Zakaźne zapalenie bursy Fabrycjusza kurcząt – aktualny stan wiedzy w zakresie wybranych aspektów choroby

ANNA PIKUŁA, KRZYSZTOF ŚMIETANKA

Zakład Chorób Drobiu, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach,
al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Otrzymano 10.01.2018

Zaakceptowano 24.05.2018

Pikuła A., Śmietanka K.

Selected aspects of infectious bursal disease – the current state of knowledge

Summary

Infectious bursal disease (IBD) is a highly infectious and contagious immunosuppressive viral disease of chickens with a worldwide economic significance to the poultry industry. Over fifty years have passed since the first confirmed occurrence of the disease, and the virus has spread all over world and evolved into multiple genetic, antigenic and pathotypic variants, becoming a serious threat to the poultry industry. The primary tool in IBD eradication is the maintenance of strict biosecurity in poultry farms and implementation of vaccination programmes which should take into account the current epidemiological knowledge about the IBDV strains circulating in the field. This review article presents the current state of knowledge about the infectious bursal disease virus (IBDV) with special regard to the molecular biology of the virus, immunological aspects, as well as current and future prevention strategies.

Keywords: infectious bursal disease virus, genetic evolution, immunity, vaccines

Zakaźne zapalenie bursy (torby) Fabrycjusza (Infectious Bursal Disease – IBD), nazywane również chorobą Gumboro, jest wysoce zaraźliwą wirusową chorobą kurcząt i jednym z ważniejszych problemów o charakterze epizootycznym i ekonomicznym w produkcji drobiarskiej, co w dużej mierze wynika z immunosupresyjnego charakteru czynnika etiologicznego. Podatność kurcząt na tę chorobę jest największa pomiędzy 3. a 6. tygodniem życia i bezpośrednio związana z okresem najsilniejszego rozwoju bursy Fabrycjusza (bF) (9, 23). Narząd ten jest organem docelowym, w którym następuje replikacja wirusa IBD. Wirus ten masowo powoduje destrukcję limfocytów B, co w rezultacie prowadzi do dysfunkcji odpowiedzi humoralnej. Wywołana działaniem wirusa immunosupresja skutkuje zwiększoną podatnością na wtórne zakażenia (wirusowe, bakteryjne i pasożytnicze), co więcej – sprzyja obniżeniu przyrostu masy ciała kurcząt i pogorszeniu wskaźnika wykorzystania paszy (97). Z tych powodów IBD należy do chorób o największym znaczeniu ekonomicznym w skali światowej. W Polsce choroba Gumboro zgodnie z ustawodawstwem weterynaryjnym podlega obowiązkowi rejestracji (Dz. U. 2004 nr 69 poz. 625). Choroba ta znajduje się również na liście chorób OIE (78).

Od rozpoznania pierwszego ogniska choroby Gumboro wywołanej przez szczepy klasyczne zjadliwe (cIBDV, classical IBDV) minęło ponad 50 lat (16). W tym czasie wirus rozprzestrzenił się na całym świecie, a w trakcie kilkudziesięcioletniej ewolucji tego patogenu powstały wirusy o zmienionej antygenowości, tzw. szczepy wariantowe IBDV (variant IBDV, vIBDV) (95) oraz szczepy o wysokiej zjadliwości (very virulent IBDV, vvIBDV) (7, 14). Pojawienie się tych ostatnich spowodowało w początkowych latach znaczące straty ekonomiczne w różnych częściach świata. Nawet w obecnych czasach, pomimo stosowania bioasekuracji oraz szczepień profilaktycznych, wirusy te stanowią poważne zagrożenie dla przemysłu drobiarskiego. Stosowanie na szeroką skalę żywych szczepionek sprzyja pojawianiu się nowych szczepów, które mają zdolność przełamывania odporności poszczepiennej, a ponadto może prowadzić do poważnych zmian w genomie wirusa, takich jak reasortacja czy rekombinacja (wymiana fragmentów genów lub całych segmentów genomu pomiędzy wirusami o różnym pochodzeniu). Ponadto wykazano, że niektóre żywe szczepionki przeciwko IBD składają się z mieszaniny bardzo podobnych genetycznie wariantów (tzw. quasi-species), różniących się pojedynczymi zmianami

w sekwencji nukleotydowej (47). Stosowanie takich szczepionek może na skutek presji selekcyjnej sprzyjać powstawaniu bardziej zjadliwych wariantów czy mutantów o nowych, nieznanych cechach w wirusowej populacji. Skuteczne zwalczanie choroby Gumboro zależy w dużym stopniu od zrozumienia epidemiologii i patogenyzy tej choroby. Niniejszy artykuł przedstawia obecny stan wiedzy w zakresie IBD ze szczególnym uwzględnieniem biologii molekularnej wirusa i aspektów immunologii zakażeń, a także strategii immunoprofilaktyki choroby Gumboro.

Genom i białka wirusa IBD

Genom wirusa tworzą dwa segmenty dwuniciowego RNA (double stranded RNA, dsRNA) (18, 69). Segment A składa się z ponad 3,2 kbp i posiada dwie nakładające się otwarte ramki odczytu (Open Reading Frame – ORF). Większa ramka odczytu koduje poliproteinę (NH₂-pVP2-VP4-VP3-COOH), która jest w kilku etapach cięta na drodze autoproteolitycznej na wirusowe białka VP2, VP3 oraz VP4. Mniejsza ramka odczytu poprzedza i częściowo nakłada się na koniec 5' większej ORF i koduje wirusowe białko VP5.

Z kolei segment B składa się z około 2,8 kbp, posiada jedną ORF i koduje białko VP1 stanowiące enzym wirusową polimerazę RNA (21, 40, 71), który katalizuje zarówno replikację, jak i transkrypcję wirusowego genomu (81).

Białko VP2 jest najważniejszym białkiem strukturalnym IBDV i jedynym, które buduje wirusowy kapsyd (17). Składa się z trzech domen: podstawy (base, B), szkieletu (shell, S) oraz części wystającej (projection, P). Analiza sekwencji nukleotydowej wykazała konserwatywność domeny B i S, w przeciwieństwie do domeny P. W obrębie domeny P (pomiędzy 206 a 350 aminokwasem) znajduje się region wysoce zmienny (hvVP2) (6), który składa się z dwóch większych pików hydrofilowych A (nazywany również pętlą P_{BC}, pomiędzy 212-224 aminokwasem) i B (pętla P_{HL}, pomiędzy 314-324 aminokwasem) (96) oraz z dwóch mniejszych pików hydrofilowych 1 (pętla P_{DE}, 248-252) i 2 (pętla P_{FG}, 279-290) (8). Badania struktury wirusa wykazały, że wymienione piki hydrofilowe znajdują się w najbardziej wyeksponowanej na zewnątrz części białka VP2 (17). Region wysoce zmienny charakteryzuje się dużym stopniem mutacji i odpowiada za zmienność antygenową IBDV (11, 103). Ponadto, hvVP2 formują epitopy odpowiedzialne za indukcję przeciwciał neutralizujących (5, 96, 103).

Białko VP3 jest białkiem strukturalnym, które w trakcie replikacji wirusa IBD łączy się z białkiem VP1 i VP2, kontrolując w ten sposób prawidłową organizację kapsydu oraz włączanie polimerazy i genomu do powstających cząsteczek wirusa (15, 17, 63, 79).

Z kolei białko VP4 jest wirusową proteazą (40), która posiada rzadko spotykane serynowo-lizynowe miejsce cięcia katalitycznego (10).

