

# Immunization and Host Responses to MB-1, a Live Hatchery Vaccine against Infectious Bursal Disease

Immunizacja i odpowiedź organizmu gospodarza  
na szczepienie MB-1 - żywą szczepionką przeciwko  
zakaźnemu zapaleniu torby Fabrycjusza  
do stosowania w wylęgarni

**Phivax BD-1**  
IBD

**TAbic® M.B.**

## **Immunizacja i odpowiedź organizmu gospodarza na szczepienie MB-1 - żywą szczepionką przeciwko zakaźnemu zapaleniu torby Fabrycjusza do stosowania w wylęgarni.**

*Yossi Wein 1,\* , Virginie Loeb 2 , Aderajew Asmare 2 , Saar Tal 2 , Avner Finger 2 and Aharon Friedman  
1 Wydział Nauk o Zwierzętach, R.H. Smith Wydział Rolnictwa, Żywności i Środowiska, Hebrajski Uniwersytet w  
Jerozolimie, P.O. Box 12, Rehovot 7610001, Izrael*

*2 Phibro Animal Health Corporation, P.O. Box 489, Beit Shemesh 99100, Izrael; virginie.loeb@pahc.com (V.L.)*

*\* Korespondencja: [yosi.wein@mail.huji.ac.il](mailto:yosi.wein@mail.huji.ac.il)*

**Abstrakt:** MB-1 to atenuowana szczepionka przeciwko zakaźnemu zapaleniu torby Fabrycjusza.

Początkowo obserwowaliśmy czasowe opóźnienie replikacji wirusa szczepionkowego w torbie Fabrycjusza kurcząt ze względu na obecność w ich organizmie przeciwciał matczynych (MDA). Mechanizm, który umożliwił jego przeżycie pomimo neutralizującego działania przeciwciał matczynych pozostawał niejasny. Postawiliśmy hipotezę, że po szczepieniu w pierwszym dniu życia (DOA), wirus MB-1 przeżywa i rezyduje w miejscowych makrofagach, które są następnie dystrybuowane do narządów limfatycznych. Zdolność przeżywania wirusa MB-1 we wnętrzu makrofagów zapewnia jego przetrwanie w czasie ochrony ptaka przez przeciwciała matczyne. Analiza PCR narządów limfatycznych kurcząt posiadających przeciwciała matczyne, szczepionych w pierwszym dniu życia, wykazywała, że wirus MB-1 był identyfikowany w małych ilościach wyłącznie w śledzionie przed 14 dniem życia. Czternaście dni po szczepieniu wirus szczepionkowy identyfikowano już w torbie Fabrycjusza, a jego ilość zwiększała się z czasem. Możliwe opóźnienie w kolonizacji torby Fabrycjusza wirusem przypisywano obecności kapsydu VP2 anty-IBDV przeciwciał matczynych IgA oraz przeciwciał IgY tkanki śródmiąższowej torby Fabrycjusza. Pozwala to stwierdzić, że w okresie utrzymywanie się w organizmie ptaka wysokiego poziomu przeciwciał matczynych, w jego śledzionie utrzymywał się niewielki, ale zdolny do przeżycia, rezerwuar wirusa MB-1. Rezerwuar ten mógł stanowić punkt wyjścia do kolonizacji narządu kiedy poziom MDA ulegał naturalnemu obniżeniu. Finalnie osiągnięto skuteczną immunizację piskląt przeciwko chorobie Gumboro.

**Słownictwo:** szczepionka MB1; przeciwciała matczyne; Gumboro; (wirus) zakaźne zapalenie torby Fabrycjusza

### **1. Wstęp**

Choroba Gumboro, to zakaźna, wysoce zaraźliwa, trudna do eradykacji ze środowiska choroba wirusowa młodych kurcząt, mogąca prowadzić do supresji układu immunologicznego oraz wystąpienia wtórnych infekcji, którym bezpośrednio lub pośrednio towarzyszy wysoki stopień śmiertelności [1–3]. Chorobę wywołuje wirus choroby Gumboro (IBDV), bez otoczki, wielkości 60 nm, o symetrii dwudziestościanu i podwójnej nici RNA. Wirus z rodzaju Avibirnavirusów, rodzina Birnaviridae. Główną drogą zakażenia jest przewód pokarmowy: droga oralna i/lub poprzez kloakę [1–3]. Proteina IBDV 2 (VP2) oraz białko VP3 to białka kapsydu wirusa. VP2 jest jednym z pięciu najistotniejszych białek wirusa IBD. Jako unikalna proteina, eksponowana na powierzchni, VP2 odgrywa główną rolę w wytwarzaniu przeciwciał neutralizujących wirusa [1–4].

Ze względu na wysoki tropizm do niedojrzałych limfoblastów B (powierzchniowe IgM-dodatnie limfoblasty B-sIgM+), głównym narządem docelowym wirusa IBD jest torba Fabrycjusza młodych piskląt – w wieku 1– 6 tyg. [2,5–7]. IBDV może również atakować inne narządy limfatyczne, takie jak śledziona, grasica i migdałki jelit ślepych, uważa się je jednak za wtórne narządy docelowe [1–3,8]. Ostatnio wykazano zdolność wirusa IBD do przebywania w makrofagach [1,2,5,7].

Co ciekawe, obraz kliniczny choroby Gumboro zmienia się w zależności od poziomu dostępnych niedojrzałych limfoblastów B, co wydaje się być skorelowane z wiekiem ptaków. Odzwierciedleniem tej tezy jest znacząca różnica w przebiegu choroby w przypadku wczesnej infekcji (do 3 tyg. ż.), skutkującej niską śmiertelnością i trwałą immunosupresją oraz infekcji późnej (3 – 6 tyg. ż.), przebiegającej z wysoką śmiertelnością i przejściową immunosupresją [1–3]. Do chwili obecnej IBD stanowi poważne zagrożenie dla przemysłu drobiarskiego, a szczepienie

przeciwko chorobie Gumboro jest najskuteczniejszą strategią ochrony stad drobiu przed wystąpieniem klinicznej postaci choroby [1,3,9].

Przez lata powstały oraz praktykowane były różne strategie szczepień, takich jak stosowanie szczepionek żywych atenuowanych, inaktywowanych, podjednostkowych, wektorowych/rekombinowanych oraz kompleksów immunologicznych. Nie jest zaskoczeniem, że każda z tych strategii ma zarówno zalety jak i wady, takie jak stosunek skuteczności w porównaniu do bezpieczeństwa, neutralizacja wirusa szczepionkowego przez MDA a niedobory tej odporności u piskląt, początek i czas trwania odporności i wreszcie zdolność do wywołania zarówno humoralnej, jak i komórkowej reakcji odpornościowej [10–13].

Pomimo powyższych dylematów to żywa atenuowana szczepionka, która naśladuje infekcję wywołaną przez wirus terenowy, zapewnia najlepszą ochronę. Aktywuje ona zarówno komórkową – w tym miejscową, jak i humoralną odpowiedź immunologiczną w organizmie ptaka [1,3,10,13,14].

Wirus zakaża młode kurczęta, dlatego też skuteczna szczepionka przeciwko IBD powinna zapewnić jak najwcześniejszą immunizację, z utrzymującą się w czasie skuteczną ochroną [1,3,10–12]. Jest to szczególnie ważne w przypadku brojlerów, które mają bardzo ograniczony czas na wytworzenie czynnej odporności, po zaniku odporności zapewnianej przez przeciwciała matczyne (MDA).

W związku z tym stworzono szczepionkę **MB-1 (Phivax BD-1, Phibro Animal Health)**. Przeznaczona jest ona do stosowania w wylęgarni, jako iniekcja podskórna w pierwszym dniu życia lub in-ovo. Zawiera żywy, atenuowany szczep wirusa IBD. Jest bezpieczna, skuteczna i zarejestrowana w wielu krajach. Wcześniejsze obserwacje wykazały, że szczepienie MB-1 prowadzi do produkcji przeciwciał anti-IBDV już w 23. dniu życia (DOA) [10–12].

W licznych badaniach opisano interakcję pomiędzy przeciwciałami matczynymi (MDA) a szczepionkami podawanymi zarodkom i pisklątom [15,16]. Badania te wskazywały na dychotomiczną zależność: szczepionka może służyć do wyczerpania zasobów MDA (żywy wirus tworzy fizjologiczny kompleks z przeciwciałem), co blokuje działanie szczepionki a tym samym zapobiega powstaniu odporności. Stąd badania przeprowadzone przez nas i innych badaczy wykazały, że u poszczególnych piskląt immunizowanych MB-1 replikacja wirusa w torbie Fabrycjusza była opóźniona w zależności od poziomów MDA [10–12]. Efektu tego nie zaobserwowano u kurcząt SPF, a replikację wirusa w torbie Fabrycjusza obserwowano już w 24 godziny po szczepieniu [10,11,17–20].

Możliwe interakcje pomiędzy szczepionką MB-1, przeciwciałami matczynymi oraz tropizmem wirusa zostały zbadane zgodnie z następującymi hipotezami:

1. Po iniekcji wirus szczepionkowy MB-1 infekuje makrofagi, które następnie migrują wraz z krwią do narządów bogatych w limfoblasty B; MDA utrudniają to rozprzestrzenianie.
2. Poziomy MDA są różne w różnych tkankach i narządach. Narządy o niskim poziomie MDA są bardziej podatne na zakażenie, co pozwala na utrzymanie żywotności wirusa szczepionkowego.
3. Zanik ogólnoustrojowej ochrony przeciwciał matczynych (MDA) stwarza wirusowi szczepionkowemu możliwość zainfekowania wszystkich wcześniej niedostępnych tkanek i narządów. Ochronna odpowiedź immunologiczna występuje po krytycznej infekcji masowej, wtedy wirus szczepionkowy jest zwalczany.

## 2. Materiały i Metody

### 2.1. Zwierzęta i ich utrzymanie

Kurczęta brojlery linii Ross utrzymywane były w izolatorach z kontrolą warunków środowiska (Ośrodek Doświadczalny Herut, Izrael zgodnie ze standardowym protokołem hodowlanym (Wydział Drobniarstwa, Ministerstwo Rolnictwa, Izrael). Ptaki żywione były pełnoporcjową paszą dla brojlerów, a woda podawana była do woli [21]. Długość dnia świetlnego wynosiła 16:8 godzin światła i ciemności. Temperatura otoczenia była dostosowywana do wieku kurcząt i utrzymywana na jednakowym poziomie we wszystkich grupach.

### 2.2. Oświadczenie etyczne

Wszystkie badania przeprowadzono według protokołu zatwierzonego przez Instytut Opieki nad Zwierzętami Ministerstwa Zdrowia-Konsulat Doświadczeń na Zwierzętach zgodnie z Rozporządzeniami Dotyczącymi Dobrostanu Zwierząt (Zatwierdzenie nr IL-20-6-226).

### 2.3. Szczepienie MB-1

Pierwszego dnia po transporcie 161 kurcząt podzielono losowo na dwie grupy i oznakowano (N = 113 grupa szczepiona, N = 48 grupa kontrolna).

Pisklęta z grupy szczepionej otrzymały podskórnie (s.c.) jedną dawkę szczepionki MB-1, zgodnie z instrukcją producenta (Phibro Animal Health, Izrael). Pisklęta z grupy kontrolnej otrzymały iniekcję MB-1 i identyczną ilość zbuforowanego rozpuszczalnika szczepionki - roztworu Ringera z dodatkiem mleczanu (LRS, Teva Medical LTD, Ashdod, Izrael).

