

# Optimizacija uzgoja virusa sličnog varijantu 2 u svrhu razvoja cjepiva protiv ptičjeg infektivnog bronhitisa

---

Ćurčibašić, Valentina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:934593>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, lipanj 2020.

Valentina Ćurčibašić

1026/MB

**OPTIMIZACIJA UZGOJA VIRUSA  
SLIČNOG VARIJANTU 2 U SVRHU  
RAZVOJA CJEPIVA PROTIV  
PTIČJEG INFEKTIVNOG  
BRONHITISA**

Rad je izrađen u Laboratoriju Razvoja proizvoda – Biologija u Generi d.d. pod neposrednim voditeljstvom dr.sc. Leonide Kutle, te pod mentorstvom prof.dr.sc. Blaženke Kos iz Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

Prof.dr.sc. Jagoda Šušković, pročelnica Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i kolege iz tvrke Genera d.d. su temeljem ostvarene suradnje, omogućili izradu eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada u Generi d.d., u odjelu Razvoj, cjepiva zbog čega im se posebno zahvaljujem.

Zahvaljujem mentorici prof.dr.sc Blaženki Kos i dr.sc. Leonidi Kutle na stručnoj pomoći, savjetovanju i strpljenju prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem svim djelatnicima odjela Razvoj cjepiva na nesebičnoj pomoći, a posebnu zahvalu dugujem dr.sc. Leonidi Kutle, mag.ing.biotechn. Lani Ljuma Skupnjak, i dr.sc. Katarini Huić-Babić koje su mi pomogle pri izradi eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Zahvaljujem se prijateljima i kolegama koji su bili sve vrijeme uz mene, koji su sa mnom proživljavali sve moje ispite te mi olakšavali i uveseljavali studentsko razdoblje.

Za kraj, najveću zahvalu dugujem svojoj obitelji bez kojih sve ovo ne bi bilo moguće i koju su bili uz mene u svim dobrim i lošim trenucima.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Biotehnologija

### Optimizacija uzgoja virusa sličnog varijantu 2 u svrhu razvoja cjepiva protiv ptičjeg infektivnog bronhitisa

*Valentina Ćurčibašić, 1026/MB*

**Sažetak:** Ptičji infektivni bronhitis je bolest koja uzrokuje probleme u peradarskoj industriji diljem svijeta. Bolest napada respiratorni sustav pilića čime izaziva velike ekonomske gubitke u peradarskoj industriji. Uzročnik bolesti je virus infektivnog bronhitisa koji je podložan čestim mutacijama i genomskim rekombinacijama. Zbog širokog spektra različitih serotipova i genotipova virusa potrebno je razvijati nova cjepiva. Optimizacija uzgoja živog cjepiva, glavnog alata u kontroli širenja infektivnog bronhitisa, soja virusa sličnog varijantu 2, ispitana je metodom dizajna eksperimenta. U istraživanje su bila uključena tri različita čimbenika: starost embrija u SPF jajima, veličina inokuluma i trajanje inkubacije. Količina virusa izražava se kao logaritam recipročnog razrjeđenja doze koja izaziva 50% promjena na inficiranoj staničnoj kulturi. Zajednički učinak primijenjenog titra inokuluma i trajanja inkubacije je imao najveći utjecaj na postignuti titar virusa sličnog varijantu 2.

**Ključne riječi:** virus ptičjeg infektivnog bronhitisa, virus sličan varijantu 2, cjepivo, dizajn eksperimenta

**Rad sadrži:** 60 stranica, 21 slika, 11 tablica, 83 literaturna navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** *prof.dr.sc. Blaženka Kos*

**Pomoć pri izradi:** *dr.sc. Leonida Kutle i Lana Ljuma-Skupnjak, mag.ing.biotechn.*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof.dr.sc. *Jagoda Šušković*
2. prof.dr.sc. *Blaženka Kos*
3. dr.sc. *Anto Vrdoljak*, znan. sur.
4. izv.prof.dr.sc. *Igor Slivac* (zamjena)

**Datum obrane:** 01. srpanja 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Biochemical Engineering  
Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Cultures Technology

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

### Optimization of variant-2 like virus cultivation for the development of avian infectious bronchitis vaccine

*Valentina Ćurčibašić, 1026/MB*

**Abstract:** The avian infectious bronchitis is disease that causes problems in poultry industry. A disease affecting the respiratory system of chickens and is associated with huge economic losses in poultry industry. Avian infectious bronchitis is caused by infectious bronchitis virus with great ability for mutation and genomic recombination. Because of many different serotypes and genotypes of virus the development of new vaccines is necessary. Optimization of variant 2-like virus cultivation as live vaccine, the most important method for controlling infectious bronchitis, was performed by the experimental design methodology. The experiments were performed by studying the effects of three different factors: the age of the embryos, the initial inoculum and the duration of virus incubation. The amount of virus was expressed as the logarithm of reciprocal dose dilution causing 50% change of infected cells. The greatest effect on the variant 2-like virus titer was achieved by the combined effect of the inoculum titer and incubation time.

**Keywords:** avian infectious bronchitis virus, variant 2-like virus, vaccine, design of experiments

**Thesis contains:** 60 pages, 21 figures, 11 tables, 83 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** *PhD Blaženka Kos, Full professor*

**Technical support and assistance:** *PhD Leonida Kutle and PhD Lana Ljuma-Skupnjak*

**Reviewers:**

1. PhD. *Jagoda Šušković*, Full professor
2. PhD. *Blaženka Kos*, Full professor
3. PhD. *Anto Vrdoljak*, Scientific associate
4. PhD. *Igor Slivac*, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** 1 July 2020



# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
<b>2.1. PTIČJI INFEKTIVNI BRONHITIS</b> .....	2
2.1.1. Povijest.....	2
2.1.2. Klinička obilježja .....	2
2.1.3. Rasprostranjenost.....	4
<b>2.2. VIRUS INFEKTIVNOG BRONHITISA (IBV)</b> .....	5
2.2.1. Opće karakteristike .....	5
2.2.1.1. Koronavirusi .....	6
2.2.2. Organizacija genoma.....	7
2.2.2.1. Nestrukturni proteini.....	7
2.2.2.2. Strukturni proteini.....	8
2.2.3. Domaćini virusa .....	9
2.2.4. Evolucija virusa.....	9
2.2.5. Otkrivanje i identifikacija virusa infektivnog bronhitisa .....	11
2.2.6. Soj sličan varijantu 2.....	12
<b>2.3. IMUNITET I CJEPIVA</b> .....	14
2.3.1. Imunitet.....	14
2.3.2. Općenito o cjepivima .....	15
2.3.3. Proizvodnja cjepiva.....	15
2.3.4. Vrste virusnih cjepiva .....	16
2.3.4.1. Živa/atenuirana cjepiva .....	16
2.3.4.2. Neživa (inaktivirana) cjepiva.....	16
2.3.4.3. Podjedinična cjepiva .....	17
2.3.4.4. DNA cjepiva .....	17
2.3.4.5. Peptidna cjepiva .....	18
2.3.5. Cjepiva za virus infektivnog bronhitisa (IBV).....	19
<b>2.4. DIZAJN EKSPERIMENTA</b> .....	19
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	23
<b>3.1. KEMIKALIJE I OPREMA</b> .....	23
3.1.1. Kemikalije.....	23
3.1.2. Oprema.....	23

<b>3.2. METODE RADA</b> .....	24
3.2.1. Dizajn eksperimenta.....	24
3.2.2. Uzgoj virusa sličnog varijantu 2 .....	25
3.2.3. Žetva virusa kultiviranog u jajima .....	28
3.2.4. Priprema kulture stanica bubrega pilećih embrija.....	29
3.2.5. Određivanje broja kulture stanica bubrega pilećih embrija .....	30
3.2.6. Infekcija kulture stanica bubrega pilećih embrija .....	31
3.2.7. Određivanje titra virusa pomoću Reed-Münch-ove metode .....	32
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	35
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	52

# 1. UVOD

Virus infektivnog bronhitisa (IBV) je koronavirus uzročnik ptičjeg infektivnog bronhitisa. Najčešće napada piliće u kojima zahvaća respiratorni, reprodukcijski, probavni i mokraćni sustav. Zbog velikog broja serotipova virusa infektivnog bronhitisa, bolest se iz SAD-a proširila po cijelom svijetu. Identificirano je šest različitih virusnih genotipova IBV-a, a njihova distribucija i raznolikost ovisi o geografskom položaju (Valastro i sur., 2016). S pojavom bolesti 1931. godine povezuju se veliki ekonomski gubici u peradarskoj industriji zbog smanjenja ili gubitka proizvodnje jaja te visoke stope smrtnosti peradi (Bande i sur., 2015). Još jedna negativna strana bolesti je što se lako širi zrakom, izravnim dodiranjem kokoši na farmama te neposredno mehanički npr. kontaminacijom opreme za perad, materijala za pakiranje jaja, gnojiva, hrane, vode ili fekalija (Ignjatović i Sapats, 2000).

Najučinkovitiji način suzbijanja širenja infektivnog bronhitisa, pa tako i smanjivanje ekonomskih gubitaka, je primjena cjepiva. Većina se cjepiva za IBV temelji na živim, oslabljenim ili neživim virusima dobivenih iz klasičnih ili varijantnih serotipova. Neki sojevi IBV-a za koja postoje cjepiva mogu nestati zbog pojave novih varijanta pa je zbog toga potreban razvoj novih cjepiva (Meeusen i sur., 2007). Pojava novih varijanta virusa povezana je s mutacijama, rekombinacijama te virusnim selektivnim pritiskom zbog cijepljenja ili djelomično imunih ptica (Bande i sur., 2017).

Virus ptičjeg infektivnog bronhitisa soja sličnog varijantu 2 koji se još naziva genotipski GI-23 IBV genotip GI-23 kruži u zemljama Bliskog Istoka već skoro 20 godina. Ime je dobio po genetski sličnom varijantu 2, a kod pilića zaraženih virusom sličnom varijantu 2 uočeni su respiratorni i mokraćni problemi (Meir i sur., 2004).

Cilj ovog diplomskog rada je bio optimizirati uzgoj cjepiva protiv virusa ptičjeg infektivnog bronhitisa, sličnog varijantu 2 metodom dizajna eksperimenta. Stoga je bilo potrebno statističkom analizom pronaći optimum u kojem su postignuti najbolji rezultati. Ispitani su učinci triju čimbenika za koje je prethodno ustanovljeno da imaju najveći utjecaj na titar virusa sličnog varijantu 2 tijekom uzgoja koji se provodi u svrhu razvoja cjepiva protiv ptičjeg infektivnog bronhitisa.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. PTIČJI INFEKTIVNI BRONHITIS

#### 2.1.1. Povijest

Infektivni bronhitis je zarazna bolest koja se javlja u peradarskoj industriji diljem svijeta. 1931. godine u Sjevernoj Dakoti u Sjedinjenim Američkim Državama prvi put su opisani simptomi bolesti koja zahvaća mlade piliće, a najčešće napada respiratorni sustav (Schalk i Hawn, 1931). Bolest je odgovorna za velike ekonomske gubitke u peradarskoj industriji diljem svijeta zbog velikih varijacija u antigenima te je to potaknulo znanstvenike da više od pola stoljeća proučavaju virus infektivnog bronhitisa (IBV, eng. *infectious bronchitis virus*) (Cavanagh, 2007). Virus je prisutan diljem svijeta te je otkriven širok spektar različitih serotipova i genotipova virusa infektivnog bronhitisa (de Wit i sur., 2011).

#### 2.1.2. Klinička obilježja

Klinički slučajevi povezani su s respiratornim, reproduktivnim, probavnim i bubrežnim infekcijama domaće peradi i raznih drugih vrsta ptica (Cavanagh, 2005). Virus se razmnožava prvenstveno u respiratornom sustavu, ali i u epitelnim stanicama drugih organa (crijeva, bubrezi, jajovodi). Bolest se očituje kašljanjem, kihanjem, iscjetkom iz nosa, pukotinama u traheji, smanjenim unosom hrane, gubitkom na težini, natečenim sinusima, povećanim unosom vode, vlažnim izmetom i depresijom, a sve te simptome uzrokuje virus koji se replicira u gornjem respiratornom traktu te se širi na druge organe. Infekcija virusom u nekim slučajevima može naštetiti jajovodu što rezultira smanjenjem ili gubitkom proizvodnje jaja. Kod jata pilića u starosti od pet do šest tjedana smrtnost uzrokovana infektivnim bronhitisom je 20 do 30% (Ignjatović i sur., 2002; Seifi i sur., 2010). Smrtnost se može povećati ako je pilić izložen bakterijskim infekcijama uzrokovanim bakterijama kao što su *Escherichia coli*, *Ornithobacterium rhinotracheale* i *Bordetella avium* (Hopkins i Yoder, 1984; Matthijs i sur., 2003; Cavanagh i Gelb, 2008). Izloženost infektivnom virusu ne mora uvijek rezultirati smrću. Pilići se mogu brzo

oporaviti ako su inficirani blago virulentnim sojem te nisu izloženi bakterijskim infekcijama (Abro, 2013).

S obzirom na tkivo koje napada, viruse infektivnog bronhitisa (IBV) dijelimo na one koje napadaju respiratorni sustav i one koje ne napadaju respiratorni sustav (nefropatogeni). Klasični IBV, poput serotipa Massachusetts, inficira dišne puteve, dok nefropatogeni sojevi, sojeve koje uglavnom nalazimo u zemljama Azije i Bliskog Istoka, inficiraju najčešće bubrege, ali i druge organe. Tako npr. marokanski IBV-G inficira i oštećuje gastrointestinalni trakt, a QX IBV, nađen u Kini, a danas se proširio i do Europe i Afrike, uz infekciju bubrega inficira i reproduktivni sustav što u konačnici dovodi do velike smrtnosti (Bande i sur., 2017). Simptomi bronhitisa javljaju se 36 - 48 sati nakon izlaganja virusu (Bande i sur., 2017).

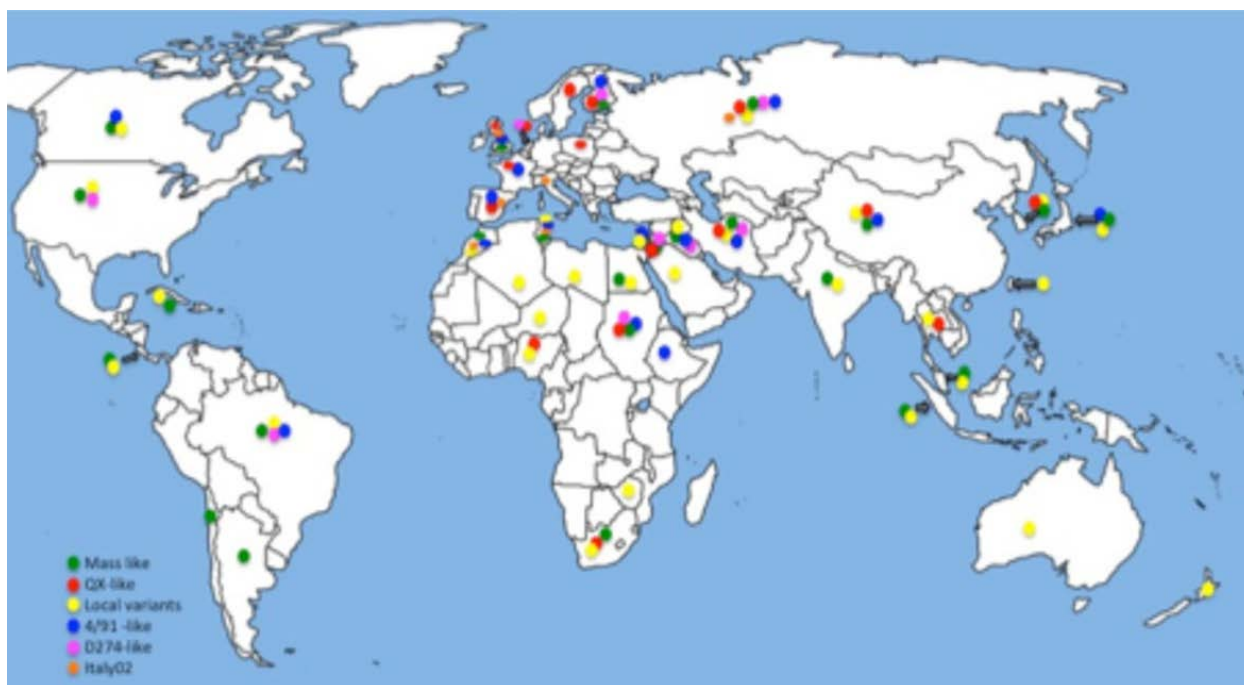
Bolest se prenosi zrakom, izravnim dodiranjem kokoši na farmama te neposredno mehaničkim širenjem npr. kontaminacija opreme za perad, materijala za pakiranje jaja, gnojiva, hrane, vode ili fekalija (Ignjatović i Sapats, 2000). Zaražene ptice izbacuju virus u okoliš i time kontaminiraju njegovo okruženje. U literaturi nema podataka o ljudskoj infekciji virusom ptičjeg infektivnog bronhitisa.



**Slika 1.** Prikaz mjesta napada i replikacije virusa infektivnog bronhitisa u kokoši (Cavanagh, 2005).

### 2.1.3. Rasprostranjenost

Identificirano je šest različitih virusnih genotipova IBV-a, a njihova distribucija i raznolikost ovisi o geografskom položaju (Valastro i sur., 2016). Globalne distribucije glavnih IBV serotipova, poput Mass-tip, 4/91, D274, QX-sličnih i Italija02, prikazane su na slici 1. Postoje serotipovi, kao što su QX iz Kine, Mass iz SAD-a, 4/91 iz Velike Britanije i H120 iz Nizozemske, koji imaju lokalne i regionalne utjecaje, ali imaju i mogućnost širenja na druge zemlje (de Wit i sur., 2012; Jackwood, 2012). Zbog toga cjepiva, koja se razvijaju kako bi spriječila i kontrolirala prijetnje koje uzrokuje virus, su najčešće bazirana na Mass/H120 soju koji se najviše proširio.



**Slika 2.** Distribucija IBV serotipa uključujući Massachusetts (potječe iz SAD-a); 4/91 i D274 (potječu iz Europe); QX slični serotipi (potječe iz Kine) i nekoliko lokalnih serotipova (Bande i sur. 2017).

