele lat skuteczna szczepionka anty-VARV oparta była na CPXV zaadaptowanym ewolucyjnie do bydła – wirus ten skutecznie zapewnił ochronę przeciwko VARV u tych osób (w tym dzieci), które zostały nim zaszczepione. Przykładowo w Szwecji, w której rozpoczęto szczepienia przeciwko ospie prawdziwej na przełomie XVIII/XIX w. mało doskonałym wówczas preparatem zawierającym CPXV, liczba śmiertelnych ofiar została obniżona z około 7200 na 1 milion ludności w 1800 r. do tylko około 200 przypadków śmiertelnych w 1820 r. [7, 14] (Rys. 1). Był to sukces o wymiarze

* Śmiałym los sprzyja!



Rys. 1. Ochronny wpływ szczepienia CPXV (w latach 1800–1840) ludności Szwecji przeciwko ospie prawdziwej (opracowanie własne wg 7) – liczba zgonów uległa obniżeniu z około 4000 w 1780 r. do około 400 w latach 1820–1840

historycznym, a szczepionkę używano do zabezpieczenia ludzi w wielu krajach świata (np. w USA).

Wydane własnym sumptem niskonakładowe 75-stronicowe dzieło E. Jennera „Zbadanie przyczyn i skutków użycia szczepionki przeciwospowej: choroby odkrytej w niektórych hrabstwach Zachodniej Anglii, szczególnie Gloucestershire, znanej pod nazwą ospy krowiej” (1798) 1st ed. Law Murray & Highly, London, England cyt. za T s c h a r k e i wsp. [34] przetłumaczono na wiele języków europejskich, jak również przez wiele lat tworzono instytuty szczepień antyospowych (*nota bene*, nowoczesny instytut im. Edwarda Jennera /*The Edward Jenner Institute for Vaccine Research*/ powstał w latach 90-tych XX w. i jest zlokalizowany tuż obok *Institute for Animal Health* w Compton, Berkshire, Anglia wpisując się w piękną tradycję tych zapomnianych już XIX-wiecznych Jennerowskich instytutów medycznych). Jak dalece E. Jenner wyprzedził swój czas świadczy również to, że dopiero w 1880 r. Ludwik P a s t e u r wykonał kolejną immunizację innym, niż CPXV, przedstawicielem świata wirusów, to jest przygotowanym laboratoryjnie wirusem wścieklizny („fixed” *rabies virus*), który uodparniał osoby szczepione, ale nie wywoływał śmiertelnej choroby. Trzecią próbę szczepienia przeciwko jeszcze innemu wirusowi (żółtej febrze; 17D *yellow fever vaccine*) podjęto dopiero w 1930 r. [21]. Jak wspomniano wcześniej, dynamiczny rozwój biomedycyny, w tym wirusologii, doprowadził w II-połowie XX w. (1967 r.) do uruchomienia przez Światową Organizację Zdrowia międzynarodowego programu zwalczania ospy ludzkiej poprzez zastosowanie udoskonalonych szczepionek i masowych szczepień, w tym przede wszystkim w krajach azjatyckich, afrykańskich i południowoamerykańskich, w których występowały

endemiczne ogniska ospy prawdziwej [7, 12, 15, 19]. W utworzonej „*The Global Commission for the Certification of Smallpox Eradication*” uczestniczyli znawcy wirusologii i epidemiologii z wielu krajów, w tym z Polski, a szczególnie doniosłą rolę odegrali australijczyk dr Frank F e n n e r, uczeń i współpracownik innego słynnego wirusologa australijskiego, laureata nagrody Nobla (w 1960 r.) Sir Franka MacFarlane Burneta, jak również amerykańsin dr Donald A. H e n d e r s o n [12].

Istnieją wątpliwości co do pochodzenia i naturalnych rezerwuarów wirusów ospy używanych do szczepień (wcześniej CPXV, a następnie VACV), które znacznie różnią się od siebie wieloma cechami, w tym mapą genetyczną. Zarówno pochodzenie VACV, jak i określenie naturalnego gospodarza dla tych wirusów pozostają w sferze domniemań i spekulacji. Według F e n n e r a i wsp. [7] VACV mógł powstać wskutek: (i) zaadaptowania się VARV do krów, w których podlegał kolejnym pasażom, (ii) wielokrotnych pasażów VARV w skórze zakażonych ludzi pod koniec XVIII w. i we wczesnych latach XIX w., co mogło doprowadzić do zmian genotypu i, w następstwie, fenotypu „dzikiego” VARV w kierunku charakterystycznym dla VACV, (iii) wytworzenia się hybryd CPXV i VARV we wczesnych latach XIX w., kiedy to CPXV był używany do wakcynacji pacjentów w szpitalach, w których podejmowano próby udzielania pomocy zakażonym ludziom. Być może VACV jest wyizolowaną ze zwierząt dzikich lub domowych wirusową „skamieniałością” ewolucyjną i jest możliwy do utrzymania tylko w specyficznych warunkach laboratoryjnych. Mógł też powstać na skutek mutacji w genomie CPXV, do których doszło po wielokrotnych pasażach wirusa w skórze ludzi oraz bydła, owiec lub innych gatunków zwierząt – warto wspomnieć, że CPXV ma największy genom ze wszystkich ortopokswirusów, a mutacje zachodzą w nim z dużą częstotliwością [7, 8, 21].