Białko VP5 jest białkiem niestrukturalnym (70). Uważa się, że bierze udział w uwalnianiu wirusa z komórki za pośrednictwem kanałów lub porów, które formują cząsteczki VP5 w błonie cytoplazmatycznej gospodarza (tzw. permeabilizacja, czyli zwiększenie porowatości błony komórkowej) (60). Wykazano też, że białko to bierze udział w regulacji procesu apoptozy w warunkach *in vitro* – hamuje zaprogramowaną przez komórkę we wczesnym etapie zakażenia apoptozę, która ma na celu zatrzymać namnażanie wirusa (58) i pobudza ten proces, gdy wirus zakończy cykl życiowy poprzez aktywację kaspazy 3 i 9 oraz NF-κB (58, 112).

Zmienność genetyczna IBDV

Wirusy RNA, do których należy IBDV, charakteryzuje duże tempo ewolucji wynikające z ich trzech podstawowych cech: wysokiego wskaźnika mutacji, dużych rozmiarów populacji wirusa oraz zdolności do szybkiej replikacji. Polimeraza RNA cechuje się 1000 × większym współczynnikiem popełniania błędów niż polimeraza DNA (36). Pojedyncza zmiana nukleotydu w kodonie, jeśli skutkuje zmianą aminokwasu w białku, może wpływać na jego funkcję i zmianę fenotypu. Taki rodzaj mutacji nazywa się mutacją zmiany sensu (mutacja niesynonimiczna). Wystąpienie tego rodzaju mutacji może warunkować powstanie nowych szczepów ze zmienioną antygenowością i jest określane mianem dryfu antygenowego. Badania wykazały, że przykładem takich mutantów są amerykańskie szczepy wariantowe IBDV (95, 99).

W ostatnich latach zaobserwowano na świecie wzrost zakażeń IBDV w stadach szczepionych. Wywołujące te infekcje szczepy charakteryzowała obecność pojedynczych zmian aminokwasowych w obrębie mniejszych pików hydrofilowych (pętla P_{DE} oraz P_{FG}) regionu hvVP2 (20, 24, 52). Ważność mutacji niesynonimicznych dla funkcjonowania wirusa IBD podkreślają badania z użyciem technik inżynierii genetycznej. W badaniach eksperymentalnych wykazano, że substytucje aminokwasów w pozycji 253 [glutamina (Q) → histydyna (H)] i 284 [alanina (A) → treonina (T)] białka VP2 szczepu wysoce zjadliwego skutkowałą atenuacją wirusa (61, 74). Co więcej, obecność innych aminokwasów w tych samych pozycjach [253H → Q/asparagina (N)] wpływa na wzrost zjadliwości u szczepów atenuowanych IBDV (50). Z kolei zmiana aminokwasu w pozycji 254 [seryna (S) → asparagina (N)] zmieniła właściwości antygenowe szczepu wariantowego Del-E, co pozwoliło wirusowi na ominięcie immunologicznej odpowiedzi poszczepiennej i spowodowanie zmian w bursie Fabrycjusza (46). Część naukowców już wcześniej postulowała wpływ mutacji w pozycji 254 na dryf antygenowy szczepów wariantowych IBDV, gdyż często wykrywali takie wirusy w stadach, gdzie obserwowano przełamanie odporności poszczepiennej (48). Podobną sytuację opisywano przy identyfikacji szczepów wysoce zjadli-

wych w stadach szczepionych. Szczepy te posiadały w pozycji 254 serynę (S), kwas aspartowy (D) lub asparaginę (N), zaś szczepy szczepionkowe stosowane do immunizacji posiadały glicynę (G), co mogło pomóc w ominięciu przeciwciał neutralizujących i wystąpieniu choroby (24, 72, 83). Częste mutacje w sekwencji genu białka VP2 wskazują, że pewne kodony podlegają ciągłej presji ze strony środowiska, co może sprzyjać pojawianiu się mutacji zmieniających antygenowość wirusa.

Zjawisko antygenowości wirusa ma niezwykle złożoną strukturę. Badania przeprowadzone na 300 szczepach terenowych pochodzących z USA wykazały, że ponad 1/3 badanych izolatów nie reagowała z żadnym ze znanych przeciwciał monoklonalnych używanych przez ponad 20 lat do identyfikacji IBDV (20). Uzyskane wyniki obrazują ogromną ewolucję wirusa IBD.

Zróżnicowanie sekwencji pomiędzy szczepami terenowymi IBDV może również zachodzić na drodze rekombinacji. Zjawisko to polega na wymianie fragmentów genów (rekombinacja homologiczna) lub segmentów genomu (reasortacja) pomiędzy dwoma szczepami rodzicielskimi wirusów, które zainfekowały jedną komórkę w tym samym czasie. W ten sposób wirusy potomne posiadają pewne geny (lub ich fragmenty) pochodzące od obu szczepów rodzicielskich.

Wirus IBD posiada dwusegmentowy genom (segment A i B), co może sprzyjać ich wymianie w trakcie replikacji w zakażonej komórce. W piśmiennictwie światowym opublikowano szereg doniesień o identyfikacji naturalnych reasortantów IBDV. Udokumentowano przypadki reasortacji pomiędzy szczepami wysoce zjadliwymi a klasycznymi lub atenuowanymi, a także pomiędzy wirusami serotypu 1 i 2 (26, 49, 51, 75, 100, 108, 109).

Najbardziej znanym przykładem reasortanta IBDV są szczepy wysoce zjadliwe (37), a ich pojawienie się w sposób dramatyczny zmieniło epidemiologię choroby Gumboro. Badania z użyciem algorytmów statystycznych (metoda Monte Carlo z wykorzystaniem łańcuchów Markowa, metoda największej wiarygodności oraz regresja liniowa) wskazały tzw. domniemanego najbliższego wspólnego przodka – tMRCA (time-to-most recent common ancestor). Datuje się, że segment A o sekwencji typowej dla szczepów vvIBDV pojawił się w latach 60., zaś segment B 20 lat później. Co więcej, pochodzenie segmentu B jest nieznane i cechuje go znacząca odrębność filogenetyczna, a prawdopodobny rezerwuuar zakażenia stanowią dzikie ptaki. Ostatnio przeprowadzone badania potwierdzają uzyskane wyniki przez chińskich naukowców oraz dodatkowo prezentują geograficzne rozprzestrzenienie się zmutowanego wirusa. Moralesa i wsp. wykazali, że źródłem sekwencji segmentu A vvIBDV są szczepy pochodzące z Iranu, skąd za pośrednictwem ptaków migrujących przeniesione zostały do Europy (1, 2). W połowie

lat 80. doszło do wymiany segmentów, a w przeciągu dwóch dekad wirus rozprzestrzenił się na całym świecie (z wyjątkiem Australii). Utrzymywanie się szczepów wysoce zjadliwych o stosunkowo niezmiennionej antygenowości i homogenności genetycznej w terenie sugeruje stabilność tej populacji. Niemniej wzrost wykrywanych naturalnych reasortantów być może wskazuje, że to tylko kwestia czasu, kiedy szczepy vvIBDV zostaną zastąpione szczepami o nowych właściwościach antygenowych czy zjadliwości (42). Dowodem na to może być ostatnio opublikowane doniesienie, gdzie w latach 2000-2012 reasortanty były najczęściej wykrywanym IBDV w południowych Chinach (34).