Epidemiološke indikacije potvrdile su cirkulaciju nekoliko serotipova virusa u različitim dijelovima svijeta. U Europi se virus infektivnog bronhitisa prvi put pojavio početkom 1970. godine (Dawson i Gough, 1971). Europski serotipovi identificirani su u Velikoj Britaniji, Francuskoj, Belgiji, Italiji, Poljskoj i Španjolskoj (Bande i sur., 2017). U zapadnoj Europi

prevladavaju serotipovi 793B, Mass tip, H120, M41, IBM, Italija02 i varijanta koja je usko povezana s kineskim QX (Worthington i sur., 2008). IBV QX-sličan prvi put je izoliran u Europi 2004. godine, a zabilježeni su u Škotskoj, Italiji, Nizozemskoj, Poljskoj, Sloveniji, Španjolskoj, Velikoj Britaniji i Švedskoj te je u novije vrijeme postao najzahtjevniji IBV u Europi (Bende i sur., 2017).

## 2.2. VIRUS INFEKTIVNOG BRONHITISA (IBV)

### 2.2.1. Opće karakteristike

IBV pripada rodu *Coronavirus*, obitelji *Coronaviridae*, redu *Nidovirales*. Virus infektivnog bronhitisa s još nekim virusima pripada grupi 3 koronavirusa (Armesto i sur., 2009). Od pojave SARS koronavirusa u ljudi 2002. godine pojačala je zainteresiranost za koronavirusima u drugim vrstama, uključujući i ptice.

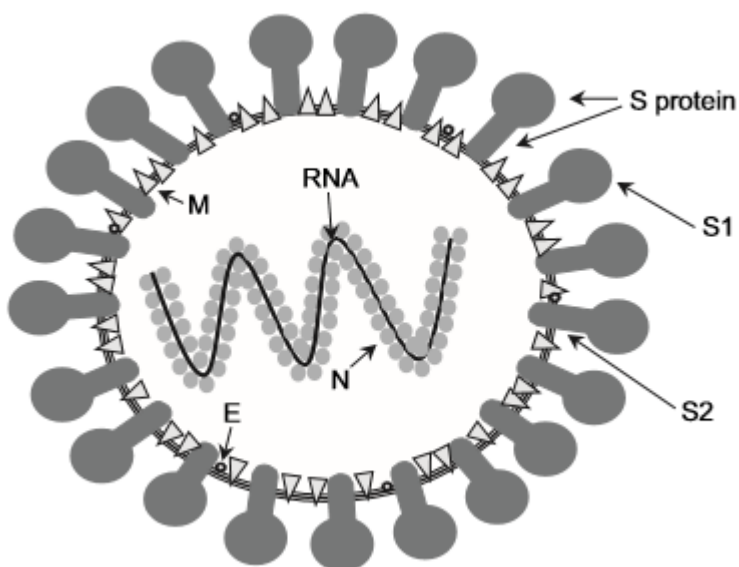
Virusi su nestanični entiteti, čestice na granici između žive i nežive prirode. Ne možemo ih smatrati živim bićima jer nemaju staničnu građu te nemaju sposobnost samostalnog disanja, prehrane i razmnožavanja. Ono što ih čini živima je prisutnost složenih organskih molekula (proteini i nukleinske kiseline) u građi virusnih čestica. Virusi se ne mogu samostalno razmnožavati, ali se mogu umnažati unutar stanica živih bića te ih zbog toga nazivamo parazitima. Izvan žive stanice virus će kristalizirati. Kristalizacija je proces karakterističan za rast minerala te ga to čini dijelom nežive prirode. Virusi pripadaju najmanjim biološkim objektima duljine 20 do 400 nm. Virus je građen od kapside, kapsomere, nukleokapside i vanjskog omotača. Jednolančana ili dvolančana DNA ili RNA obavijena je kapsidom (proteinski omotač). Kapsomera je proteinska jedinica koja tvori kapsidu, a kapsida i nukleinska kiselina zajedno tvore nukleokapsidu. Dodatni vanjski omotač je lipoproteinska ovojnica koja je promjenjiva oblika, nije čvrsta.

Virus infektivnog bronhitisa može preživjeti pri pH 6 do 7,3 (Cowen i Hitchner, 1975), a većina sojeva inaktivira se pri 46°C nakon 90 minuta izlaganja. Koronavirusi su virusi koji se repliciraju u citoplazmi domaćina te sadrže jednolančanu RNA molekulu. Genom dug 27,6 kb kodira za 4 strukturna proteina (šiljasti glikoproteini (S), proteini ovojnice (E), proteini membrane (M) i nukleokapsidni protein (N) koji su prikazani na slici 3) i nestrukturne proteine. Promjer

virusa iznosi oko 120 nm, glikoproteini za specifično vezanje na osjetljive stanice (eng. *S-proteins*, "*spike proteins*") koji strše na površini ovojnice virusa, veličine su 20 nm (Cavanagh i Gelb, 2008).

#### 2.2.1.1. Koronavirusi

Koronavirusi su raspoređeni u tri skupine, a IBV pripada trećoj skupini. U početku se ta podjela temeljila na antigenskim odnosima koja se kasnije potvrdila sekvenciranjem (Cavanagh, 2007). U trećoj skupini koronavirusa osim IBV-a nalaze se i koronavirus purana (TCoV), koronavirus fazana (PhCoV), koronavirus guske (GCov), koronavirus patke (DCoV) i koronavirus goluba (PiCoV).

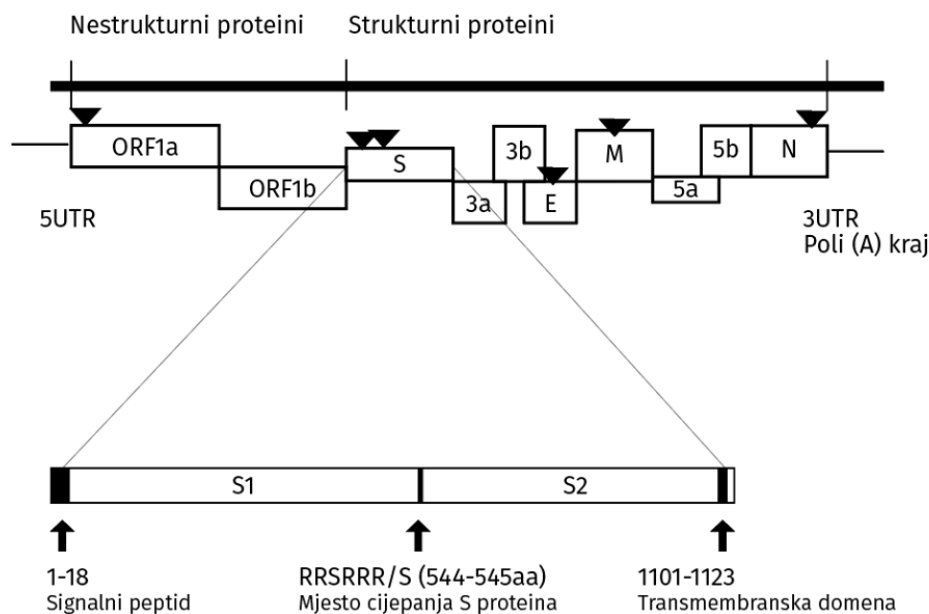


**Slika 3.** IBV okružen je lipidnom ovojnicom unutar koje se nalazi RNA genom dug 27,6 kb. N protein okružuju RNA, dok se 3 ostala proteina nalaze na ovojnici. E protein se nalazi samo u tragovima, dok se M protein pojavljuje u najvećem broju. S protein je veliki protein koji se nalazi na površini virusa (Cavanagh, 2005).



## 2.2.2. Organizacija genoma

Glavni dio genoma organiziran je kao dva otvorena okvira čitanja (ORF, eng. *open reading frames*) koja se preklapaju, ORF1a i ORF1b, koji kodiraju za dva velika poliproteina 1a i 1b. Preostali dio genoma sastoji se od područja koji kodiraju za strukturne proteine (S, E, M i N). Također u genomu se nalaze i dva pomoćna gena, ORF3 i ORF5, koji eksprimiraju dodatne proteine 3a i 3b te 5a i 5b (Pasternak i sur., 2006). Sve ovo opisano prikazano je na slici 4. Redoslijed strukturnih proteinskih gena unutar genoma jednak je za sve koronavirus.



**Slika 4.** Shematski prikaz organizacije genoma infektivnog virusa bronhitisa (Umar i sur., 2016).

### 2.2.2.1. Nestrukturni proteini

Dvije trećine genoma sastoji se od ORF1a i ORF1b koji kodiraju za poliproteine 1a i 1b. Ti poliproteini doprinose formiranju replikacijskog i transkripcijskog kompleksa (Imbert i sur., 2008). Nakon cijepanja, poliproteini stvaraju 15 nestrukturnih proteina (3C slična proteaza, papain proteaza, RNA ovisna polimeraza i drugi nestrukturni proteini) (van Hemert i sur., 2008).

#### 2.2.2.2. Strukturni proteini

Glikoproteini za specifično vezanje na osjetljive stanice (eng. *S-proteins*, "*spike proteins*") koji strše na površini ovojnice svih koronavirusa sadrže četiri domene koje su uključene u smještanje S proteina u lipidni dvosloj virusa. IBV S gen sastoji se od 1162 aminokiseline i podijeljen je na dvije podjedinice, N-terminalnu S1 podjedinicu (535 aminokiselina) i C-terminalnu S2 podjedinicu (627 aminokiselina). S1 podjedinica sadrži serotip specifični antigen (epitop) koji je odgovoran za vezanje na stanicu domaćina, neutralizaciju antitijela i imunološki odgovor (Abro, 2013), dok S2 podjedinica omogućuje fuziju virusa (Belouzard, 2012) i oligomerizaciju proteina te ulazak proteina u osjetljive stanice domaćina. Pričvršćivanjem virusa uz pomoć S proteina na stanicu domaćina dolazi do oslobođenja RNA molekule u citoplazmu domaćina gdje se onda odvija replikacija te RNA molekule. Velike promjene u slijedu nukleotida sekvence S-proteina mogu promijeniti zaštitnu sposobnost cjepiva (Cavanagh i Gelb, 2008).

Ekspresijom gena 3 nastaju dva proteina, protein 3a i 3b. Gen 3 sastoji se od dva ORF-a (ORF3a i ORF3b) koji sadrže visoko očuvane regije nukleotidnih sljedova (Mo i sur., 2012). Uloga proteina još nije otkrivena, ali smatra se da doprinose virulenciji virusa (Shen i sur., 2003).

Proteini ovojnice (E) su mali integralni proteini membrane povezani s ovojnicom virusa. Dokazano je da su proteini ovojnice ključni za nakupljanje i fuziju virusa te mutacije u proteinima ovojnice mogu značajno utjecati na nakupljanje virusa u stanicama domaćina (Fischer i sur., 1998; Maeda i sur., 1999).

Membranski protein (M) je protein koji se nalazi u lipidnom dvosloju te održava strukturni integritet virusa. Membranski proteini odgovorni su za organizaciju i fuziju virusa interakcijom s drugim strukturnim proteinima (Hogue i Machamer, 2008). Membranski protein je glikoliziran u N-terminalnoj regiji pomoću N-veznih oligosaharidnih molekula, a uloga glikolizacije M proteina još nije jasna.

Gen 5 kodira za dva proteina 5a i 5b, a sastoji se od dva ORF-a (ORF5a i ORF5b). Njihova uloga nije otkrivena, ali kao i kod 3a i 3b proteina vjeruje se da doprinosi virulentnosti virusa (Casais i sur., 2005) te nemaju ulogu pri replikaciji RNA molekule.

Nukleokapsidni protein (N) sastoji se od 409 aminokiselina te je uključen u različite funkcije kao što su pakiranje virusa, stvaranje virusne jezgre, transdukcija signala i modulacija procesa u stanicama domaćina (He i sur., 2004; You i sur., 2007). N protein se funkcionalno veže za genomsku RNA stvarajući spiralni ribonukleoproteinski kompleks (RNPC) pomažući tako pri replikaciji, transkripciji, translaciji i pakiranju virusnog genoma tijekom procesa replikacije (Jayaram i sur., 2005).

### 2.2.3. Domaćini virusa

IBV inficira širok spektar ptičjih vrsta kao npr. kokoši, guske, golubove, patke, paunove, jarebice, tela i zamorce (Cavanagh, 2007), ali za prirodne domaćine smatraju se kokoš i fazan (Cavanagh i sur., 1988). Zabilježeni su i izolati IBV-a kod prepelica, pingvina i zamoraca (Liais i sur., 2014). Osjetljivost domaćina na sojeve virusa ovisi o više čimbenika, a to su dob domaćina, genetika domaćina i/ili okolišni stres.

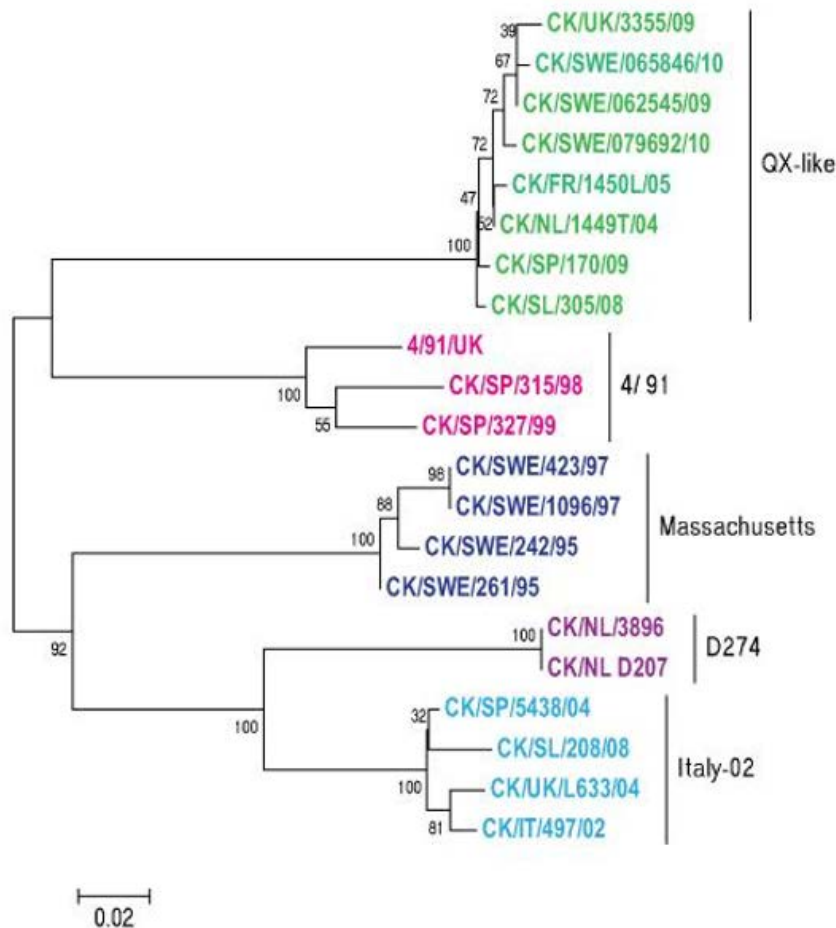
### 2.2.4. Evolucija virusa

Genske promjene poput mutacija, rekombinacija i selektivnog pritiska igraju značajnu ulogu u evoluciji virusnog genoma (Liu i sur., 2007). Rekombinacija se obično događa između dva ili više virusa koji inficiraju istu stanicu, a to su najčešće IBV i drugi koronavirusi (Jackwood i sur., 2012). Mutacije i selektivni pritisak u hipervarijabilnim regijama gena omogućuju virusu da se prilagodi na novu vrstu domaćina, što doprinosi evoluciji virusa (Liu i sur., 2007).

IBV serotipovi se razlikuju otprilike 20 do 25% u njihovim S1 glikoproteinskim sekvencama, nekad te razlike mogu doseći i 50% (Bande i sur., 2017), a promjena od samo 5% može dovesti do promjene u serotipovima (Bende i sur., 2015). Kao i kod većine RNA virusa, pa tako i kod IBV-a, promjene na virusnom genomu dovode do nastanka različitih genotipova koji onda na različite načine djeluju na domaćina (različiti ishodi infekcije) (Jia i sur., 1995; Lim i sur., 2011; Jackwood i sur., 2012). Još uvijek nije jasno kako se razvijaju koronavirusi, osobito IBV, ali može se reći da na nastanak novih genotipova/serotipova koronavirusa utječu sljedeće tri stvari: a) nukleotidne mutacije (delecija, insercije, točkaste mutacije), b) RNA rekombinacija *in vitro* i *in*

*vivo* i c) virusni selektivni pritisak zbog cijepljenja ili djelomično imunih ptica (Bande i sur., 2017). *In vitro* rekombinacija odvija se pod strogim laboratorijskim uvjetima, dok se *in vivo* rekombinacija ne može kontrolirati. Za *in vivo* rekombinaciju znamo da je stopa učestalosti visoka odnosno pet od osam ispitanih uzoraka IBV-a pokazuje mogućnost rekombinacije (Kusters i sur., 1990). Promjene u redosljed u S1 sekvenci moguće su i tijekom adaptacije virusa u Vero stanicama ili nakon nekoliko pasaža u pilećim embrijima tijekom razvoja cjepiva.

Veliki broj IBV serotipova identificiran je i prijavljen širom svijeta kao npr. Arkansas, Connecticut (Conn), Massachusetts (Mass), 4/91 ili 793B, D274, H120, Italija02, QX. Serotipizacija sojeva IBV-a obično se provodi pomoću sustava temeljenog na infekciji kokoši IBV-om sa serotip specifičnim epitopom. Danas je serotipizacija IBV-a sve rjeđa zbog pojave velikog broja inačica IBV-a, a za serotipizaciju je potrebno protutijelo specifično za serotip što nije lako dobiti (de Wit i sur., 2011). Zbog toga se u posljednje vrijeme tipizacija virusa provodi molekularnim metodama pomoću kojih je moguće identificirati mnoge vrste virusa. Genotipizacija IBV-a provodi se umnožavanjem visoko varijabilne regije sekvence S1 lančanom reakcijom polimeraze (RT - PCR) nakon čega slijedi sekvenciranje (de Wit, 2000).



**Slika 5.** Filogenetičko stablo, dobiveno usporednim analizama S1 sekvence S gena sojeva iz različitih zemalja, prikazuje evoluciju IBV genotipova u Europi (Abro, 2013).