Do wytwarzania szczepionki przeciwospowej używano w XX w. głównie cielęta, które zakażano VACV, mniej – inne gatunki zwierząt, jak, na przykład, owce. Wirusy szczepionkowe (przede wszystkim szczep VACV – Lister oraz VACV – *New York City Board of Health*) namnażano też we wrażliwych hodowlach komórek *in vitro* lub na błonie kosmówkowo-omoczniowej (*CAM, chorion allantois membrane*) zależonych jaj kurzych. Po ocenie ryzyka związanego z używaniem do szczepień różnych szczepów VACV wielu producentów zaczęło stosować jako wirus szczepionkowy tylko szczep Listera, który powodował mniej groźnych powikłań u zaszczepionych osób. Należy zaznaczyć, że każde szczepienie, szczególnie przy użyciu wirusa atenuowanego (żywego, ale pozbawionego w laboratorium zdolności wywoływania choroby), a nie inaktywowanego (zabitego), jest obciążone mniej-

szym lub większym ryzykiem wywołania choroby zakaźnej wskutek zawsze możliwej rewersji wirusa atenuowanego do fenotypu cechującego w pełni zjadliwy szczep „dziki”. W przypadku atenuowanej szczepionki przeciwko VARV występowały dwa rodzaje bardzo niebezpiecznych komplikacji: (i) uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego (OUN) wskutek indukcji stanów zapalnych w mózgu [„*neurovaccinia*”] oraz (ii) powstawania zmian skórnych [„*dermal vaccinia*”] u osób zaszczepionych [7, 15]. Niebezpieczeństwo to było szczególnie istotne u pacjentów, u których występowała dysfunkcja mechanizmów odpornościowych, jak również u chorych pobierających leki immunosupresyjne.

Sir Graham Wilson [7] stwierdził, że szczepionka przeciwko ospie ludzkiej, choć w skali masowej spełniła znakomicie swoją rolę ochronną, była jednak przyczyną większej liczby przypadków śmiertelnych niż jakakolwiek inna szczepionka. Ta opinia odnosi się do zapaleń mózgu oraz zapaleń rdzenia kręgowego wywoływanych przez atenuowane (lub tylko częściowo /! atenuowane) wirusy szczepionkowe szczególnie u zaszczepionych dzieci i osób starszych. Również VARV powodował podobne objawy u osób zakażonych – wirus ten występujący na obszarze Azji nazwano „*variola major virus*” (VARV „major”; powodował od 20–40% przypadków śmiertelnych), a we Wschodniej Afryce i Ameryce Południowej – „*variola minor virus*” (VARV „minor” lub „*alastrim*”; powodował około 1% śmiertelnych przypadków). Porównując liczbę przypadków zapaleń mózgu indukowanych przez VARV i żywe, szczepionkowe wirusy ospy (VACV) stwierdzono, że przeciętnie w I połowie XX w. VARV „major” był przyczyną około 2000 przypadków zapaleń mózgu na milion zachorowań, a VARV „minor” 500 [7, 14, 15]. Po szczepieniach wykonanych w Holandii w latach 1924–1943 wykazano wystąpienie 258 przypadków zapaleń mózgu. Na podstawie danych epidemiologicznych z wielu krajów stwierdzono, że VARV „major” powoduje zapalenia mózgu u około 0,2% chorych, a VARV „minor” u 0,05%. Tak więc zarówno VARV „dziki”, jak i wirusy szczepionkowe mogły powodować dużą liczbę zgonów, co czyniło cały program szczepień bardzo ryzykownym (z tego powodu możliwość użycia VACV, czy też innych wirusów, jako wektorów różnych genów innych czynników zakaźnych niesie ze sobą duże ryzyko ciężkich zachorowań mogących zakończyć się śmiercią pacjentów, do których wprowadzono wektory szczepionkowe stosując jako nośnik VACV – w wielu przypadkach ogranicza to lub całkowicie uniemożliwia ich stosowanie do celów profilaktycznych). Należy przypomnieć, że w 1967 r., a więc roku rozpoczęcia masowych szczepień, ospa prawdziwa występowała endemicznie w 31 krajach ze stwierdzonym „eksportem” wirusa do

innych 15 krajów. Mimo różnych zagrożeń i różnych czasowych porażek „*Intensified Smallpox Eradication Program*” (1967–1977) zakończył się jednak olbrzymim, spektakularnym sukcesem – ostatnie ogniska ospy ludzkiej zarejestrowano w 1976 r. w Etiopii, a w 1977 r. w Mogadishu, stolicy Somalii. Natomiast ostatnimi indywidualnymi zgonami w wyniku zakażenia naturalnego VARV było zejście śmiertelne kucharza w szpitalu również w Somalii w mieście Merka, a w wyniku zakażenia laboratoryjnego śmierć członka zespołu badawczego w Birmingham w Anglii w 1978 r. W dniu 8 maja 1980 r., Światowa Organizacja Zdrowia ogłosiła, że świat jest wolny od VARV, a zatem ospa ludzka została skutecznie zwalczona jako jedyna do tej pory z „wielkich”, historycznych plag związanych z naszym gatunkiem [7, 12, 15].