### 2.4. Pobieranie prób krwi i narządów

18 piskląt posłużyło do określenia czasu serokonwersji (te same pisklęta w każdym punkcie czasowym), a 125 piskląt posłużyło do określenia czasu wystąpienia wirerii, poziomu przeciwciał i kompleksów immunologicznych w narządach (różne kurczęta wykorzystywano w każdym punkcie czasowym, ponieważ musiały być poddane eutanazji do pobrania narządów). Określono 9 punktów czasowych, w których pobierano materiał do badań: torbę Fabrycjusza, śledzionę, grasicę i żółć.

W ośmiu z nich, tj. 4, 8, 11, 14, 18, 23, 28, 32 DOA badano po dziesięć ptaków z grupy zaszczepionej i po trzy z grupy kontrolnej. W ostatnim punkcie czasowym, wyznaczonym na 36 DOA było to piętnaście ptaków z grupy szczepionej i sześć z grupy kontrolnej.

Ustalenie potrzebnej liczby ptaków w tym badaniu oparto na wcześniej opublikowanych obserwacjach [10–12,20] oraz konsultacji ze statystykiem (Dr. Yotva Lavi), w celu zapewnienia wystarczającej istotności statystycznej przy jak najmniejszym wykorzystaniu piskląt. Na tej podstawie określono liczbę piskląt, które należy użyć do badania, aby uzyskać istotne wyniki ( $\alpha = 0,05$ ), gdzie istotność badania wynosiła przynajmniej 0.8. Wstępne dane obejmowały podobne, dwukierunkowe projekty ANOVA, które stosowano w przeszłości. W tym samym czasie (z dodatkowym punktem czasowym 1 dnia, przed szczepieniem) pobrano krew od dziewięciu zaszczepionych piskląt i dziewięciu nieszczepionych piskląt. W izolatorze pisklęta wybrano losowo, ręcznie unieruchomiono i pobrano po 1,5 ml krwi przez nakłucie żyły podskórnej łokciowej. Pobraną krew rozlano do dwóch próbek: pierwsza próbka zawierała TRI Reagent®-BD (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH, USA), przeznaczony do ekstrakcji wirusowego RNA i dalszej ilościowej oceny wirerii. Druga próbka - Vacuette® Z Serum Sep Clot Activator (Greiner Bio-one, Kremsmünster, Austria) służyła do przygotowania surowicy i badań serologicznych metodą ELISA.

Do analizy FACS (sortowanie komórek aktywowanych fluorescencją) i badania przy pomocy mikroskopu konfokalnego w 4 DOA uśredniono dodatkowo po 9 kurcząt z każdej grupy badanej, a tkankę pochodzącą ze śledziony pobrano do próbki zawierającej żywkę RPMI 1640 z HEPES 25 mM i L-Glutaminą (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Izrael).

### 2.5. Ekstrakcja RNA i badanie PCR

Pobrane próbki torby Fabrycjusza, śledziony i grasicy każdego pisklęcia homogenizowano oddzielnie politronem PT2500E (Kinematica, Malters, Szwajcaria). Następnie wirowano homogenat z prędkością 400x g przez 10 minut w temperaturze 4°C, a RNA ekstrahowano z supernatantu przy użyciu mini zestawu QIAamp viral RNA (Qiagen, Hilden, Niemcy), zgodnie z instrukcją producenta. Dodatkowo ekstrahowano RNA z PBL kurcząt przy użyciu TRI Reagent™ (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH, USA), -zgodnie z instrukcją producenta.

W kolejnym etapie 300 nanogramów RNA z każdej próbki poddano odwrotnej transkrypcji i amplifikowano cDNA przy użyciu qScript XLT 1-Step RT-qPCR ToughMix (QuantaBio, Beverly, MA, USA) oraz swoistych starterów i sond dla genów segmentu A IBDV-MB-1.

Sekwencje starterów i sond zaprojektowano przy użyciu oprogramowania do analizy primerów Oligo (Molecular Biology Insights, Inc., Colorado Springs, CO, USA) zgodnie z sekwencjami opublikowanymi w GeneBank (DQ927040.1) oraz Techera i in., 2019.

Wykorzystano następujące primery i sondy:

Primer	Sekwencja
IBDV_F82	5'0 -CAAGATCAAACCCAACAGATTG-30
IBDV_R253	5'0 -CTCTGACCTGAGAGTGTGCTTCTC-30
IBDV_P175	FAM-ACGGAGCCTTCTGATGCCAACAAAC-NFQ

Pary starterów i sondy kalibrowano dla ustalenia optymalnej temperatury reakcji oraz stężenia cDNA. Poziomy ekspresji badanych genów określono metodą qPCR przy użyciu termocyklera C1000, a wyniki analizowano przy użyciu oprogramowania CFX manager™ firmy Bio-Rad ([http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/100213\\_37.pdf](http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/100213_37.pdf), dostęp 1 czerwca 2023 r., Bio-Rad, Hercules CA, USA). Ilość cząsteczek wirusa określano poprzez porównanie wartości C<sub>q</sub> z krzywą standardową powstałą po użyciu szczepionki MB-1 o znanym mianie.

## 2.6. Ustalenie ilości anty-IBDV IgY w surowicy krwi

Poziomy przeciwciał anty-IBDV IgY ustalano w surowicy przy użyciu testu ELISA IBD-XR Ab ELISA (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA), zgodnie z instrukcją producenta.

## 2.7. Ustalenie poziomu przeciwciał anty-IBDV IgY i IgA w narządach wewnętrznych i żółci

Poziomy przeciwciał anty-IBDV IgY i IgA w narządach i żółci oznaczono za pomocą odpowiednio ilościowego i jakościowego pośredniego testu ELISA. Pokróctce, w przypadku obu testów, rekombinowany IBDV-VP2 (Phibro Animal Health, Izrael) po rozcieńczeniu w buforze, naniesiono na płytki ELISA (Nunc, Thermo Fischer Scientific Inc., Rockford, IL, USA). Powleczone płytki inkubowano w komorze o kontrolowanym poziomie wilgotności w temperaturze 4°C przez noc, a następnie blokowano inkubację przy użyciu 0,5% odtłuszczonego mleka (BD, Difco, Sparks, MD, USA) w PBS. Po intensywnym płukaniu płytek (roztwór do płukania Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, USA) dodano rozcieńczony supernatant z narządów, wcześniej odwirowany z prędkością 6000x g przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Równolegle zastosowano krzywą standardową dla oczyszczonych in situ metodą powinowactwa kurzych IgY anty-IBDV-VP2, w celu ilościowego oznaczenia poziomu IgY. Następnie płytki ponownie umieszczono w komorze o kontrolowanej wilgotności w temperaturze 4°C na noc. Detekcję przeprowadzono przy użyciu swoistych, skoniugowanych z HRP, poliklonalnych przeciwciał kozich przeciwko kurzym IgY-Fc lub swoistych, poliklonalnych przeciwciał kozich przeciwko kurzym IgA specyficznym dla łańcucha  $\alpha$  (Bethyl Laboratories, Montgomery, Teksas, USA), substratu TMB (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, USA) i roztworu 450 nm hamującego TMB (Abcam, Cambridge, Wielka Brytania). Gęstość optyczną (absorbancję) oznaczono przy 450 nm z użyciem czytnika mikropłytek Bio Tek (Bio Tek, Winooski, VT, USA). Poziomy IgY anty-IBDV określono ilościowo poprzez porównanie wartości absorbancji z krzywą standardową, natomiast poziomy IgA anty-IBDV określono jakościowo.

## 2.8. Ustalenie obecności kompleksów immunologicznych IgY-IBDV w narządach z użyciem metody ELISA

Pokróctce, płytki ELISA pokryto 2,5  $\mu$ g/ml monoklonalnym mysim IgG anty-IBDV-VP2 (Abnova, Taipei City, Tajwan) rozcieńczonym w buforze. Powleczone płytki inkubowano w temperaturze 4°C przez noc, a następnie płukano i blokowano, jak opisano powyżej. Dodano próbki narządów przygotowane jak opisano poprzednio, a następnie płytki inkubowano przez noc w komorze o kontrolowanej wilgotności w temperaturze 4°C. Obecność kompleksów immunologicznych IgY-IBDV wykrywano przy użyciu skoniugowanych z HRP swoistych, poliklonalnych przeciwciał kozich przeciwko kurzym IgY-Fc (Bethyl Laboratories, Montgomery, Teksas, USA). W celu zbadania swoistości płytki inkubowano z rekombinowanym IBDV-VP2 (50  $\mu$ g/ml) (Phibro Animal Health, Izrael) lub z próbkami ptaków nieszczepionych.

## 2.9. Lokalizacja IBDV-MB-1 w obrębie splenocytów przy użyciu analizy FACS (sortowania komórek aktywowanych fluorescencją)

Świeżo śledziony pobrane od 9 szczepionych i 9 nieszczepionych kurcząt umieszczono w probówkach zawierających podłoże RPMI 1640 z 25 mM HEPES i L-Glutamię (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Izrael). Tkankę rozdrobiono przy użyciu płaskiego końca tłołka strzykawki 5 ml oraz metalowego sitka do hodowli komórkowych. Następnie zawiesina przenoszona była za pomocą 40  $\mu$ m sita komórkowego Falcon™ (Thermo-Fisher Scientific, Nowy Jork, USA) do probówek stożkowych o pojemności 50 ml. Żywność komórek oceniono na ~95% po zabarwieniu 0,5% błękitem trypanu (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Izrael). Następnie pulowano po 3 próbki z każdej grupy, co dało 3 połączone próbki dla każdej z badanych grup. Pulowanie przeprowadzono ze względu na niewielki rozmiar śledziony piskląt oraz w celu zapewnienia wystarczającej ilości komórek do analizy FACS. Dane uzyskane w wstępnych doświadczeniach sugerowały, że pulowanie ilości 3 prób

zapewni wystarczającą ilość komórek przy minimalnej zmienności pomiędzy próbkami. Splenocyty utrwalano przez 10 minut w użyciu 1,6% formaldehydu w PBS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), a następnie permeabilizowano przez 15 minut przy użyciu 0,2% Tween 20 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) w PBS. Komórki (1 x 106 komórek/probówkę) barwiono dwukrotnie w celu wykrycia wirusa oraz określenia subpopulacji splenocytów: limfocytów B, niedojrzałych limfoblastów B i makrofagów.

Wykrywanie wirusa MB-1 IBD przeprowadzono przy użyciu monoklonalnych mysich anti-IBDV-VP2 IgG (Abnova, Taipei City, Tajwan), skoniugowanych z AF488 z zastosowaniem zestawu do koniugacji przeciwciał Lynx Rapid Plus DyLight®488 (Bio-Rad, Hercules CA, USA), zgodnie z instrukcją producenta. Subpopulacje splenocytów określono przy użyciu mysich przeciwciał monoklonalnych sprzężonych z AF647 rozpoznających kurcze: BU-1 dla limfocytów B, IgM dla niedojrzałych limfoblastów B i KUL1 dla makrofagów (SouthernBiotech, AL, USA). Wstępne doświadczenia nie wykazały żadnego wpływu na dyspersję populacji komórek po procedurach utrwalania i permeabilizacji. Jako wewnętrzne kontrole negatywne zastosowano kontrole izotypowe AF488 IgG i AF647 IgG (SouthernBiotech, AL, USA).