### 2.2.5. Otkrivanje i identifikacija virusa infektivnog bronhitisa

Zbog stalne evolucije neprestano se pojavljuju nove varijante IBV-a po cijelom svijetu te ih je zbog toga bitno moći otkriti i identificirati pomoću raznih metoda. Najčešći testovi za rutinsku dijagnozu su izolacija virusa, inhibicija hemaglutinacije (HI, eng. *hemagglutination inhibition*), imuno-enzimska (ELISA, eng. *Enzyme Linked Imunosorbent Assay*) metoda, test imunoperoksidaze (IPA, eng. *immunoperoxidase assay*), test neutralizacije virusa (VNT, eng. *virus neutralisation test*), test imunofluorescencije (IFA, eng. *immunofluorescence assay*), test precipitacije u agaru (AGPT, eng. *agar gel precipitation test*) i RT-PCR (eng. *reverse*

*transcription polymerase chain reaction*) (de Wit, 2000). Većina konvencionalnih dijagnostičkih ispitivanja su dugotrajna, skupa te daju relativno nisku specifičnost i osjetljivost (Abro, 2013). U veterinarskoj medicini razrađeni su različiti testovi primjenom PCR u stvarnom vremenu (eng. *real-time PCR*) za dijagnozu različitih zaraznih patogena pa tako i za specifično otkrivanje IBV-a. Real time RT-PCR je vrlo osjetljiva metoda i može se primijeniti za brzo otkrivanje i identificiranje IBV-a. Tipizacija virusa temelji se na usporednoj analizi nukleotidnih sljedova varijabilnog S gena.

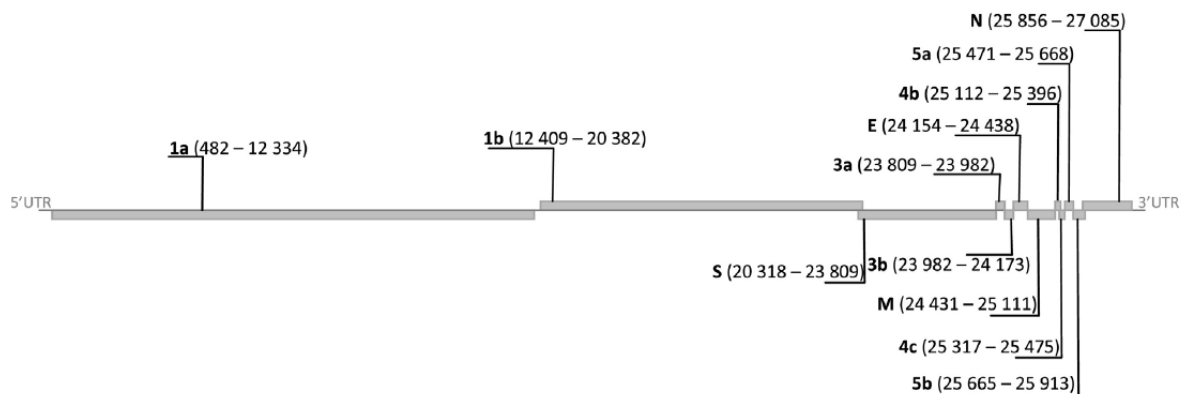
IBV se najuspješnije izolira iz sluznice traheje i pluća nekoliko dana do jednog tjedna nakon infekcije domaćina. RT-PCR se sve više koristi za identificiranje S-glikoproteina genotipova nađenih na terenu. Genotipizacija upotrebom početnica specifičnih za S1 podjedinicu S gena ili sekvenciranje S gena općenito daje slične, ali ne uvijek identične rezultate kao HI ili VNT serotipizacija (OIE, 2008). Serotip se može odrediti upotrebom HI i VNT metode uz odgovarajući antiserum. Komercijalni ELISA testovi se koriste za praćenje odgovora antitijela u serumu. Antigeni koji se koriste u komercijalno dostupnim testovima imaju široki raspon reakcija na različite serotipove.

#### 2.2.6. Soj sličan varijantu 2

Virus ptičjeg infektivnog bronhitisa soj sličan varijantu 2 koji se još naziva genotipski GI-23 IBV genotip GI-23 kruži u zemljama Bliskog Istoka već skoro 20 godina, a prvi put je identificiran u Izraelu 1998. godine, samo dvije godine nakon pojave prve epidemije IBV-a uzrokovane sojem Varijant 1 (Callison i sur., 2001). Kod pilića kod kojih su uočeni respiratorni i mokraćni problemi pronađen je soj genetski sličan Varijantu 2 pa je nazvan sličan varijantu 2 (Meir i sur., 2004). Tijekom godina broj slučajeva uzrokovan sojem sličnim varijantu 2 se smanjivao sve do 2006. godine kada je nastupio drugi val epidemije (Lisowska i sur., 2017). 2010. godine izraelska peradarska industrija počela je primjenjivati novo cjepivo protiv soja sličnog varijantu 2 zbog velikih ekonomskih gubitaka (Even-Chen i sur., 2014). Neke zemlje Bliskog Istoka, kako bi smanjile problem uzrokovan genotipom GI-23, upotrebljavale su cjepiva protiv serotipa H120 (Selim i sur., 2013). Soj sličan varijantu 2 brzo se proširio na druge zemlje Bliskog Istoka, 2009. godine pojavio se u Jordanu i na sjeveru Iraka (Seger i sur., 2016). Molekularno praćenje sojeva

IBV-a koji cirkuliraju Iranom pokazalo je da je 17,2 % kliničkih slučajeva uzrokovano sojem sličnim varijantu 2 (Hosseini i sur., 2015). U 2011. i 2012. godini soj sličan varijantu 2 identificiran je i u Egiptu, Turskoj i Libiji (Yilmaz i sur., 2016; Zanyat i sur., 2016). Kasnije je prisustvo soja otkriveno i u Saudijskoj Arabiji, Kuvajtu, Bahreinu, Armeniji, a od 2015. godine i u Rusiji, Litvi, Poljskoj i Ukrajini (Lisowska i sur., 2017). Intenzivna međunarodna trgovina, nekontrolirano kretanje ljudi i životinja preko granica zemalja Bliskog Istoka mogući su uzroci širenja genotipa GI-23 (Hussein i sur., 2014). Soj sličan varijantu 2 je nefropatogen odnosno osim što napada dišni sustav napada i bubrege i jajovod što rezultira smanjenom proizvodnjom jaja (Selim i sur., 2013).

Genom je organiziran kao i kod svih koronavirusa (slika 6). Sastoji se od dijela koji kodira za nestrukturane proteine 1a i 1b te dijela koji kodira za strukturne proteine S, E, M, N, 3a, 3b, 5a i 5b.



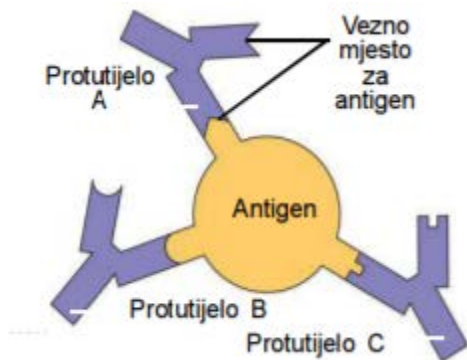
**Slika 6.** Organizacija genoma soja sličnog varijantu 2 (Lisowska i sur., 2017).

## 2.3. IMUNITET I CJEPIVA

### 2.3.1. Imunitet

Svrha cijepljenja je stvaranje imunosti osnovane na postojanju odgovarajućeg titra protutijela i populacije aktiviranih stanica, koje se mogu brzo umnožiti nakon ponovnog dodira s antigenom koji se unio cijepljenjem. Imunitet dijelimo na prirođeni i stečeni (adaptivni). Prirođeni imunitet dijeli se na vanjsku obranu (koža, sekreti i mukozne membrane) i unutrašnju obranu (fagocitne stanice, antimikrobni protein, upalne reakcije, stanice prirodene ubojice). Adaptivni imunitet dijeli se na humoralni i stanično posredovani imunitet. Humoralni imunitet je posredovan protutijelima koje proizvode B limfociti te je osnovni obrambeni mehanizam organizma protiv patogena i njihovih toksina pri čemu se izlučena protutijela vežu na njih i sudjeluju u njihovom uklanjanju. Stanično posredovani imunitet je obrana organizma od patogena djelovanjem T stanica koje: a) aktiviraju makrofage koji fagocitiraju patogenom inficiranu stanicu, b) izravno uništavaju inficiranu stanicu i c) oslobađaju citokine koji uništavaju inficiranu stanicu (Andreis i sur., 2010).

Antigeni su proteinske ili polisaharidne molekule koje se nalaze na površini virusa, bakterija i drugih organizama ili su slobodne molekule. Svaki antigen ima ograničene dijelove koji se nazivaju epitopi i svaki epitop veže specifičnu molekulu protutijela (slika 7).



**Slika 7.** Prikaz vezanja protutijela i antigena preko epitopa (Anonymous, 2001).



### 2.3.2. Općenito o cjepivima

Aktivna imunizacija, cijepljenje, je unošenje živih, oslabljenih ili inaktiviranih (mrtvih) uzročnika zarazne bolesti ili njihovih izlučevina u organizam čovjeka ili životinja radi stvaranja specifične otpornosti na određene zarazne bolesti (Medicinski leksikon, 1992). Vrste virusnih cjepiva možemo podijeliti na 4 skupine: a) živa atenuirana cjepiva, b) neživa/inaktivirana cjepiva, c) podjedinična cjepiva i d) cjepiva na bazi nukleinskih kiselina.

### 2.3.3. Proizvodnja cjepiva

Proizvodnja cjepiva obuhvaća 3 osnovne faze: 1. uzgoj virusa, 2. postupke pročišćavanja proizvoda i 3. formulaciju proizvoda. Za uzgoj virusa zahtijeva se prisutnost supstrata odnosno živog domaćina da bi se mogao replicirati, a mogući supstrati su tkivo životinje, pileći embriji i stanične kulture. Kod *in vivo* uzgoja virusa antigen se inokulira u organ životinje i nakon inkubacije uzima se inficirani organ. Kod uzgoja virusa u pilećem embriju, virus se inokulira u alantoisnu vrećicu 9 do 11 dana starih pilećih embrija. Jaja se onda inkubiraju 2 do 3 dana, prosvjetljuju se da se provjeri je li embrij živ i je li došlo do kontaminacije virusom. Nakon toga slijedi sakupljanje alantoinsne tekućine, pročišćavanja i oblikovanja cjepiva. Kod proizvodnje virusnih čestica u kulturama životinjskih stanica dolazi do usmjeravanja staničnih funkcija k proizvodnji virusnih čestica koja se odvija nakon infekcije kulture virusom. Nema proizvodnje stanične biomase, već samo virusnih čestica te nutritivni i metabolički uvjeti se razlikuju od faze rasta stanične kulture. Stanična kultura mora biti osjetljiva na određeni virus kako bi se taj virus mogao umnažati u vrlo visokim koncentracijama (Leland i Ginocchio, 2007).

## 2.3.4. Vrste virusnih cjepiva

### 2.3.4.1. Živa/atenuirana cjepiva

Dobivaju se od virusa koji se umnožavaju u stanicima, ali je genetički izmijenjen odnosno atenuiran tako da ne izaziva bolest. Virus posjeduje proteine (antigene) koji izazivaju imunološki odgovor koji štiti organizam od bolesti izazvane patogenim virusom. Prednosti primjene živih cjepiva su: a) jednokratna doza je dovoljna da izazove dugotrajan imunitet, b) osiguravaju veću količinu antigena koji se u organizmu može umnažati, c) duže vrijeme izlaganje imunološkog sustava antigenu i d) jeftina proizvodnja. Nedostaci su da ponekad virusi mogu revertirati ili mutirati u oblike koje izazivaju bolest te se tako širiti te zahtijevaju čuvanje u hladnjaku kako bi se zadržala aktivnost cjepiva (Bande i sur., 2015).

Živa atenuirana IB cjepiva su prva generacija cjepiva protiv IBV-a koja se koriste za kontrolu infekcije na terenima. Cjepiva su komercijalno dostupna za primjenu putem vode za piće ili kao sprejevi koji se primjenjuju na pilićima starim od jednog dana do tjedan dana. Pojačano cijepljenje provodi se s istim cjepivom ili u kombinaciji s drugim sojevima 2 do 3 tjedna nakon prvog cijepjenja (Cavanagh, 2003). Komercijalno dostupna cjepiva potječu od različitih serotipova, npr. M41 i H25 (Sasipreeyajsan i sur., 2012), ali među zemljama postoje varijacije u tipu cjepiva protiv IBV-a zbog različitosti sojeva koje prevladavaju u pojedinim regijama. Iz logističkih i ekonomskih razloga živa atenuirana cjepiva kombiniraju se s drugim virusnim cjepivima kao npr. cjepivo protiv Newcastleške bolesti i Marekove bolesti (Bande i sur., 2015). Primjeri nekih komercijalno dostupnih cjepiva: Nobilis IB-Ma5 (MSD Animal Health, UK) dobiven iz Mass serotipa, AviPro IB H120 (Lohmann Animal Health, Germany), Nobilis IB 4-91 (MSD Animal Health, UK), Gallivac CR88 (Merial, USA) i POULVAC IB QX (Pfizer, France).

### 2.3.4.2. Neživa (inaktivirana) cjepiva

Patogeni virus se kao i kod živih cjepiva uzgaja na živim supstratima i uzrokuje bolest, ali se na kraju procesa kemijski inaktivira. Prednost primjene inaktiviranih cjepiva je to što antigen ne može mutirati ili revertirati u oblik koji može dovesti do pojave simptoma bolesti. Nedostaci su to što se virus ne može umnažati u organizmu pa je jačina imunološkog odgovora ograničena,

zahtijevaju primjenu većeg broja doza kako bi se postigla razina zaštitnog imuniteta i vrlo su visoki troškovi proizvodnje.

Inaktivirana ili neživa cjepiva mogu se upotrebljavati kao pojedinačna ili u kombinaciji sa živim atenuiranim cjepivima (Finney i sur., 1990). Inaktivirana cjepiva najčešće se primjenjuju ubrizgavanjem kod pilića starih 13 do 18 tjedana. Može se zaključiti da primjena inaktiviranih cjepiva nije praktična u peradarskoj industriji iz više razloga, kao npr. ako nisu u kombinaciji sa živim atenuiranim cjepivom izazivaju manji imunološki odgovor, potrebna je velika doza i/ili višekratno cijepljenje te sami način primjene injektiranjem nije praktičan u velikim peradarskim farmama (Bande i sur., 2015).

#### 2.3.4.3. Podjedinična cjepiva

Podjedinična cjepiva su cjepiva koja sadrže proteinske fragmente virusa bitnih za stvaranje imuniteta, a ne cijele čestice virusa odnosno dolazi do uklanjanja DNA ili RNA molekule. Prednost primjene ovih cjepiva je da ne sadrže dijelove antigena koji mogu izazvati neželjene reakcije. Rekombinantno cjepivo je podjedinično cjepivo dobiveno tehnologijom rDNA pomoću ekspresijskih sustava (bakterije, kvasci i stanice kukaca). Rekombinantna cjepiva još uvijek nisu našla veliku primjenu u kontroli infekcija virusom infektivnog bronhitisa, ali njihov potencijal je sve veći te ga znanstvenici sve više prepoznaju. Rekombinantna cjepiva koja se nalaze u eksperimentalnim fazama razvoja su DNA cjepiva i peptidna cjepiva (Bande i sur., 2015).

#### 2.3.4.4. DNA cjepiva

Cjepiva na osnovi nukleinskih kiselina sadrže plazmidne DNA vektore (rjeđe RNA) koji kodiraju za antigen ili antigene od interesa. Nakon unosa plazmida, antigen se eksprimira *in situ* i dolazi do stvaranja specifičnog imunološkog odgovora. Prednosti primjene DNA cjepiva su da se plazmidi lako proizvode u velikim količinama, DNA je stabilna i podnosi visoke temperature tako da su čuvanje i transport cjepiva olakšani, lako se može odgovoriti na promjene infektivnog agensa budući da se DNA sekvenca može dobiti u laboratorijskim uvjetima, mogu se koristiti smjese plazmida koje kodiraju brojne proteinske fragmente jednog ili više virusa pa se može proizvesti

širok spektar cjepiva te nemaju proteinsku komponentu pa nema imunogenih reakcija. Nedostaci primjene su mogućnost ugradnje plazmida u genom primatelja (mutageneza), stvaranje autoimunog odgovora (patogena anti DNA-protutijela), stvaranje imunološke tolerancije (ekspresija antigena kod domaćina može dovesti do nespecifičnog ne-odgovora na taj antigen).

Do nedavno nije bilo komercijalno dostupnog DNA cjepiva u peradarskoj industriji, ali to se u zadnje vrijeme mijenja jer su znanstvenici sve više zainteresirani za proizvodnju takvog tipa cjepiva što nam pokazuje podatak da se nekoliko proizvoda nalazi u eksperimentalnom stadiju razvoja kao npr. pDKArkS-DP cjepivo bazirano na genu S1 serotipa Arkansas (Liu, 2011). DNA cjepiva se primjenjuju injektiranjem što dovodi do limitacije primjene cjepiva u velikim peradarskim industrijama. Problem bi se mogao riješiti tako da se cjepivo daje putem vode za piće ili u obliku spreja (Bande i sur., 2015).

#### *2.3.4.5. Peptidna cjepiva*

Proizvodnja peptidnih cjepiva je temeljena na izravnoj kemijskoj sintezi peptidne sekvence. Cjepiva sadrže peptide (imunogene epitope) koji mogu izazvati jak imunološki odgovor kad se unose u organizam pomoću nosača ili adjuvansa jer ako se unese samo peptid onda ne dolazi do značajnog imunološkog odgovora budući da se brzo izlučuje iz organizma.

Peptidna cjepiva koja se nalaze u eksperimentalnom stadiju razvoja pokazuju obećavajuću ulogu u kontroli i borbi protiv IBV-a. Nekoliko istraživanja fokusirana su na razvijanju peptidnih cjepiva s većim brojem epitopa za primjenu protiv različitih serotipova virusa diljem svijeta (Bande i sur., 2015). Yang i sur. (2009) su razvili IBV cjepivo bazirano na velikom broju epitopa iz S1 i N gena. Analize ekspresije i imunizacije pokazale su da sintetički dizajnirani peptidi izazivaju imunološki odgovor koji štiti organizam od virusa u 80% slučajeva (Bende i sur., 2015).