Nie powinniśmy być jednak tym uspokojeni, gdyż szczepy VARV w dalszym ciągu istnieją, a obecna sytuacja może być ciszą przed burzą. W wyniku porozumienia społeczności międzynarodowej w latach 1994 i 1999 szczepy VARV będące w posiadaniu różnych krajów zostały, przynajmniej oficjalnie, zniszczone z wyjątkiem zachowania ich w laboratoriach referencyjnych dwóch krajów współpracujących ściśle z WHO, to jest w: (i) Rosji w *Institute of Virus Preparations* w Moskwie i *State Research Center of Virology and Biotechnology (VECTOR)* w Koltsovo w regionie nowosybirskim oraz (ii) USA w *US Center for Disease Control and Prevention* w Atlancie, GA [12, 31]; szczepionkowy referencyjny szczep VACV (szczep Listera Elstree) jest przechowywany w *WHO Collaborating Centre for Smallpox Vaccine* w Bilthoven, Holandia. Wielu ekspertów uważa, że szczepy VARV mogą znajdować się również w innych krajach, nie mówiąc już o laboratoriach wojskowych, w których prowadzi się badania nad zaawansowaną genetycznie i biotechnologicznie bronią biologiczną i jej produkcją. Pomimo trwającej od więcej niż dekady gorącej dyskusji nad całkowitym zniszczeniem istniejących szczepów VARV, do tej pory nie podjęto takiej decyzji, a wręcz przeciwnie, zmieniając obowiązującą do tej pory rozsądną strategię Światowa Organizacja Zdrowia dopuszcza ostatnio prowadzenie ściśle określonych badań na tych szczepach w wyznaczonych do tego celu instytucjach naukowych, jak we wspomnianym wcześniej *US Center for Disease Control and Prevention* w Atlancie. Należy podkreślić, że bardzo duża część ludzkości nie jest od ponad 30 lat szczepiona przeciwko ospie prawdziwej, dlatego też w przypadku ponownego, celowego lub przypadkowego, wprowadzenia VARV do środowiska mogłaby nastąpić katastrofa na masową skalę, szczególnie wśród młodszej części populacji światowej, a olbrzymia mobilność komunikacyjna milionów ludzi i łatwo przewidywalna panika tylko zwiększyłyby stopień śmiertelnego zagrożenia – w tym

kontekście polecam P.T. czytelnikom interesujący artykuł *Vespignaniego* [35]. I chociaż badania *Demkowicza* i wsp. [4] wykazały, że aktywne VACV-swoiste CD8⁺ i CD4⁺ CTL (cytotoksyczne limfocyty T pamięci) można stwierdzić nawet po 50 latach u osób, które w wieku dziecięcym zostały zaszczepione VACV, to warto zauważyć, że status immunologiczny osób zaszczepionych przeciwko ospie ludzkiej kilkadziesiąt lat wcześniej nie jest klarowny i w chwili obecnej trudno odpowiedzialnie stwierdzić, na ile skuteczne okazałyby się teraz szczepienia wykonane przed 1980 r. Dlatego też prowadzenie badań nad patogenezą zakażeń ortopokswirusami i innymi groźnymi patogenami powinno stanowić jeden z priorytetów naukowych w czołowych ośrodkach świata zajmujących się immunobiologią zakażeń wirusowych, a poznanie strategii walki z VARV oraz opracowanie nowych, skuteczniejszych niż dotychczas stosowane, biopreparatów antyospowych powinno być nadrzędnym celem jednoczącym, w dobie coraz groźniejszego bioterroryzmu państwowego i indywidualnego, odpowiedzialną część społeczności światowej [1, 5, 11, 12].

Rozwój współczesnych szczepionek anty-VARV jest związany z badaniami modelowymi nad szczepionkami DNA, które mogą chronić małpy (głównie *cynomolgus* i *rhesus*) przed śmiertelnymi dawkami wirusa ospy małp (MPXV, *monkeypox virus*) [6, 7, 12]. Prowadzone prace badawcze zmierzają do uzyskania bezpiecznych szczepionek, które zastąpią stare, jeszcze z okresu trwania ogólnoswiatowego programu szczepień w II połowie XX w. W okresie przejściowym, między tym co było („stare” szczepy VACV), a tym co będzie (nowoczesne szczepionki DNA i inne), bardzo efektywne „stare”, ale dające groźne efekty uboczne, szczepy VACV są zastępowane bezpieczniejszymi szczepami VACV, jak: (i) zmodyfikowany, żywy szczep Ankara (MVA, *modified vaccinia Ankara*; pasażowany 574 razy w fibroblastach zarodków kury) lub (ii) szczep *DryVax* używany do szczepienia ludzi w USA – u pewnej liczby osób zaszczepionych *DryVax* stwierdzono jednak wystąpienie efektu ubocznego w postaci stanów zapalnych serca. Oba te szczepy są produkowane przez firmy: (i) Acambis, Cambridge, MA, USA oraz (ii) Danish-German biotech Bavarian-Nordic). W U.S. Army Medical Research Institute of Infectious Diseases w Fort Detrick, MD, prowadzone są intensywne prace nad szczepionką zawierającą geny dla tych białek VACV, które odgrywają główną rolę w indukcji odporności anty-VARV. Natomiast US Food and Drug Administration (FDA) dopuszcza możliwość wykonywania szczepień anty-VARV tylko u ściśle określonych grup zawodowych podwyższonego ryzyka ze względu na możliwość wystąpienia powikłań poszczepiennych (zapalenie mózgu, ciężkie postępujące zakażenie VACV /krowianka zgorzeli-

nowa, *vaccinia gangrenosa*/, wyprysk poszczepienny /*eczema vaccinatum*/, uogólnione zakażenie skóry/krowianka uogólniona/ i inne) [7, 12]. Społeczność międzynarodowa jest w praktyce bezbronna w obliczu ciągle istniejącego zagrożenia ospą prawdziwą, chociaż Światowa Organizacja Zdrowia dysponuje w Genewie nadzwyczajną rezerwą szczepionki anty-VARV. Prowadzone są również intensywne badania nad różnymi chemioterapeutykami (np. cidofoviem – inhibitorem wirusowej polimerazy DNA), które mogą być użyte do walki z VARV.