W skrócie, do każdej puli splenocytów w 1% BSA (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) w PBS dodano skoniugowane z AF488 anti-IBDV-VP2 IgG i skoniugowane AF647 anti-BU-1 lub IgM lub KUL1, które inkubowano w 4°C przez noc. Komórki następnie dokładnie płukano i filtrowano, stosując 40 µm nylonowe sito komórkowe Falcon™ (Thermo-Fisher Scientific, NY, USA), do polistyrenowych probówek FACS Falcon™ (Becton Dickinson, NJ, USA). Probówka z kontrolą izotypową służyła jako kontrola ujemna. W sumie liczono 10 000 komórek z każdej puli przy użyciu analizatora BD Accuri C6 plus Cell Analyzer, rozproszenia przednie, boczne oraz charakterystyki FL-1 i FL-4.

## 2.10. Badanie w mikroskopie konfokalnym fluorescencyjnym

Po barwieniu i analizie FACS wykonywano rozsmaz komórek z każdej puli na dodatnio naładowanych szkiełkach mikroskopowych i barwiono kontrastowo przy użyciu Fluoroshield™ z DAPI (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu świetlnego konfokalnego SP8 (Leica, Niemcy).

## 2.11. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu oprogramowania JMP® software (SAS® Institute Inc., Cary NC, USA). W przypadku danych o równych wariancjach, analizowano główny efekt przy użyciu jednocierunkowej lub dwukierunkowej metody Anova, następnie Tukey HSD dla licznych porównań lub Welch-Student dla porównań w parach. W przypadku danych o nierównych wariancjach, analizowano główny efekt przy użyciu nieparametrycznego Wilcoxon i zastosowano każdy test parowany dla licznych porównań.

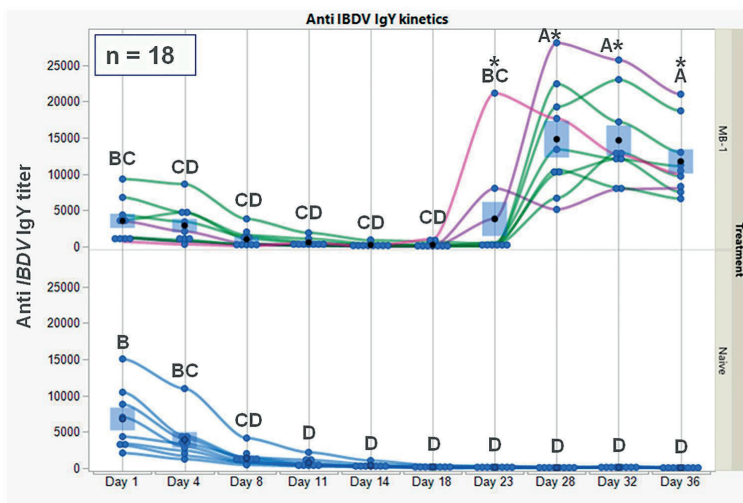
Analizowano dane FACS przy użyciu oprogramowania FlowJo (FlowJo, LLC data analysis software, Ashland, OR, USA) oraz analizy statystycznej przy użyciu testu Kolmogorov-Smirnov test (K-S test): test nieparametryczny jednorodności dystrybucji prawdopodobieństwa stałego jednowymiarowego, stosowanego w celu porównania dwóch lub więcej prób (pule nieszczepione i szczepione).

## 3. Wyniki

Zrozumienie sposobu działania szczepionki MB-1 wymagało na początku ustalenia występowania w organizmie ptaka matczynych przeciwciał IgY anti-IBDV oraz zmienności ich poziomu w czasie. Charakterystykę odpowiedzi przeciwciał anti-IBDV (matczynych i de novo) obserwowano i porównywano przez 36 dni zarówno u zaszczepionych (MB-1 sc. w 1 DOA) jak i nieszczepionych brojlerów.

Wyniki przedstawione na Rysunku 1 pokazują wysokie i podobne zakresy mian MDA IgY anti-IBDV zarówno w grupie zaszczepionej (średnia: 4766 ± 1356), jak i nieszczepionej (średnia: 7743 ± 2032) w 1-szym dniu życia. W obu grupach wystąpił potem podobny spadek ilości IgY, z niewykrywalnym ich poziomem w 18 dniu życia (436 ± 125 i 217 ± 59 odpowiednio dla grupy zaszczepionej i nie szczepionej). Znaczący wzrost poziomu przeciwciał wystąpił jedynie w grupie ptaków zaszczepionych w 18–23 dniu po szczepieniu (patrz legenda rysunku), co było wynikiem wytwarzania w ich organizmach przeciwciał de novo. Poziomy przeciwciał utrzymywały się na relatywnie stałym poziomie, aż do 36 dnia życia. Co ciekawe, podczas serokonwersji zaobserwowano wysoki stopień zmienności poziomów przeciwciał pomiędzy poszczególnymi kurczętami; u niektórych serokonwersja widoczna była wieku 18–23 DOA (4456 ± 2423), podczas gdy u innych pomiędzy 23–28 DOA (18 486 ± 2423). Wydaje się, że większość piskląt mająca początkowo niski poziom MDA (2302 ± 929) przeszła wczesną

serokonwersję, podczas gdy u piskląt mających początkowo wysoki poziom MDA serokonwersja wystąpiła nieco później, z różną wysokością wyników; wartość  $p = 0,0363$ .



Rysunek 1. Kinetyka IgY anti-IBDV w surowicy u zaszczipionych i nieszczipionych brojerów kurzych, po szczepieniu szczepionką MB-1 w 1 dniu życia. Miiana przeciwciał określono przy użyciu testu IDEXX IBD-XR Ab ELISA. Każdy niebieski punkt reprezentuje pojedynczego ptaka w określonym punkcie czasowym (dni życia). W grupie szczepionych ptaków - zielone linie przedstawiają ptaki ze stosunkowo wysokim poziomem MDA anti-IBDV, natomiast różowe i fioletowe linie przedstawiają pisklęta ze stosunkowo niskim poziomem MDA anti-IBDV (każda linia oznacza powtarzane pomiary u tego samego ptaka). Dla każdego punktu czasowego niebieskie słupki reprezentują średnią  $\pm$  SEM z 9 pomiarów u poszczególnych piskląt. Dwukierunkowy model ANOVA w układzie powtarzanych pomiarów zastosowano dla określenia znaczenia różnic pomiędzy średnimi wartościami w grupach; grupy lub dni oznaczane różnymi kombinacjami liter znacząco się pomiędzy sobą różniły ( $p < 0.05$ ).

W dniach 23–36, ze względu na niejednorodność wariancji między grupami w ciągu kilku dni, znaczenie różnic pomiędzy średnimi wartościami grup określono za pomocą testu Welch t-test ( $p < 0.05$ ); różnice oznaczano przy użyciu gwiazdek (\*).

Czasy występowania przeciwciał IgY anti-IBDV w surowicy, jak opisano powyżej, potwierdzają naszą hipotezę dotyczącą przeżywalności wirusa szczepionkowego szczepionki MB-1 nawet w obecności neutralizujących przeciwciał matczynych. Obserwacja ta skłania do przyjęcia następującego sposobu działania:

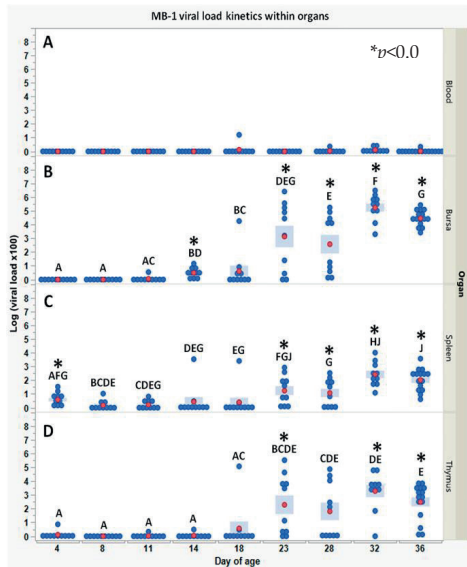
- działanie MDA skutecznie zapobiega możliwości infekowania głównego miejsca docelowego – torby Fabrycjusza przez MB-1,
- zdolność przeżywania MB-1 w obrębie makrofagów zapewnia ich przetrwanie podczas utrzymywania się ochrony jaką dają przeciwciała matczyne. Kiedy ochrona przeciwciał matczynych słabnie, wirus szczepionkowy jest w stanie zakażać niedojrzałe limfocyty B. Dla potwierdzenia tego mechanizmu działania, obliczaliśmy i porównywaliśmy ilość wirusa MB-1 w torbie Fabrycjusza, grasicy i krwi, przy użyciu qPCR.

Zgodnie z oczekiwaniami próbki od ptaków nieszczipionych, ze wszystkich badanych narządów i we wszystkich punktach czasowych, wykazały zerowe miana wirusa (dane nie przedstawione). U immunizowanych ptaków miana wirusa we krwi (Rysunek 2A) były niskie lub zerowe we wszystkich punktach czasowych, a wartości były bliskie limitu wykrywalności. W torbie Fabrycjusza (Rysunek 2B) wirus MB-1 był wykrywany tylko w 14 i 18 dniu życia; poziomy te, jak pokazano na wykresie, znacznie przekraczały granicę wykrywalności (ilość wirusa u jednego pisklęcia w 18 DOA była szczególnie wysoka). Miiana wirusa, zarówno pod względem liczby piskląt, jak i poziomów, rosły od 18 do 32 dnia życia, kiedy to uzyskały najwyższą wartość (patrz rysunek); następnie nastąpił niewielki, ale znaczący spadek w 36 dniu życia (znaczenie różnic między punktami czasowymi pokazano na rysunku).

Największą zmienność osobniczą zaobserwowano pomiędzy 23 a 28 dniem życia. Co ciekawe, wirusa wykrywano w śledzeniu pojedynczych piskląt już w 4 dniu ich życia. Te minimalne miana wirusa utrzymywały się do 18 dnia (ilość wirusa u jednego pisklęcia w wieku 14 dni i jednego w wieku 18 dni była szczególnie wysoka). Następnie u większości ptaków obserwowano umiarkowany i znaczący wzrost mian wirusa, aż do osiągnięcia wartości szczytowej w 32–36

dniu życia, przy czym u wszystkich ptaków obserwowano pozytywną reakcję immunologiczną na szczepienie. Poziomy wirusa stwierdzone w śledzionie były o kilka log niższe niż te obserwowane w torbie Fabrycjusza.

Podobny schemat „działania” wirusa obserwowano w grasicy (Rysunek 2D): bardzo niskie, bliskie granicy detekcji miana obserwowano pomiędzy 4 a 18 dniem życia (z wyjątkiem jednego ptaka w wieku 18 dni). Poczawszy od 23 dnia ilość wirusa znacznie rosła w większości ptaków, a potem utrzymywała się na stabilnym poziomie do 36 dnia życia; wysoka zmienność poziomu mian występowała u ptaków pomiędzy 23 a 36 dniem życia. W śledzionie najwyższe stwierdzone poziomy wirusa były o kilka log niższe, niż te obserwowane w torbie Fabrycjusza.