W badaniach nad zjadliwością wirusa IBD naukowcy głównie zajmowali się białkiem VP2, a trzeba przypomnieć, że dopiero reasortacja z „nowym” segmentem B stworzyła wirusa charakteryzującego się wysoką zjadliwością. Teoria ta została potwierdzona w laboratorium, a wyniki badań jednoznacznie wskazują na wpływ kilku domen w obrębie VP1 na wirulencję szczepów vvIBDV (22, 76). Niedawno Gao i wsp. (27) wykazali wpływ tripletu aminokwasów w pozycjach 145, 146 i 147 w białku VP1 na zjadliwość IBDV. Obecność aminokwasów charakterystycznych dla szczepów niezjadliwych (NEG) skutkowałą atenuacją szczepu wysoce zjadliwego i odwrotnie – wymiana tej trójki w szczepie atenuowanym na aminokwasy typowe dla vvIBDV zwiększała ich zjadliwość.

Z kolei rekombinacja homologiczna polega na wymianie różnej wielkości fragmentów genów pomiędzy dwoma wirusami i również może odgrywać istotną rolę w ewolucji wirusów (13, 30, 107). Badania z wykorzystaniem analizy filogenetycznej oraz oprogramowania do wykrywania rekombinacji wykazały małą liczbę takich zdarzeń wśród wirusów IBD (33, 38, 98).

Naukowcy podkreślają duże znaczenie szczepień w zmienności genetycznej wirusów. Wirusy szczepionkowe stanowią znaczącą pulę materiału genetycznego stanowiącą punkt wyjścia do rekombinacji, przy jednoczesnej silnej presji immunologicznej, jaką wywierają same szczepienia. Szereg zidentyfikowanych rekombinantów IBDV charakteryzowało się dużą homologią fragmentów genów ze szczepami szczepionkowymi (33, 38, 51, 108).

Odpowiedź immunologiczna

Zakażenie wirusem zakaźnego zapalenia bursy Fabrycjusza aktywuje u ptaków wszystkie składowe układy immunologicznego, niemniej poziom ich aktywacji zależy od zjadliwości szczepu, wieku ptaków oraz ich statusu immunologicznego.

Odporność wrodzona

U kręgowców odpowiedź wrodzona stanowi pierwszą linię obrony przeciw patogenom i jest kierowana za pośrednictwem receptorów rozpoznających

wzorce (PRRs, pattern recognition receptors), które zlokalizowane są na nieswoistych komórkach układu immunologicznego (19). Zidentyfikowano 10 różnych Toll-podobnych receptorów (TLRs, Toll-like receptors) u kur, które stanowią rodzinę PRRs. We wczesnej fazie zakażenia wirusem IBD w bursie Fabrycjusza ptaków obserwowany jest napływ makrofagów, heterofilii i komórek tucznych (53, 80, 91, 104). Komórki te za pomocą receptorów Toll-podobnych (TLR3 i TLR7) rozpoznają materiał genetyczny IBDV. W ostrym przebiegu zakażenia wirusem obserwuje się wzrost ekspresji genów tych receptorów. Co więcej, interakcje pomiędzy antygenem IBDV a receptorami Toll-podobnymi aktywuje wydzielanie interferonu (IFN) oraz cytokin prozapalnych (IL-6, IL-1 β oraz IL-18) (29, 88). Badania wykazały, że synteza cytokin jest również regulowana przez czynnik transkrypcyjny NF- κ B, gdyż we wczesnej fazie infekcji odnotowano podwyższoną ekspresję jego genów (29, 54). Wyniki badań jednoznacznie wskazują na udział receptorów Toll-podobnych w rozpoznawaniu zakażenia wirusem IBD oraz aktywację odporności wrodzonej.

Odpowiedź humoralna

Odpowiedź humoralna u ptaków może być indukowana sztucznie z użyciem szczepionek inaktywowanych lub żywych atenuowanych oraz naturalnie – poprzez kontakt ze szczepami terenowymi IBDV. Wytworzone przeciwciała osiągają wysokie miana, niemniej nie zawsze mogą zabezpieczać kurczęta przed zakażeniem różnymi typami antygenowymi szczepów IBDV (43).

Odpowiedź humoralna odgrywa istotną rolę w protekcji przeciwko zakażeniom wirusem IBD. Przeciwciała matczyne stanowią ochronę bierną w kilku pierwszych tygodniach życia kurcząt po wylęgu (3). Kurczęta posiadające przeciwciała matczyne miały dużo mniej zmian w bursie Fabrycjusza po zakażeniu kontrolnym niż grupa nie posiadająca tych immunoglobulin, co wskazuje, jak istotną rolę odgrywa ochrona bierna w zabezpieczeniu ptaków przed IBDV (31).

Odpowiedź komórkowa

W przebiegu ostrej postaci IBD, w fazie deplecji limfocytów B w bursie Fabrycjusza następuje akumulacja limfocytów T w miejscu replikacji IBDV (97). Napływ limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ został wykryty już w 1. dniu po zakażeniu (110). Limfocyty T powodują zwiększenie ekspresji genów kodujących IL-2, IL-6, IL-8, IFN- γ , NO oraz białek tzw. ziaren cytolitycznych jak perforyna czy granzymy (są to białka tworzące kanały w błonie komórek docelowych, prowadząc do ich rozpadu) (89, 93).

Rola limfocytów T w ochronie przed IBDV została udowodniona w badaniach *in vivo*. Badania przeprowadzone na kurczętach, u których zastosowano cyklosporynę A lub usunięto operacyjnie grasnicę

w celu wywołania deplecji limfocytów T w organizmie wykazały, że ptaki te posiadały dużo słabszą protekcję na zakażenie IBDV pomimo wcześniejszej immunizacji, w stosunku do grupy kurcząt z normalną sekrecją limfocytów T (92). Yeh i wsp. (113) przeprowadzili badania, w których wywołano deplecję limfocytów B. Ptaki, którym podano cyklofosfamid, wykazały protekcję na zakażenie IBDV, pomimo że nie wykryto u nich przeciwciał testem ELISA. W ten sposób udowodniono udział odpowiedzi komórkowej w zwalczaniu infekcji IBDV.

Zwalczanie zakaźnego zapalenia bursy Fabrycjusza

Dotychczas nie opracowano metod leczenia przyczynowego (leki antywirusowe) choroby Gumboro. Podstawową metodą zwalczania zakaźnego zapalenia bursy Fabrycjusza jest przestrzeganie restrykcyjnego programu bioasekuracji, w tym przestrzeganie zasady „całe pomieszczenie pełne – całe pomieszczenie puste” (all-in/all-out) oraz stosowanie szczepień profilaktycznych (9).

Na rynku dostępnych jest szereg szczepionek przeciwko chorobie Gumboro – szczepionki konwencjonalne (żywe atenuowane i inaktywowane) oraz szczepionki nowej generacji (wektorowe). W programie szczepień należy uwzględnić rodzaj szczepu szczepionkowego oraz czas jego podania, a także obecność krążących w terenie patotypów wirusa IBD. Większość komercyjnie dostępnych żywych szczepionek została wytworzona przez atenuację szczepów klasycznych zjadliwych (cIBDV) na zarodkach SPF lub hodowlach komórkowych. Na podstawie stopnia atenuacji szczepów szczepionkowych wyróżniamy szczepionki łagodne (tzw. „mild”) o największym stopniu atenuacji wirusa, średnio atenuowane („intermediate”), nazywane też pośrednimi oraz szczepionki „gorące”, czyli pośrednie „plus” („hot”/„intermediate plus”), zawierające szczepy słabo atenuowane. Szczepionki łagodne charakteryzują się słabą skutecznością wobec szczepów wysoce zjadliwych (68). Z kolei szczepionki słabo atenuowane/pośrednie przełamują wysokie miana matczynych przeciwciał neutralizujących, ale powodują od umiarkowanych do dużych zmian w bursie Fabrycjusza i immunosupresję, nie dając pełnej ochrony przed zakażeniem szczepem wysoce zjadliwym (90). Do najważniejszych problemów związanych z bezpieczeństwem szczepionek żywych należą: możliwość rewersji zjadliwości szczepu szczepionkowego (87), efekt immunosupresji poszczepiennej oraz ich udział w roli źródła genetycznego w powstawaniu reasortantów wirusa IBD.