3. Indukcja wrodzonej i nabytej odporności przeciwwakaźnej przez wirusowe zakażenia ośrodkowego układu nerwowego

Współpraca wirusologów, immunologów, neurobiologów, patologów, cytobiologów i przedstawicieli innych dyscyplin biomedycyny nad wyjaśnieniem komórkowych i molekularnych mechanizmów patogenezы wirusowej zachodzącej w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) oraz odpowiedzi immunologicznej zakażonego organizmu doprowadziła do ukształtowania się tak fascynujących nauk, jak neurowirusologia oraz neuroimmunologia. Zdolność zakażenia komórek OUN u człowieka i replikowania się w nich posiada wiele wirusów należących do różnych rodzin, w tym wirusy opryszczki (HSV-1, herpes simplex virus 1/HHV-1, human herpesvirus 1), wirusy polio i inne [7, 20]. Niektóre wirusy, jak, na przykład, HHV-1 mogą powodować utajone lub przetrwałe zakażenia wrażliwych komórek, w których kwas nukleinowy wirusa jest wbudowany w genom komórki nie wywołując widocznych objawów klinicznych aż do chwili jego reaktywacji – klasycznym przykładem jest wspomniany HHV-1, którego DNA znajduje się w zwojach nerwu trójdzielnego mózgu u większości ludzi i, po reaktywacji wirusa, może powodować w określonych sytuacjach (np. wskutek stresu, zmiany klimatu, zakażenia innymi, niż HHV-1, czynnikami zakaźnymi) popularną opryszczkę wargową (*herpesvirus labialis*) [8, 23].

Również VARV i VACV mogą, mimo istnienia silnej bariery krew-mózg, zakażać OUN, co może prowadzić do zapalenia mózgu i śmierci organizmu zakażonego na drodze naturalnej lub wskutek przeprowadzonych szczepień [15]. Tak więc, uwzględniając historię neurowirusologii, nawet w okresie, w którym nie była ona jeszcze zdefiniowana jako nauka, komplikacje neurologiczne wynikające nie tylko z zakażenia VARV, ale i szczepień ochronnych VACV przeciwko ospie prawdziwej były jednymi z najwcześniej rozpoznanych.

Innymi wirusami wywołującymi neuropatie poszczepionkowe są, przykładowo, wirusy używane jako szczepionki: (i) żywe (atenuowane): wspomniany VACV,

następnie wirusy polio (*Enterovirus*), świnki (*Rubulavirus*), odry (*Morbillivirus*), różyczki (*Rubivirus*) i HHV-3 (human herpesvirus 3; *Varicellovirus*) i inne, (ii) zabite (inaktywowane): wirus wścieklizny (*Lyssavirus*), wirusy grypy A i B (*Orthomyxoviridae*), ponownie wspomniany już wirus polio oraz wirus zapalenia wątroby A (*Hepatovirus*) i inne, jak również (iii) szczepionki rekombinowane z użyciem, na przykład, białek wirusa zapalenia wątroby B [8, 14]. Oprócz wywoływania zaburzeń w OUN atenuowane wirusy szczepionkowe mogą wywierać działanie teratogenne, co ma szczególnie dramatyczne konsekwencje zarówno u ludzi, jak i u zwierząt. Znane są doskonale z przeszłości sytuacje, w których do szczepień używano wirusy z obecnymi w szczepionce wirusami „pasażerskimi”, jak to miało miejsce w USA na przełomie lat 40/50 XX w. w przypadku szczepionkowego wirusa polio (synonimy: Heine-Medine disease virus; infantile paralysis virus; *Enterovirus*) zanieczyszczonego, czego nigdy nie potwierdzono doświadczalnie, „pasażerskim” SV40 (simian virus 40; *Polyomavirus*) lub SIV (simian immunodeficiency virus; *Lentivirus*). W związku z namnażaniem *in vitro* w laboratoriach szczepionkowego wirusa polio w pierwotnych hodowlach komórek nerek małp zakażonych SV40 i/lub SIV, a następnie podawaniem doustnym szczepionym dzieciom jako szczepionki nie tylko żywych, atenuowanych wirusów polio, ale i dodatkowo „pasażerskich” SIV, które wielokrotnie pasażując się u człowieka mogły ulegać mutacjom przełamując następnie barierę gatunkową i objawiając się jako HIV – przyczyna AIDS. To tylko kilka z realnych możliwości obrazujących komplikacje będące pochodnymi szczepień – genialnego pomysłu E. Jennera.

Do tej pory brak jest szczegółowych informacji, które komórki OUN są zakażane przez VARV (w zakażeniu naturalnym) i VACV (po szczepieniu), co ma istotne znaczenie dla poznania mechanizmów patogeny ortopokswirusowej, również w kontekście opracowywania skutecznej terapii anti-VARV. Wiadomo, że VARV był jednym z głównych sprawców utraty wzroku – na przykład w XVIII-wiecznej Europie około 30% wszystkich przypadków zaniwiedzenia było spowodowane przez VARV. Ortopokswirusy mogą również wywoływać zakażenia spojówek, w których replikują się doprowadzając do stanu zapalnego [7, 17, 18, 25]. Warto wspomnieć, że do głównych wirusowych patogenów oczu należą adenowirusy i HHV-1 – te ostatnie mogą wywoływać opryszczkowe zapalenie rogówki (*herpetic stromal keratitis*, HSK) i w wyniku tego zaburzenia widzenia i/lub całkowite zaniwiedzenie wskutek immunopatologicznej reakcji w zakażonym oku związanej z migracją do rogówki z replikującym się wirusem komórek układu odpornościowego (na przykład CTL CD8⁺ i/lub pomocniczych limfocytów T CD4⁺ Th1) z uszkodzonymi mechanizmami efektorowymi