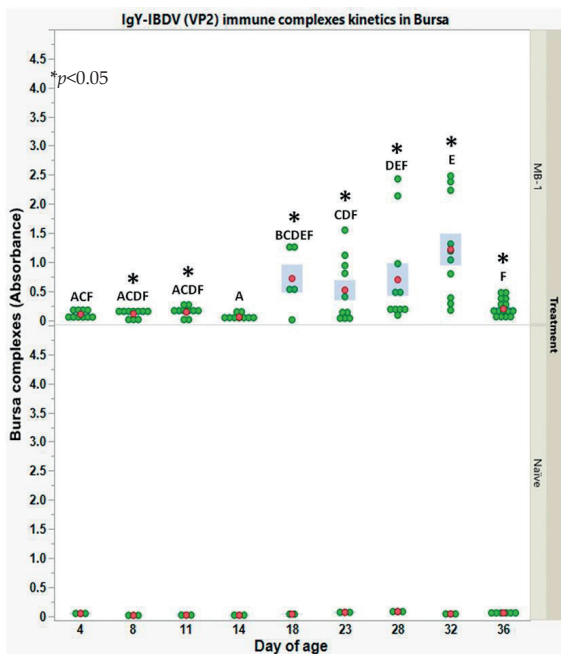


Rysunek 2. Kinetyka mian wirusa MB-1 we krwi (A), w torbie Fabrycjusza (B), w śledzionie (C) i w grasicy (D) ptaków zaszczepionych MB-1 w 1-szym dniu życia; u brojlerów nieszczepionych miana wirusa było takie same i wynosiły 0 (dane nie przedstawione). Miana wirusa określano stosując qPCR i przekładając wartości Cq przy użyciu znanego standardu MB-1 (opisano w sekcji 2. Materiały i Metody). Każdy niebieski punkt reprezentuje pojedyncze piskle w konkretnym punkcie czasowym. Dla każdego punktu czasowego i narządu czerwone punkty i niebieskie słupki przedstawiają średnią ± SEM z 10 indywidualnych pomiarów u poszczególnych ptaków (15 pomiarów w 36 dniu życia). Ze względu na niejednorodność wariacji pomiędzy dniami, istotność różnic pomiędzy średnimi wartościami dni określono metodą nieparametryczną testem Wilcoxon; dni oznaczone różnymi kombinacjami liter prezentują znaczące różnice ( $p < 0,05$ ). Istotność różnic pomiędzy grupami w zakresie średnich wartości dni określono za pomocą testu Welch-t-test ( $p < 0,05$ ); różnice oznaczano przy użyciu gwiazdek (\*).

Możliwe interakcje pomiędzy układem immunologicznym gospodarza (przeciwciała) i szczepem szczepionkowym wirusa (MB-1 IBDV) w sąsiedztwie pierwotnego narządu docelowego (torba Fabrycjusza) mogą przyćmiwać dynamikę procesu immunizacji. W celu zbadania tej interakcji, przeprowadzono nowoczesne badanie metodą ELISA w celu zlokalizowania kompleksów immunologicznych IgY-IB(VP2) w płynie śródmiąższowym torby Fabrycjusza.

Jak pokazuje Rysunek 3 (dolny panel) u kurcząt nieszczepionych nie wykryto obecności kompleksów immunologicznych. U piskląt zaszczepionych (górny panel) już w 4 dniu ich życia wykryto bardzo niski poziom kompleksów immunologicznych IgY-IBDV, które utrzymywały się na umiarkowanie stałym poziomie do 14 dnia, a następnie od 18 dnia życia ich poziom wzrastał w sposób umiarkowany do 32 dnia życia u wszystkich ptaków reagujących. Z kolei u wszystkich badanych ptaków zaobserwowano dramatyczny spadek poziomu kompleksów immunologicznych w wieku 36 dni. Podobnie jak w przypadku poprzednich obserwacji, dotyczących obecności IBDV w torbie Fabrycjusza, wysoką zmienność pomiędzy poszczególnymi osobnikami obserwowano pomiędzy 18 a 32 dniem życia.

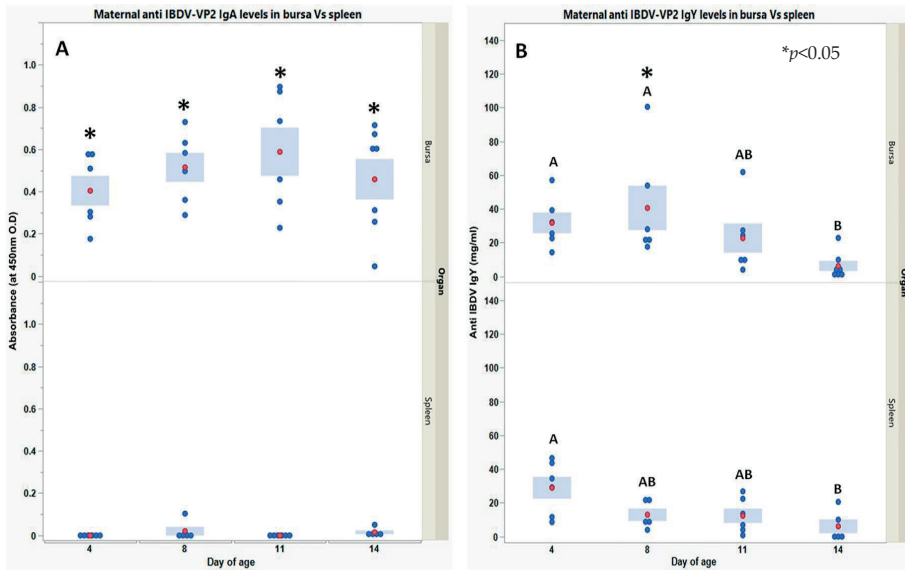
Dlatego miejscowa obecność kompleksów immunologicznych w tkance śródmiąższowej torby Fabrycjusza może stanowić przeszkodę w przenikaniu wirusa szczepionkowego do limfoblastów B przez wirus szczepionkowy. Podobnie jak w przypadku obecność MDA.



Rysunek 3. Poziomy kompleksów immunologicznych określono za pomocą autorskiej metody „sandwich ELISA” (szczegóły w sekcji Materiały i Metody). Każdy zielony punkt reprezentuje pojedyncze pisklę w określonym punkcie czasowym i konkretnej grupie. Dla każdego punktu czasowego i grupy czerwone punkty i niebieskie słupki przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z 10 pojedynczych pomiarów w zaszczypanych piskląt i u 3 piskląt nieszczypanych (15 pomiarów dla zaszczypanych i 6 dla nieszczypanych, w 36 dniu życia). Ze względu na niejednorodność wariancji pomiędzy poszczególnymi dniami, znaczenie różnic pomiędzy średnimi wartościami dni określono za pomocą nieparametrycznego testu Wilcoxon dla każdej pary; dni oznaczone różnymi kombinacjami liter różnią się istotnie ( $p < 0,05$ ). Istotność różnic pomiędzy średnimi wartościami grup w ciągu dni określono za pomocą testu Welch-t-test ( $p < 0,05$ ); różnice oznaczano przy użyciu gwiazdek (\*).

Migracja wirusa szczepionkowego MB-1 i jego lokalizacja w śledzionie, a nie w torbie Fabrycjusza w pierwszych 14 dniach życia (Rys. 2C), skłoniła firmę do zbadania, czy w torbie Fabrycjusza i śledzionie nieszczypanych piskląt występowały różne poziomy przeciwciał matczynych (MDA). Poziomy przeciwciał anty-IBDV IgY i IgA ustalano przy użyciu testu ELISA.

Poziom przeciwciał IgA anty-IBDV (Rysunek 4A) był znacznie wyższy w torbie Fabrycjusza niż w śledzionie we wszystkich badanych grupach wiekowych (4 DOA – 14 DOA) - średni poziom w czterech punktach czasowych w torbie Fabrycjusza porównywano ze śledzioną. Obecność IgY anty-IBDV (Rys. 4B) obserwowano zarówno w śledzionie, jak i w torbie Fabrycjusza (4 dzień życia). IgY anty-IBDV utrzymywały się dłużej w torbie Fabrycjusza niż w śledzionie (porównano poziom w 8 i 11 dniu życia; niewielka ilość w 11 dniu). Do 14 dnia poziom przeciwciał IgY anty-IBDV spadał do tego samego poziomu w obu narządach.



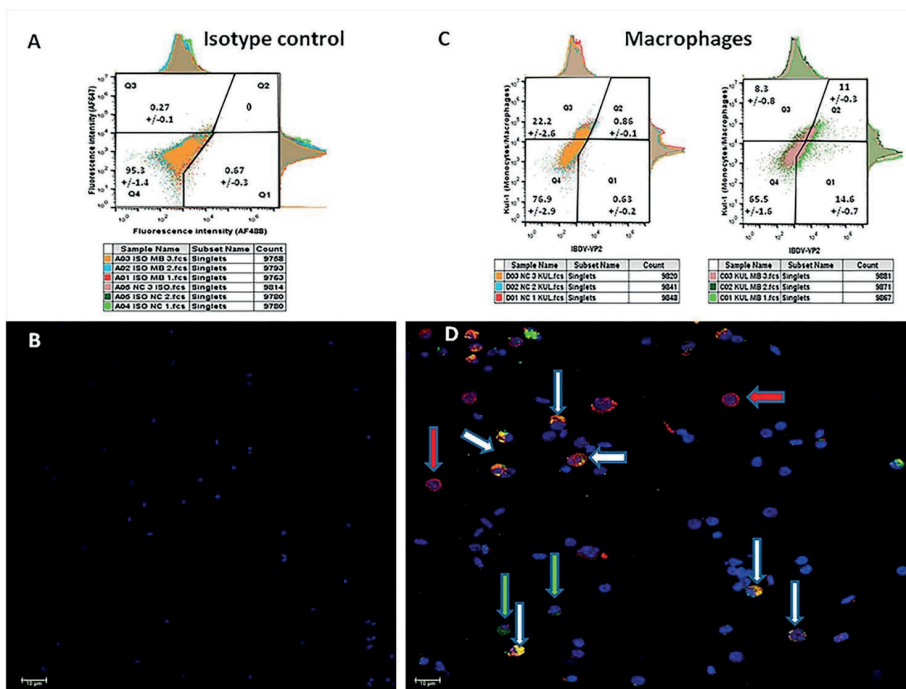
Rysunek 4. Porównanie poziomów MDA anti-IBDV IgA (A) i IgY (B) w torbie Fabrycjusza i w płynie śródmięszkowym śledziony u nieszczepionych piskląt przez 14 dni po wykluciu. Poziomy IgY i IgA określono za pomocą pośredniego testu ELICA (metoda ilościowo-jakościowa), opracowanego w naszej Firmie w celu rozpoznania białka VP2 wirusa IBDV (szczegóły w sekcji Materiały i Metody). Każdy niebieski punkt reprezentuje pojedyncze pisklę w określonym punkcie czasowym i narządzie. Dla każdego punktu czasowego i narządu czerwone punkty i niebieskie słupki przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z 6 pomiarów pojedynczych piskląt. Zarówno w przypadku IgY, jak i IgA anti-IBDV zastosowano jednokierunkowy model ANOVA w celu określenia istotności różnic między średnimi wartościami dni w tym samym narządzie; dni oznaczone różnymi kombinacjami liter różnią się istotnie według testu Tukey HSD ( $p < 0,05$ ). Ze względu na heterogeniczność wariancji pomiędzy narządami w obrębie dni, znaczenie różnic pomiędzy średnimi wartościami dla narządów ustalano w teście Welch-t-test ( $p < 0,05$ ); różnice oznaczano przy użyciu gwiazdek (\*).

