

Optimizacija uzgoja virusa sličnog varijantu QX u svrhu razvoja cjepiva ptičjeg infektivnog bronhitisa

Bagarić, Marieta

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:159:684660>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-23**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

Marieta Bagarić

1018/MB

**Optimizacija uzgoja virusa sličnog
varijantu QX u svrhu razvoja cjepiva
ptičjeg infektivnog bronhitisa**

Rad je izrađen u Laboratoriju za razvoj cjepiva, tvrtke Genera d.d., pod neposrednim voditeljstvom mag.ing.biotechn. Lane Ljuma Skupnjak i dr.sc. Leonide Kutle te pod mentorstvom prof.dr.sc. Jagode Šušković iz Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnoškog 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 dr.sc. Anto Vrdoljak, znan. sur. u polju biotehnologije, 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. Također, zahvaljujem prof. dr. sc. Blaženki Kos na stručnoj pomoći i savjetovanju pri pisanju ovog diplomskog rada.

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

Zahvaljujem prijateljima i kolegama zbog kojih mi je razdoblje studiranja bilo ispunjeno veselim trenucima.

Za kraj, najveću zahvalu dugujem svojoj obitelji i ljubavi svog života, Luki Rajhu, na podršci i razumijevanju koje su mi pružili tijekom pripreme svakog ispita.

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 QX u svrhu razvoja cjepiva ptičjeg infektivnog bronhitisa

Marieta Bagarić, 1018/MB

Sažetak: Virus ptičjeg infektivnog bronhitisa uzrokuje oboljenje peradi koje se najčešće manifestira poteškoćama u disanju, dok ponekad dolazi do nastanka lezija u bubrezima. U tom razdoblju perad gubi na težini i ne proizvodi kvalitetna jaja dopuštena za upotrebu. S obzirom na činjenicu da se virus lako prenosi i mutira, potrebno je učestalo razvijati nova cjepiva koja bi spriječila širenje sojeva virusa ptičjeg infektivnog bronhitisa do nezahvaćenih područja. Optimizacija uzgoja takvog živog cjepiva, soja virusa sličnog varijantu QX ispitana je pomoću metodologije dizajna eksperimenta. Korišten je potpuni faktorijalni dizajn u kojem su tri faktora ispitana na dvije razine, pri gornjoj i donjoj granici trenutnog uzgoja. Ispitani su faktori starosti embrija u kojima se uzgaja virus, početnog inokuluma kojim se embrij inficira i trajanja inkubacije, odnosno umnažanja virusa u embriju. Statističkom obradom rezultata pokusa predviđen je utjecaj pojedinog faktora te utjecaj međudjelovanja dva faktora i sva tri faktora na količinu virusa u potencijalnom cjepivu. Količina virusa je određena postupkom titracije virusa na primarnoj kulturi stanica bubrega pilećih embrija te izražena u obliku logaritma recipročnog razrjeđenja doze koja izaziva 50% promjena na inficiranoj staničnoj kulturi, $\log_{10} \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$. Tijekom uzgoja virusa sličnog varijantu QX statistički je najznačajniji utjecaj trajanja inkubacije virusa u embriju.

Ključne riječi: cjepivo, virus ptičjeg infektivnog bronhitisa, dizajn eksperimenta, titracija

Rad sadrži: 62 stranice, 21 slika, 12 tablica, 103 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. Jagoda Šušković*

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

Datum obrane: 23. rujna 2019.

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 QX-like virus cultivation for the development of avian infectious bronchitis vaccine

Marieta Bagarić, 1018/MB

Abstract: The avian infectious bronchitis virus causes a disease in poultry that is most commonly manifested by respiratory difficulties, while sometimes lesions in the kidneys can occur. During this period, the poultry loses weight and produces no quality eggs allowed for use. Since the virus is easily transmitted and mutated, the outbreak is prevented by the use of a viral vaccine. Optimization of cultivation of such live vaccine, variant QX-like was tested using the experimental design methodology. The full factorial design of experiments studied the effects of three factors, each at two levels, the upper and lower limit of current virus cultivation. Factors of interest are the age of the embryos in which the virus is grown, the initial inoculum by which the embryo is infected, and the duration of virus incubation. Statistical analysis of the results predicted the effects of a single factor as well as the effects of the interaction between two and all three factors on the final amount of virus in a potential vaccine. The amount of virus was determined by the virus titration method on cells of the primary culture of chicken embryo kidney cells (CEK cells) and expressed as the logarithm of reciprocal dose dilution causing 50% change of infected cells, $\log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$. The factor of the duration of incubation time is statistically most significant.