Szczepionki inaktywowane najczęściej mają postać wielokomponentowych emulsji wodno-olejowych z dodatkiem adjuwantów i podawane są iniekcyjnie. Stosowane są głównie w stadach reprodukcyjnych kur w okresie przed wejściem w nieśność, w celu indukcji

długo utrzymujących się wysokich mian przeciwciał, które następnie przekazane będą potomstwu (68).

Ciekawym skomercjalizowanym rozwiązaniem jest szczepionka będąca kompleksem immunologicznym, w którego skład wchodzi szczep Winterfield 2512 oraz przeciwciała anti-IBDV. Dużą zaletą tego typu immunopreparatów jest możliwość podania ich *in ovo* w 18. dniu inkubacji zarodków za pomocą automatów lub iniekcyjnie w pierwszym dniu życia. Uwolnienie wirusa szczepionkowego z kompleksu jest uzależnione od naturalnego spadku poziomu przeciwciał matczy-nych. W eksperymentalnych badaniach kompleksu immunologicznego wykazano skuteczność podobną lub lepszą w porównaniu do żywych szczepionek (68).

Na rynku dostępna jest też szczepionka wektorowa przeciwko IBD, będąca przykładem immunopreparatu nowej generacji. Zawiera wklonowany do genomu herpeswirusa indyjskiego (HVT) gen białka VP2 szczepu Faragher 52/70 IBDV, które jest odpowiedzialne za indukcję przeciwciał neutralizujących. Szczepionka może być podana *in ovo* (na 3 dni przed wylęgiem) lub podskórnie w pierwszej dobie życia, w obecności nawet wysokich mian przeciwciał matczy-nych. Badania wykazały, że szczepionka nie powoduje zmian w bursie Fabrycjusza, a co za tym idzie – immunosupresji (12, 86). Zakażenie kontrolne immunizowanych szczepionką wektorową kurcząt SPF wykazało, że zapewnia ona protekcję sięgającą 95-100% przed wirusami o różnej zjadliwości (vvIBDV, cIBDV, vIBDV pochodzące ze Stanów Zjednoczonych) (12). Co więcej, szczepionka ta indukuje powstawanie przeciwciał już w 3. tygodniu po szczepieniu, dzięki czemu u ptaków nie występuje charakterystyczna „luka immunologiczna” stwierdzana przy stosowaniu konwencjonalnych żywych szczepionek (12, 28). Wykazano również, że jedno szczepienie tym preparatem, bez stosowania szczepionki inaktywowanej w dalszym odchowie, wystarczy do uodpornienia stad rodzicielskich i ich potomstwa (82). Stosowanie takiej szczepionki daje też możliwość zastosowania strategii DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) do różnicowania przeciwciał indukowanych zakażeniem od przeciwciał poszczepiennych za pomocą komercyjnych zestawów ELISA.

Badania nad nowymi szczepionkami

Na rynku dostępnych jest dużo różnych preparatów do immunizacji przeciwko IBD, niemniej żadna ze szczepionek nie rozwiązała problemu zakażeń IBDV w terenie, co jest spowodowane m.in. różnicami antygenowymi między wirusami wchodzącymi w skład preparatów i IBDV terenowymi.

W USA częstą praktyką jest stosowanie autoszczepionek, gdzie wirus wyizolowany na fermie jest namnażany, inaktywowany i następnie po wymieszaniu z adjuwantem podawany ptakom (44). Taka sytuacja wynika z długiego okresu niezbędnego do wprowa-

dzenia nowej szczepionki komercyjnej do obrotu oraz bardziej restrykcyjnymi przepisami prawnymi. Ważnym aspektem dla firm farmaceutycznych, brany pod uwagę przy opracowywaniu nowego preparatu jest jego potencjał rynkowy. Trzeba mieć na uwadze, że zmienność antygenowa wirusa IBD wydaje się ograniczona rozprzestrzenieniem geograficznym. Szczepy vvIBDV są rozpowszechnione na całym świecie, niemniej opublikowane doniesienia wskazują na ewolucję wirusa w obrębie tzw. klastrow geograficznych, co sprawia, że trudno wybrać odpowiedni szczep wirusa, który byłby uniwersalny (35, 62, 66, 67, 77, 114).

Naukowcy podejmują badania nad stworzeniem nowych rozwiązań w immunoprofilaktyce, a przykładem takich nowości są szczepionki podjednostkowe. Białko kapsydu VP2 ze względu na swoje właściwości indukowania wytwarzania przeciwciał neutralizujących jest głównym przedmiotem zainteresowania w produkcji szczepionek podjednostkowych. Ekspresja białka VP2 powiodła się zarówno w systemie prokariotycznym i eukariotycznym, niemniej w tym ostatnim wydaje się zachowywać lepsze właściwości immunogenne, gdyż tak powstałe białka zachowują naturalną konformację przestrzenną (4, 85, 105, 111). Pewną modyfikacją szczepionki podjednostkowej jest zastosowanie tzw. mimotopów, czyli wygenerowanego białka składającego się tylko z domen antygenowych specyficznych dla IBDV (106). Szczepionki podjednostkowe wykazują dużą immunogenność (protekcja poszczepienna nawet do 100%), cechują się dużym bezpieczeństwem użycia (brak możliwości rewersji szczepu szczepionkowego), a co więcej – dają możliwość zastosowania strategii DIVA w celu odróżnienia stad szczepionych na podstawie obecności przeciwciał skierowanych przeciwko (VP2) od zakażonych (VP3). Niemniej w Polsce brak jest takich preparatów, a na świecie zostały wprowadzone do obrotu trzy szczepionki podjednostkowe IBDV na terenie Izraela, Indii oraz Chin (84, 94).

Szczepionki DNA stanowią kolejny, interesujący kierunek rozwoju immunoprofilaktyki. Szczepienie polega na wprowadzeniu do organizmu gospodarza plazmidowego DNA z wklonowanym genem kodującym immunogenne białko IBDV, a po wewnątrzkomórkowej ekspresji genu następuje indukcja odporności poszczepiennej. Uzyskany poziom protekcji poszczepiennej z użyciem szczepionek DNA był różny i uzależniony zarówno od sekwencji użytego genu (gen białka VP2 lub poliproteiny: VP2-VP4-VP3), jak też drogi podania (domięśniowa, do oka, *in ovo*) (25, 32, 39, 57). Szczepionki DNA przeciwko IBD wciąż pozostają w fazie eksperymentalnej, niemniej stanowią potencjał, który może rozwiązać problemy związane ze stosowaniem żywych atenuowanych szczepionek, takich jak ominięcie neutralizującego działania przeciwciał matczy-nych oraz rewersja szczepu szczepionkowego czy też duża presja ze strony wirusa obecnego w środowisku.

Technologia cząsteczek wirusopodobnych (VLP, virus-like particle) jest uważana za jedną z najbardziej obiecujących metod w immunoprofilaktyce chorób zwierząt ze względu na swoje właściwości immunogenne oraz duży stopień bezpieczeństwa. Po względem strukturalnym VLP stanowi natywny wirusowy kapsyd pozbawiony kwasu nukleinowego. Badania z użyciem szczepionek VLP wykazały nawet 100% protekcję na zakażenie szczepem IBDV terenowym zarówno wysoce zjadliwym, klasycznym, jak i wariantem antygenowym (45, 56, 102).