Ponieważ powyższe obserwacje sugerowały, że w okresie utrzymywania się protekcyjnych poziomów MDA w organizmie ptaka, to śledziona jest głównym narządem lokalizacji wirusa szczepionkowego MB-1, kolejnym etapem naszych badań była charakterystyka populacji splenocytów zakażonych przez wirus. W tym celu przeprowadzono FACS i mikroskopię konfokalną na sześciu jednokomórkowych pulach zawieszin przygotowanych ze śledzion dziewięciu szczepionych i dziewięciu nieszczepionych piskląt. Śledziona zebrano w 4 dniu życia (3 dni po szczepieniu MB-1). Komórki barwiono w sposób opisany w sekcji Metody, a każdą pulę badano za pomocą konfokalnej mikroskopii fluorescencyjnej.

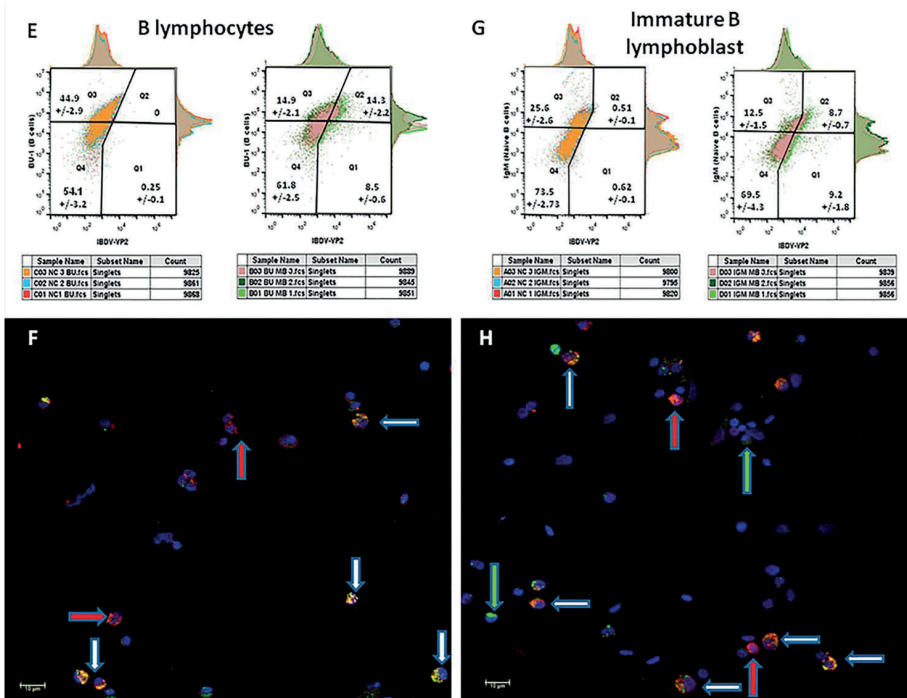
Podwójne barwienie kontrolą izotypowo ujemną (Rys. 5, panel A) wykazuje pojedynczą populację splenocytów zlokalizowaną niemal wyłącznie w czwartej ćwiartce diagramu FACS (95,3+/-1,4%). W związku z tym w komórkach widoczne są jedynie komórki wybarwione jądrem DAPI w parowanym mikrowykrzesie (Rysunek 5, panel B). Zgodnie z oczekiwaniami w pulach ptaków nieszczepionych nie wykryto żadnego sygnału wirusa.

Podwójne barwienie próbek od szczepionych ptaków markerem IBDV i markerem makrofagów KUL-1 (Rys. 5, panel C) ujawniło, że 57,02  $\pm$  3,14% makrofagów było IBDV-dodatnich (Q2/Q2 + Q3), podczas gdy 43  $\pm$  0,8 % komórek zakażonych IBDV stanowiły makrofagi (Q2/Q2 + Q1). Podwójne barwienie próbek ptaków szczepionych z markerem IBDV i markerem limfocytów B BU-1 (Rys. 5, panel E) ujawniło, że 48,9  $\pm$  6,94% limfocytów B było IBDV-dodatnich, podczas gdy 62,3  $\pm$  2,5% komórek zakażonych IBDV to limfocyty B. Co ciekawe, podwójne barwienie próbek szczepionych ptaków oznaczonych markerem IBDV i markerem niedojrzałych limfocytów B IgM (Rys. 5, panel G), ujawniło podobny odsetek niedojrzałych limfocytów B (w porównaniu z dojrzałymi komórkami B) w stosunku do całkowitej liczby komórek zakażonych IBDV (49,3  $\pm$  2,9%), co sugeruje, że około 85% zakażonych limfocytów B było niedojrzałych.

Na wszystkich obrazach mikroskopowych wykonanych z podwójnie barwionych próbek ptaków szczeplonych MB-1 (Rys. 5: panel D – makrofagi, Rys. 5: panel F – limfocyty B i panel H – niedojrzałe limfoblasty B) widoczne są cztery populacje komórek: podwójnie ujemne komórki (barwione wyłącznie DAPI), IBDV-dodatnie i ujemne komórki z markerem komórkowym (barwienie niebieskie i zielone), IBDV-ujemne i dodatnie komórki z markerem komórkowym (barwienie niebieskie i czerwone) oraz podwójnie dodatnie (IBDV-dodatnie i dodatnie dla markera komórkowego z barwieniem niebieskim, czerwonym i zielonym). Co więcej, metoda „z-stacking” wykazała, że markery komórkowe ograniczają się do błon komórkowych, zaś marker IBDV występuje głównie w cytoplazmie komórek.

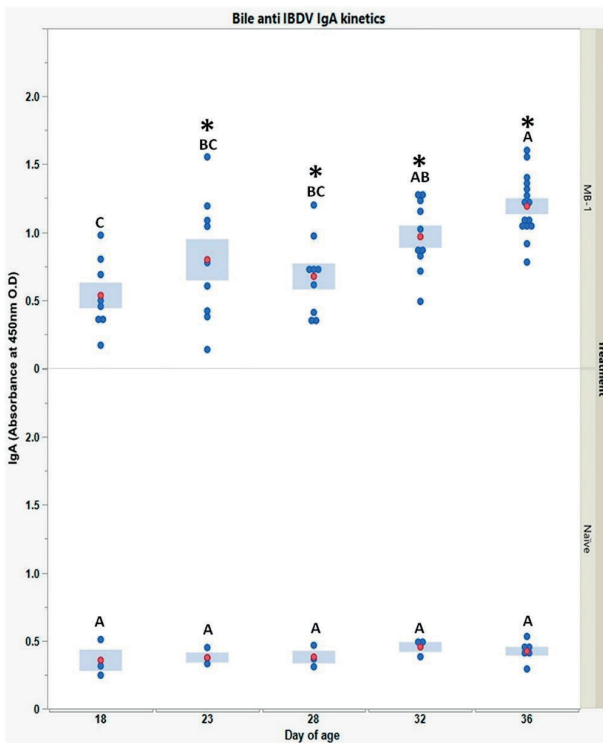


Rysunek 5. w kontynuacji poniżej



Rysunek 5. Lokalizacja wirusa szczepionkowego MB-1 w splenocytach w 4 dniu życia. Pule pojedynczych zawiesin komórek splenocytów sporządzono ze sledzion dziewięciu nieszczepionych i dziewięciu szczepionych szczepionką MB-1 w 1 dniu życia kurecząt, pobranych w 4 dniu życia (każda pula składa się z 3 pojedynczych sledzion z danej grupy). Każdą pulę poddano podwójnemu barwieniu przy użyciu mysich przeciwciał monoklonalnych anti-IBDV-VP2 AF488 i przeciwciał AF747 przeciwko markerowi komórkowemu dla makrofagów (C) lub limfocytów B (E) lub niedojrzałych limfoblastów B (G) i analizowano 10 000 komórek/pulę. Bramkowanie przeprowadzono przy użyciu kontroli ujemnej dla izotypu (A). Średnia  $\pm$  SEM prezentowana w każdej ćwiartce w wykresach FACS składała się z 3 puli (30 000 komórek). Po analizie FACS, splenocyty z każdej puli (przedstawiono tylko pule z ptaków szczepionych) badano dalej z użyciem mikroskopu konfokalnego z fluorescencją. Panel B – izotypowa kontrola ujemna, wskazuje, że komórki zostały specyficznie znakowane bez fałszywie dodatniego tła. Widoczne są cztery możliwe populacje komórek: komórki podwójnie ujemne wybarwione jedynie błękitem jądra (DAPI), komórki IBDV-dodatnie i ujemne dla markera komórkowego – wybarwione na niebiesko i zielono (zielona strzałka), komórki IBDV-ujemne i IBDV-dodatnie dla markera komórkowego wybarwione na niebiesko i czerwono (czerwona strzałka) oraz podwójnie dodatnie (dodatni IBDV i dodatni marker komórkowy) wybarwione na niebiesko, czerwono i zielono (biała strzałka).

Na koniec, aby zbadać, czy szczepionka MB-1 wywołuje również odporność miejscową z błon śluzowych, mierziliśmy poziom przeciwciał IgA anti-IBDV w żółci od 18-go do 36-go dnia życia. Poziomy IgA anti-IBDV, przedstawiony na Rys. 6, były bardzo niskie i stabilne u ptaków wcześniej nieszczepionych, podczas gdy u piskląt szczepionych poziomy te były, nie tylko dodatnie w 18 dniu życia (3 pisklęta, które zareagowały), ale wzrastały do 36 dnia życia, czyli wieku, w którym wszystkie badane pisklęta uwalniały już przeciwciała IgA anti-IBDV do żółci.



Rysunek 6. Kinetyka poziomów przeciwciał IgA anty-IBDV w żółci u piskląt nieszczepionych i szczepionych w okresie 18–36 dni po wykluciu. Poziomy IgA określono przy użyciu pośredniego, jakościowego testu ELISA w celu rozpoznania VP2 IBDV (szczegóły w sekcji 2). Każdy niebieski punkt reprezentuje pojedyncze pisklę w określonym punkcie czasowym i poszczególnej grupie. Dla każdego punktu czasowego i grupy czerwone punkty i niebieskie słupki reprezentują średnią  $\pm$  10 indywidualnych pomiarów u piskląt szczepionych i 3 piskląt nieszczepionych (15 pomiarów w 36 dniu życia dla szczepionych i 6 dla nieszczepionych). Do określenia istotności różnic pomiędzy średnimi wartościami dni w tej samej grupie zastosowano jednokierunkowy model ANOVA; dni oznaczone różnymi kombinacjami liter różnią się istotnie według testu Tukey HSD ( $p < 0,05$ ). Ze względu na niejednorodność wariancji pomiędzy grupami w obrębie dni, istotność różnic pomiędzy średnimi wartościami grup określono za pomocą testu Welch t-test ( $p < 0,05$ ); różnice oznaczano przy użyciu gwiazdek (\*).

#### 4. Dyskusja

Wytworzenie przeciwciał de novo zwykle jest wynikiem skutecznego szczepienia. Szczepionka MB-1 różni się od innych żywych szczepionek IBDV, ponieważ wykazuje dwie intrygujące cechy:

1. przebieg serokonwersji w czasie zależy od indywidualnych poziomów przeciwciał matczynych (MDA anty-IBDV)
2. wirus szczepionkowy jest zdolny do przeżycia pomimo ochrony przeciwciał matczynych, wywołując opóźnioną replikację po indywidualnej immunizacji.