Keywords: vaccine, avian infectious bronchitis virus, design of experiments, titration

Thesis contains: 62 pages, 21 figures, 12 tables, 103 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 Jagoda Šušković, Full Profesor*

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

Reviewers:

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

Thesis defended: 23 September 2019.

TABLICA SADRŽAJA

1. Uvod.....	1
2. Teorijski dio	2
2.1. Povijest	2
2.2. Cjepiva za perad.....	4
2.2.1. Prednosti i nedostaci virusnih cjepiva za perad	5
2.3. Ptičji infektivni bronhitis	6
2.3.1. Karakteristike genoma.....	6
2.3.2. Epidemiologija i patologija nastanka bolesti	8
2.3.3. Identifikacija virusa ptičjeg infektivnog bronhitisa	10
2.3.4. Kontrola infekcije.....	12
2.4. Razvoj i proizvodnja živog cjepiva ptičjeg infektivnog bronhitisa.....	13
2.5. Dizajn eksperimenata	18
2.5.1. Osnovni pojmovi dizajna eksperimenata.....	19
2.5.2. Potpuni faktorijski dizajn	20
2.5.3. Primjena dizajna eksperimenata.....	22
3. Eksperimentalni dio	23
3.1. Kemikalije i oprema	23
3.1.1. Kemikalije.....	23
3.1.2. Oprema	23
3.2. Metode rada	24
3.2.1. Dizajn eksperimenta	24
3.2.2. Uzgoj virusa sličnog varijantu QX.....	25
3.2.3. Žetva virusa kultiviranog u jajima	27
3.2.4. Priprema kulture stanica bubrega pilećih embrija.....	29
3.2.5. Određivanje broja stanica CEK kulture.....	30
3.2.6. Infekcija kulture stanica bubrega pilećih embrija (titracija).....	30
3.2.7. Određivanje titra virusa pomoću Reed-Munch-ove metode.....	32
4. Rezultati i rasprava	35
5. Zaključci.....	51
6. Literatura.....	52

1. UVOD

Meso peradi je bitan izvor proteina životinjskog podrijetla diljem svijeta. Dvorišna proizvodnja peradi može se vidjeti u većini ruralnih područja te je bazirana na uzgoju i brizi za domaću perad. Intenzivna proizvodnja peradi je najčešća u razvijenim zemljama, no u zadnjih nekoliko desetljeća su zemlje u razvoju prilagodile svoje proizvodnje kako bi zadovoljile povećane potrebe za proteinima životinjskog podrijetla. Paralelno s povećanom proizvodnjom peradi povećava se rizik od prijenosa određenih bolesti peradi do još nezahvaćenih područja. Problem predstavlja urbana globalizacija, koja omogućuje unakrsno širenje agenasa bolesti od domaćih do divljih peradi i obratno (Shahid i sur., 2017).

Kako bi se umanjile posljedice virusnih infekcija koje prvenstveno uzrokuju ekonomski i zdravstveni problem u svijetu, mnoge farmaceutske tvrtke su svoju proizvodnju fokusirale na proizvodnju cjepiva kao jedine opcije za borbu protiv virusa. Postoji velik broj cjepiva dostupnih za upotrebu u obliku živih, inaktiviranih, atenuiranih cjepiva i cjepiva na bazi podjedinica virusa. No, velik izazov za buduće generacije cjepiva predstavlja brza mutacija i međusobna izmjena genetskog materijala, pri čemu nastaju tipovi virusa za koje ne postoji adekvatno cjepivo (Jane, 2012).