### 2.3.5. Cjepiva za virus infektivnog bronhitisa (IBV)

Infektivni bronhitis se kontrolira primjenom živih atenuiranih cjepiva koja se dobivaju od virulentnih virusa koja su oslabljena višestrukim serijskim pasažama (najčešće 50 pasaža). Pasaže odnosno oslabljivanje virusa provodi se na embrijima pilića starih otprilike od 10 do 11 dana (Armesto i sur., 2009). Kao posljedica ovog procesa virus postaje prilagođeniji embriju, što se očituje učinkovitijom replikacijom i većom patogenošću virusa prema embriju.

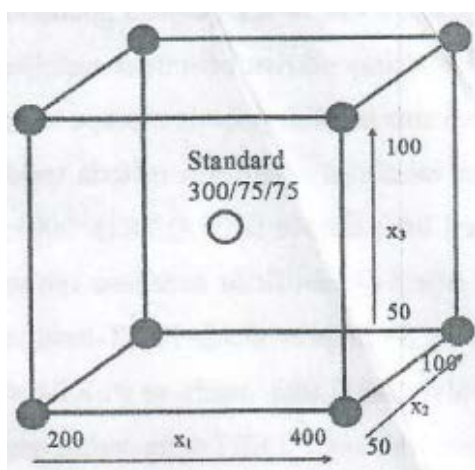
Cijepljenje je glavni alat u kontroli IBV infekcija. Međutim, ovaj pristup je izazvao nastajanje novih IBV serotipova (danas više od 50 varijanti). Neki sojevi IBV-a za koja postoje cjepiva mogu nestati zbog pojave novih varijanta pa je zbog toga potreban razvoj novih cjepiva. Većina se cjepiva za IBV temelji na živim, oslabljenim ili neživim virusima dobivenih iz klasičnih ili varijantnih serotipova. Takva cjepiva razvijena su iz sojeva koja potječu iz SAD-a kao što su M41, Ma5, Ark, Conn i Nizozemske kao što su H52 i H120, ali i iz nekih sojeva koji potječu iz Europe (793/B, CR88, iD274) (Bande i sur., 2015). Svjetska organizacija za zdravlje životinja (OIE, eng. *World Organisation for Animal Health*) preporučuje da distribucija IBV serotipova u svakoj geografskoj regiji treba utjecati na izbor cjepiva. Nedavno su se pojavile kineske varijante QX-a koje izazivaju epidemije u Europi, Aziji, Bliskom Istoku i Africi i time pokazujući pomak u geografskoj distribuciji (Bande i sur., 2015).

## 2.4. DIZAJN EKSPERIMENTA

Dizajn eksperimenta (DoE, eng. *design of experiments*) pojam je koji obuhvaća planiranje, projektiranje i analizu eksperimenta potrebne za donošenje važećih i općenitih zaključaka na djelotvoran i učinkovit način (Montgomery i Rugner, 2003b). Koristi se za razvoj novih proizvoda ili procesa te za njihovo unaprjeđenje ili ispitivanje otpornosti te u pronalaženju parametara koji su značajni za neki proizvod ili proces (Markušić i sur., 2013). Cilj dizajna eksperimenta je pronaći optimum u kojem je postignuta najbolja moguća kvaliteta s najmanjim troškovima.

Dizajn eksperimenta se provodi tako da se istovremeno ispituju svi parametri za koje se smatra da imaju utjecaj na proizvod ili proces. Mora se odrediti neka standardna operativna vrijednost oko koje se onda provode niz eksperimenata kao što je prikazano na slici 8. Na primjer,

određeno je da se ispituje tri parametra ( $X_1$ ,  $X_2$  i  $X_3$ ) kojima se pridaje neka standardna vrijednost. Prvi parametar  $X_1$  ima standardnu vrijednost 300, te drugi  $X_2$  i treći parametar  $X_3$  standardnu vrijednost 75. Na kocki je vidljivo kako svaki parametar varira sustavno oko centralne vrijednosti što znači da se  $X_1$  još ispituje na vrijednostima 200 i 400, a  $X_2$  i  $X_3$  na vrijednostima 50 i 100. Na kraju se izračuna koji operativni parametar ima kakav utjecaj na proizvod ili proces (Eriksson i sur., 2000).



**Slika 8.** Princip dizajna eksperimenta (Eriksson i sur., 2000).

Glavni cilj dizajna eksperimenata je utvrditi varijable koje imaju utjecaj na rezultat, utvrditi optimalne vrijednosti svih važnih čimbenika  $X$  kako bi uvijek davale približno istu vrijednost rezultata  $Y$  te utvrditi optimalne vrijednosti svih važnih čimbenika  $X$  kako bi varijacija između rezultata  $Y$  bila mala (Anderson i Withcomb, 2015).

Čimbenici su procesni ulazni parametri koji se ispituju na razinama. Ulazni parametri se najčešće označavaju sa slovom „ $X$ “ i dodjeljuju im se brojevi (vrijednosti) kako bi se razlikovali. Mogu biti kategorički ili numerički. Čimbenici se mogu ispitivati na dvije ili više razina, ovisno o samom čimbeniku. Ako se u sklopu dizajna eksperimenta pravilno primjene nasumičnost izvedbe eksperimenta, ponavljanje i podjela eksperimenta na blokove, dolazi do poboljšanja učinkovitosti ispitivanja (Antony, 2003a). Ponavljanje je proces izvođenja eksperimenta nasumičnim redoslijedom. Ponavljanje je važno zbog dva svojstva: omogućavanje izračuna procjene

eksperimentalne standardne greške (SE) te dozvoljavanje osobi koja vrši eksperimente precizniju procjenu učinka čimbenika ili međudjelovanja. U slučaju da je broj ponavljanja bio jednak 0 ili 1, ne bi se moglo sa sigurnošću valjano zaključiti (Montgomery i Runger, 2003e). Podjela eksperimenta na blokove metoda je kojom se eliminira učinak vanjskih varijacija zbog pozadinskih čimbenika i tako se povećava učinkovitost dizajna eksperimenta. Glavni cilj je uklanjanje neželjenih izvora varijabilnosti kao što su razlike između dvije šarže ili dva dana. Ideja je grupirati slične eksperimente u blokove koji se izvode u različitim uvjetima. Dizajn eksperimenta se dijeli na potpuni faktorijalni dizajn eksperimenata te djelomični faktorijalni dizajn eksperimenata na dvije ili tri razine (Antony, 2014). Faktorijalni dizajn omogućuje ispitivanje zajedničkog učinka čimbenika (odnosno procesnih parametara) na rezultate. Potpuni faktorijalni dizajn eksperimenata sastoji se od izvođenja eksperimenta svih mogućih kombinacija na svim razinama za sve čimbenike. Djelomični faktorijalni dizajn je dizajn eksperimenta u kojem se izvode eksperimenti samo adekvatno odabranih dijelova svih kombinacija sveukupnog dizajna eksperimenta (Montgomery, 2005). Ako je broj čimbenika,  $k$ , ispitivanih na dvije razine onda je broj ukupnih eksperimenata za ispitivanje svih kombinacija  $2^k$ , što znači da broj ukupnih eksperimenata u potpunom faktorijalnom dizajnu može postati velik. Na primjer ako se koriste dva čimbenika na dvije razine to je onda  $2^2 = 4$  eksperimenata, ali ako se uzme četiri čimbenika na tri razine, to je onda  $3^4 = 81$  eksperiment. Time se gubi vrijeme i resursi za mali broj ispitanih čimbenika, a problem se rješava odabiranjem  $\frac{1}{2}$  ili  $\frac{1}{4}$  kombinacija potpunog faktorijalnog dizajna.

Primjenom dizajna eksperimenata, ispitana su tri čimbenika u svrhu optimizacije uzgoja virusa infektivnog ptičjeg bronhitisa i razvoja cjepiva. Eksperiment je ponovljen tri puta, na dvije razine tako da iznosi  $2^3 = 8$  eksperimenata.

Tablica 1 sadrži matricu dizajna kada eksperiment obuhvaća analizu 3 različita čimbenika na dvije razine, korištenjem StatSoft Inc. Statistica 6.1. računalnog programa. Razlikuju se „visoka“ i „niska“ razina, a u matričnom sustavu su zabilježene simbolima „+1“ za „visoku“ i „-1“ za „nisku“ razinu. Nenasumični eksperimenti od 1 do 8 standardnim redom navedeni su u prvom stupcu tablice. Tako se eksperiment 1 provodi na „niskoj“ razini za sva 3 čimbenika.

**Tablica 1.** Matrica dizajna eksperimenata (Antony, 2003a)

<b>Eksperiment</b>	<b>Čimbenik</b>		
	<b>X<sub>1</sub></b>	<b>X<sub>2</sub></b>	<b>X<sub>3</sub></b>
<b>1</b>	-1	-1	-1
<b>2</b>	1	-1	-1
<b>3</b>	-1	1	-1
<b>4</b>	1	1	-1
<b>5</b>	-1	-1	1
<b>6</b>	1	-1	1
<b>7</b>	-1	1	1
<b>8</b>	1	1	1



## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. KEMIKALIJE I OPREMA

#### 3.1.1. Kemikalije

- PBS – Phosphate Buffered Saline (Gibco, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- MEM – Minimum Essential Medium (Lonza Group AG, Basel, Švicarska)
- DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Lonza Group AG, Basel, Švicarska)
- HEPES (Gibco, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- FBS – Fetal Bovine Serum (Gibco, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Specific-Pathogen-Free (SPF) jaja (Valo, Njemačka)
- Otopina tripsina
- Neesencijalne aminokiseline (Gibco, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Neomicin (Gibco, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Triptan Blue bojilo

#### 3.1.2. Oprema

- LF kabinet (eng. *Laminar-flow cabinet*) – laminarni kabinet s vertikalnim strujanjem zraka
- Inkubatori za jaja (Fiem, Italija)
- Inkubator za kulture stanica (Memmert, Njemačka)
- Hladnjak
- Vorteks miješalica
- Ultra zamrzivač (New Brunswick Scientific™ Innova U 725-G Upright Freezer, Fischer Scientific, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Standardno sterilno posuđe za rad laboratoriju s jajima, virusima i kulturama stanica

- Automatske pipete (5 – 50  $\mu\text{L}$ , 10 – 100  $\mu\text{L}$ , 20 – 200  $\mu\text{L}$ , 100 – 1000  $\mu\text{L}$ , 500 – 5000  $\mu\text{L}$ )
- Laboratorijska centrifuga (Andreas Hettich GmbH, Universal 320, Njemačka)
- Inverzni mikroskop (Olympus, Japan)

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Dizajn eksperimenta

Dizajnom eksperimenata ispituju se 3 čimbenika i njihov utjecaj na rezultate uzgoja: X1 - starost embrija u SPF jajima za vrijeme inokulacije virusa (10 ili 13 dana stari), X2 - titar inokuluma odnosno titar virusa kojim se inokuliraju embrionirana SPF jaja (2,0 ili 3,0 log TCID<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup>), X3 - vrijeme inkubacije inokuliranih embrioniranih SPF jaja (18 ili 30h). TCID (eng. *Tissue Culture Infectious Dose 50*) je recipročna vrijednost razrjeđenja doze koja dovodi do promjene (citopatskog učinka; CPE, eng. *cytopathic effect*) kod 50% inficiranih staničnih kultura.

**Tablica 2.** Tri ispitivana čimbenika i njihove razine

Čimbenici	Niža razina (-)	Viša razina (+)
X1 (dani)	10	13
X2 (log TCID <sub>50</sub> mL <sup>-1</sup> )	2,0	3,0
X3 (h)	18	30

U odnosu na postojeće uvjete razvoja cjepiva za soj virusa sličnog varijantu 2 uzročnika ptičjeg infektivnog bronhitisa određene su niža i viša razina za svaki čimbenik. U tablici 2 prikazane su viša i niža razina sva tri čimbenika dobivena dizajnom eksperimenta odnosno dobivene su gornje i donje granice uvjeta uzgoja virusa. Za dizajn eksperimenta primijenjen je program StatSoft Inc. Statistica 6.1 (TIBCO) kako bi se predvidjeli bitni čimbenici i njihove interakcije na ukupni rezultat uzgoja virusa sličnog varijantu 2. Korišten je potpuni faktorijalni dizajn eksperimenata s ponavljanjem na dvije razine s tri čimbenika s ukupno 8 eksperimenata (2<sup>3</sup>). Eksperimenti su označeni slovima od „O“ do „Z“ te su svi izrađeni istovremeno unutar jednog

ponavljanja. Cjelokupni eksperiment je ponavljen tri puta za bolju analizu rezultata. U tablici 3 prikazane su kombinacije procijenjenih bitnih učinaka pri uzgoju virusa ptičjeg infektivnog bronhitisa sličnog varijantu 2 prema matrici potpunog faktorijalnog dizajna  $2^3$ .

**Tablica 3.** Istraživanje i optimizacija uzgoja virusa ptičjeg infektivnog bronhitisa sličnog varijantu 2 primjenom matrice potpunog faktorijalnog dizajna  $2^3$

Eksperiment	Čimbenik		
	X1	X2	X3
<b>O</b>	-1	-1	-1
<b>P</b>	1	-1	-1
<b>R</b>	-1	1	-1
<b>S</b>	1	1	-1
<b>T</b>	-1	-1	1
<b>U</b>	1	-1	1
<b>V</b>	-1	1	1
<b>Z</b>	1	1	1

### 3.2.2. Uzgoj virusa sličnog varijantu 2

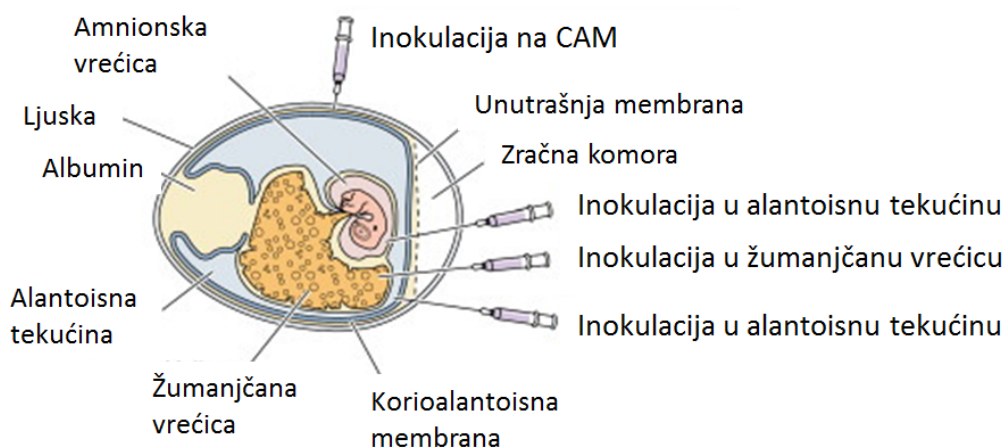
Virus infektivnog ptičjeg bronhitisa sličnog varijantu 2 je u vlasništvu tvrtke Genera d.d. Virus se do korištenja čuva u hladnjači na  $-80^{\circ}\text{C}$ . Uzgoj virusa provodi se u LF kabinetu u aseptičnim uvjetima. Sve što se unosi u LF kabinet mora biti dezinficirano. Kako bi se dobili inokulumi 2,0 i 3,0 log TCID<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup> razrijedio se početni titra virusa od 7,7 log TCID<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup> s kompletnim EMEM medijem.

Za eksperiment je ukupno korišteno 48 embrioniranih SPF jaja starih 10 dana i 13 dana koja se prije unošenja u LF kabinet i inokulacije lampiraju te dezinficiraju 70%-tnim etanolom. U eksperimentu se koriste samo jaja sa živim embrijima. 24 embrioniranih jaja starosti 10 i 24

embrioniranih jaja starosti 13 dana su inficirani inokulumima 2,0 i 3,0 log TCID<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup> kako je prikazano u tablici 4. Svaki eksperiment proveden je tri puta. Inokulacija virusa izvršena je pomoću šprice sa sterilnom iglom kroz rupicu na ljusci jajeta (probušenom trepanatorom) do alantoisne tekućine, pri čemu je svako jaje inokulirano s 0,1 mL odgovarajućeg inokuluma, a put inokulacije prikazan je na slici 9.

**Tablica 4.** Dizajn eksperimenta

Starost embrija (dani)	10				13			
	2,0		3,0		2,0		3,0	
Inokulum (log TCID <sub>50</sub> mL <sup>-1</sup> )	2,0		3,0		2,0		3,0	
Vrijeme inkubacije (h)	18	30	18	30	18	30	18	30
Oznaka eksperimenta	0	P	R	S	T	U	V	Z



**Slika 9.** Prikaz puteva inokulacije virusa u jaje (Aryal, 2018). Inokulacija virusa sličnog varijantu 2 provodi se u alantoisnu tekućinu jer se tamo najbolje razmnožava.

Jaja su podijeljena u 4 grupe, a to su 12 SPF jaja starih 10 dana i 12 SPF jaja starih 13 dana inficirano s inokulumom  $2,0 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$  prikazanih na slici 10 te je 12 SPF jaja starih 10 dana i 12 SPF jaja starih 13 dana inficirano s inokulumom  $3,0 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$  koja su prikazana na slici 11. Svaka kombinacija čimbenika dobila je pripadajuću oznaku odnosno korišteno je zadnjih 8 slova engleske abecede. Na primjer oznaku „T“ ima kombinacija čimbenika koja uključuje jaja stara 13 dana, inokulirana s  $2,0 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$  te inkubirana tijekom 18h u inkubatoru za jaja. Potom su sva inokulirana jaja uložena u inkubator za jaja pri temperaturi od  $37,5^{\circ}\text{C}$  i vlažnosti zraka  $\geq 50\%$ . Prije inkubacije jaja su se podijelila u 8 grupa jer su se jaja inkubirala tijekom 18 i 30 sati. Svaka grupa imala je 6 jaja određene starosti odnosno embriji stari 10 ili 13 dana, inficirana s inokulumima 2,0 ili 3,0  $\log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$  te uložena na određeno vrijeme (18 ili 30h). Nakon potrebnog perioda inkubacije, a prije žetve sva su jaja ohlađena na temperaturu od 2 do  $8^{\circ}\text{C}$  preko noći kako bi se izazvala smrt embrija, stisnule krvne žile i tako smanjila krvarenja prilikom žetve.