Naukowcy oprócz opracowywania nowych preparatów immunologicznych próbują również poprawić ich jakość, a dokładnie – wzmocnić reakcję odpowiedzi poszczepiennej, stosując adjuwanty molekularne oraz modyfikując sposób ich podawania. Przykładem takich rozwiązań jest zastosowanie w szczepionkach podjednostkowych białka VP2 w połączeniu z interleukiną 2, 12 lub 18 (55, 59, 101). Z kolei Wang i wsp. (105) wykazali, że szczepionka podjednostkowa zawierająca dodatkowo fragment Fc kurzej immunoglobuliny IgY oraz adjuwant TPPPS (Taishan *Pinus massoniana* pollen polysaccharide), ma dużo lepsze właściwości protekcyjne przeciwko IBD niż wersja szczepionki bez adjuwantu lub immunoglobuliny. Schemat podawania adjuwantów również ma wpływ na efektywność szczepienia. Wykazano, że podanie adjuwantów w różnych odstępach czasu podnosi skuteczność szczepionki w porównaniu do jednoczesnego podania szczepionki z adjuwantem (73). Wśród obiecujących kandydatów na adjuwanty wymienia się również takie substancje, jak: świńska laktoferyna (41), białko szoku termicznego (cHSP70) (65), kurza beta-defensyna 1 (115) oraz CpG ODN – syntetyczny aktywator receptorów Toll-podobnych (64, 73).

Wirus zakaźnego zapalenia bursy Fabrycjusza stanowi ciągle zagrożenie dla produkcji drobiarskiej na świecie pomimo stosowanej immunoprofilaktyki oraz restrykcyjnych programów bioasekuracji, na co ma wpływ jego duża oporność na czynniki środowiskowe oraz zmienność antygenowa. Zapobieganie stratom powstałym na skutek zakażeń IBDV, zarówno pierwotnym, wynikającym z patogenności samego wirusa, jak również wtórnym, będącym efektem immunosupresji i wtórnych infekcji u ozdrowieńców, będą nadal przedmiotem szczególnej uwagi. Identyfikacja i charakterystyka nowo pojawiających się szczepów IBDV, lepsze zrozumienie epidemiologii i patogenyzy zakażeń wirusem IBD oraz interakcji patogen–gospodarz wciąż stanowi decydujący czynnik w udoskonalaniu strategii zwalczania tej choroby.

Piśmiennictwo

- Alfonso-Morales A., Martínez-Pérez O., Dolz R., Valle R., Perera C. L., Bertran K., Frias M. T., Majó N., Ganges L., Pérez L. J.: Spatiotemporal phylogenetic analysis and molecular characterisation of infectious bursal disease viruses based on the VP2 hyper-variable region. *PLoS One* 2013, 8, e65999.
- Alfonso-Morales A., Rios L., Martínez-Pérez O., Dolz R., Valle R., Perera C. L., Bertran K., Frias M. T., Ganges L., Díaz de Arce H., Majó N., Núñez J. I., Pérez L. J.: Evaluation of a phylogenetic marker based on genomic segment B of infectious bursal disease virus: facilitating a feasible incorporation of this segment to the molecular epidemiology studies for this viral agent. *PLoS One* 2015, 10, e0125853.
- Al-Natour M. Q., Ward L. A., Saif Y. M., Stewart-Brown B., Keck L. D.: Effect of different levels of maternally derived antibodies on protection against infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 2004, 48, 177-182.
- Arnold M., Durairaj V., Mundt E., Schulze K., Breunig K. D., Behrens S. E.: Protective vaccination against infectious bursal disease virus with whole recombinant *Kluyveromyces lactis* yeast expressing the viral VP2 subunit. *PLoS One* 2012, 7, e42870.
- Azad A. A., Jagadish M. N., Brown M. A., Hudson P. J.: Deletions mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. *Virology* 1987, 161, 145-152.
- Bayliss C. D., Spies U., Shaw K., Peters R. W., Papageorgiou A., Müller H., Boursnell M. E. G.: A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strain and identification of a variable region in VP2. *J. Gen. Virol.* 1990, 71, 1303-1312.
- Berg T. P. van den, Gonze M., Meulemans G.: Acute infectious bursal disease in poultry: isolation and characterization of a highly virulent strain. *Avian Pathol.* 1991, 20, 133-143.
- Berg T. P. van den, Gonze M., Morales D., Meulemans G.: Acute infectious bursal disease in poultry: immunological and molecular basis of antigenicity of a highly virulent strain. *Avian Pathol.* 1996, 25, 751-768.
- Berg T. P. van den, Eterradossi N., Toquin D., Meulemans G.: Infectious bursal disease (Gumboro disease). *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.* 2000, 19, 527-543.
- Birghan C., Mundt E., Gorbalenya A. E.: A non-canonical I α proteinase lacking the ATPase domain employs the ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus. *EMBO J.* 2000, 19, 114-123.
- Brown M. D., Green P., Skinner M. A.: VP2 sequences of recent European "very virulent" isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of "classical" strains. *J. Gen. Virol.* 1994, 75, 675-680.
- Bublot M., Pritchard N., Le Gros F. X., Goutebroze S.: Use of a vectored vaccine against infectious bursal disease of chickens in the face of high-titred maternally derived antibody. *J. Comp. Pathol.* 2007, 137 Suppl 1, S81-S84.
- Cai L., Shen Y., Wang G., Guo H., Liu J., Cheng Z.: Identification of two novel multiple recombinant avian leukosis viruses in two different lines of layer chicken. *J. Gen. Virol.* 2013, 94, 2278-2286.
- Chettle N. J., Stuart J. C., Wyeth P. J.: Outbreaks of virulent infectious bursal disease in East Anglia. *Vet. Rec.* 1989, 125, 271-272.
- Chevalier C., Lepault J., Da Costa B., Delmas B.: The last C-terminal residue of VP3, glutamic acid 257, controls capsid assembly of infectious bursal disease virus. *J. Virol.* 2004, 78, 3296-3303.
- Cosgrove A. S.: An apparently new disease of chickens – avian nephrosis. *Avian Dis.* 1962, 41, 385-389.
- Coulbaly F., Chevalier C., Gutsche I., Pous J., Navaza J., Bressanelli S., Delmas B., Rey F. A.: The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell* 2005, 120, 761-772.
- Dobos P., Hill B. J., Hallett R., Kells D. T., Becht H., Teninges D.: Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J. Virol.* 1979, 32, 593-605.
- Doyle S. L., O'Neill L. A.: Toll-like receptors: from the discovery of NF κ B to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem. Pharmacol.* 2006, 72, 1102-1113.
- Durairaj V., Sellers H., Linnemann E. G., Icard A. H., Mundt E.: Investigation of the antigenic evolution of field isolates using the reverse genetic system of infectious bursal disease virus (IBDV). *Arch. Virol.* 2011, 156, 1717-1728.
- Einem U. I. von, Gorbalenya A. E., Schirmer H., Behrens S. E., Letzel T., Mundt E.: VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase. *J. Gen. Virol.* 2004, 85, 2221-2229.
- Escaffre O., Le Nouen C., Amelot M., Ambroggio X., Ogden K. M., Guionie O., Toquin D., Muller H., Islam M. R., Eterradossi N.: Both genome segments contribute to the pathogenicity of very virulent infectious bursal disease virus. *J. Virol.* 2013, 87, 2767-2780.
- Eterradossi N., Saif Y. M.: Infectious bursal disease, [w:] Swayne D. E. (red.): *Diseases of Poultry*. 13th ed., Wiley-Blackwell, Aimes 2013, s. 219.
- Fernandes M. J., Simoni I. C., Vogel M. G., Harakava R., Rivas E. B., Oliveira M. B., Kanashiro A. M., Tessari E. N., Gama N. M., Arns C. W.: Molecular characterization of Brazilian infectious bursal disease virus isolated from 1997 to 2005. *Avian Dis.* 2009, 53, 449-454.