Jedan od visoko mutabilnih virusa je virus ptičjeg infektivnog bronhitisa. Iako je prvotno izoliran u Sjedinjenim Američkim Državama, zbog jednostavnog načina prenošenja zrakom, opremom i vodom, dominira kao jedan od globalnih ekonomskih problema (Zhang i sur., 2015).

U svrhu optimizacije uzgoja cjepiva protiv virusa ptičjeg infektivnog bronhitisa, sličnog varijantu QX, u ovom je diplomskom radu korištena metodologija dizajna eksperimenta. Dizajn eksperimenta pojam je koji obuhvaća planiranje, projektiranje i analizu eksperimenata potrebnih za donošenje važećih i općenitih zaključaka na djelotvoran i učinkovit način (Montgomery, 2003a). Primarna svrha dizajna eksperimenta je reducirati utrošeno vrijeme i resurse na ispitivanje svih mogućih kombinacija parametara pojedinačno i njihovih međusobnih utjecaja na ukupni prinos procesa. Statističkom analizom eksperimentalnih rezultata postavljaju se vrijednosne granice za optimalne prinose cjepiva svake šarže. Cilj ovog diplomskog rada je upotrebom dizajna eksperimenata odgovoriti na pitanje „Koji glavni učinci ili učinci njihovih interakcija imaju utjecaj na rezultate uzgoja virusa sličnog varijantu QX u svrhu razvoja cjepiva ptičjeg infektivnog bronhitisa?“. Razvoj cjepiva u vidu postavljanja optimalnih vrijednosti za svaki parametar koji utječe na proces je ključan dio proizvodnje cjepiva.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Povijest

U antičko doba, postojalo je vjerovanje kako su božanstva u svrhu kažnjavanja ljudskog neposluha slala bolesti na Zemlju. Neki su vladari strah od uništenja izazvanog bolestima koristili u svrhu kontroliranja naroda, stoga su mnoga otkrića ostala nezabilježena. Tek je u kasnom 19. stoljeću otkriveno kako su stari Egipćani znali za oblik stečenog imuniteta na infekcije nakon preživljene infekcije, prijenos bolesti kukcima, higijenu i sanitaciju (Andreau, 1997). Nakon pada Zapadnog rimskog carstva i početka Mračnog doba civilizacije, ta su znanja bila izgubljena za srednjovjekovne ljude. Ono što je prethodilo prvim pokušajima cijepljenja jest spoznaja da se neke bolesti prenose s čovjeka na čovjeka. Stari kineski liječnici su prve pokušaje cijepljenja virusom malih boginja (*Variola vera minor*), zvane variolacija, izvodili tako što su pamučnu vatu namakali gnojem iz gnojnih vezikula bolesnika, a potom je stavljali u nos zdravom čovjeku ili bi sasušeni gnoj pomoću trake upuhivali u nos. Tako zdrav čovjek preboli blaži oblik bolesti te tako stječe prirodni imunitet (Boylston, 2012). Još je jedna činjenica igrala važnu ulogu koja je pomogla engleskom liječniku Edwardu Jenneru kako bi 1796. godine otkrio prvo cjepivo. Žene koje su muzle krave imale su stečeni imunitet na velike boginje jer su prethodno preživjele infekciju kravljim boginjama. Sam postupak inokulacije virusa puno je sigurniji od variolacije jer ne uključuje rizik od prijenosa variole. Jenner je inokuliranu tekućinu nazvao vakcinom, a postupak vakcinacijom (cijepljenjem), (lat., vacca“= krava; vakcina; vakcinacija) (Riedel, 2005). Nakon Jennera, veliko ime u svjetskoj znanosti bilo je ono Luisa Pasteura. Louis Pasteur je 1870. godine napravio prvo živo atenuirano (oslabljeno) bakterijsko cjepivo za koleru peradi. Pasteur je otkrio da ako se bakterija kolere peradi (*Pasteurella cholerae gallinarum*) ostavi mirovati određeno vremensko razdoblje, nakon ubrizgavanja u životinju, ne dolazi do nastanka infekcije. Kada je, nakon toga, istu perad cijepio aktivnom kulturom bakterije, perad je preživjela. Godine 1882., Pasteur je otkrio bakterijsko cjepivo antraksa (*Bacillus anthracis*), bolesti koja se jako rijetko javlja kod ljudi, ali je rasprostranjena kod stoke. Nakon toga je 1885. sintetizirao prvo živo atenuirano virusno cjepivo bjesnoće (Rabies virus) za ljudsku upotrebu (Berche, 2012). Početkom 20. stoljeća, razvoj cjepiva brzo dobiva nove razine otkrićem inaktiviranih cjepiva protiv tifusa (*Rickettsia prowazekii*, Rudolf Stefan Jan Weigl, 1930. godine) i kuge (*Yersinia pestis*, Waldemar Haffkine, 1900. godine); bakterije su uzgojene u insektima prijenosnicima, ubijene grijanjem i fenolom. Emil von Behring je 1890. godine paralelno otkrio serume protiv difterije i tetanusa, dok je Paul Ehrlich 1897. godine objavio teoriju receptorskog imuniteta, prekretnicu u tadašnjoj