**Slika 10.** Prikaz SPF jaja inokulirana s  $2,0 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$  koje su spremne za inkubaciju 18 ili 30 sati (vlastita fotografija).



**Slika 11.** Prikaz SPF jaja inokulirana s  $3,0 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$  koje su spremne za inkubaciju 18 ili 30 sati (vlastita fotografija).

### 3.2.3. Žetva virusa kultiviranog u jajima

Jaja koja su dezinficirana sa 70%-tnim etanolom otvaraju se u LF kabinetu. Otklanja se ljuska i membrane kao što je prikazano na slici 12. Potom se pomoću pipete iz svakog jaja prebaci 0,9 mL alantosine tekućine u Falcon epruvetu koja se centrifugira. Centrifugom nastaje alikvot koji se podjeli u 2 Eppendorf epruvete od 1,5 mL. Ukupno 16 Eppendorf epruveta se čuva na  $-80^{\circ}\text{C}$  do infekcije kulture stanica bubrega pilećih embrija za potrebe određivanja koncentracije virusa.



**Slika 12.** Prikaz prvog koraka žetve; uklanjanje ljuske i membrana sterilnom pincetom (vlastita fotografija).

#### 3.2.4. Priprema kulture stanica bubrega pilećih embrija

Kultura stanica bubrega pilećih embrija (CEK, eng. *Chicken Embryo Kidney*) obuhvatila je izolaciju uzgoj stanica primarne kulture iz pilećih embrija starih 17 dana (OIE, 2018a). Najprije je odstranjen pileći bubreg, i ispran u otopini PBS-a 2 puta. Nakon toga je provedeno razlaganje organa na stanice u 0,25%-tnoj otopini tripsina pri sobnoj temperaturi. Tako priređena suspenzija stanica je filtrirana, a zatim centrifugirana 10 min pri 300 rcf-a (eng. *relative centrifugal force*) Dobiveni supernatant se odbacuje, a preostali talog dodaje u medij s fetalnim goveđim serumom (FBS, eng. *Fetal Bovine Serum*) koji služi kao podloga za rast stanica. Broj stanica u priređenim uzorcima je određivan na hemocitometru, a zatim su stanice inokulirane na mikrotitarske pločice s 96 jažica. Broj stanica je bio podešen prije inokuliranja na oko  $10^6$ , radi postizanja broja stanica oko  $10^5$  po svakoj jažici. U tako raspoređene stanice dodana je DMEM podloga s 5% FBS-a, te je na kraju ukupni volumen po jažici iznosio 0,1 mL. Ploče su inkubirane tijekom 24 sata pri 37°C uz 5% CO<sub>2</sub> u inkubatoru.

### 3.2.5. Određivanje broja kulture stanica bubrega pilećih embrija

Određivanja početnog broj stanica kulture stanica pilećih bubrega vrši se brojanjem neizravnim metodom na hemocitometru po Neubauer-u (OIE, 2018a). Iz primarne kulture se uzelo 10 $\mu$ L primarne kulture suspenzije stanica bubrega pilećih embrija te pomiješalo u omjeru 1:20 s tripan plavim bojilom koji boja mrtve stanice. Potom se po 10 $\mu$ L obojene suspenzije stanica stavi sa svake strane komorice i stanice se broje u jednakom broju kvadrata sa svake strane komorice. Stanice se broje pod inverznim mikroskopom i onda se određuje broj stanica po mililitru. Nakon inkubacije potrebno je provjeriti kvalitetu monosloja kulture stanica bubrega pilećih embrija također pod inverznim mikroskopom. Stanice bubrega pilećih embrija su male, okrugle i povezane u nakupine nepravilnog oblika, okružene stanicama fibroblasta koje su vretenastog oblika.

Jednadžba izračna ukupnog broja stanica po mL uzorka:

$$\frac{n \text{ stanica}}{mL} = \frac{R+F+\sum \text{ stanica}}{n \text{ kvadrata}} \quad (1)$$

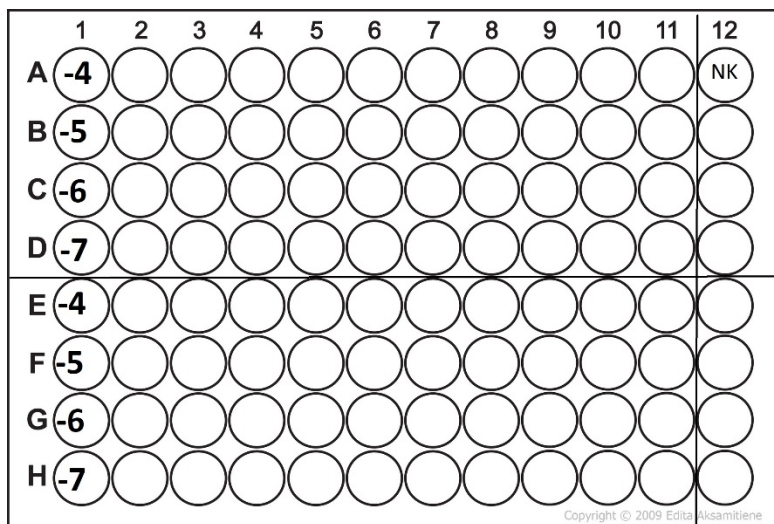
Gdje je:

- R - čimbenik razrjeđenja
- F - čimbenik komorice (10<sup>4</sup>)
- $\sum$  stanica - suma svih stanica izbrojanih u oba dijela komorice
- n kvadrata - ukupni broj kvadrata sa svake strane komorice u kojima su stanice brojane.



### 3.2.6. Infekcija kulture stanica bubrega pilećih embrija

Razrjeđenja virusa sličnog varijantu 2 uzgojenog u jajima pripremaju se pomoću kompletnog DMEM medija za uzgoj stanica koji sadrži neesencijalne aminokiseline i neomicin te otopinu 1M HEPES-a u omjeru 1:5. Za infekciju pripremaju se deseterostruka razrjeđenja virusa uzgojenog u jajima za svih 8 eksperimenata. Za titraciju se koriste 4 razrjeđenja odnosno od 4. do 7. deseterostrukog razrjeđenja. Standard virusa uzgojen u optimalnim uvjetima se razrjeđuje od 3. do 6. deseterostrukog razrjeđenja i služi kao pozitivna kontrola infektivnosti virusa. Virus se najepljuje na mikrotitarske pločice u 3 paralele za svaki eksperiment od „O“ do „Z“ i 4 paralele standarda. Jedna mikrotitarska pločica podijeli se na 2 djela te se sva 4 razrjeđenja najepljuju u 11 jažica tako da je jedan red jedno razrjeđenje što se vidi na slici 13. Od reda A do reda D je jedan dio, dok je od reda E do reda H drugi dio na pločici, redom po slovnim oznakama. Negativna kontrola nalazi se u dvanaestom, a čini ju samo medij za uzgoj stanica. Pločice se onda centrifugiraju pri 1000 rcf tijekom 30 minuta radi boljeg kontakt virusa i stanica. Pločice su inkubirane tijekom 72h u inkubatoru na 37°C i 5% CO<sub>2</sub>.



**Slika 13.** Shema mikrotitarske pločice s 96 jažica podijeljene na dva replikanta. Prikazane su pozicije nanošenja 4 deseterostruka razrjeđenja (-4, -5, -6, -7) i negativne kontrole (NK) (Anonymous, 2017).

### 3.2.7. Određivanje titra virusa pomoću Reed-Münch-ove metode

Titar virusa izražava se kao broj infektivnih doza koje uzrokuju pojavu citopatskog učinka kod 50% inficiranih staničnih kultura tkiva. Računa se kao logaritam recipročne vrijednosti razrjeđenja kod takozvane infektivne doze 50. Nakon inkubacije 72 sata mikrotitarske pločice se pregledavaju pod inverznim mikroskopom te se uočavaju moguće promjene na stanicama. Rezultati se bilježe kao pozitivni kod onih jažica gdje se uočava citopatski učinak u odnosu na negativnu kontrolu te negativni kod jažica kod kojih se ne uočava citopatski učinak u odnosu na negativnu kontrolu. Na slici 14 vidi se razlika između CEK stanica negativne kontrole i CEK stanica sa citopatskim učinkom. Nakon što su sve jažice pregledanje potrebnoje odrediti titar virusa Reed-Münch-ovom metodom (tablica 5) koja glasi:

$$\% \text{ infektivnosti} = \frac{\text{broj supstrata s promjenom u kumulativnom nizu}}{\text{ukupan broj inficiranih supstrata kumulativnog niza}} \times 100 \quad (2)$$

Da bi mogli dobiti izračun potrebni su sljedeći podaci:

- *proporcionalna distanca* =  $\frac{a-50}{a-b}$ ; (3)
  - a = % infektivnosti doze A, a doza A je doza koja izaziva infekciju najbliže 50%, ali jednako ili iznad 50%
  - b = % infektivnosti doze B, a doza B je doza koja izaziva infekciju najbliže 50%, ali ispod 50%.
- $\log \text{TCID}_{50}/\text{inokulum}$  = logaritam recipročne vrijednosti razrjeđenja doza A + proporcionalna distanca;  $\log \text{TCID}_{50}/\text{inokulum}$  predstavlja logaritam recipročne vrijednosti razrjeđenja koje uzrokuje promjene okarakterizirane kao citopatski učinak 50% inficirane populacije stanica u kulturi bubrega pilećih embrija.

**Tablica 5.** Izračunvanje titra virusa prema Reed – Münchu (iz vlastitih rezultata)

Razrjeđenje virusa	Broj jažica	Apsolutni rezultati		Kumulativni rezultati		% infektivnosti
		Pozitivni	Negativni	Pozitivni	Negativni	
10 <sup>-4</sup>	11	11	0	19	0	100
10 <sup>-5</sup>	11	7	4	8	4	66,7
10 <sup>-6</sup>	11	1	10	1	14	6,7
10 <sup>-7</sup>	11	0	11	0	25	0

Izračun:

$$a = \% \text{ infektivnosti (doza A)} = \frac{8}{12} \times 100 = 66,7$$

$$b = \% \text{ infektivnosti (doza B)} = \frac{1}{15} \times 100 = 6,7$$

$$\text{proporcionalna distanca} = \frac{66,7-50}{66,7-6,7} = 0,28$$

$$\log \text{TCID}_{50}/\text{inokulum} = 5 + 0,28 = 5,28$$

Podatak dobiven izračunom logaritma titra po inokulumu potrebno je preračunati na broj doza i volumen kojim su inokulirane jažice sa staničnom linijom bubrega embrija pilića:

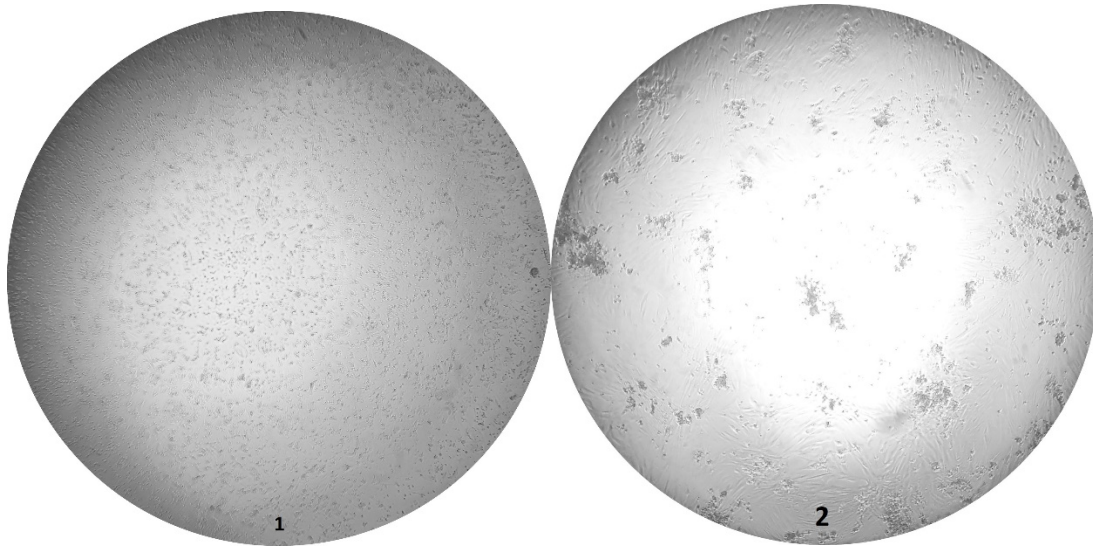
$$\text{broj doza} = 1x$$

$$\text{otopljeno} = 1x$$

$$\text{inokulirano} = 0,03 \text{ mL}$$

$$\text{omjer otapanja/inokulum} = 33,3333$$

$$\log \text{TCID}_{50}/\text{dozi} = 5,28 + \log (33,3333) = 6,80$$



**Slika 14.** 1 – CEK stanice negativne kontrole; 2 – CEK stanice sa citopatskim učinkom (Bagarić, 2019).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Posljednji korak u uzgoju virusa sličnog varijantu 2 u SPF embrioniranim jajima je titracija na CEK staničnoj liniji. Određivanjem titra virusa dobiveni su rezultati prikazani u tablici 6. Da bi dobiveni rezultati bili valjani svaki eksperiment morao je zadovoljiti dva kriterija. Potrebno je postići da najmanje 3 uzastopna razrjeđenja uspiju inficirati između 90% i 10% inokulirane kulture CEK stanica. Mora također biti zadovoljen kriterij doze i odgovora; najbolje je da svako sljedeće razrjeđenje u nizu ima niži broj jažica u kojima je vidljiv citopatski učinak, dozvoljeno je da dva razrjeđenja u nizu imaju jednak broj jažica s citoptaskim učinkom, kao i da više razrjeđenje rezultira s jednom jažicom više od susjednog nižeg razrjeđenja (Doel, 1997).

Svi eksperimenti su zadovoljili ova dva navedena kriterija te su svi rezultati uzeti za izračun titra Reed – Münchovom metodom. Dobivenim vrijednostima titara virusa varijantu 2 sličnog, izračunana je srednja aritmetička vrijednost, za svaki provedeni eksperiment sljedećom formulom:

$$\bar{y} (\log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}) = \frac{\sum y}{r}; \quad (4)$$

gdje je:

- $\sum y$  suma titara svih ponavljanja,
- $r$  je broj ponavljanja odnosno replikata (Antony, 2003b).

Svi dobiveni eksperimentalni rezultati prikazani su u tablici 6 a paralele su obilježene odgovarajućim oznakama od „O“ do „Z“ te je izračunata njihova srednja vrijednost.

**Tablica 6.** Eksperimentalno dobiveni svi pojedinačni rezultati uzevši u obzir ponavljanja i paralele te izračunane srednje vrijednosti za svaku kombinaciju ispitivanih čimbenika

<b>Kombinacija čimbenika: Starost embrija (dani) / Inokulum (log TCID<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup>) / Vrijeme inkubacije (h)</b>	<b>Oznaka eksperi menta</b>	<b>Broj replikata, r</b>	<b>Titar svakog ponavljanja, y (log TCID<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Srednja vrijednost titra, <math>\bar{y}</math> (log TCID<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup>)</b>
10/2,0/18	O	3	6,8467	6,6567
			6,7600	
			6,3633	
10/2,0/30	P	3	7,5000	7,3922
			7,4767	
			7,2000	
10/3,0/18	R	3	7,8733	7,6244
			7,4833	
			7,5167	
10/3,0/30	S	3	7,4333	7,2789
			7,1767	
			7,2267	
13/2,0/18	T	3	7,1767	7,1811
			7,2867	
			7,0800	
13/2,0/30	U	3	7,3133	7,3578
			7,5767	
			7,1833	
13/3,0/18	V	3	7,8167	7,4989
			7,4433	
			7,2367	
13/3,0/30	Z	3	7,1300	7,1522
			7,1700	
			7,1567	

Nakon što smo dobili srednje vrijednosti svakog eksperimenta potrebno je izračunati 95% granicu pouzdanosti prema sljedećoj formuli:

$$GP = TINV(\alpha, DF) \cdot S_{\bar{y}}; \quad (5)$$

gdje je:

- $GP$  granica pouzdanosti,
- $TINV$  Excelova funkcija inverzne dvostrane Studentove t-raspodjele, a to je neprekidna raspodjela vjerojatnosti koja se koristi za testiranje hipoteza kod manjih skupova podataka (Montgomery i Runger, 2003f)
- $\alpha$  razina značajnosti od 0,05 što znači da je 95% rezultata eksperimenta sva tri ponavljanja unutar granica pouzdanosti
- $DF$  broj stupnjeva slobode i računa se kao  $n - 1$ , a  $n$  je broj eksperimenta.
- $S_{\bar{y}}$  standardna greška srednje vrijednosti.

Standardna greška srednje vrijednosti izračunata je prema formuli:

$$S_{\bar{y}} = \frac{SD}{\sqrt{n}}; \quad (6)$$

gdje je:

- $SD$  standardna devijacija
- $n$  broj uzoraka koji je u ovom slučaju iznosi 8.

Standardna devijacija izračunata je prema formuli:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n-1}}; \quad (7)$$

gdje je:

- $\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$  suma kvadrata razlika između pojedinog eksperimenta i srednje vrijednosti svih eksperimenta,
- $n$  broj uzoraka.

Korištenom formulom dobili smo vrijednostu standardne devijacije koja iznosi 0,2924 log TCID<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup>. Pomoću standardne devijacije izračunata je standardna greška srednje vrijednosti koja iznosi 0,1034 log TCID<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup>. Standardna greška srednje vrijednosti dalje je korištena za izračun granica pouzdanosti koje su prikazane u tablici 7.