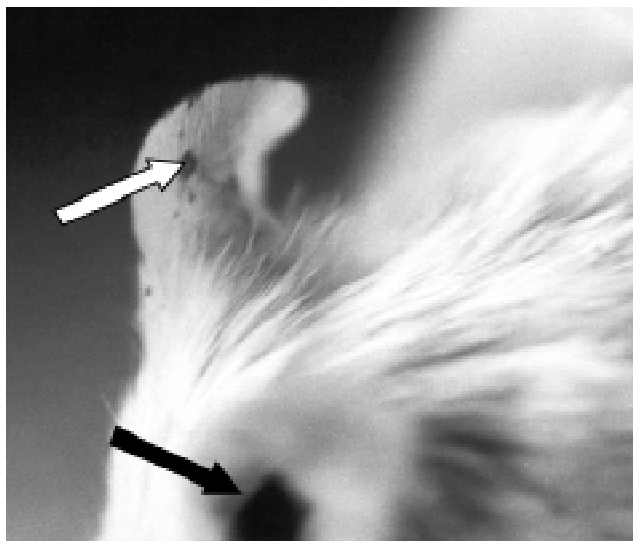
(aktywnością cytotoksyczną i zmianą w profilu wytwarzania jednych z ważnych białek regulatorowych – cytokin), które nawet gdyby były sprawne, to tym bardziej wpłynęłyby destrukcyjnie na rogówkę uszkadzając ją bezpowrotnie wskutek, chociażby, uruchomienia silnej antygenowo-swoistej aktywności cytotoksycznej w tej części oka, w której nie powinno jej nigdy być [17, 18, 23, 24, 28].

4. Ortopokswirus ospy myszy wartościowym modelem badawczym nad immunobiologią wirusa ospy ludzkiej

Skoro nie powinno się, ze zrozumiałych i wspomnianych już w tym artykule, względów bezpieczeństwa, prowadzić badań przy użyciu VARV, to w celu lepszego poznania – w odniesieniu do prac zmierzających do opracowania nowych generacji leków i bezpiecznych szczepionek anti-VARV – mechanizmów patogeny ospy prawdziwej wirus ospy myszy (ECTV) został zaakceptowany przez wirusologów i immunologów jako wirus modelowy. Wirus ten, opisany po raz pierwszy przez J. Marchalą w 1930 r. [20], Sir F. MacFarlane Burnet dopiero w 1945 r. zaklasyfikował do rodzaju *Orthopoxvirus* (Tab. I). ECTV u genetycznie wrażliwych na zakażenie myszy o haplocyocie H-2^a (np. A, A/J) i H-2^d (np. BALB/c) wywołuje ektromelię – ospę myszy [2, 7, 16, 22, 25, 26, 27, 30] nazywaną obrazowo „*smallpox of mice*”. Dlatego też od wielu lat prowadzone są w naszym laboratorium badania z użyciem myszy BALB/c (H-2^d), w których po dostopowym zakażeniu wysoce zjadliwym, referencyjnym szczepem Moscow ECTV (ECTV-MOS; wirus wyizolowany przez profesora V.D. Solovieva w Moskwie w połowie lat 40-tych XX w.) dochodzi do uogólnionego zakażenia często kończącego się śmiercią zakażonych zwierząt [6]. Ortopokswirusy mogą bowiem powodować zakażenia miejscowe (CPXV) lub uogólnione (ECTV), a VARV jest przykładem wirusa mogącego wywoływać zakażenie miejscowe i uogólnione. W zakażeniu miejscowym wirus replikuje się w komórkach skóry, natomiast w zakażeniu uogólnionym we wrotach zakażenia,

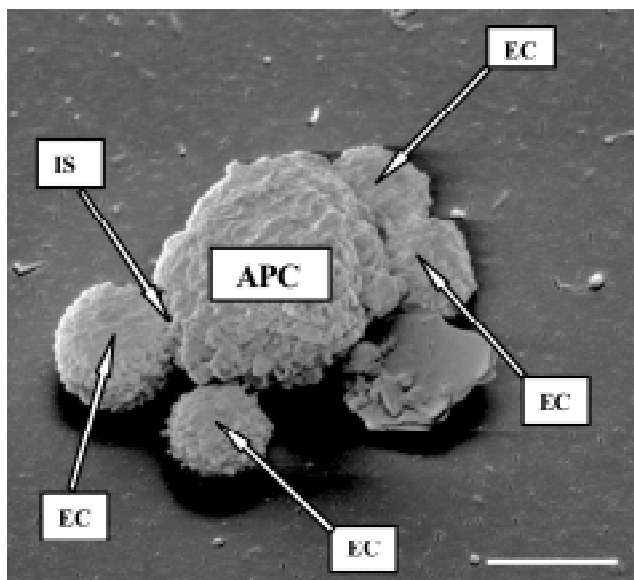
Tabela I
Historia izolacji szczepów wirusa ospy myszy (ECTV)

Nazwa szczepu	Kraj	Rok izolacji
Hampstead	Anglia	1930
Moscow	Rosja	1947
Ishibashi I-III	Japonia	1966
Münich 1	Niemcy	1976
NIH-79	USA	1979
St. Louis 79	USA	1979



Rys. 2. Zmiany kliniczne u myszy BALB/c (H-2^d) w 14 dniu po dostopowym zakażeniu szczepem Moscow wirusa ektromelii (ECTV-MOS; ATCC 1374). Strzałka biała wskazuje zmiany skórne na małżowinie usznej, a strzałka czarna stan zapalny (conjunctivitis) w spojówce ww. myszy

a następnie przedostaje się do krwi (wiremia pierwotna) z którą przenosi się do narządów mięsnych (śledziony, wątroby), w których zachodzi ponownie proces jego replikacji związany z tworzeniem się nowych cząsteczek zakaźnych wirusa, a następnie ponowne uwalnianie wirusa do krwi (wiremia wtórna). W ospie myszy (Rys. 2) może dojść do charaktery-