imunologiji (Hilemann, 1999). U prvoj polovici 20. stoljeća znanost o cijepljenju se nastavila razvijati sintezom inaktiviranih cjepiva tuberkuloze (*Mycobacterium tuberculosis*, Albert Calmette i Camille Guerin, 1919. godine), hripavca (*Bordetella pertussis*, Leila Denmark, 1930.g.), poliomijelitisa (lat. polio, Jonas Salk, 1955.g.), ospica (lat. measles, Thomas Peebles i John Franklin Enders, 1954.g.), zaušnjaka (lat. mumps, Maurice Hilleman, 1963.g.) i rubele (lat. rubella, National Institutes of Health's Division of Biologics standards, 1964.g.). Hugh i Maria Maitland bili su prvi znanstvenici koji su razmatrali mogućnost razvoja humanih virusa u staničnoj kulturi. Kako bi to dokazali, 1928. godine su razvili kulturu tkiva u kojoj je virus boginja uzgojen u mljevenim pilećim bubrezima. Goodpasture (1931) je opisao tehnologiju razvoja virusa u kokošjim jajima koja se i danas koristi kod uzgoja virusa za cjepiva. Harald zur Hausen je dobio 2008. godine Nobelovu nagradu za otkriće uzročnika tumora grlića maternice – humanog papiloma virusa (HPV-a), koje je dovelo do nastanka nekoliko inaktiviranih tipova cjepiva koja se danas upotrebljavaju u svrhu prevencije oboljenja (Nour, 2009). Unatoč velikim uspjesima znanstvenika na području proizvodnje cjepiva, Vaccine Nation, organizator Svjetskog kongresa cjepiva (eng. World Vaccine Congress) objavio je kako postoji 10 virusa i bakterija za koje današnja civilizacija nema licencirano cjepivo, među kojima su HIV (eng. Human immunodeficiency virus), *Trypanosoma cruzi*; uzročnik američke tripanosomijaze, chikungunya virus; uzročnik istoimene bolesti, dengue virus; uzročnik denge groznice, citomegalovirusi; uzročnici virusne upale pluća, *Leishmania infantum*; uzročnik lišmanijaze i *Plasmodium*; uzročnik malarije (Bottazzi, 2013).

Perad je domaćin virusima koji uzrokuju Newcastle bolest (Indonezija, 1926.g.), Marekovu bolest (Churchill, 1969.g.), infektivnu bolest burze (Winterfield, 1962.), infektivni bronhitis (Schalk i Hawn, 1931.g.), niskopatogenu i viskopatogenu ptičju gripu (Perroncito, 1878.g.) te ptičju infektivnu anemiju (Yuasa, 1979.g.). Posljednje desetljeće, pojava epidemija peradi u velikom razmjeru (ptičja gripa, Newcastle bolest) uzrokovala je financijske gubitke koji su zahvatili potrošački i javni sektor (Lupiani, 2009). Iz tog razloga, cijepljenje peradi se izvodi u okviru programa iskorjenjivanja zaraznih bolesti na nacionalnoj i regionalnoj razini pod nadzorom javnih veterinarskih instituta. Cilj je izbjeći ili umanjiti posljedice kliničkih bolesti na farmama i direktno povećati proizvodnju peradi. Postupci cijepljenja razlikuju se ovisno o lokalnim faktorima (primjerice tip proizvodnje, lokalni uzorak bolesti, razina biosigurnosti, troškovi i mogući gubitci), a pod kontrolom su industrije peradi i Svjetske zdravstvene organizacije.