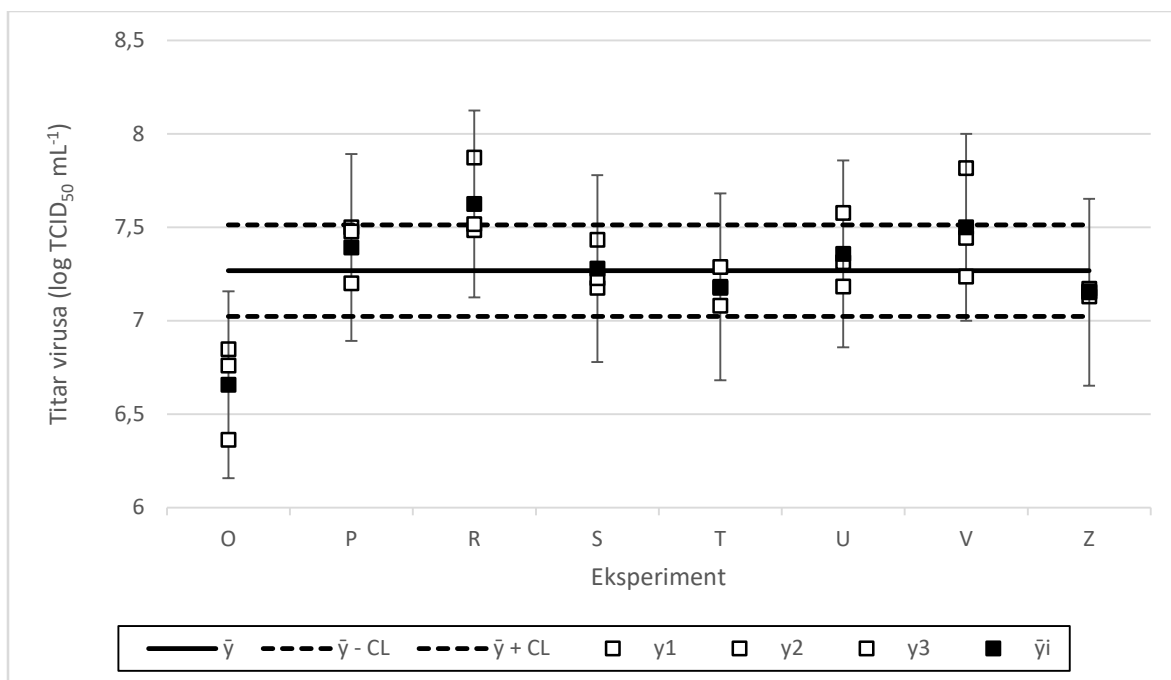
**Tablica 7.** Prikaz dizajna provedenih pokusa korištenjem matrice koja sadrži sve dobivene srednje vrijednosti uzevši u obzir 95%-tne granice pouzdanosti

Oznaka eksperimenta	Čimbenici			Rezultati		
	X1	X2	X3	Titar, $\bar{y}$ (log TCID <sub>50</sub> mL <sup>-1</sup> )	R	95% granice pouzdanosti, GP (log TCID <sub>50</sub> mL <sup>-1</sup> )
O	-	-	-	6,6567	3	±0,6402
P	-	-	+	7,3922	3	±0,4146
R	-	+	-	7,6244	3	±0,5370
S	-	+	+	7,2789	3	±0,3379
T	+	-	-	7,1811	3	±0,2569
U	+	-	+	7,3578	3	±0,4979
V	+	+	-	7,4989	3	±0,7303
Z	+	+	+	7,1522	3	±0,0506
Ukupno:				7,2678	24	7,02333 do 7,5123



Na slici 15 se vidi položaj svih rezultata u odnosu na srednju vrijednost titra svih eksperimenata koja iznosi  $7,2678 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$  te gornje i donje granice pouzdanosti srednje vrijednosti koje iznose  $7,5123 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$ , a donja  $7,0233 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$ . Može se primijetiti da se jedino eksperiment „O“ nalazi izvan intervala pouzdanosti srednje vrijednosti titra svih eksperimenata, dok su ostali eksperimenti unutar intervala. Uzgoj virusa u eksperimentu O izveden je u embrijima starim 10 dana početnog inokuluma  $2,0 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$  inkubiranih tijekom 18 sati što znači da ta kombinacija čimbenika rezultirala nižim prinosom koncentracije virusa u odnosu na ostale eksperimente. Srednje vrijednosti titra virusa uzgojenog u embrijima starim 13 dana u eksperimentima „T“, „U“, „V“ i „Z“ općenito su veće za prosječno  $0,2378 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$  od titra virusa koji je uzgojen u embrijima starim 10 dana u eksperimentima „O“, „P“, „R“ i „S“ što nije za očekivati jer embriji stari 13 dana imaju razvijeniji imunski sustav i veću količinu antitijela od embrija starih 10 dana (Janković i sur., 1975) te bi srednja vrijednost titra virusa trebala biti veća u embrijima starim 10 dana. Pozitivan trend koji ukazuje na utjecaj doze inokuluma najizraženiji je kod embrija starih 10 dana gdje se vrijednosti titra između eksperimenata s dva različita inokuluma ( $2,0 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$  i  $3,0 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$ ) razlikuju za  $0,4272 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$ . Kod embrija starih 13 dana također je primijećen pozitivan trend, ali razlika između dva inokuluma je manja i iznosi  $0,0561 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$ . Te su činjenice u skladu s očekivanjima jer je veći inokulirani početni titar virusa rezultirao većim prinosom virusa. Unutar podgrupe istog ispitivanog inokuluma primjetan je porast titra virusa duljom inkubacijom u trajanju od 30 sati u odnosu na 18 sati gdje razlika u titru iznosi  $0,0550 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$  što je bilo za pretpostaviti jer s duljim vremenom inkubacije nastaje više virusa. Ipak, ta razlika u titru je mala čime možemo zaključiti da nema neke velike razlike inkubiramo li tijekom 18 ili 30 sati.

Općenito se na temelju dobivenih vrijednosti titra u pojedinim eksperimentima može zaključiti kako su sva tri čimbenika važna za uzgoj virusa. Iz slike 15 vidljivo je da su najveći prinosi titra virusa u embriji starim 10 dana inokuliranih s  $3,0 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$  te inkubirani tijekom 18 sati.



**Slika 15.** Utjecaj triju ispitivanih eksperimentalnih čimbenika na titar varijantu 2 sličnog virusa. Bijelim kvadratićima prikazane su vrijednosti titra tri ponavljanja (y1, y2 i y3) svakog eksperimenta od „O“ do „Z“, a crnim kvadratićima prikazane su srednje vrijednosti titra svakog eksperimenta ( $\bar{y}_i$ ). Vertikalnim crtama s tupim završetkom ( $\top$ ) prikazane su pripadajuće granice pouzdanosti svakog eksperimenta. Srednja vrijednosti titra svih eksperimenta ( $7,2678 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$ ) prikazana je punom linijom, a gornja ( $7,5123 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$ ) i donja ( $7,0233 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$ ) granica pouzdanosti srednje vrijednosti titra svih eksperimenta prikazana je isprekidanim linijama. Iz grafa se vidi da su jedino vrijednosti titra varijantu 2 sličnog virusa kod eksperimenta „O“ izvan intervala pouzdanosti srednje vrijednosti ispitivanog titra virusa.

Dobivene srednje vrijednosti titara varijantu 2 sličnog virusa za svaki pojedini eksperiment poslužile su pri statističkoj obradi podataka kojom su procjenjivani učinci svakog pojedinog čimbenika i učinci kombinacije dvaju čimbenika kao i svih triju čimbenika. Učinci su izračunati prema formuli:

$$E_x = \frac{2\sum \bar{y}_i^+}{n} - \frac{2\sum \bar{y}_i^-}{n}; \quad (8)$$

gdje je:

- $E_x$  oznaka učinka pri čemu indeks  $x$  predstavlja broj svih mogućih učinaka koji su prikazani u tablici 8
- $n$  ukupan broj eksperimenta i iznosi 8
- $\bar{y}_i^+$  logaritam titra virusa na višoj (+) razini za svaki čimbenik
- $\bar{y}_i^-$  logaritam titra virusa na nižoj (-) razni za isti čimbenik (Antony, 2003c).

**Tablica 8.** Prikaz korištenog dizajna eksperimenata i svi dobiveni rezultati u matrici dizajna eksperimenata

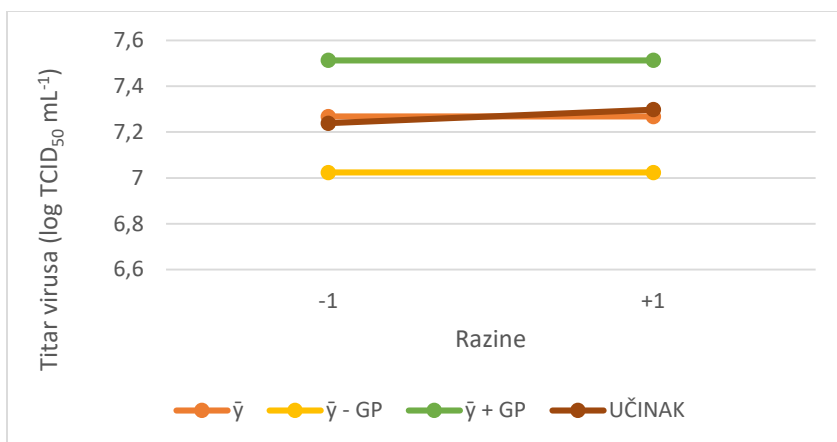
Oznaka eksperimenta	Glavni učinci i učinci interakcija							Titar, $\bar{y}$ (log TCID <sub>50</sub> mL <sup>-1</sup> )
	X1	X2	X3	X1·X2	X1·X3	X2·X3	X1·X2·X3	
O	-	-	-	+	+	+	-	6,6567
P	-	-	+	+	-	-	+	7,3922
R	-	+	-	-	+	-	+	7,6244
S	-	+	+	-	-	+	-	7,2789
T	+	-	-	-	-	+	+	7,1811
U	+	-	+	-	+	-	-	7,3578
V	+	+	-	+	-	-	-	7,4989
Z	+	+	+	+	+	+	+	7,1522

Vrijednosti učinka koji su dobiveni korištenjem navedene formule prikazani su u tablici 9.

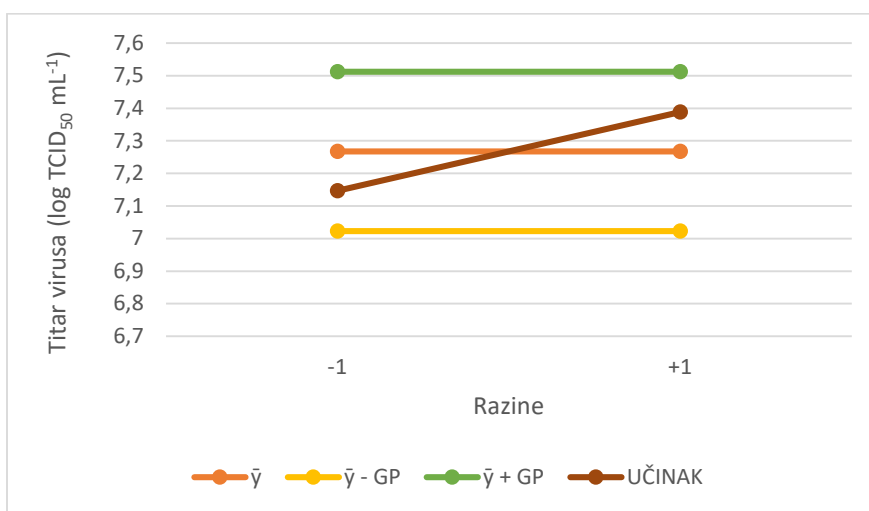
**Tablica 9.**  $E_x$  učinci izračunani za sva tri ispitivana čimbenika pojedinačno, i u kombinaciji, kao i njihov kumulativni  $E_x$  učinak

Oznaka učinka $E_x$	$\frac{2\sum\bar{y}_1^+}{n}$ (log TCID <sub>50</sub> mL <sup>-1</sup> )	$\frac{2\sum\bar{y}_1^-}{n}$ (log TCID <sub>50</sub> mL <sup>-1</sup> )	Učinak $E_x$ (log TCID <sub>50</sub> mL <sup>-1</sup> )
X1	7,2975	7,2381	0,0594
X2	7,3886	7,1470	0,2416
X3	7,2953	7,2403	0,0550
X1·X2	7,1750	7,3606	-0,1856
X1·X3	7,1978	7,3378	-0,1400
X2·X3	7,0672	7,4683	-0,4011
X1·X2·X3	7,3375	7,1981	0,1394

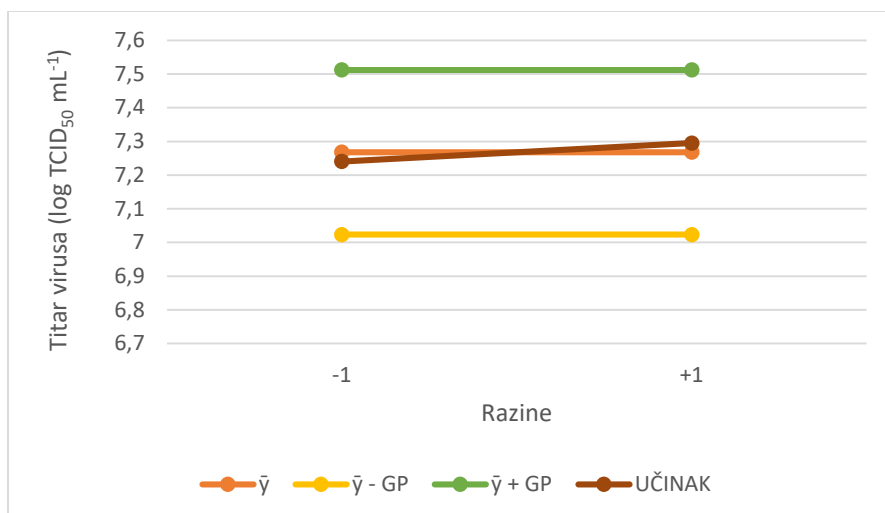
Prema granici pouzdanosti 95% izračunane su sve vrijednosti postignutih glavnih učinaka u odnosu na izračunanu srednju vrijednost svake od pojedinih dobivenih eksperimentalnih vrijednosti titra varijantu 2 sličnog virusa (Antony, 2003b). Ispitivani čimbenici označeni su sljedećim simbolima: X1 za starost embrija u SPF jajima u kojima se uzgaja virus, X2 inokulum kojim se embriji inficiraju i X3 za trajanje inkubacije inokuliranih embrioniranih SPF jaja. Svi ispitivani čimbenici imaju pozitivan predznak odnosno na nižoj razini (-) daju niže vrijednosti, a na višoj razini (+) daju veće vrijednosti titra varijantu 2 sličnog virusa. Prema tome, proizlazi da sva tri čimbenika imaju pozitivno djelovanje na uzgoj virusa kad su na višem nivou. Utjecaj starosti embrija prikazan je na slici 16, inokuluma na slici 17 te trajanja inkubacije prikazan na je slici 18. Na slici 19 prikazani su pozitivni utjecaji procijenjenih učinaka za sva tri ispitana čimbenika na obje razine u obliku stupaca vrijednosti glavnih učinaka.



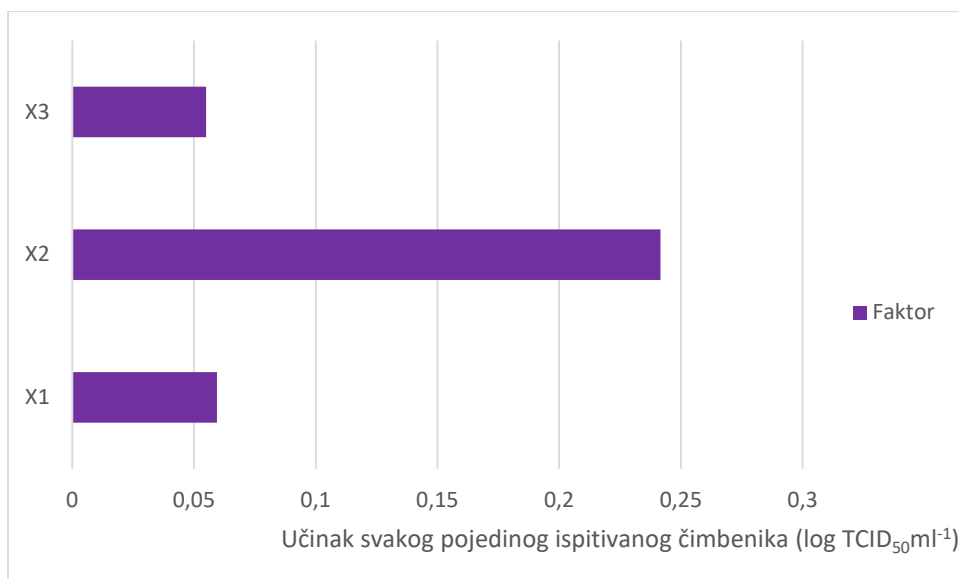
**Slika 16.** Utjecaj starosti embrija u SPF jajima u kojima se uzgaja varijantu 2 slični virus na titar virusa. Srednja vrijednost titra virusa svih eksperimenata je označena narančastom crtom, a 95%-tna granica pouzdanosti je označena žutom i zelenom crtom. Učinak čimbenika starosti embrija u SPF jajima u kojima se uzgaja virus na nižoj (-1) i višoj (+1) razini je označen smeđom crtom. S povećanjem starosti embrija učinak raste što upućuje na zaključak da veća starost embrija doprinosi većem titru varijantu 2 sličnog virusa.



**Slika 17.** Utjecaj inokuluma kojim se embrij inficira na titar varijantu 2 sličnog virusa. Srednja vrijednost titra virusa svih eksperimenata je označena narančastom crtom, a 95%-tna granica pouzdanosti je označena žutom i zelenom crtom. Učinak čimbenika starosti embrija u SPF jajima u kojima se uzgaja virus na nižoj (-1) i višoj (+1) razini je označen smeđom crtom. S povećanjem titra inokuluma raste titar virusa što upućuje na zaključak da veća vrijednost titra inokuluma doprinosi većem titru varijantu 2 sličnog virusa.



**Slika 18.** Utjecaj trajanja inkubacije inokuliranih embrioniranih SPF jaja na titar varijantu 2 sličnog virusa. Srednja vrijednost titra virusa svih eksperimenata je označena narančastom crtom, a 95%-tna granica pouzdanosti je označena žutom i zelenom crtom. Učinak čimbenika starosti embrija u SPF jajima u kojima se uzgaja virus na nižoj (-1) i višoj (+1) razini je označen smeđom crtom. S povećanjem trajanja inkubacije titar virusa raste što upućuje na zaključak da veća vrijednost trajanja inkubacije doprinosi većem titru varijantu 2 sličnog virusa.



**Slika 19.** Učinak svakog pojedinog ispitivanog čimbenika (log TCID<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup>) na titar varijantu 2 sličnog virusa.