25. Fodor I., Horvath E., Fodor N., Nagy E., Rencendorsh A., Vakharia V. N., Dube S. K.: Induction of protective immunity in chickens immunised with plasmid DNA encoding infectious bursal disease virus antigens. *Acta Vet. Hung.* 1999, 47, 481-492.
26. Gao H. L., Wang X. M., Gao Y. L., Fu C. Y.: Direct evidence of reassortment and mutant spectrum analysis of a very virulent infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 2007, 51, 893-899.
27. Gao L., Li K., Qi X., Gao H., Gao Y., Qin L., Wang Y., Shen N., Kong X., Wang X.: Triplet amino acids located at positions 145/146/147 of the RNA polymerase of very virulent infectious bursal disease virus contribute to viral virulence. *J. Gen. Virol.* 2014, 95, 888-897.
28. Gros F. X. le, Dancer A., Giacomini C., Pizzoni L., Bublot M., Graziani M., Prandini F.: Field efficacy trial of a novel HVT-IBD vector vaccine for 1-day-old broilers. *Vaccine* 2009, 27, 592-596.
29. Guo X., Wang L., Cui D., Ruan W., Liu F., Li H.: Differential expression of the Toll-like receptor pathway and related genes of chicken bursa after experimental infection with infectious bursa disease virus. *Arch. Virol.* 2012, 157, 2189-2199.
30. Han G. Z., He C. Q., Ding N. Z., Ma L. Y.: Identification of a natural multi-recombinant of Newcastle disease virus. *Virology* 2008, 371, 54-60.
31. Hassan M. K., Afify M., Aly M. M.: Susceptibility of vaccinated and unvaccinated Egyptian chickens to very virulent infectious bursal disease virus. *Avian Pathol.* 2002, 31, 149-156.
32. Haygreen E. A., Kaiser P., Burgess S. C., Davison T. F.: In ovo DNA immunisation followed by a recombinant fowlpox boost is fully protective to challenge with virulent IBDV. *Vaccine* 2006, 24, 4951-4961.
33. He C. Q., Ma L. Y., Wang D., Li G. R., Ding N. Z.: Homologous recombination is apparent in infectious bursal disease virus. *Virology* 2009, 384, 51-58.
34. He X., Xiong Z., Yang L., Guan D., Yang X., Wei P.: Molecular epidemiology studies on partial sequences of both genome segments reveal that reassortant infectious bursal disease viruses were dominantly prevalent in southern China during 2000-2012. *Arch. Virol.* 2014, 159, 3279-3292.
35. Hernández M., Banda A., Hernández D., Panzera F., Pérez R.: Detection of very virulent strains of infectious bursal disease virus (vvIBDV) in commercial broilers from Uruguay. *Avian Dis.* 2006, 50, 624-631.
36. Holland J. J., de la Torre J. C., Steinhauer D. A.: RNA virus populations as quasispecies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1992, 176, 1-20.
37. Hon C. C., Lam T. Y., Drummond A., Rambaut A., Lee Y. F., Yip C. W., Zeng F., Lam P. Y., Ng P. T. W., Leung F. C. C.: Phylogenetic analysis reveals a correlation between the expansion of very virulent infectious bursal disease virus and reassortment of its genome segment B. *J. Virol.* 2006, 80, 8503-8509.
38. Hon C. C., Lam T. T., Yip C. W., Wong R. T., Shi M., Jiang J., Zeng F., Leung F. C.: Phylogenetic evidence for homologous recombination within the family Birnaviridae. *J. Gen. Virol.* 2008, 89, 3156-3164.
39. Hsieh M. K., Wu C. C., Lin T. L.: DNA-mediated vaccination conferring protection against infectious bursal disease in broiler chickens in the presence of maternal antibody. *Vaccine* 2010, 28, 3936-3943.
40. Hudson P. J., McKern N. M., Power B. E., Azad A. A.: Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus. *Nucleic Acids Res.* 1986, 14, 5001-5012.
41. Hung C. M., Wu S. C., Yen C. C., Lin M. F., Lai Y. W., Tung Y. T., Chen H. L., Chen C. M.: Porcine lactoferrin administration enhances peripheral lymphocyte proliferation and assists infectious bursal disease vaccination in native chickens. *Biomaterials*. 2010, 23, 579-587.
42. Ingraio F., Rauw F., Lambrecht B., van den Berg T.: Infectious Bursal Disease: a complex host-pathogen interaction. *Dev. Comp. Immunol.* 2013, 41, 429-438.
43. Ismail N. M., Saif Y. M.: Immunogenicity of infectious bursal disease viruses in chickens. *Avian Dis.* 1991, 35, 460-469.
44. Jackwood D. J.: Advances in vaccine research against economically important viral diseases of food animals: Infectious bursal disease virus. *Vet. Microbiol.* 2017, 206, 121-125.
45. Jackwood D. J.: Multivalent virus-like-particle vaccine protects against classic and variant infectious bursal disease viruses. *Avian Dis.* 2013, 57, 41-50.
46. Jackwood D. J., Sommer S. E.: Amino acids contributing to antigenic drift in the infectious bursal disease Birnavirus (IBDV). *Virology* 2011, 409, 33-37.
47. Jackwood D. J., Sommer S. E.: Identification of infectious bursal disease virus quasispecies in commercial vaccines and field isolates of this double-stranded RNA virus. *Virology* 2002, 304, 105-113.
48. Jackwood D. J., Sommer-Wagner S. E.: Molecular epidemiology of infectious bursal disease viruses: distribution and genetic analysis of newly emerging viruses in the United States. *Avian Dis.* 2005, 49, 220-226.
49. Jackwood D. J., Sommer-Wagner S. E., Crossley B. M., Stoute S. T., Woolcock P. R., Charlton B. R.: Identification and pathogenicity of a natural reassortant between a very virulent serotype 1 infectious bursal disease virus (IBDV) and a serotype 2 IBDV. *Virology* 2011, 420, 98-105.