1931. godine Schalk i Hawn opisali su prve simptome respiratorne bolesti mladih pilića u Sjedinjenim američkim državama koja je nazvana „infektivni bronhitis mladih pilića“. 1936.

godine taj virus je identificiran kao virus infektivnog bronhitisa, obitelji *Coronavirus* unutar koljena *Coronaviridae* (Beach i Schalm, 1936). Virus je prvi puta uzgojen 1937. godine u korialantoisnoj membrani 12-dnevnih pilećih jaja (Beaudette, 1937), a 1956. godine je prvi puta dijagnosticiran u Europi (Nizozemskoj), procesom izolacije virusa, infekcijom pilića i testiran pomoću neutralizacijskog seruma. Takav je izolat korišten za pripravu prvog živog cjepiva u embrioniranim pilećim jajima 1960. godine (Bijlenga, 1960) u Europi. Cjepivo je nazvano cjepivo ptičjeg infektivnog bronhitisa, soj H52, pri čemu je H predstavljalo prvo slovo imena farme (Huyben) s koje je virus izoliran, te 52 broj pasaža tijekom kojih je virus oslabljen (atenuiran). Prvo živo atenuirano cjepivo protiv ovog virusa u svijetu bilo je izolat Massachussets (Mass 41) kojeg je izolirao van Roekel sredinom prošloga stoljeća.

Ubrzo nakon otkrića prvog varijanata, Mass 41, pojavili su se novi varijanti virusa ptičjeg infektivnog bronhitisa koji su izazvali ekonomske krize u industriji perad, točnije u proizvodnim pogonima piletine. Jedan od varijanata je QX, primarno izoliran u Kini 1998. godine (Wang i sur., 1998), nedugo nakon toga izoliran u Nizozemskoj (Landman i sur., 2005), Sjevernoj Italiji (Beato i sur., 2005; Zanella i sur., 2006), Francuskoj, Njemačkoj i Belgiji (Worthington i sur., 2008). Filogenetskom analizom potvrđena je srodnost s virusom ptičjeg infektivnog bronhitisa izoliranim u Kini (Chuyang, 2011). Kako bi se spriječile negativne posljedice na industriju perad, u Nizozemskoj je 2014. godine na tržište stavljeno prvo cjepivo protiv varijanta QX (Nobilis Primo QX, Intervet International B.V). No, zbog brze evolucije ovog varijanta dostupna cjepiva ne pružaju dovoljnu zaštitu od svih sojeva, stoga se cjepiva stalno unaprjeđuju i razvijaju nova.

2.2.Cjepiva za perad

Definicija cjepiva za veterinarsku upotrebu (Europska farmakopeja, 2017a) ističe kako ta cjepiva sadrže antigenske supstancije te se primjenjuju u svrhu induciranja specifične i aktivne imunosti protiv bolesti uzrokovanih bakterijama, toksinima, virusima, gljivicama te parazitima. Cjepiva za perad mogu biti živa ili inaktivirana, odnosno mogu sadržavati žive ili inaktivirane mikroorganizme (bakterije, viruse, gljivice), parazite ili dijelove antigena ili supstancije koje ti organizmi proizvode (primjerice toksine). U bilo kojem navedenom slučaju, odabrane antigenske supstancije moraju zadržati svoja antigenska svojstva zadovoljavajućom imunizacijom organizma te istovremeno biti bezopasna po zdravlje organizma koji prima cjepivo. Nadalje, cjepiva mogu sadržavati kombinacije antigenskih supstancija te tako organizmu pružati zaštitu od nekoliko različitih mikroorganizama ili njihovih izlučevina. Antigeni mogu biti proizvedeni pomoću rekombinantne DNA tehnologije. Često u cjepiva