Nasze obserwacje, w których pisklęta, z początkowo niskim poziomem MDA, przeszły wczesną serokonwersję, podczas gdy te z początkowo wysokim MDA przechodziły serokonwersję później, są zgodne z wcześniejszymi badaniami [11]. Jednak zdolność wirusa do przetrwania pomimo ochrony matczynej oraz dalszego wywoływania odpowiedzi przeciwciał de novo i ochrony immunologicznej przeciwko IBDV tylko częściowo wyjaśnić można poziomem MDA, gdyż ptaki z wysokim poziomem przeciwciał matczynych również ostatecznie wytwarzały skuteczną odpowiedź immunologiczną [10–12]. Ze względu na fakt, że pierwotna odpowiedź immunologiczna wymaga proliferacji i różnicowania komórek, a serokonwersja zachodzi między 14 a 23 dniem życia, autorzy, aby zgłębić proces immunizacji MB-1, skupili się na badaniu narządów docelowych dla wirusa przez pierwsze trzy tygodnie życia brojlerów po wykluciu.

Ponieważ torba Fabrycjusza jest uważana za główny narząd docelowy dla IBDV [2,3,22], autorzy zdecydowali się ocenić kinetykę replikacji w torbie Fabrycjusza i innych narządach za pomocą metody qPCR, podobnie jak w poprzednich badaniach [9,11,23, 24]. Co zaskakujące MB-1 wykrywano w torbie Fabrycjusza u niektórych ptaków już w 14 dniu ich życia. Dużą zmienność ilości wirusa, obserwowaną pomiędzy 18 a 28 dniem życia, można wyjaśnić głównie zróżnicowanymi poziomami MDA anty-IBDV u kurcząt, a później (~24 dzień) pojawianiem się przeciwciał *de novo*. Wzrost mian wirusa obserwowany w 18 dniu wskazuje, że wirus szczepionkowy przeżył rezydując w różnych organach, nie tylko w torbie Fabrycjusza. Wraz ze spadkiem poziomu MDA, z powrotem przechodził do TF. W końcu spadek miana wirusa w 36 dniu może sugerować neutralizację *de novo*.

Ponieważ wirus IBDV znany jest z wysokiego tropizmu do niedojrzałych limfoblastów B (sIgM+) i zdolności do przebywania wewnątrz makrofagów [1,2,5,7,25], kinetykę mian wirusa badano przez 36 dni po szczepieniu w pierwotnych i wtórnych narządach docelowych dla IBDV, tj. torbie Fabrycjusza, krwi, grasicy i śledzionie [2, 8,26].

Kinetyka mian wirusa w grasicy różniła się od kinetyki mian wirusa w torbie Fabrycjusza: wirus szczepionkowy po raz pierwszy wykryto w grasicy w 23 dniu życia (~9 dni później niż w torbie Fabrycjusza) i obserwowano stosunkowo niskie miano wirusa. Ponadto we krwi wirusa nie wykryto wcale. Można wyjaśnić te wyniki faktem, że fizjologicznie ilość niedojrzałych limfoblastów B (3% limfocytów) w grasicy [27] jest bardzo niska, a jeszcze niższa we krwi obwodowej [28].

Co ciekawe, wirus MB-1 wykrywano w śledzionie już 4 dnia po szczepieniu, potem jego poziom delikatnie wzrastał do 23 dnia życia i osiągał znaczący poziom pomiędzy 32 a 36 dniem życia. Obserwacja ta może sugerować, że śledziona jest „alternatywnym” narządem docelowym w okresie, w którym występuje silna odporność matczyzna.

Ponieważ interakcja pomiędzy gospodarzem-patogenem w obrębie pierwotnego narządu docelowego może znacznie przyczynić się do lepszego zrozumienia dynamiki immunizacji [2,7,29–31], za pomocą testu ELISA określano ilości kompleksów immunologicznych IBDV-IgY w płynie śródmiąższowym torby Fabrycjusza. Do 14 dnia życia obserwowano bardzo małą ilość kompleksów, natomiast ich poziom wzrastał pomiędzy 18 a 36 dniem życia. Obserwacje te korelowały z kinetyką mian wirusa i torbie Fabrycjusza. Można przypuszczać, że miano wirusa w śledzionie w ciągu pierwszych 14 dni było zbyt niskie, aby zakażać komórki torby Fabrycjusza. Dodatkowo był on neutralizowany przez przeciwciała matczyne (MDA). Kiedy poziom MDA się obniżył wirus MB-1 mógł zakażać i replikować w komórkach torby Fabrycjusza, generując wysokie miano wirusa i zwiększając ilość kompleksów IBDV-IgY. Ostatecznie gwałtowny spadek ilości kompleksów immunologicznych w 36 dniu życia, wraz z obniżeniem się miana wirusa w śledzionie i torbie Fabrycjusza, przypisuje się odpowiedzi immunologicznej przeciwciał *de novo*, która eliminuje wirus. Co ciekawe, kompleksy immunologiczne nie występowały we krwi od 4 do 14 dnia (dane nie przedstawione).

Skuteczność ochronna przeciwciał matczynych jest istotnym czynnikiem wpływającym na zdolność wirusa do infekowania narządów. Co więcej, wysoki poziom przeciwciał IgA i IgY anty-IBDV w torbie Fabrycjusza, świadczy o wyższym poziomie ochrony matczynej w torbie niż w śledzionie. Można to tłumaczyć faktem, że torba Fabrycjusza jest narządem wydającym się z błony śluzowej, a co za tym idzie jest dodatkowo chroniona przez mechanizmy odporności lokalnej - błon śluzowych [32,33]. Dodatkowo torba posiada anatomiczne połączenie w przewod pokarmowym poprzez przewód torby – zapewnia on dostęp do niewchłoniętych i nienaruszonych matczynych IgY pochodzących z woreczka żółtkowego i dostarcza je z przewodu pokarmowego, aby umożliwić neutralizację patogenów [34,35]. Wcześniejsze badania wykazujące, że MDA mogą zneutralizować każdą szczepionkę IBDV podaną doustnie przed 10–17 dniem życia, potwierdzają obecne obserwacje dotyczące ochrony matczynej i neutralizacji patogenów w przewodzie pokarmowym [10,11].

Wcześniejsze badania wykazujące, że MDA mogą zneutralizować każdą szczepionkę anty-IBDV podaną doustnie przed 10-17 dniem życia, potwierdzają obecne obserwacje dotyczące ochrony matczynej i neutralizacji patogenów w przewodzie pokarmowym [10,11].

Ustalenie śledziona jako głównego miejsca alternatywnego dla wirusa szczepionkowego MB-1 w ciągu pierwszych dwóch tygodni po wylęgu doprowadziła nas do dokonania charakterystyki różnych subpopulacji zakażonych splenocytów.

Jako ostateczny punkt czasowy wybrano czwarty dzień życia (3 dni po szczepieniu MB-1), ponieważ reprezentował on najwcześniejszy punkt czasowy, kiedy przy najwyższych poziomach MDA wirus był wykrywalny w śledzionie. Cytometria przepływową wspartą mikroskopią konfokalną wykazała, że populacja komórkowa zakażona MB-1 to zasadniczo makrofagi. Wyższy ich odsetek był IBDV-dodatni (~60%) (przy wzmożonym sygnale fluorescencyjnym z

komórki). W mniejszym stopniu zakażeniu ulegały limfoblasty B. Biorąc pod uwagę zdolność wirusa do przetrwania i replikacji w makrofagach [5,8], obserwacja ta jest wiarygodna. U ptaków, śledziona jako analog węzłów chłonnych u ssaków, stanowi podzielne mikro-środowisko, w którym rośnie prawdopodobieństwo interakcji antygen-makrofag i limfocyt (przetwarzanie i prezentacja antygeny), w celu zapoczątkowania nabytej odpowiedzi immunologicznej. Śledziona jest także głównym organem zasiedlanym przez makrofagi po fagocytozie [36–39]. Wyniki badań sugerują, że makrofagi IBDV-dodatnie w śledzionie pochodzą z tkanek skóry: po podaniu szczepionki w formie iniekcji makrofagi wychwytyją wirus szczepionkowy i migrują do śledziony. Zdolność wirusa MB-1 do przetrwania w makrofagach jest kluczową koncepcją sposobu działania szczepionki, zapewniającą żywotność wirusa nawet przy skutecznej odporności matczynej.

Reasumując, kluczową wydaje się zdolność szczepionki MB-1 do wzbudzenia zarówno mechanizmów odporności lokalnej (z błon śluzowych) jak i swoistej (humoralnej). Odporność lokalna z błon śluzowych (IgA) stanowi pierwszą linię obrony - unikania infekcji, natomiast odporność humoralna (neutralizujące IgY) stanowi drugą - ograniczającą czas infekcji i poprawiając rokowanie [1,3,13].

## 5. Wnioski

To badanie doprowadziło do zaproponowania jasnego sposobu działania immunizacji MB-1: po iniekcji, wirus szczepionkowy MB-1 niesiony przez makrofagi bytujące w skórze, migruje drogą krwi do śledziony, w której makrofagach znajduje przyjazne środowisko do przeżycia w czasie, gdy poziom MDA jest wysoki. Fizjologiczny spadek poziomu przeciwciał matczynych pozwala wirusowi szczepionkowemu się rozprzestrzeniać do narządów docelowych i replikować w nich. W końcu produkcja de novo przeciwciał IgY anti-IBDV zapewni pełną ochronę ptaka i może rozpocząć się eliminacja wirusa z organizmu. Taki sposób działania wyjaśnia zdolność wirusa szczepionkowego MB-1 do przeżywania u kurcząt ze sprawną odpornością matczyną i odpowiedniego replikowania w organizmie, umożliwiając wczesną, skuteczną i trwałą immunizację przeciwko chorobie Gumboro.

**Wkład autorów:** Conceptualization, Y.W., V.L., A.F. (Avner Finger) i AF (Aharon Friedman); metodologia, Y.W., V.L., A.F. (Avner Finger) i A.F. (Aharon Friedman); walidacja, Y.W., V.L., A.F. (Avner Finger) i A.F. (Aharon Friedman); analiza formalna, Y.W. i V.L.; badania, Y.W., V.L., AA i ST; środki, Y.W., V.L., A.A. i ST; weryfikacja danych, Y.W., V.L., AF (Avner Finger) i AF (Aharon Friedman); napisanie, przygotowanie oryginalnego projektu, Y.W., V.L. i A.F. (Avner Finger); napisanie, recenzja i redagowanie, Y.W., V.L., A.F. (Avner Finger) i AF (Aharon Friedman); wizualizacja, Y.W. i V.L.; administracja projektu, A.F. (Avner Finger). Wszyscy autorzy przeczytali i zgodzili się na opublikowaną wersję artykułu.

Finansowanie Autorzy nie otrzymali zewnętrznych środków na przeprowadzenie tego badania.

### **Oświadczenie Komisji Etycznej:**

zgodnie z protokołem zatwierdzonym przez Instytucjonalną Radę ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Komisji ds. Opieki i Wykorzystywania Zwierząt Ministerstwa Zdrowia – zgodnie z przepisami dotyczącymi dobrostanu zwierząt (nr zatwierdzenia IL-20-6-226).