Procjena značajnosti učinaka provedena je također primjenom t-statistike kojom je također obuhvaćen utjecaj svih ispitivanih čimbenika i njihovih interakcija (Montgomery i Runger, 2003f).

Formula za izračun t-vrijednosti glasi:

$$t = \frac{|E_x|}{SE}, \quad (9)$$

gdje je:

- $|E_x|$  apsolutna vrijednost svakog učinka
- $SE$  standardna greška (Kutle i sur., 2010).

Standardna greška računala se prema formuli:

$$SE = \frac{SD}{\sqrt{n}}, \quad (10)$$

gdje je:

- $SE$  standardna greška tri glavna učinka
- $SD$  standardna devijacija tri glavna učinka
- $n$  broj uzoraka i iznosi iznosi 3 (Montgomery i Runger, 2003e).

Standardna devijacija izračunata je prije te iznosi  $0,2924 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$ , a prema tome standardna greška iznosi  $0,1688 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$ . S tim dobivenim vrijednostima izračunata je t-vrijednost svakog učinka koje su prikazane u tablici 10.

Apsolutne vrijednosti učinaka i njihove t-vrijednosti uspoređene su u odnosu na kritične vrijednosti apsolutnih učinaka ( $E_{krit.}$ ) i t-vrijednosti ( $t_{krit.}$ ). Te su vrijednosti dobivene pomoću iduće dvije formule:

$$E_{krit.} = t_{krit.} \cdot SE; \quad (11)$$

gdje je:

- $SE$  je standardna greška

$$t_{krit.} = TINV(\alpha, DF), \quad (12)$$

gdje je:

- $TINV$  Excelova funkcija inverzije dvostrane Studentove t-raspodjele (Kutle i sur., 2010)
- $\alpha$  razinu značajnosti (0,05 i 0,1)
- $DF$  broj stupnjeva slobode i u ovom slučaju iznosi 2.

Rezultati koji su veći ili jednaki nekoj referentnoj vrijednosti (Montgomery, 2005), odnosno učinak je značajan za određeni  $\alpha$ , ako je  $|E_X| > E_{krit.}$  ili  $t > t_{krit.}$ . Za razinu značajnosti 0,05  $t_{krit.}$  iznosi od 4,3027 log TCID<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup>, a  $E_{krit.}$  onda iznosi 0,7263 log TCID<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup>. Nijedan čimbenik nije statistički značajan jer su im apsolutne vrijednosti manje od  $E_{krit.}$  te t-vrijednosti manje od  $t_{krit.}$ . Kod razine značajnosti od 0,1  $t_{krit.}$  iznosi 2,9200, a  $E_{krit.}$  onda iznosi 0,4929 log TCID<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup>, pri čemu također, ni jedan čimbenik nije statistički značajan jer su im apsolutne vrijednosti manje od  $E_{krit.}$  te t-vrijednosti manje od  $t_{krit.}$ .

Kako bi se dodatno provjerila procjena važnih učinaka pomoću kritične vrijednosti učinaka i t-vrijednosti potrebno je izračunati p-vrijednost t-raspodjele prema formuli:

$$p = TDIST(t - vrijednost, DF, 2); \quad (13)$$

gdje je:

- $TDIST$  Excelova funkcija koja rezultira postotnom vjerojatnošću za Studentovu t-raspodjelu gdje je varijabla numerička t-vrijednost za koju se želi odrediti p-vrijednost
- $DF$  broj stupnjeva slobode koji iznosi 6
- 2 dvostrana statistička procjena raspodjele (Anderson i Whitcomb, 2015).

Statistički značajne p-vrijednosti svih učinaka su za razinu značajnosti 0,05 one koje su manje od 0,05 te za razinu značajnosti 0,1 one koje su manje od 0,1. Za razinu značajnosti 0,05 ni jedna p-vrijednost nije statistički značajna, dok za razinu značajnosti 0,1 statistički je značajna p-vrijednost učinka interakcije inokuluma i trajanja inkubacije jer je p-vrijednost manja od 0,1.



Izračunate p-vrijednosti prikazane su u tablici 10, a statistički važna p-vrijednost je prikazana crvenom bojom.

**Tablica 10.** Apsolutne, t i p-vrijednosti svih ispitivanih učinaka. Značajna p-vrijednost je prikazana crvenom bojom.

Oznaka učinka $E_x$	Apsolutna vrijednost $E_x$ (log $TCID_{50} mL^{-1}$ )	t-vrijednost	p-vrijednost
X1	0,0594	0,3519	0,7369
X2	0,2416	1,4313	0,2023
X3	0,0550	0,3258	0,7556
X1·X2	0,1856	1,0995	0,3137
X1·X3	0,1400	0,8294	0,4386
X2·X3	0,4011	2,3762	<b>0,0551</b>
X1·X2·X3	0,1394	0,8259	0,4405

Grafički je ovaj način procjene statističke važnosti učinaka prikazan slikom 20 pomoću raspodjele polu-normalne vjerojatnosti (Barton, 1990). U tu svrhu izračunata je polunormalna vrijednost  $z$ , prikazana u tablici 11, pomoću ranga apsolutnih vrijednosti učinaka u programu Sigmaplot software package (verzija 14). Program je u izračunu koristio sljedeće dvije formule:

$$z = norminv(x, m, s), \quad (14)$$

gdje je:

- $norminv(x, m, s)$  inverzna kumulativna normalna (Gaussova) funkcija raspodjele s argumentima  $x$  koji predstavlja iznos vjerojatnosti
- $m$  srednju vrijednost jednaku 0
- $s$  standardna devijacija raspodjele jednaka 1.

$$\bullet \quad \chi = \frac{3 \cdot n_e + 3 \cdot r - 1}{6 \cdot n_e + 1}, \quad (15)$$

gdje je:

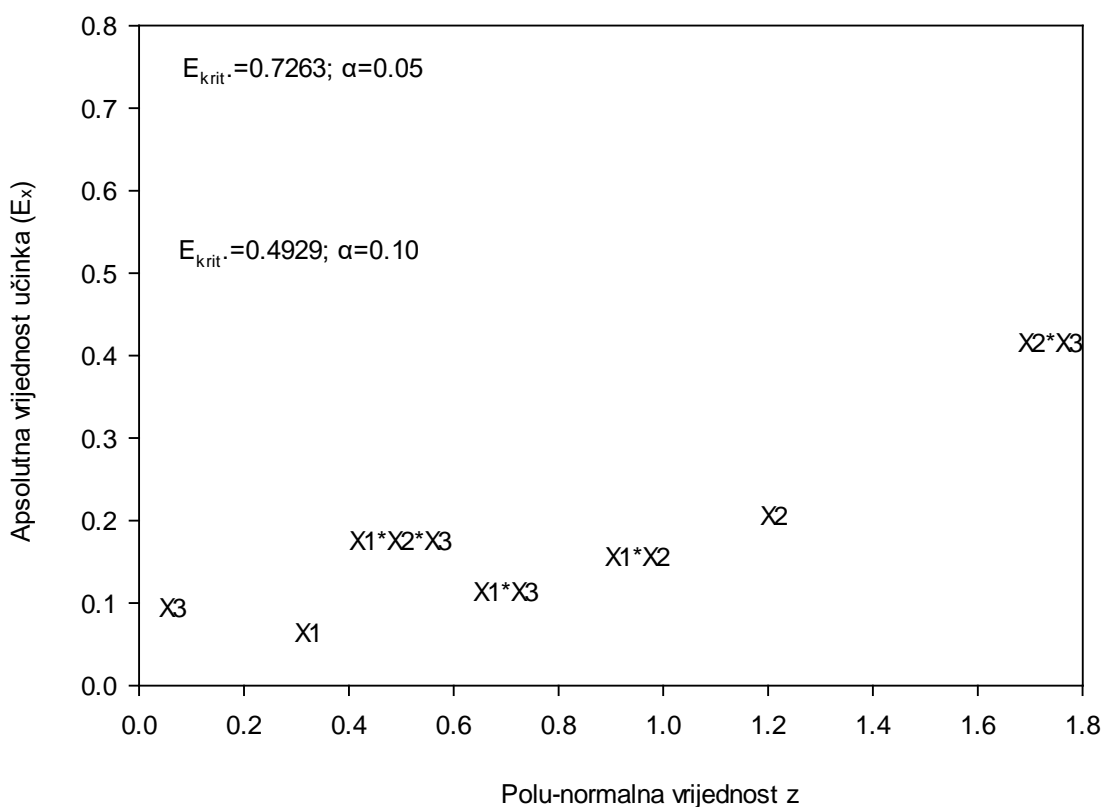
- $n_e$  ukupan broj učinaka,
- $r$  oznaka za rang apsolutne vrijednosti nekog učinka prema ostalim učincima kada se oni poredaju od najmanjeg do najvećeg iznosa (Montgomery i Runger, 2003c).

**Tablica 11.** Procjena raspodjele polu-normalne vjerojatnosti na temelju dobivenih apsolutnih vrijednosti procijenjenih učinaka, njihovih rangova i polu-normalnih  $z$  vrijednosti

Oznaka učinka $E_x$	$E_x$ (log TCID <sub>50</sub> mL <sup>-1</sup> )	Apsolutna vrijednost $E_x$ (log TCID <sub>50</sub> mL <sup>-1</sup> )	Rang $E_x$	Polu-normalna vrijednost $z$
X1	0,0594	0,0594	2	0,2655
X2	0,2416	0,2416	6	1,1937
X3	0,0550	0,0550	1	0,0876
X1·X2	-0,1856	0,1856	5	0,8927
X1·X3	-0,1400	0,1400	4	0,6563
X2·X3	-0,4011	0,4011	7	1,6798
X1·X2·X3	0,1394	0,1394	3	0,4521

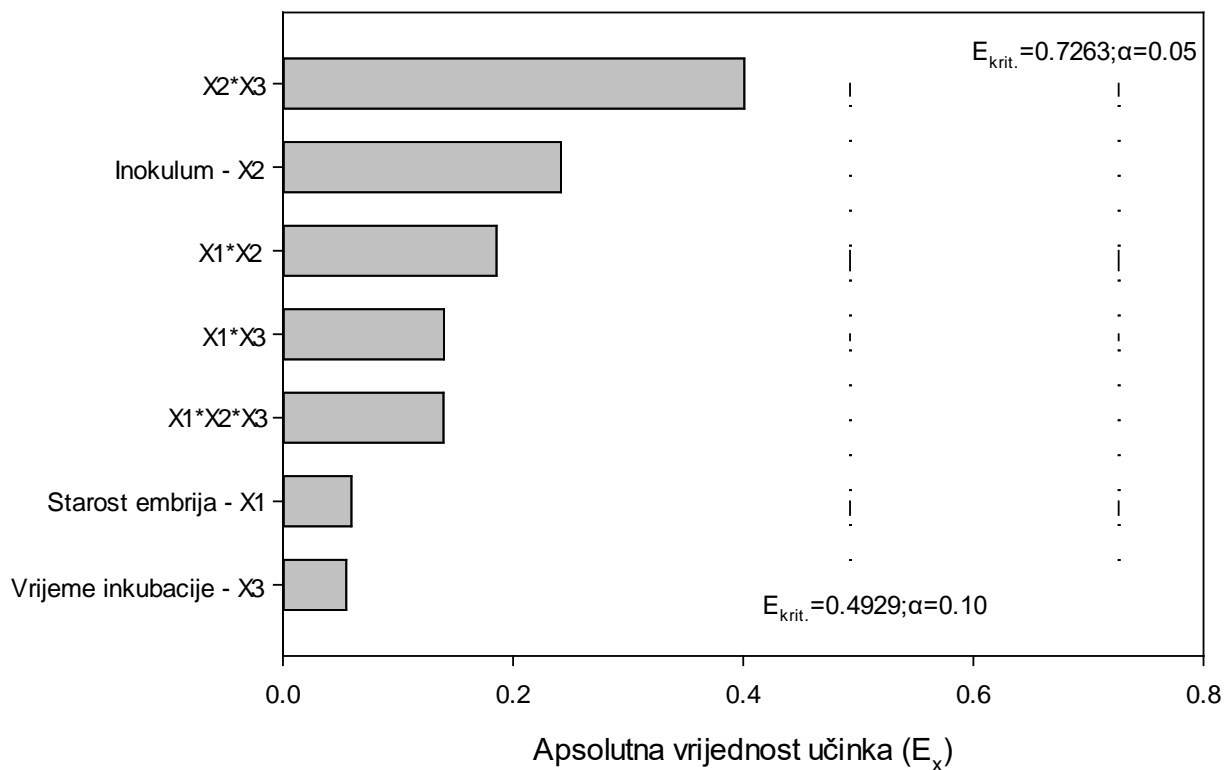
Kako bi se razlikovali čimbenici i njihove interakcije prema učinku na postignuti titar varijantu 2 sličnog virusa, dan je prikaz raspodjele polu-normalne vjerojatnosti. Metodom najmanjih kvadrata provedena je interpretacija prikaza raspodjele polu-normalne vjerojatnosti određen pravcem koji predstavlja linearni prikaz nule u normalnoj raspodjeli. Vrijednosti koje se nalaze na tom pravcu ili u blizini pravca, smatraju se nevažnim za svaki od ispitivanih učinaka, dok sve vrijednosti koje su udaljene od samog pravca se smatraju statistički značajnim (Montgomery i Runger, 2003d). Kao što je prikazano na slici 20, svi učinci nalaze se u blizini pravca i manji su od kritičnih učinaka određenih na razinama značajnosti 0,05 i 0,1 te stoga nisu važni. Prema tome, najvažniji je učinak međudjelovanja titra inokuluma kojim se embrij inficira i

trajanja inkubacije inokuliranih embrioniranih SPF jaja na postignuti titar varijantu 2 sličnog virusa. Slijede manje važni učinci, a to su učinak ispitanog titra inokuluma kojim se embrij inficira, učinak međudjelovanja starosti embrija u SPF jajima u kojima se uzgaja virus i ispitanog titra inokuluma kojim se embrij inficira, zatim učinak međudjelovanja starosti embrija u SPF jajima u kojima se uzgaja virus i trajanja inkubacije inokuliranih embrioniranih SPF jaja, učinak međudjelovanja sva tri čimbenika, učinak starosti embrija u SPF jajima u kojima se uzgaja virus te učinak trajanja inkubacije inokuliranih embrioniranih SPF jaja.



**Slika 20.** Raspodjela apsolutnih vrijednosti učinaka u odnosu na polu-normalnu vrijednost z. Glavni učinci su označeni sivim kružićima, a učinci njihovog međudjelovanja su označeni crnim kružićima. Prikazan je pravac kvadratne jednadžbe te pravci koji prikazuju vrijednost kritičnog učinka ( $E_{krit.}$ ) koji iznosi  $0,7263 \log TCID_{50} mL^{-1}$  određena na razini značajnosti 0,05 te vrijednost kritičnog učinka ( $E_{krit.}$ ) koji iznosi  $0,4929 \log TCID_{50} mL^{-1}$  na razini značajnosti 0,1.

Na slici 21 prikazana je procjena učinaka pomoću t-statistike. Dan je Pareto prikaz stupaca koji predstavljaju iznose apsolutnih vrijednosti učinaka. Stupci su poredani od najvećeg do najmanjeg učinka odozgo prema dolje. Učinci testiraju nultu hipotezu prema kojoj su svi učinci jednaki referentnoj vrijednosti (Montgomery i Runger, 2003d). Kao što je vidljivo na slici 21, referentna vrijednost kritičnog učinka,  $E_{krit.}$  iznosi  $0,7263 \log TCID_{50} mL^{-1}$ , a određena je na razini značajnosti  $0,05$ , dok referentna vrijednost kritičnog učinka,  $E_{krit.}$  iznosi  $0,4929 \log TCID_{50} mL^{-1}$ , pri razini značajnosti  $0,1$ . Svaki učinak čiji stupac prelazi preko referentnog pravca smatra se značajnim. Može se zaključiti da niti jedan učinak nije značajan obzirom na kritične vrijednosti  $E_{krit.}$  određene na razinama značajnosti  $0,05$  i  $0,1$  (slika 21).



**Slika 21.** Prikaz apsolutnih vrijednosti glavnih učinaka i učinaka interakcija u obliku stupaca dok su isprekidanim linijama prikazane vrijednost kritičnih učinaka ( $E_{krit.}$ ) koje iznose  $0,7263 \log TCID_{50} mL^{-1}$  za razinu značajnosti  $0,05$  i  $0,49290 \log TCID_{50} mL^{-1}$  za razinu značajnosti  $0,1$ . Niti jedan učinak nije statistički značajan.

Iz statističke obrade rezultata možemo zaključiti da niti jedan čimbenik nije statistički značajan, ali da najveći utjecaj na postignuti titar virusa ima zajednički učinak primijenjenog titra inokuluma i trajanja inkubacije. Ako pogledamo zasebno, pozitivan utjecaj na uzgoj virusa kad su višem nivou imaju čimbenik ispitanog inokuluma i trajanja inkubacije odnosno veći titar inokuluma dovodi do postizanja većeg logaritma titra virusa i duljim trajanjem inkubacije virusa u embrijima, postiže se veći titar virusa, a to su ujedno i optimalni uvjeti uzgoja. Iz eksperimentalnih podataka možemo zaključiti da najveći prinos virusa nastaje u embrijima starim 10 dana inficiranih s ispitivanim inokulumom  $3,0 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$  i inkubiranih 18 sati, ali uzimajući rezultate dobivene statističkom obradom dolazi se do zaključka da bi se najveći prinos virusa dobio u embrijima starim 13 dana inficiranih s ispitivanim inokulumom  $3,0 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$  i inkubiranih 30 sati pri temperaturi od  $37^{\circ}\text{C}$  i  $5\% \text{ CO}_2$ .

## 5. ZAKLJUČCI

1. Zbog mutacija virusa ptičjeg infektivnog bronhitisa nastaju novi serotipovi virusa, kontinuirano se razvijaju cjepiva protiv novih serotipova virusa.
2. Primjenom živih atenuiranih cjepiva protiv poznatih virusa učinkovito se sprječava pojava ptičjeg infektivnog bronhitisa.
3. Utjecaj čimbenika početnog titra inokuluma, starost SPF embrija i trajanja inkubacije na postignuti titar varijantu 2 sličnog virusa istražen je metodom dizajna eskperimenta.
4. Ispitivani SPF embriji za uzgoj virusa bili su stari 10 i 13 dana.
5. Ispitivani početni titar inokuluma iznosio je 2,0 i 3,0 log TCID<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup>.
6. Inkubacija inficiranih SPF embrija je provedena tijekom 18 i 30 sati.
7. Dobiveni rezultati su pokazali da najveći utjecaj na postignuti titar varijantu 2 sličnog virusa ima zajednički učinak primijenjenog titra inokuluma i trajanja inkubacije.
8. Veći titar inokuluma doveo je do postizanja većeg logaritma titra varijantu 2 sličnog virusa.
9. Duljim trajanjem inkubacije virusa u embrijima postignut je veći titar varijantu 2 sličnog virusa.