dodaju adjuvansi kako bi poboljšali svojstva imunizacije organizma. U nekim slučajevima antigeni primljeni imunizacijom mogu se pasivno prenijeti na potomke preko majke te pružati zaštitu od nekoliko sličnih antigenskih supstanci, odnosno mikroorganizama (de Wit i sur., 2011). Ovaj se rad temelji na razvoju živog oslabljenog virusnog cjepiva protiv ptičjeg infektivnog bronhitisa u laboratoriju, kao dio ispitivanja cjepiva za proizvodnju u velikom mjerilu.

2.2.1. Prednosti i nedostaci virusnih cjepiva za perad

Kako je spomenuto prije u radu, cjepiva koja se koriste u industriji peradi mogu se klasificirati na živa i inaktivirana. Tablicom 1 ilustrirane su opće karakteristike živih i inaktiviranih cjepiva za perad.

Tablica 1. Karakteristike cjepiva za perad (Marangon i Busani, 2006)

Živa cjepiva	Inaktivirana cjepiva
Manja količina antigena. Potrebno je višestruko cijepljenje	Veća količina antigena. Nije potrebno višestruko cijepljenje
Lako se uništi s kemikalijama i vrućinom	Lakše skladištenje
Relativno jeftino, jednostavna primjena u velikoj masi: voda za piće, sprejevi	Zahtjevno za proizvesti i primijeniti, individualna administracija
Podložno postojećim antitijelima u organizmu	Izazivanje imunog odgovora usprkos postojećim antitijelima
Opasnost od kontaminacije cjepiva	Nema opasnosti od kontaminacije cjepiva
Ograničen broj kombinacija zbog interferencije mikroorganizama	Velik broj kombinacija jer nema interferencije mikroorganizama
Izaziva brz imunološki odgovor	Izaziva spor imunološki odgovor

Programi cijepjenja koji koriste nekoliko sojeva virusa različitih patogenosti i imunogenosti trebali bi biti primijenjeni u skladu sa stupnjem virulencije virusa u cirkulaciji. Kako bi se postigle optimalne razine zaštite bez nuspojava, programi cijepjenja trebali bi uključiti prvo primjenu progresivnih virulentnijih živih sojeva cjepiva ili živih cjepiva nakon toga praćenih s inaktiviranim cjepivima. Općenito, inaktivirana cjepiva primijenjena nakon živih, induciraju visoku i jednoliku razinu zaštite. Ovakav tip programa trebao bi se izvršavati kod cijepjenja peradi uzgajane radi mesa i kod uzgoja ptica nesilica, jer im je potrebna

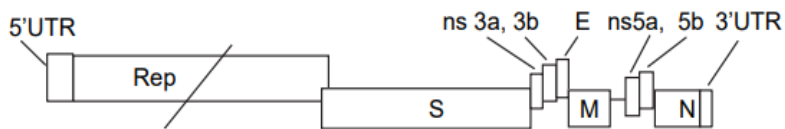
dugotrajna i učinkovita zaštita tijekom cijelog perioda lijeganja jaja. Živa cjepiva su više imunogenična od inaktiviranih, poprilično se jednostavno i jeftino primjenjuju kod velikog broja peradi odjednom, dok inaktivirana cjepiva sadrže veću količinu antigena, moguće su kombinacije nekoliko virusa u jednom cjepivu i otpornija su na uvjete skladištenja. Nejednaka dostupnost različitih cjepiva u svijetu rezultira ograničavanjem učinkovitosti programa cijepljenja (Marangon i Busani, 2008).