**Oświadczenie Instytucjonalnej Komisji Rewizyjnej:** Wszystkie badania przeprowadzono

**Oświadczenie o Świadomej Zgodzie:** Nie dotyczy.

**Oświadczenie o Dostępności Danych:** Nie dotyczy.

**Konflikt interesów:** Yossi Wein oświadcza, że wsparcie finansowe zapewniła firma Phibro Animal Health Corporation. Yossi Wein oświadcza o współpracy z Phibro Animal Health Corporation, która obejmuje: konsultacje i doradztwo. Virginie Loeb, Aderajew Asmare, Saar Tal i Avner Finger oświadcza, że wsparcie finansowe, administracyjne, opłaty za publikację artykułów oraz sprzęt, leki i materiały zostały dostarczone przez Phibro Animal Health Corporation. Virginie Loeb, Aderajew Asmare, Saar Tal, Avner Finger oświadcza, że związek z Phibro Animal Health Corporation, który obejmuje zatrudnienie. Aharon Friedman nie zgłasza żadnego konfliktu interesów.

## Bibliografia:

1. 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. [CrossRef] [PubMed]
2. Qin, Y.; Zheng, S.J. Infectious Bursal Disease Virus-Host Interactions: Multifunctional Viral Proteins that Perform Multiple and Differing Jobs. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 161. [CrossRef] [PubMed] *Vaccines* **2023**, *11*, 1316–15 of 16
3. van den Berg, T.P.; Etteradossi, N.; Toquin, D.; Meulemans, G. Infectious bursal disease (Gumboro disease). *Rev. Sci. Tech.* **2000**, *19*, 509–543. [CrossRef] [PubMed]
4. Mertens, J.; Casado, S.; Mata, C.P.; Hernando-Perez, M.; de Pablo, P.J.; Carrascosa, J.L.; Caston, J.R. A protein with simultaneous capsid scaffolding and dsRNA-binding activities enhances the birnavirus capsid mechanical stability. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 13486. [CrossRef] [PubMed]
5. Inoue, M.; Yamamoto, H.; Matuo, K.; Hihara, H. Susceptibility of chicken monocytic cell lines to infectious bursal disease virus. *J. Vet. Med. Sci.* **1992**, *54*, 575–577. [CrossRef]
6. Luo, J.; Zhang, H.; Teng, M.; Fan, J.M.; You, L.M.; Xiao, Z.J.; Yi, M.L.; Zhi, Y.B.; Li, X.W.; Zhang, G.P. Surface IgM on DT40 cells may be a component of the putative receptor complex responsible for the binding of infectious bursal disease virus. *Avian Pathol.* **2010**, *39*, 359–365. [CrossRef]
7. Trapp, J.; Rautenschlein, S. Infectious bursal disease virus' interferences with host immune cells: What do we know? *Avian Pathol.* **2022**, *51*, 303–316. [CrossRef]
8. Tanimura, N.; Tsukamoto, K.; Nakamura, K.; Narita, M.; Maeda, M. Association between pathogenicity of infectious bursal disease virus and viral antigen distribution detected by immunohistochemistry. *Avian Dis.* **1995**, *39*, 9–20.
9. de Wit, J.J.; Cazaban, C.; Dijkman, R.; Ramon, G.; Gardin, Y. Detection of different genotypes of infectious bronchitis virus and of infectious bursal disease virus in European broilers during an epidemiological study in 2013 and the consequences for the diagnostic approach. *Avian Pathol.* **2018**, *47*, 140–151. [CrossRef]
10. Ashash, U.; Noach, C.; Perelman, B.; Costello, C.; Sansalone, P.; Brazil, T.; Raviv, Z. In Ovo and Day of Hatch Application of a Live Infectious Bursal Disease Virus Vaccine to Commercial Broilers. *Avian Dis.* **2019**, *63*, 713–720. [CrossRef]
11. de Wit, J.J.; Jorna, I.; Finger, A.; Loeb, V.; Dijkman, R.; Ashash, U.; Iffrah, M.; Raviv, Z. In ovo application of a live infectious bursal disease vaccine to commercial broilers confers proper immunity. *Avian Pathol.* **2021**, *50*, 531–539. [CrossRef]
12. Ray, S.M.; Ashash, U.; Muthukumar, S. A field study on the evaluation of day-of-hatch and in grow-out application of live infectious bursal disease virus vaccine in broiler chickens. *Poult. Sci.* **2021**, *100*, 101252. [CrossRef]
13. Spackman, E.; Pantin-Jackwood, M.J. Practical aspects of vaccination of poultry against avian influenza virus. *Vet. J.* **2014**, *202*, 408–415. [CrossRef]
14. Lazarus, D.; Pasmank-Chor, M.; Gutter, B.; Gallili, G.; Barbakov, M.; Krispel, S.; Pitcovski, J. Attenuation of very virulent infectious bursal disease virus and comparison of full sequences of virulent and attenuated strains. *Avian Pathol.* **2008**, *37*, 151–159. [CrossRef]
15. Deka, P.; Das, S.; Deka, P. Influence of Maternal Antibody on the Efficacy of Newcastle Disease Vaccination in Broilers. *Curr. J. Appl. Sci. Technol.* **2020**, *39*, 108–114. [CrossRef]
16. Niewiesk, S. Maternal antibodies: Clinical significance, mechanism of interference with immune responses, and possible vaccination strategies. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 446. [CrossRef]
17. Corley, M.M.; Giambone, J.J. Immunosuppression in specific-pathogen-free broilers administered infectious bursal disease virus vaccines by in ovo route. *Avian Dis.* **2002**, *46*, 810–815. [CrossRef]
18. Gagic, M.; St Hill, C.A.; Sharma, J.M. In ovo vaccination of specific-pathogen-free chickens with vaccines containing multiple agents. *Avian Dis.* **1999**, *43*, 293–301. [CrossRef]
19. Giambone, J.J.; Dormitorio, T.; Brown, T. Safety and efficacy of in ovo administration of infectious bursal disease viral vaccines. *Avian Dis.* **2001**, *45*, 144–148. [CrossRef]
20. Rosenzweig, E.; Perelman, B.; Ashash, U.; Loeb, V. Characterization of the mode of action of MB-1, a live hatchery vaccine against gumboro disease. In Proceedings of the World Veterinary Poultry Association Congress, Bangkok, Thailand, 16–20 September 2019.
21. National Research Council. *Nutrient Requirements of Poultry: Ninth Revised Edition, 1994*; The National Academies Press: Washington, DC, USA, 1994; p. 176.
22. Mahgoub, H.A.; Bailey, M.; Kaiser, P. An overview of infectious bursal disease. *Arch. Virol.* **2012**, *157*, 2047–2057. [CrossRef]
23. Techera, C.; Tomas, G.; Panzera, Y.; Banda, A.; Perbolianachis, P.; Perez, R.; Marandino, A. Development of real-time PCR assays for single and simultaneous detection of infectious bursal disease virus and chicken anemia virus. *Mol. Cell. Probes* **2019**, *43*, 58–63. [CrossRef] [PubMed]
24. Watzinger, F.; Ebner, K.; Lion, T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Mol. Asp. Med.* **2006**, *27*, 254–298. [CrossRef] [PubMed]
25. Bülow, V.V.; Klases, A. Effects of avian viruses on cultured chicken bone-marrow-derived macrophages. *Avian Pathol.* **1983**, *12*, 179–198. [CrossRef] [PubMed]
26. 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. [CrossRef]
27. Jeurissen, S.H.; Janse, E.M.; Ekino, S.; Nieuwenhuis, P.; Koch, G.; De Boer, G.F. Monoclonal antibodies as probes for defining cellular subsets in the bone marrow, thymus, bursa of fabricius, and spleen of the chicken. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **1988**, *19*, 225–238. [CrossRef]
28. Paramithiotis, E.; Ratcliffe, M.J. Bursa-dependent subpopulations of peripheral B lymphocytes in chicken blood. *Eur. J. Immunol.* **1993**, *23*, 96–102. [CrossRef]
29. Al-Khalifa, H. Immunological techniques in avian studies. *World's Poult. Sci. J.* **2015**, *72*, 573–584. [CrossRef]
30. Bruni, C.; Giovenco, M.A.; Koch, G.; Strom, R. A dynamical model of humoral immune response. *Math. Biosci.* **1975**, *27*, 191–211. [CrossRef]
31. Nowak, M.A.; Bangham, C.R.M. Population Dynamics of Immune Responses to Persistent Viruses. *Science* **1996**, *272*, 74–79. [CrossRef]
32. Friedman, A.; Bar-shira, E.; Sklan, D. Ontogeny of gut associated immune competence in the chick. *World's Poult. Sci. J.* **2003**, *59*, 209–219. [CrossRef]
33. Smith, A.L.; Powers, C.; Beal, R. Chapter 11.1—The avian enteric immune system in health and disease. In *Avian Immunology*, 3rd ed.; Kaspers, B., Schat, K.A., Göbel, T.W., Vervelde, L., Eds.; Academic Press: Boston, MA, USA, 2022; pp. 303–326.
34. Hamal, K.R.; Burgess, S.C.; Pevzner, I.Y.; Erf, G.F. Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens. *Poult. Sci.* **2006**, *85*, 1364–1372. [CrossRef]

35. Kowalczyk, K.; Daiss, J.; Halpern, J.; Roth, T.F. Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken. *Immunology* **1985**, *54*, 755–762.
36. Jeurissen, S.H. Structure and function of the chicken spleen. *Res. Immunol.* **1991**, *142*, 352–355. [CrossRef]
37. John, J.L. The avian spleen: A neglected organ. *Q. Rev. Biol.* **1994**, *69*, 327–351. [CrossRef]
38. Nagy, Z.A.; Horvath, E.; Urban, Z. Antigen capture in chicken spleen during the primary immune response and relationship to phagocytic activity. *Nat. New Biol.* **1973**, *242*, 241–244. [CrossRef]
39. Scanes, C.G. Avian Physiology: Are Birds Simply Feathered Mammals? *Front. Physiol.* **2020**, *11*, 542466. [CrossRef]

**Zastrzeżenie/Nota wydawcy:** Oświadczenia, opinie i dane zawarte we wszystkich publikacjach pochodzą wyłącznie od poszczególnych autorów i współautorów, a nie od MDPI i/lub redaktora(ów). MDPI i/lub redaktorzy nie ponoszą odpowiedzialności za jakiegokolwiek szkody u osób lub na mieniu wynikające z pomysłów, metod, instrukcji lub produktów, o których mowa w treści.

## **AZWA PRODUKTU LECZNICZEGO WETERYNARYJNEGO**

hivax BD-1

### **KŁAD JAKOŚCIOWY I ILOŚCIOWY**

substancja czynna: Żywy, atenuowany, pośredni szczep M.B. wirusa zakaźnego zapalenia torby Fabrycjusza taków 10<sup>1,5</sup> do 10<sup>2,5</sup> EID<sub>50</sub> \*

substancje pomocnicze: Liofilizat: Laktoza jednowodna, Glutaminian sodu, Odtłuszczone mleko

ozpuszczalnik: Sodu chlorek, Potasu chlorek, Uwodniony chlorek wapnia, Mleczan sodu, Woda do wstrzykiwań EID<sub>50</sub> dawka zakaźna dla 50% jaj

### **OSTAĆ FARMACEUTYCZNA**

ezbarwny Liofilizat i rozpuszczalnik do sporządzania zawiesiny do wstrzykiwań dla kur

ozpuszczalnik i roztwór po odtworzeniu: bezbarwny

### **OCELOWE GATUNKI ZWIERZĄT**

ura (brojler, nioska, ptaki stad zarodowych lub hodowlanych)

### **/SKAZANIA LECZNICZE DLA POSZCZEGÓLNYCH DOCELOWYCH GATUNKÓW ZWIERZĄT**

zczepionka jest wskazana do czynnego uodparniania kurcząt, u których poziom przeciwciał matczynych jest wyższy niż 2500 jednostek ELISA, w celu zmniejszenia śmiertelności i nasilenia zmian chorobowych związanych z zakażeniem wirusem IBD

akładany początek odporności następuje w 21. dniu życia, w zależności od początkowego poziomu przeciwciał matczynych (odporność jest uzależniona od naturalnego spadku poziomu przeciwciał matczynych i związanego nim stopnia uwalniania wirusa szczepionkowego). Czas trwania odporności: 42 dni.