50. Jackwood D. J., Sreedevi B., LeFever L. J., Sommer-Wagner S. E.: Studies on naturally occurring infectious bursal disease viruses suggest that a single amino acid substitution at position 253 in VP2 increases pathogenicity. *Virology* 2008, 377, 110-116.
51. Kasanga C. J., Yamaguchi T., Munan'andu H. M., Ohya K., Fukushi H.: Genomic sequence of an infectious bursal disease virus isolate from Zambia: classical attenuated segment B reassortment in nature with existing very virulent segment A. *Arch. Virol.* 2013, 158, 685-689.
52. Kasanga C. J., Yamaguchi T., Wambura P. N., Maeda-Machang'u A. D., Ohya K., Fukushi H.: Molecular characterisation of infectious bursal disease virus (IBDV): diversity of very virulent IBDV in Tanzania. *Arch. Virol.* 2007, 152, 783-790.
53. Khatri M., Palmquist J. A., Cha R. M., Sharma J. A.: Infection and activation of bursal macrophages by virulent infectious bursal disease virus. *Virus Res.* 2005, 113, 44-50.
54. Khatri M., Sharma J. M.: Infectious bursal disease virus infection induces macrophage activation via p38 MAPK and NF-kappaB pathways. *Virus Res.* 2006, 118, 70-77.
55. Kong N., Wang X., Zhao J., Hu J., Zhang H., Zhao H.: A recombinant baculovirus expressing vp2 protein of infectious bursal disease virus (IBDV) and chicken interleukin-18 (ChIL-18) protein protects against very virulent IBDV. *J. Anim. Vet. Adv.* 2011, 10, 2706-2715.
56. Lee H. J., Kim J. Y., Kye S. J., Seul H. J., Jung S. C., Choi K. S.: Efficient self-assembly and protective efficacy of infectious bursal disease virus-like particles by a recombinant baculovirus co-expressing precursor polyprotein and VP4. *Virol. J.* 2015, 12, 177.
57. Li J., Huang Y., Liang X., Lu M., Li L., Yu L., Deng R.: Plasmid DNA encoding antigens of infectious bursal disease viruses induce protective immune responses in chickens: factors influencing efficacy. *Virus Res.* 2003, 98, 63-74.
58. Liu M., Vakharia V. N.: Nonstructural protein of infectious bursal disease virus inhibits apoptosis at the early stage of virus infection. *J. Virol.* 2006, 80, 3369-3377.
59. Liu Y., Wei Y., Wu X., Yu L.: Preparation of ChIL-2 and IBDV VP2 fusion protein by baculovirus expression system. *Cell Mol. Immunol.* 2005, 2, 231-235.
60. Lombardo E., Maraver A., Espinosa I., Fernandez-Arias A., Rodriguez J. F.: VP5, the non-structural polypeptide of infectious bursal disease, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. *Virology* 2000, 277, 345-357.
61. Loon A. A. van, de Hass N., Zeyda I., Mundt E.: Alternation of amino acids in VP2 of very virulent infectious bursal disease virus results in tissue culture adaptation and attenuation in chickens. *J. Gen. Virol.* 2002, 83, 121-129.
62. Lupini C., Giovandardi D., Pesente P., Bonci M., Felice V., Rossi G., Morandini E., Cecchinato M., Catelli E.: A molecular epidemiology study based on VP2 gene sequences reveals that a new genotype of infectious bursal disease virus is dominantly prevalent in Italy. *Avian Pathol.* 2016, 45, 458-464.
63. Luque D., Saugar I., Rejas M. T., Carrascosa J. L., Rodríguez J. F., Castón J. R.: Infectious bursal disease virus: ribonucleoprotein complexes of a double-stranded RNA virus. *J. Mol. Biol.* 2009, 386, 891-901.
64. Mahmood M. S., Siddique M., Hussain I., Khan A., Mansoor M. K.: Protection capability of recombinant plasmid DNA vaccine containing VP2 gene of very virulent infectious bursal disease virus in chickens adjuvanted with CpG oligodeoxynucleotide. *Vaccine* 2006, 24, 4838-4846.
65. Maity H. K., Dey S., Mohan C. M., Khulape S. A., Pathak D. C., Vakharia V. N.: Protective efficacy of a DNA vaccine construct encoding the VP2 gene of infectious bursal disease and a truncated HSP70 of *Mycobacterium tuberculosis* in chickens. *Vaccine* 2015, 33, 1033-1039.
66. Martin A. M., Fallacara F., Barbieri I., Tosi G., Rivallan G., Eterradossi N., Ceruti R., Cordioli P.: Genetic and antigenic characterization of infectious bursal disease virus isolated in Italy during the period 2002-2005. *Avian Dis.* 2007, 51, 863-872.
67. Mittal D., Naresh J., Gupta S., Kataria R., Singh K., Tiwari A. K.: Molecular characterization of Indian isolates of infectious bursal disease virus from broiler chickens. *DNA Seq.* 2006, 17, 431-439.
68. Müller H., Mundt E., Eterradossi N., Islam M. R.: Current status of vaccines against infectious bursal disease. *Avian Pathol.* 2012, 41, 133-139.
69. Müller H., Scholtissek C., Becht H.: The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA. *J. Virol.* 1979, 31, 584-589.
70. Mundt E., Beyer J., Müller H.: Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells. *J. Gen. Virol.* 1995, 76, 437-443.
71. Mundt E., Müller H.: Complete nucleotide sequences of 5'- and 3'-noncoding regions of both genome segments of different strains of infectious bursal disease virus. *Virology* 1995, 209, 10-18.
72. Negash T., Gelave E., Petersen H., Grummer B., Rautenschlein S.: Molecular evidence of very virulent infectious bursal disease viruses in chickens in Ethiopia. *Avian Dis.* 2012, 56, 605-610.