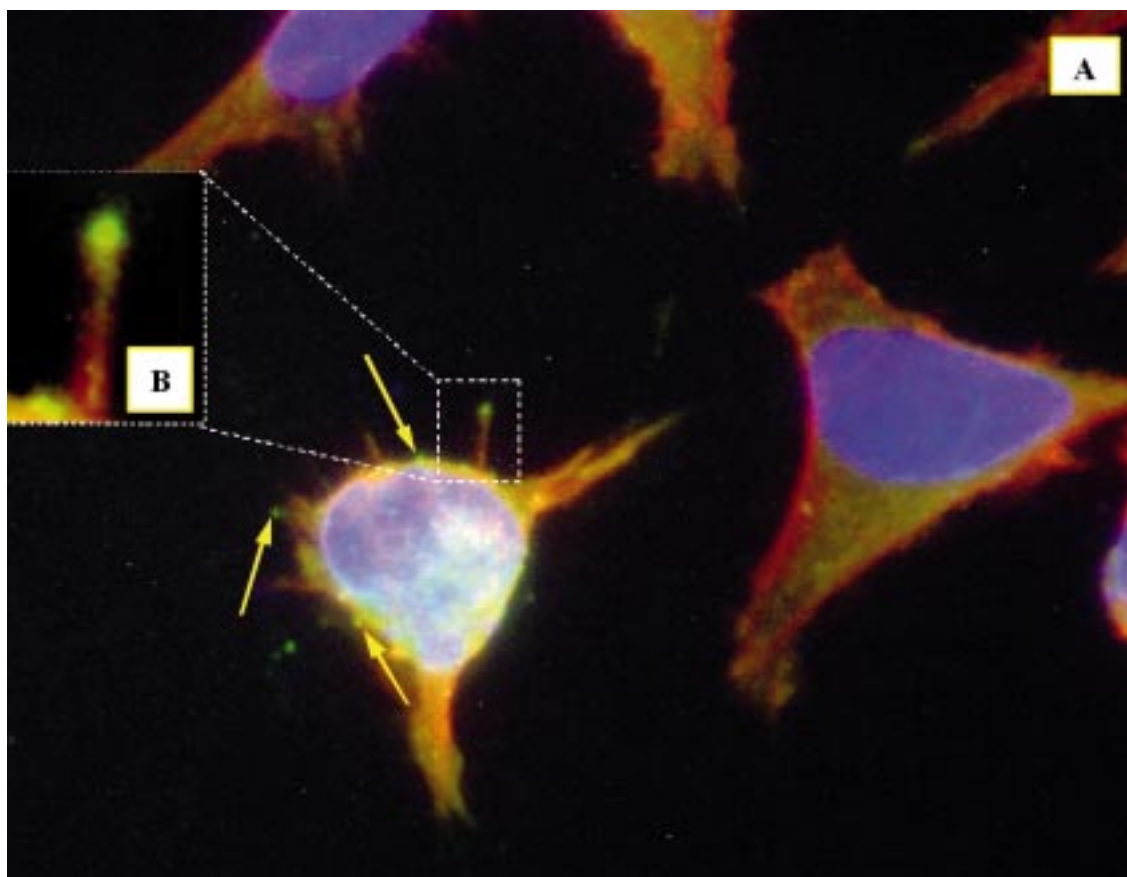
Rys. 3. Rozetka utworzona z komórki prezentującej antygeny (APC) szczepu Moscow wirusa ektromelii (ECTV-MOS) i komórek efektorowych (EC, effector cells; limfocyty T CD4⁺/CD8⁺, limfocyty B, komórki NK i/lub neutrofile) w śledzionie myszy BALB/c (H-2^d) w 7 dni po zakażeniu dostopowym – badania własne. IS pokazuje mikropoprzestrzeń synapsy immunologicznej między APC a EC. Mikroskop SEM FEI Quanta 200; Centrum Analityczne SGGW

stycznych zmian ospowych na skórze, nekrozy oraz amputacji ogona i/lub łapek zakażonych zwierząt, jak również zapalenia spojówek i zakażenia OUN – zarówno w przypadku ektromelii, jak i ospy prawdziwej u ludzi czas wylegania choroby wynosi około 10–14 dni, a po 2 tygodniach może nastąpić okres zdrowienia zarówno u ocalałych myszy, jak i ludzi.

Dramatyczne skutki zakażenia VARV uwidaczniają się w typowych ciężkich objawach ogólnych z dolegliwą wysypką (krosty) na skórze i błonach śluzowych, a podobieństwo objawów klinicznych ospy myszy do ospy prawdziwej jest uderzające. Badania wykonane w naszym zespole wykazały zmienną w czasie intensywną replikację ECTV-MOS w mózgu i wielu innych narządach (np. skórze, spojówkach, węzłach chłonnych, śledzionie, wątrobie, płucach i układzie rozrodczym) zakażonych myszy BALB/c (H-2^d), co wskazuje na wytworzenie się sieci replikującego się wirusa, która kontroluje w różnych komórkach i narządach/tkankach efektorowe mechanizmy odpornościowe zachodzące w zakażonym organizmie [3, 17, 18, 31]. Dlatego też poznanie mechanizmów komórkowych i molekularnych związanych z patogenezą, w tym neuropatogenezą, wirusowego zakażenia spojówek i mózgu myszy BALB/c w zakażeniu uogólnionym, po dostopowym wprowadzeniu ECTV-MOS, może znaleźć praktyczne zastosowanie przy opracowywaniu nowych (bio)preparatów antywirusowych.