### **RZECIWSKAZANIA**

rak

### **PECJALNE OSTRZEŻENIA DLA KAŻDEGO Z DOCELOWYCH GATUNKÓW ZWIERZĄT**

rodki kurze w 18. dniu inkubacji:

iekcja metodą *in-ovo* musi być wykonana sprzętem przeznaczonym do wykonywania tego typu szczepienia. rządzenia wykorzystywane do rozpuszczania szczepionki, jak i do szczepienia powinny być sterylne i wolne od ickichkolwiek pozostałości chemicznych środków dezynfekcyjnych.

przetę powinien zapewniać bezpieczne i skuteczne podanie jednej dawki szczepionki (0,05-0,1 ml) ezpośrednio do owodni lub zarodka.

rzed każdą iniekcją *in-ovo* technikę szczepienia należy sprawdzić przez zastosowanie zabarwionego roztworu.

ależy ściśle przestrzegać zaleceń producenta sprzętu wykorzystywanego do szczepienia. Do czyszczenia rzętu należy stosować wyłącznie środki zatwierdzone przez wytwórcę. Zaleca się stosowanie igieł o astępujących parametrach: 0,4 – 0,8 mm średnicy, 25-28 mm długości oraz 3,5 – 5 bar (50 psi – 72 psi).

iskleta jednodniowe

o podskórnego podania szczepionki można wykorzystywać strzykawki automatyczne. Urządzenia ykorzystywane do rozpuszczania szczepionki, jak i do szczepienia powinny być sterylne i wolne od ickichkolwiek pozostałości chemicznych środków dezynfekcyjnych.

przetę powinien zapewniać bezpieczne i skuteczne podanie jednej dawki szczepionki (0,1 – 0,2 ml). Należy iśle przestrzegać zaleceń producenta sprzętu wykorzystywanego do szczepienia.

zczepionkę należy podawać pod skórę na karku jednodniowych kurcząt brojlerów. Pobieranie próbek do adania poziomu przeciwciał matczynych, jak również program szczepień należy zawsze skonsultować z ikarzem weterynarii.

### **PECJALNE ŚRODKI OSTROŻNOŚCI DOTYCZĄCE STOSOWANIA U ZWIERZĄT**

ptaków nieposiadających przeciwciał matczynych podanie szczepionki może spowodować znaczną mmunosupresję i uszkodzenie torby Fabrycjusza. Dlatego nie zaleca się szczepienia 18-dniowych zależonych jaj raz piskląt, pochodzących ze stad z mianami przeciwciał matczynych (u 1-dniowych piskląt) niższymi niż 2 500 est IDEXX-ELISA).

aleca się przeprowadzenie wstępnego badania w celu ustalenia poziomów przeciwciał matczynych u piskląt: ależy pobrać próbki od 20 jednodniowych piskląt pochodzących z tego samego stada hodowlanego w celu kreślenia ich statusu serologicznego w kierunku wirusa IBD. Wyniki badania próbek wskażą czy poziom rczyciał matczynych może osiągnąć u piskląt pochodzących z badanego stada oczekiwaną wartość rzynajmniej 2 500 jednostek ELISA w kolejnych 4 tygodniach. W zależności od uzyskanych wyników i czekiwań, badanie to może być powtarzane w różnych momentach okresu nieśności.

uwagi na fakt, że szczepionkę podaje się podskórnie u jednodniowych piskląt lub metodą *in-ovo* w przypadku 8-dniowych zależonych jaj, należy zachować szczególną ostrożność w celu uniknięcia zanieczyszczenia czepionki lub wykorzystywanego sprzętu w trakcie szczepienia.

/irus może się rozprzestrzeniać na ptaki nieszczepione przez kontakt.

by zapobiec rozprzestrzenianiu się wirusa, po szczepieniu należy odkazić zarówno sprzęt stosowany do zczepienia, jak i pomieszczenia wylęgarni.

iskłeta pochodzące z zaszczepionych jaj nie powinny być łączone z pisklętami pochodzącymi z jaj iaszczepionych. Analogicznie, nie należy łączyć zaszczepionych jednodniowych piskląt z pisklętami iaszczepionymi.

#### **PECJALNE ŚRODKI OSTROŻNOŚCI DLA OSÓB PODOJĄCYCH PRODUKT LECZNICZY WETERYNARYJNY WIETRZĘTOM**

W razie przypadkowej samoiniekcji tym produktem leczniczym weterynaryjnym, należy natychmiast zasięgnąć orady lekarskiej (nawet jeśli wstrzyknięta została niewielka ilość produktu).

o zakończeniu pracy z produktem leczniczym weterynaryjnym należy umyć i zdezynfekować ręce atwierdzonym środkiem do dezynfekcji.

#### **ZIAŁANIA NIEPORZĄDANE ( CZĘSTOTLIWOŚĆ I STOPIEŃ NASILENIA)**

padek ilości limfocytów w torbie Fabrycjusza jest bardzo częsty, osiągając maksymalne wartości w 28 dniu po zczepieniu metodą „*in ovo*” i w 21 dniu po podaniu podskórnym. Po tym okresie dochodzi do ponownego amnożenia limfocytów i regeneracji torby Fabrycjusza. Przejściowy spadek ilości limfocytów nie powodował ziałania immunosupresyjnego.

zęstotliwość występowania działań niepożądanych przedstawia się zgodnie z poniższą regułą:

bardzo często (więcej niż 1 na 10 leczonych zwierząt wykazujących działanie(a) niepożądane)

często (więcej niż 1, ale mniej niż 10 na 100 leczonych zwierząt)

niezbyt często (więcej niż 1, ale mniej niż 10 na 1000 leczonych zwierząt)

rzadko (więcej niż 1, ale mniej niż 10 na 10000 leczonych zwierząt)

bardzo rzadko (mniej niż 1 na 10000 leczonych zwierząt, włączając pojedyncze raporty).

#### **IKRES (-Y) KARENCCI**

ero dni.

#### **PECJALNE ŚRODKI OSTROŻNOŚCI DOTYCZĄCE USUWANIA NIEUŻYTEGO PRODUKTU LECZNICZEGO WETERYNARYJNEGO LUB POCHADZĄCYCH Z NIEGO ODPADÓW.**

iewykorzystany produkt leczniczy weterynaryjny lub jego odpady należy usunąć w sposób zgodny z bowiązującymi przepisami.

#### **IAZWA I ADRES PODMIOTU ODPOWIEDZIALNEGO**

hibro Animal Health (Poland) Sp. z o.o.

I. Towarowa 28

0-839 Warszawa, Polska

#### **IUMER(-Y) POZWOLENIA NA DOPUSZCZENIE DO OBROTU**

962/20

EK WYDAWANY Z PRZEPISU LEKARZA- Rp.

#### **ATA WYDANIA PIERWSZEGO POZWOLENIA NA DOPUSZCZENIE DO OBROTU / DATA PRZEDŁUŻENIA OZWOLENIA**

ata wydania pierwszego pozwolenia na dopuszczenie do obrotu: 16.03.2020.

## **AZWA PRODUKTU LECZNICZEGO WETERYNARYJNEGO**

ABIC M.B. tabletki musujące dla kur

### **KŁAD JAKOŚCIOWY I ILOŚCIOWY**

dawka szczepionki zawiera: szczep M.B. wirusa zakaźnego zapalenia torby Fabrycjusza ptaków - nie mniej niż  $10^{2,5}$  EID<sub>50</sub>.

### **kład jakościowy substancji pomocniczych**

odu dwuwęglan, Kwas cytrynowy bezwodny, Poliwidon, Magnezu stearynian

### **OSTAĆ FARMACEUTYCZNA**

abletka musująca.

### **OCELOWE GATUNKI ZWIERZĄT**

ura

### **/SKAZANIA LECZNICZE DLA POSZCZEGÓLNYCH DOCELOWYCH GATUNKÓW ZWIERZĄT**

zynne uodparnianie kurcząt przeciw zakaźnemu zapaleniu torby Fabrycjusza ptaków na terenach, dzie przeważa wirulentna postać choroby, a kurczęta mogą posiadać wysoki poziom przeciwciał natczynych.

ełna odporność wykształca się 2 tygodnie po szczepieniu

### **RZECIWSKAZANIA**

ie należy stosować później niż 3 tygodnie przed ubojem

### **PECJALNE OSTRZEŻENIA DLA KAŻDEGO Z DOCELOWYCH GATUNKÓW ZWIERZĄT**

zczepić należy wyłącznie ptaki zdrowe, nie narażone na czynniki stresowe, jak nadmierne stłoczenie, rzegrzanie, zimno lub nieodpowiednie żywienie.

ależy zwrócić szczególną uwagę na stosowanie odpowiednich dawek preparatu - z uwagi na brak zkodliwego działania szczepionki, podanie zbyt małej dawki jest bardziej niebezpieczne w skutkach niż :kkie przedawkowanie.

uwagi na niestabilność żywych szczepionek, należy unikać ekspozycji na światło słoneczne, wysoką mperaturę, detergenty oraz środki dezynfekcyjne.

ie używać tabletek z uszkodzonych części blistra.

ie podgrzewać wody zawierającej szczepionkę.

### **PECJALNE ŚRODKI OSTROŻNOŚCI DLA OSÓB PODAJĄCYCH PRODUKT LECZNICZY WETERYNARYJNY**

#### **WIETRZĘTOM**

rak.

### **ZIAŁANIA NIEPORZĄDANE ( CZĘSTOTLIWOŚĆ I STOPIEŃ NASILENIA)**

ie obserwowano.

### **IKRES (-Y) KARENCJI**

ero dni.

### **PECJALNE ŚRODKI OSTROŻNOŚCI DOTYCZĄCE USUWANIA NIEUŻYTEGO PRODUKTU LECZNICZEGO**

#### **/ETERYNARYJNEGO LUB POCHADZĄCYCH Z NIEGO ODPADÓW.**

iewykorzystany produkt leczniczy weterynaryjny lub jego odpady należy unieszkodliwić w sposób zgodny z obowiązującymi przepisami.

**NAZWA I ADRES PODMIOTU ODPOWIEDZIALNEGO**

Phibro Animal Health (Poland) Sp. z o.o.

ul. Towarowa 28

00-839 Warszawa, Polska

**NUMER(-Y) POZWOLENIA NA DOPUSZCZENIE DO OBROTU**

1701/06

**LEK WYDAWANY Z PRZEPISU LEKARZA- Rp.**

**DATA WYDANIA PIERWSZEGO POZWOLENIA NA DOPUSZCZENIE DO OBROTU / DATA PRZEDŁUŻENIA  
POZWOLENIA**

24.10.2006 / 19.10.2011





HEALTHY ANIMALS. HEALTHY FOOD. HEALTHY WORLD.®