2.3. Ptičji infektivni bronhitis

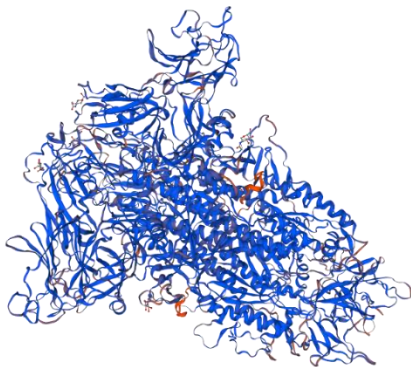
2.3.1. Karakteristike genoma

Genetički materijal virusa ptičjeg infektivnog bronhitisa sastoji se od jednolančane RNA (eng. ribonucleic acid; ribonukleinska kiselina) (+) pozitivnog smjera, što svrstava ovaj virus u grupu IV klasifikacije prema Baltimore-u (Baltimore, 1971). Prema taksonomiji virusa (ICTV, 2019), virus ptičjeg infektivnog bronhitisa je dio reda *Nidovirales*, obitelji *Coronaviridae*, roda *Coronavirus*, podgrupe *Gammacoronaviridae*. Duljina viralnog genoma je od 27 do 32 kb, što čini ovaj genom najvećim RNA virusom (Lai i Cavanough, 1997). Svi se geni RNA genoma nalaze između 2 UTR regije (eng. Untranslated Region; netranslatirajuća regija) prikazano kao na slici 1. Viralni genom sastoji se od četiri gena koja kodiraju strukturne proteine; gen S (eng. spike: šiljak; glikoproteinski izdanak), gen E (eng. envelope: lipidna ovojnica), gen M (eng. matrix: matriks) te gen N (eng. nucleocapsid: nukleokapsidni omotač). Između gena koji kodiraju strukturne proteine nalaze se geni koji kodiraju nestrukturne proteine (ns) ORF1a i 1b, 3a, 3b, 5a i 5b (eng. ORF = Open Reading Frame; otvoren okvir čitanja genoma) (Jackwood i sur, 2012), za koje se smatra da pomažu virulenciju virusa (Bande i sur, 2016). Protein S, čiji je model predviđen slikom 2, znanstvenicima je zanimljiv zbog regije s varijabilnom sekvencom koja se razlikuje od varijanta do varijanta virusa ptičjeg infektivnog bronhitisa. Protein je lociran na površini virusa te je odgovoran za indukciju diferencijacije antitijela domaćina (Cavanagh i sur, 2007), vezanje (adsorpciju) i ulazak (penetraciju) virusa u stanicu domaćina (Koch i sur., 1990). Post-translacijski se cijepa na amino-terminalni kraj; podjedinicu S1 (535 aminokiselina) te na karboksi-terminalni kraj; podjedinicu S2 (627 aminokiselina) (Valastro i sur, 2016). Podjedinica S1 ima ulogu epitopa odgovornog za imunološku reakciju domaćina (Bande i sur, 2016). Nakon što virus preko podjedinice S stupi u interakcije s proteinima na stanici domaćina, prodire u stanicu te se replicira u citoplazmi. Slaganje virusne čestice odvija se na unutarnjim membranama stanice (Golgijska membrana),

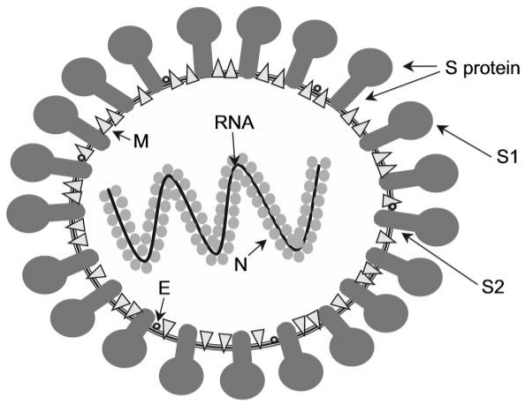
a najviše zrelih virusnih čestica (slika 3) napušta uništenu stanicu domaćina unutar 12 sati od infekcije pri temperaturi od 37°C (Jackwood i de Wit, 2013).