Tak więc chociaż istnieją istotne różnice pomiędzy VARV i ECTV (np. wynikające z faktu odmienności antygenowej tych wirusów oraz procesu przetwarzania i prezentacji ich antygenów efektorowym mechanizmom zakażonego gospodarza, w tym zróżnicowanemu repertuarowi receptorów limfocytów T [TcR] i limfocytów B [BcR]), to jednak podstawowe procesy obronne są zbliżone u ludzi (VARV) i myszy (ECTV), a lepsze ich zrozumienie jest pochodną badań prowadzonych przy użyciu modelowego układu doświadczalnego: myszy określonego haplotypu (np. H-2^d) jako genetycznie wrażliwego gospodarza – ECTV. Jako przykład takich badań na rys. 3 przedstawiono „rozetkę” komórek powstałą wskutek prezentacji komórkom efektorowym (effector cells, EC, np. CTL CD8⁺, limfocyty T CD4⁺, limfocyty B, komórki NK i neutrofile) w śledzionie myszy BALB/c antygenów ECTV-MOS przez komórki prezentujące antygen (APC; komórki dendrytyczne lub makrofagi), a na rys. 4 ogonki aktywno utworzone w komórkach HeLa zakażonych ECTV-MOS.

Ludzkość, poprzez reprezentujących ją naukowców i lekarzy, odniosła sukces zakończony opanowaniem ospy prawdziwej. Jednakże zagrożenie tą chorobą istnieje nadal, czego dowodem są narastające obawy przed rozwojem nowych generacji broni biologicznej i to niezależnie od tego, kto ją wytwarza i jakiej reto-



Rys. 4. [A] Komórki HeLa (ATCC CCL-2) 19 godzin po zakażeniu ECTV-MOS. Kolor zielony wskazuje na lokalizację wirusa w zakażonej komórce (barwienie króliczymi anti-ECTV-MOS pAb/FITC), kolor czerwony na F-aktynę (barwienie Alexa Fluor 633-Falloidyna) i kolor niebieski na DNA (barwienie DAPI). Strzałkami żółtymi oznaczono ogonki aktynowe unoszące na swoim zakończeniu wiriony ECTV-MOS. [B] Ogonek aktynowy z ECTV-MOS w powiększeniu. Z badań własnych; zdjęcie wykonano w mikroskopie Olympus BX60 wyposażonym w Color View III cooled CCD camera

ryki używa w celu wytłumaczenia tego faktu. Kontrolę zagrożeń epidemiologicznych prowadzi skutecznie Światowa Organizacja Zdrowia.

Warto przypomnieć znaną sentencję: „*Indigne vivit, per quem non vivit alter*”^{*} – z pewnością nie można tych słów odnieść do Edwarda Jennera, którego pasja i intuicja wielkiego badacza spowodowała, że od ponad 200 już lat, pomimo wielu dramatycznych niepowodzeń związanych z powikłaniami po użyciu szczepionek anty-VARV i zgonów osób chorych na ospę poszczepienną, dał szansę godnego życia tym „innym”, milionom ludzi, potencjalnym ofiarom ospy czarnej.

4. Podsumowanie

W artykule odniesiono się do problemu ospy prawdziwej, jednej z najgroźniejszych na przestrzeni wieków chorób zakaźnych. Przypomniano nazwisko Edwarda Jennera jako twórcy pierwszej (1796 r.) sku-

tecznej szczepionki przeciwko ospie ludzkiej oraz sukces Światowej Organizacji Zdrowia w całkowitym zwalczeniu tej choroby, co nastąpiło w 1980 r. Opisa- no wpływ zakażenia ortopokswirusowego na mecha- nizmy efektorowe wrodzonej i nabytej odporności przeciwwakażnej, jak również podkreślono użytecz- ność wirusa ospy myszy (ektromelii) jako modelu ba- dawczego dla wirusa ospy ludzkiej.

Piśmiennictwo

1. Breman J.G., Henderson D.A.: Poxvirus dilemmas: monkey- pox, smallpox and biological terrorism. *N. Engl. J. Med.* **339**, 556–559 (1998)
2. Buller R.M.L., Fenner F., Mousepox (w) *The Mouse in Bio- medical Research. History, Wild Mice, and Genetics*, vol. II Diseases, red. J.G. Fox, S.W. Barthold, M.T. Davisson, C.E. Newcomer, F.W. Quimby, A.L. Smith, Associated Press and Elsevier, Inc., Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singa- pore, Sydney, Tokyo, 2007, s. 67
3. Cymerys J., Krzyżowska M., Spohr I., Winnicka A., Nie- miałtowski M.: Hsp-27, hsp-70 and hsp-90 expression and

* „*Niegodnie żyje, kto nie daje żyć innemu*”