73. Negash T., Liman M., Rautenschlein S.: Mucosal application of cationic poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles as carriers of DNA vaccine and adjuvants to protect chickens against infectious bursal disease. *Vaccine* 2013, 31, 3656-3662.
74. Noor M., Mahmud M. S., Ghose P. R., Roy U., Nooruzzaman M., Chowdhury E. H., Das P. M., Islam M. R., Muller H.: Further evidence for the association of distinct amino acid residues with in vitro and in vivo growth of infectious bursal disease virus. *Arch. Virol.* 2014, 159, 701-709.
75. Nouen C. le, Rivallan G., Toquin D., Darlu P., Morin Y., Beven V., Boisseson C., Cazaban C., Comte S., Gardin Y., Etteradossi N.: Very virulent infectious bursal disease virus: reduced pathogenicity in a rare natural segment-B reassorted isolate. *J. Gen. Virol.* 2006, 87, 209-216.
76. Nouen C. le, Toquin D., Muller H., Raue R., Kean K. M., Langlois P., Cherbonnel M., Etteradossi N.: Different domains of RNA polymerase of infectious bursal disease virus contribute to virulence. *Plos One* 2012, 7, e28064.
77. Nurulfa I., Hair-Bejo M., Omar A. R., Aini I.: Molecular characterization of recent infectious bursal disease virus isolates from Malaysia. *Acta Virol.* 2006, 50, 45-51.
78. OIE: Infectious bursal disease (Gumboro disease) (Chapter 2.3.12), [w:] Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 7th ed., 2016.
79. Oña A., Luque D., Abaitua F., Maraver A., Castón J. R., Rodríguez J. F.: The C-terminal domain of the pVP2 precursor is essential for the interaction between VP2 and VP3, the capsid polypeptides of infectious bursal disease virus. *Virology* 2004, 322, 135-142.
80. Palmquist J. M., Kharti M., Cha R. M., Goddeeris B. M., Walcheck B., Sharma J. M.: In vivo activation of chicken macrophages by infectious bursal disease virus. *Viral immunol.* 2006, 19, 305-315.
81. Pan J., Vakharia V. N., Tao Y. J.: The structure of a birnavirus polymerase reveals a distinct active site topology. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2007, 104, 7385-7390.
82. Parker D., de Wit S.: Assessment of impact of a novel infectious bursal disease (IBD) vaccination programme in breeders on IBD humoral antibody levels through the laying period. *Vet. Rec. Open* 2014, 25, 1.
83. Pikula A., Domańska-Blicharz K., Cepulis R., Śmietanka K.: Identification of infectious bursal disease virus with atypical VP2 amino acid profile in Latvia. *J. Vet. Res.* 2017, 61, 145-149.
84. Pitcovski J., Gutter B., Gallili G., Goldway M., Perelman B., Gross G., Krispel S., Barbakov M., Michael A.: Development and large-scale use of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens. *Vaccine* 2003, 21, 4736-4743.
85. Pradhan S. N., Prince P. R., Madhumathi J., Roy P., Narayanan R. B., Antony U.: Protective immune responses of recombinant VP2 subunit antigen of infectious bursal disease virus in chickens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2012, 148, 293-301.
86. Rashid M. H., Lou H., Akhter J., Islam M. T., Islam M. R., Rahman M. M., Cao Y., Xue C.: Protection effect of Vaxxitec HVT + IBD vaccine against infectious bursal disease in broiler chickens. *Progress Agric.* 2013, 24, 69-78.
87. Raue R., Islam M. R., Islam M. N., Islam K. M., Badhy S. C., Das P. M., Müller H.: Reversion of molecularly engineered, partially attenuated, very virulent infectious bursal disease virus during infection of commercial chickens. *Avian Pathol.* 2004, 33, 181-189.
88. Rauf A., Khatri M., Murgia M. V., Jung K., Saif Y. M.: Differential modulation of cytokine, chemokine and Toll like receptor expression in chickens infected with classical and variant infectious bursal disease virus. *Vet. Res.* 2011, 42, 85.
89. Rauf A., Khatri M., Murgia M. V., Saif Y. M.: Expression of perforin-granzyme pathway genes in the bursa of infectious bursal disease virus-infected chickens. *Dev. Comp. Immunol.* 2011, 35, 620-627.
90. Rautenschlein S., Kraemer C., Vanmarcke J., Montiel E.: Protective efficacy of intermediate and intermediate plus infectious bursal disease virus (IBDV) vaccines against very virulent IBDV in commercial broilers. *Avian Dis.* 2005, 49, 231-237.
91. Rautenschlein S., von Samson-Himmelstjerna G., Haase C.: A comparison of immune responses to infection with virulent infectious bursal disease virus (IBDV) between specific-pathogen-free chickens infected at 12 and 28 days of age. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2007, 115, 251-260.
92. Rautenschlein S., Yeh H. Y., Sharma J. M.: The role of T cells in protection by an inactivated infectious bursal disease virus vaccine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002, 89, 159-167.
93. Rauw F., Lambrecht B., van den Berg T.: Pivotal role of ChIFNgamma in the pathogenesis and immunosuppression of infectious bursal disease. *Avian Pathol.* 2007, 36, 367-374.
94. Rong J., Jiang T., Cheng T., Shen M., Du Y., Li S., Wang S., Xu B., Fan G.: Large-scale manufacture and use of recombinant VP2 vaccine against infectious bursal disease in chickens. *Vaccine* 2007, 25, 7900-7908.
95. Rosenberger J. K., Cloud S. S.: Isolation and characterization of variant infectious bursal disease viruses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1986, 189, 357.
96. Schnitzler D., Bernstein F., Müller H., Becht H.: The genetic basis for the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.* 1993, 74, 1563-1571.
97. Sharma J. M., Kim I. J., Rautenschlein S., Yeh H. Y.: Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Dev. Comp. Immunol.* 2000, 24, 223-235.
98. Silva F. M., Vidigal P. M., Myrrha L. W., Fietto J. L., Silva A. J., Almeida M. R.: Tracking the molecular epidemiology of Brazilian Infectious bursal disease virus (IBDV) isolates. *Infect. Genet. Evol.* 2013, 13, 18-26.
99. Snyder D. B., Lana D. P., Savage P. K., Yancey F. S., Mengel S. A., Marquardt W. W.: Differentiation of infectious bursal disease viruses directly from infected tissues with neutralizing monoclonal antibodies: evidence of a major antigenic shift in recent field isolates. *Avian Dis.* 1988, 32, 535-539.
100. Soubies S. M., Courtillon C., Briand F. X., Queguiner-Leroux M., Courtois D., Amelot M., Grousson K., Morillon P., Herin J. B., Etteradossi N.: Identification of a European interserotypic reassortant strain of infectious bursal disease virus. *Avian Pathol.* 2017, 46, 19-27.
101. Su B. S., Chiu H. H., Lin C. C., Shien J. H., Yin H. S., Lee L. H.: Adjuvant activity of chicken interleukin-12 co-administrated with infectious bursal disease virus recombinant VP2 antigen in chickens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2011, 139, 167-175.
102. Taghavian O., Spiegl H., Hauck R., Hafez H. M., Fischer R., Schillberg S.: Protective oral vaccination against infectious bursal disease virus using the major viral antigenic protein VP2 produced in *Pichia pastoris*. *PLoS One* 2013, 8, e83210.
103. Vakharia V. N., He J., Ahamed B., Snyder D. B.: Molecular basis of antigenic variation in infectious bursal disease virus. *Virus Res.* 1994, 31, 265-273.
104. Wang G., Xiong J., She R., Liu L., Zhang Y., Luo D., Li W., Hu Y., Wang Y., Zhang Q., Sun Q.: Mast cell mediated inflammatory response in chickens after infection with very virulent infectious bursal disease virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2008, 124, 19-28.
105. Wang H., Shan S., Wang S., Zhang H., Ma L., Huang H., Wei K., Zhu R.: Fused IgY Fc and Polysaccharide Adjuvant Enhanced the Immune Effect of the Recombinant VP2 and VP5 Subunits-A Prospect for Improvement of Infectious Bursal Disease Virus Subunit Vaccine. *Front Microbiol.* 2017, 8, 2258.
106. Wang Y. S., Fan H. J., Li Y., Shi Z. L., Pan Y., Lu C. P.: Development of a multi-mimotope peptide as a vaccine immunogen for infectious bursal disease virus. *Vaccine* 2007, 25, 4447-4455.
107. Weber M. N., Streck A. F., Silveira S., Mósena A. C., Silva M. S., Canal C. W.: Homologous recombination in pestiviruses: identification of three putative novel events between different subtypes/genogroups. *Infect. Genet. Evol.* 2015, 30, 219-224.
108. Wei Y., Li J., Zheng J., Xu H., Li L., Yu L.: Genetic reassortment of infectious bursal disease virus in nature. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006, 350, 277-287.
109. Wei Y., Yu X., Zheng J., Chu W., Xu H., Yu L.: Reassortant infectious bursal disease virus isolated in China. *Virus Res.* 2008, 131, 279-282.
110. Withers D. R., Young J. R., Davison T. F.: Infectious bursal disease virus-induced immunosuppression in the chick is associated with the presence of undifferentiated follicles in the recovering bursa. *Viral Immunol.* 2005, 18, 127-137.
111. Wu P. C., Su H. Y., Lee L. H., Lin D. T., Yen P. C., Liu H. J.: Secreted expression of the VP2 protein of very virulent infectious bursal disease virus in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Virol. Methods* 2005, 123, 221-225.
112. Yao K., Vakharia V. N.: Induction of apoptosis in vitro by the 17-kDa non-structural protein of infectious bursal disease virus: possible role in viral pathogenesis. *Virology* 2001, 285, 50-58.
113. Yeh H. Y., Rautenschlein S., Sharma J. M.: Protective immunity against infectious bursal disease virus in chickens in the absence of virus-specific antibodies. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002, 89, 149-158.
114. Yuwen Y., Gao Y., Gao H., Qi X., Liu W., Wang X.: Sequence analysis of the VP2 hypervariable region of eight very virulent infectious bursal disease virus isolates from northeast China. *Avian Dis.* 2008, 52, 284-290.
115. Zhang H. H., Yang X. M., Xie Q. M., Ma J. J., Luo Y. N., Cao Y. C., Chen F., Bi Y. Z.: The potent adjuvant effects of chicken beta-defensin-1 when genetically fused with infectious bursal disease virus VP2 gene. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2010, 136, 92-97.

Adres autora: Anna Pikula, biolog, dr n. wet., al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: anna.pikula@piwet.pulawy.pl