## 6. LITERATURA

Abro, S. (2013) Molecular Characterization and Detection of Infectious Bronchitis Virus. Doctoral Thesis Swedish University of Agricultural Science.

Anderson, M. J., Whitcomb, P. J. (2015) Two-level Factorial Desing. U: DOE Simplified: Practical Tools for Effective Experimentation, 2.izd., Productivity Press, New York, str. 37-67.

Andreis, I., Batinić, D., Čulo, F., Grčević, D., Lukinović-Škudar, V., Marušić, M., Taradi, M., Višnjić, D. (2010) Imunologija, Medicinska naklada, Zagreb.

Anonymous (2001) <<https://www.biologyonline.com/>>. Pristupljeno: 19. kolovoza 2019.

Anonymous (2017) <<http://www.cellsignet.com/media/templ.html>>. Pristupljeno: 10. svibnja 2020.

Antony, J. (2003a) Fundamentals of Design of Experiments. U: Design of Experiments for Engineers and Scientists, Elsevier Science & Technology Books, Cambridge, str. 6–16.

Antony, J. (2003b) Systematic methodology for Design of Experiments. U: Design of Experiments for Engineers and Scientists, Elsevier Science & Technology Books, Cambridge, str. 31-45.

Antony, J. (2003c) Full factorial designs. U: Design of Experiments for Engineers and Scientists, Elsevier Science & Technology Books, Cambridge, str. 54-65.

Antony, J. (2014) Fundamentals of Design of Experiments. U: Design of Experiments for Engineers and Scientists, 2.izd, Elsevier Science & Technology Books, Cambridge, str. 7-14.

Armesto, M., Cavanagh, D., Britton, P. (2009) The Replicase Gene of Avian Coronavirus Infectious Bronchitis Virus Is a Determinant of Pathogenicity. *PLoS ONE* 4

Aryal, S. (2018) Techniques of Virus Cultivation, < <https://microbiologyinfo.com/techniques-of-virus-cultivation/> >. Pristupljeno: 02. svibnja 2020.

- Bagarić, M. (2019) Optimizacija uzgoja virusa sličnog varijantu QX u svrhu razvoja cjepiva protiv ptičjeg infektivnog bronhitisa, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Bande, F., Arshad, S. S., Bejo, M. H., Moeini H. (2015) Progress and Challenger toward the Development of Vaccines against Avian Infectious Bronchitis. *J. Immunol. Res.* **2015**, 1-12.
- Bande, F., Arshad, S. S., Omar, A. R., Hair-Bejo, M., Mahnuda, A., Nair, V., (2017) Global distribution and strain diversity of avian infectious bronchitis virus: a review. *Anim. Health Res. Rev.* **18**, 70-83.
- Barton, R., R. (1990) Presenting the results Graphically, U: Graphical Methods for the Design of Experiments, Springer-Verlag, New York, str., S., Millet, J. K., Licitra, B. N., Whittaker, G. R. (2012) Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses* **4**, 1011-1033.
- Callison, S. A., Jackwood, M. W., Hilt, D. A. (2001) Molecular characterization of infectious bronchitis virus isolates foreign to the United States and comparison with United States isolates. *Avian Dis.* **45**, 492-499.
- Casais, R., Davies, M., Cavanagh, D., Britton, P., (2005) Gene 5 of the avian coronavirus infectious bronchitis virus is not essential for replication. *J. Virol.* **79**, 8065-8078.
- Cavanagh, D. (2003) Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Pathol.* **32**, 567-582.
- Cavanagh, D. (2005) Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathol.* **36**, 439-448.
- Cavanagh, D. (2007) Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet. Res.* **38**, 281-297.
- Cavanagh, D. i Gelb, J. (2008) Infectious Bronchitis. *Diseases of Poultry* **12**, 117-135.
- Cavanagh, D., Davis, P. J., Mockett, A. P. (1988) Amino acid within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes. *Virus Res.* **11**, 141-150.
- Cowen, B. S. i Hitchner S. B. (1975) pH stability studies with avian infectious bronchitis virus (coronavirus) strains. *J. Virol.* **15**, 430-432.
- Dawson, P. S. i Gough R. E. (1971) Antigenic variation in strains of avian infectious bronchitis virus. *Arch. Gesamte. Virusforsch.* **34**, 32-39.



- de Wit, J. J. (2000) Detection of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* **29**, 79-93.
- de Wit, S. J. J., Cook, J. K., van der Heijden, H. M. (2011) Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathol.* **40**, 223-235.
- de Wit, J., Guerrero, P., Calvo, J., Hidalgo, H., Lierz, M., Heffels-Redmann, U., Kaleta, E., Heckmann, J. (2012) Report of the genotyping, pathotyping, and protectotyping of recent strains from Chile. VII. International Symposium on Avian Corona-and Pneumoviruses and Complicating Pathogens, Rauischolzhausen, str. 61-67.
- Doel, T. R. (1997) Potency assessment of inactivated viral vaccines. U: Vaccine manual, (Soulebot, J. P., Palya, V. J., Rweyemamu, M., Sylla, D., ured.), Food and Agriculture Organization of the United Nations Animal, Rim, str. 398.
- Eriksson, L., Johansson, E., Kettaneh-Wold, N., Wikström, C., Wold., S. (2000) Design of Experiments, Principles and Applications, *Umetrics Academy*, ISBN 91-973730-0-1.
- Even-Chen, T., Barbakov, M., Hiefetez, S., Perelman, B., Kin, E., Ashash, U., Finger, A., Banet-Noach, C. (2014) Development of new infectious bronchitis variant vaccines from local Israeli isolates based on their prevalence in the field. U: 8<sup>th</sup> International Symposium on Avian Corona- And Pneumoviruses And Complicating Pathogens, Rauischolzhausen, str. 215-218.
- Finney, P. M., Box, P. G., Holmes, H. C. (1990) Studies with a bivalent infectious bronchitis killed virus vaccine. *Avian Pathol.* **19**, 435-450.
- Fischer, F., Stegen, C. F., Masters, P. S., Samsonoff, W. A. (1998) Analysis of constructed E gene mutants of mouse hepatitis virus confirms a pivotal role for E protein in coronavirus assembly. *J. Virol.* **72**, 7885-7894.
- He, R., Dobie, F., Ballantine, M., Leeson, A., Li, Y., Bastien, N., Cutts, T., Andonov, A., Cao, J., Booth, T. F., Plummer, F. A., Tyler, S., Baker, L., Li, X. (2004) Analysis of multimerization of the SARS coronavirus nucleocapsid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**, 476-483.
- Hogue, B. i Machamer, C. (2008) Coronavirus structural proteins and virus assembly. U: Nidoviruses, Washington, D.C., str. 179-200.
- Hopkins, S. R. i Yoder, H. W., Jr. (1984) Increased incidence of airsacculitis in broilers infected with mycoplasma synoviae and chicken-passaged infectious bronchitis vaccine virus. *Avian Dis.* **28**, 386-396.

- Hosseini, H., Fard, M. H. B., Charkhkar, S., Morshed, R. (2015) Epidemiology of avian infectious bronchitis virus genotypes in Iran (2010-2014). *Avian Dis.* **59**, 431-435.
- Hussein, A. H., Emara, M. M., Rohaim, M. A., Ganapathy, K., Arafa, A. M. (2014) Sequence Analysis of Infectious Bronchitis Virus IS/1494 like Strain Isolated from Broiler Chicken Co-Infected with Newcastle Disease Virus in Egypt During 2012. *Int. J. Poult. Sci.* **13**, 530-536.
- Ignjatović, J. i Sapats, S (2000) Avian infectious bronchitis virus. *Rev. Sci. Tech.* **19**, 493.
- Ignjatović, J., Ashton, D. F., Reece, R., Scott, P., Hooper, P. (2002) Pathogenicity of Australian strains of avian infectious bronchitis virus. *J. Comp. Pathol.* **126**, 115-123.
- Imbert, I., Snijder, E. J., Dimitrova, M., Guillemont, J. C., Leine, P., Canard, B. (2008) The SARS-Coronavirus PLnc domain of nsp3 as a replication/transcription scaffolding protein. *Virus Res.* **133**, 136-148.
- Medicinski leksikon (1992) Ivo Padovan, Leksikografski zavod Miroslav Krleža, Zagreb.
- Jackwood, M. W. (2012) Review of infectious bronchitis virus around the world. *Avian Dis.* **56**, 634-641.
- Jackwood, M. W., Hall, D., Handel, A. (2012) Molecular evolution and emergence of avian gammacoronaviruses. *Infect. Genet. Evol.* **12**, 1305-1311.
- Janković, B. D., Isaković, K., Lukić, L., Vujanović, L., Petrović, S., Marković, M. (1975) Immunological Capacity of the Chicken Embryo; 1. Relationship between the maturation of lymphoid tissues and the occurrence of cell-mediated Immunity in the developing chicken embryo, *Immunology* **29**, 497-508.
- Jayaram, J., Youn, S., Collisson, E. W. (2005) The virion N protein of infectious bronchitis virus is more phosphorylated than the N protein from infected cell lysate. *Virology* **71**, 127-135.
- Jia, W., Karaca, K., Parrish, C. R., Naqi, S. A. (1995) A novel of avian infectious bronchitis virus resulting from recombination among three different strains. *Arch. Virol.* **140**, 259-271.
- Kusters, J. G., Jager, E. J., Niesters, H. G. M., van der Zeijst, B. A. M. (1990) Sequence evidence for RNA recombination in field isolates of avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Vaccine* **8**, 605-608.

- Kutle, L., Pavlović, N., Dorotić, M., Zadro, I., Kapustić, M., Halassy, B. (2010) Robustness testing of live rubella vaccine potency assay using fractional factorial design of experiments. *Vaccine* **28**, 5497-5502.
- Leland, D. S., Ginocchio C. C. (2007) Role of Cell culture for Virus Detection in the Age of Technology. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 49-78.
- Liais, E., Croville, G., Mariette, J., Delverdier, M., Lucas, M. N., Klopp, C., Lluch, J., Donnadiou, C., Guy, J. S., Corrand, L., Ducatez, M. F., Guérin, J. L. (2014) Novel avian coronavirus and fulminating disease in guinea fowl, France. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 105-108.
- Lim, T. H., Lee, H. J., Lee, D. H., Lee, Y. N., Park, J. K., Youn, H. N., Kim, M. S., Lee, J. B., Park, S. Y., Choi, I. S., Song, C. S. (2011) An emerging recombinant cluster of nephropathogenic strains of avian infectious bronchitis virus in Korea. *Infect. Genet. Evol.* **11**, 678-685.
- Lisowska, A., Sajewicz-Krukowska, J., Fusaro, A., Pikula, A., Domanska-Blicharz, K. (2017) First characterization of a Middle - East GI-23 lineage (Var2-like) of infectious bronchitis virus in Europe. *Virus Res.* **242**, 43-48.
- Liu, M. A. (2011) DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol. Rev.* **239**, 62-84.
- Liu, S., Han, Z., Chen, J., Liu, X., Shao, Y., Kong, X., Tong, G., Rong, J. (2007) S1 gene sequence heterogeneity of a pathogenic infectious bronchitis virus strain and its embryo-passaged, attenuated derivatives. *Avian Pathol.* **36**, 231-234.
- Maeda, J., Maeda, A., Makino, S. (1999) Release of coronavirus E protein in membrane vesicles from virus-infected cells and E protein-expressing cells. *Virology* **263**, 265-272.
- Markušić, M., Pavlović, N., Šantak, M., Marić, G., Kotarski, L., Forčić, D. (2013) Critical factors for the replication of mumps virus in primary chicken embryo fibroblasts defined by the use of design of experiments (DoE). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 1533-1541.
- Matthijs, M. G., van Eck, J. H., Landman, W. J., Stegeman, J.A. (2003) Ability of Massachusetts-type infectious bronchitis virus to increase colibacillosis susceptibility in commercial boilers: a comparison between vaccine and virulent field virus. *Avian Pathol.* **32**, 473-481.

- Meeusen, E. N. T., Walker, J., Peters, A., Pastoret, P. P., Jungersen, G. (2007) Current status of veterinary vaccines. *Clin. Microbio. Rev.* **20**, 489-510.
- Meir, R., Rosenblut, E., Perl, S., Kass, N., Ayali, G., Perk, S., Hemsani, E. (2004) Identification of a novel nephropathogenic infectious bronchitis virus in Israel. *Avian Dis.* **48**, 635-641.
- Mo, M., Huang, B., Wei, P., Wei, T., Chen, Q., Wang, X., Li, M., Fan, W. (2012) Complete genome sequences of two Chinese virulent avian coronavirus infectious bronchitis virus variants. *J. Virol.* **86**, 10903-10904.
- Montgomery D. C. (2005) Simple Comparative Experiments. U: Design and analysis of experiments, 5.izd., John Wiley & Sons Inc., New York, str. 34-36.
- Montgomery, D. C., Runger G. C. (2003e) Point Estimation of Parameters. U: Applied Statistics and Probability for Engineers, 3.izd., John Wiley & Sons Inc., New York, str. 220- 246.
- Montgomery, D. C., Runger G. C. (2003f) Tests of Hypotesis for a single Sample. U: Applied Statistics and Probability for Engineers, 3.izd., John Wiley & Sons Inc., New York, str. 277-327.
- Montgomery, D. C., Runger, G. C. (2003b) The analysis of variance, U: Applied Statistics and Probability for Engineers, 3.izd., John Wiley & Sons Inc., New York, str. 93-95.
- Montgomery, D., C., Runger G., C. (2003c), Continuous Random Variables and Probability Distributions, U: Applied Statistics and Probability for Engineers, 3.izd., John Wiley & Sons Inc., New York, str. 109-117.
- Montgomery, D., C., Runger G., C. (2003d) Random Sampling and Data Description. U: Applied Statistics and Probability for Engineers, 3.izd., John Wiley & Sons Inc., New York, str. 189-219.
- OIE - World Organisation for Animal Health (2008) Chapter 2.3.2. Avian Infectious Bronchitis, U: OIE Terrestrial Manual 2008: Manual Of Diagnostic Tests And Vaccines For Terrestrial Animals, Paris, France. str. 443–589.
- OIE - World Organisation for Animal Health (2018a) Avian Infectious Bronchitis. U: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, World Organisation for Animal Health, Pariz, str. 796-809.

- Pasternak, A. O., Spaan, W. J., Snijder, E. J. (2006) Nidovirus transcription: how to make sense...? *Gen. Virol.* **87**, 1403-1421.
- Sasipreeyajan, J., Pohuang, T., Sikikobkul, N. (2012) Efficacy of different vaccination programs against Thai QX-like infectious bronchitis virus. *Thai. J. Vet. Med.* **42**, 73-79.
- Schalk, A. F. i Hawn M. C. (1931) An apparently new respiratory disease of baby chicks. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **78**, 19.
- Seger, W., GhalyanchiLangeroudi, A., Karimi, V., Madadgar, O., Marandi, M. V., Hashemzdeh, M. (2016) Genotyping of infectious bronchitis viruses from broiler farms in Iraq during 2014-2015. *Arch. Virol.* **161**, 1229-1237.
- Seifi, S., Asasi, K., Mohammadi, A. (2010) Natural co-infection caused by avian influenza H9 subtype and infectious bronchitis viruses in broiler chicken farms. *Veterinaski Arhiv* **2**, 792-794.
- Selim, K., Arafa, A. S., Hussein, H. A., W. El-Sanousi, A. A. (2013) Molecular characterisation of infectious bronchitis viruses isolated from broiler and layer chicken farms in Egypt during 2012. *Int. J. Vet. Sci. Med.* **1**, 102-108.
- Shen, S., Wen, Z. L., Liu, D. X. (2003) Emergence of a coronavirus infectious bronchitis virus mutant with a truncated 3b gene: functional characterization of the 3b protein in pathogenesis and replication. *Virology* **311**, 16-27.
- Umar, S., Shah, M. A. A., Munir, M. T., Ahsan, U., Kaboudi, K. (2016) Infectious bronchitis virus: evolution and vaccination. *Worlds Poult. Sci. J.* **72**, 49-60.
- Valastro, V., Holmes E. C., Britton, P., Fusato, A., Jackwood M. W., Cattoli, G., Monne, I. (2016) S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: an attempt to harmonize virus classification. *Infect. Genet. Evol.* **39**, 349-364.
- van Hemert, M. J., van den Worm, S. H., Knoop, K., Mommaas, A. M., Gorbalenya A. E., Snijder, E. J. (2008) SARS-coronavirus replication/transcription complexes are membrane-protected and need a host factor for activity in vitro. *PLoS Pathol.* **4**, e1000054.

Worthington, K. J., Currie, R. J. W., Jones, R. C. (2008) A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. *Avian Pathol.* **37**, 247-257.

Yang, T., Wang, H.-N., Wang, X. (2009) The protective immune response against infectious bronchitis virus induced by multiepitope based peptide vaccines. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 1500-1504.

Yilmaz, H., Altan, E., Cizmecigil, U. Y., Gurel, A., Ozturk, G. Y., Bamac, O. E., Aydin, O., Britton, P., Monne, I., Cetinkaya, B., Morgan, K. L., Faburay, B., Richt, J. A., Turan, N. (2016) Phylogeny and S1 gene variation of infectious bronchitis virus detected in broilers and layers in Turkey. *Avian Dis.* **60**, 596-602.

You, J. H., Reed, M. L., Hiscox, J. A. (2007) Trafficking motifs in the SARS-coronavirus nucleocapsid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **358**, 1015-1020.

Zanaty, A., Naguib, M. M., El-Husseiny, M. H., Mady, W., Hagag, N., Araf, A. S. (2016) The sequence of the full spike S1 glycoprotein of infectious bronchitis virus circulating in Egypt reveals evidence of intra-genotypic recombination. *Arch. Virol.* **161**, 3583-3587.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Valentina Čeribović

Ime i prezime studenta