- apoptosis in macrophages during ectromelia (mousepox) virus infection. *Centr. Eur. J. Immunol.* **34**, 20–28 (2009)
4. Demkowicz W.E. Jr., Littau R.A., Wang J., Ennis F.A.: Human cytotoxic T-cell memory: long-lived responses to vaccinia virus. *J. Virol.* **70**, 2627–2631 (1996)
 5. Enserink M.: How devastating would a smallpox attack really be. *Science*, **296**, 1592–1595 (2002)
 6. Enserink M.: Smallpox vaccines: looking beyond the next generation. *Science*, **304**, 809 (2004)
 7. Fenner F., Wittek R., Dumbell K.R., The Orthopoxviruses. Academic Press, Inc. San Diego, New York, Berkeley, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, 1989, s. 1
 8. Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., Fundamental virology. Lippincott-Raven Publ., Philadelphia, New York, 1996, s. 1163
 9. Gorbach S.L., Bartlett J.G., Blacklow N.R., Infectious Diseases. 3rd Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Baltimore, New York, London, Buenos Aires, Hong Kong, Sydney, Tokyo, 2004, s. 120
 10. Gross L., Siewcy chorób i śmierci. Biblioteka Wiedzy, tom 49. Trzaska, Evert i Michalski. Warszawa, 1948, s. 87
 11. Halloran M.E., Longini I.M. Jr.: Smallpox bioterror response. *Science*, **300**, 1503–1504 (2003)
 12. Henderson D.A., Inglesby T.V., Bartlett J.G., Ascher M.S., Eitzen E., Jahrling P.B., Hauer J., Layton M., McDade J., Osterholm M.T., O’Toole T., Parker G., Perl T., Russel P.K., Tonat K.: Smallpox as a biological weapon. *JAMA*, **22**, 2127–2137 (1999)
 13. Huq F.: Effect of temperature and relative humidity on variola virus in crusts. *Bull. World Health Organ.* **54**, 710–712 (1976)
 14. Johnson R.T., Viral infections of the nervous system. Lippincott-Raven Publ., Philadelphia-New York. 2nd edition. 1998, s. 411
 15. Kempe C.H.: Studies on smallpox and complications of smallpox vaccination. *Pediatrics*, **26**, 176–189 (1960)
 16. Krzyżowska M., Niemiałtowski M.: Supresja apoptozy w zakażeniach chodopokswirusami. *Post. Biol. Kom.* **30**, 273–291 (2003)
 17. Krzyżowska M., Polańczyk M., Baś M., Cymerys J., Schollenberger A., Chiodi F., Niemiałtowski M.: Mousepox conjunctivitis: the role of Fas/FasL mediated apoptosis of epithelial cells in virus dissemination. *J. Gen. Virol.* **86**, 2007–2018 (2005)
 18. Krzyżowska M., Schollenberger A., Skierski J., Niemiałtowski M.: Apoptosis during ectromelia orthopoxvirus infection is DEVDase dependent: in vitro and in vivo studies. *Microb. Infect.* **4**, 599–611 (2002)
 19. Mack T.: A different view of smallpox and vaccination. *New Engl. J. Med.* **348**, 460–463 (2003)
 20. Marchal J.: Infectious ectromelia. A hitherto undescribed virus disease of mice. *J. Pathol. Bacteriol.* **33**, 713–728 (1930)
 21. Mahy B.W.J., A dictionary of virology. Academic Press. San Diego, London, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, 2001, s. 314
 22. Navarini A.A., Krzyżowska M., Lang K.S., Horvath E., Hengartner H., Niemiałtowski M.G., Zinkernagel R.M.: Long lasting immunity by early infection of maternal-antibody protected infants. *Eur. J. Immunol.* **39**, 3052–3065 (2009)
 23. Niemiałtowski M.G.: Aktywność cytotoksyczna efektorowych limfocytów T w ostrych i persystentnych/latentnych zakażeniach herpeswirusowych i HIV: testament zakażonej komórki. *Post. Mikrobiol.* **38**, 355–382 (1999)
 24. Niemiałtowski M.G., Rouse B.T.: Phenotypic and functional studies on ocular T cells during herpetic stromal infections of the eye. *J. Immunol.* **148**, 1864–1870 (1992)
 25. Niemiałtowski M.D., Spohr de Faundez I., Gieryńska M., Malicka E., Toka F.N., Schollenberger A., Popis A.: The inflammatory and immune response to mousepox (infectious ectromelia) virus. *Acta Virol.* **38**: 299–307 (1994)
 26. Niemiałtowski M.G., Toka F.N., Malicka E., Gieryńska M., Spohr de Faundez I., Schollenberger A.: Controlling Orthopoxvirus infections – 200 years after Jenner’s revolutionary immunization. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **44**, 373–378 (1996)
 27. Niemiałtowski M.G., Toka F.N., Malicka E., Spohr de Faundez I., Gieryńska M., Schollenberger A.: Orthopoxviruses and their immune escape. *Rev. Med. Virol.* **7**, 35–47 (1997)
 28. Niemiałtowski G., Gieryńska M., Toka F.N., Spohr Cespedes I., Schollenberger A., Popis A.: Herpetic stromal keratitis and mousepox conjunctivitis: CD4⁺Th1 cell aggression in infected ocular tissues. *Centr. Eur. J. Immunol.* **24**, 233–238 (1999)
 29. Seet B.T., Johnston J.B., Brunetti C.R., Barrett J.W., Everett H., Cameron C., Sypula J., Nazarian S.H., Lucas A., McFadden G.: Poxviruses and immune evasion. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 377–423 (2003)
 30. Spohr de Faundez I., Gieryńska M., Niemiałtowski M.G., Malicka E., Popis A., Ectromelia virus establishes a persistent infection in spleen dendritic cells and macrophages of BALB/c mice following the acute disease (w) Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology, red. J. Banachereau, D. Schmitt, Plenum Press, New York, 1991, s. 257
 31. Spohr Cespedes I., Toka F.N., Schollenberger A., Gieryńska M., Niemiałtowski M.: Pathogenesis of mousepox in H-2^d mice: evidence for MHC class I-restricted CD8⁺ and MHC class II-restricted CD4⁺ CTL antiviral activity in the lymph nodes, spleen and skin, but not in the conjunctivae. *Microb. Infect.* **3**, 1063–1072 (2001)
 32. Stone R.: WHO puts off destruction of U.S., Russian caches. *Science*, **295**, 598–599 (2002)
 33. Szulc L., Niemiałtowski M.G.: Synapsy immunologiczne i ich rola w mechanizmach efektorowych układu odpornościowego. *Post. Biol. Kom.* **34**, 601–621 (2007)
 34. Tscharke D.C., Karupiah G., Zhou J., Palmore T., Irvine K.R., Haeryfar S.M.M., Williams S., Sidney J., Sette A., Bennik J.R., Yewdell J.W.: Identification of poxvirus CD8⁺ T cell determinants to enable rational design and characterization of smallpox vaccines. *J. Exp. Med.* **201**, 95–104 (2005)
 35. Vespignani A.: Predicting the behavior of techno-social systems. *Science*, **325**, 425–428 (2009)

Grant no 2 PO5A 050 30 (dla MN) z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w Warszawie