Slika 1. Shematski prikaz organizacije linearnog genoma virusa ptičjeg infektivnog bronhitisa (Cavanagh, 2005). Genom je lociran između dvije netranslatirajuće regije 5' UTR i 3' UTR (eng. UTR = Untranslated region). Prvi gen, koji zauzima otprilike dvije trećine genoma, kodira nekoliko proteina potrebnih za replikaciju i transkripciju RNA. Svi virusi obitelji *Coronaviruses* sadrže gen S (eng. spike: šiljak; glikoproteinski izdanak), gen M (eng. matrix: matriks) te gen N (eng. nucleocapsid: nukleokapsidni omotač) u istom redoslijedu. Genomi virusa unutar roda *Coronaviridae* razlikuju se po broju i lokaciji gena koji kodiraju nestrukturane proteine (ns) smještene između gena koji kodiraju strukturne proteine. Virus ptičjeg infektivnog bronhitisa ima dva takva gena, 3 i 5, koji kodiraju četiri nestrukturna proteina (ns) 3a, 3b, 5a i 5b. Protein E (eng. envelope: lipidna ovojnica) kodiran je trećim ORF-om gena 3 (eng. ORF = Open Reading Frame; otvoren okvir čitanja genoma).



Slika 2. Prikaz glikoproteina izdanka (eng. Spike protein, S) virusa ptičjeg infektivnog bronhitisa, varijanta M41. Proteinska sekvenca pod brojem P12651 povučena je s baze podataka UniProt (EMBL-EBI, UK; SIB, Switzerland; PIR, US., 2019) te je pomoću Swiss modelera (Biozentrum, University of Basel, 2019) predviđen homologni model proteina.



Slika 3. Shematski prikaz virusne čestice ptičjeg infektivnog bronhitisa (Cavanagh, 2005). Virusna čestica se sastoji od lipidne ovojnice povezane s viralnim RNA genom približne duljine 27,6 kb te četiri strukturalna proteina. Protein N (eng. nucleocapsid protein gene; N) okružuje RNA. Preostala tri proteina locirane su u ovojnici. Protein E (eng. envelope protein; E) prisutan je samo u tragovima te je potreban samo u sastavljanju virusne čestice. Na površini je veliki protein S (eng. spike protein gene; S). Protein M (eng. matrix protein gene; M) je najbrojniji među svim proteinima ovojnice te stvara interakcije između proteina S, E i N.

2.3.2. Epidemiologija i patologija nastanka bolesti

Premda purice, golubovi i neke druge ptice također mogu biti inficirane bez obolijevanja, virus ptičjeg infektivnog bronhitisa ima tropizam prema peradi (Cavanagh, 2005). Neki serotipovi su geografski udaljeni, ali obično više serotipova cirkulira na istom geografskom području. Kao što je spomenuto, varijant QX, prvotno izoliran u Kini, postao je uobičajen u državama diljem Europe i Australije (Sun i sur., 2011). Virus se replicira i stvara lezije u nekoliko tipova epitelnog tkiva uključujući ona u respiratornom traktu (nosnice, Harderianova žlijezda, traheje, pluća i zračna vrećica), bubrezima i gonadama (jajnici i testisi). Putevi infekcije su preko sluzi iz traheja ili fecesa zaraženih pilića, može se širiti aerosolom, kontaminiranom hranom i vodom te opremom i odjećom (Lin, 2017). Moguća je izolacija virusa iz pilića inficiranih prirodnim putem i pilića inficiranih živim cjepivom do 20 tjedana nakon infekcije. Period inkubacije traje od 18 do 36 h s najvećim brojem virusnih čestica izoliranih iz dišnog trakta 3 do 5 dana nakon infekcije (Cavanagh i Gelb, 2008). Ozbiljnost bolesti ovisi o varijantu i soju virusa, starosnom i imunskom stanju pileta, prehrani i temperaturi organizma. Dodatno, infekcija s virusom ptičjeg infektivnog bronhitisa povećava vjerojatnost koinfekcije s nekim od oportunističkih patogena; *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Escherichia coli* i/ili *Avibacterium paragallinarum* (Cook i sur., 2012), što dovodi do pogoršavanja bolesti.

Prilikom infekcije šansa od obolijevanja je približno 100%. Ptice obično kašlju, kišu i imaju bol u trahejama tijekom 10 do 14 dana. Bolest je popraćena smanjenim apetitom, što rezultira velikim gubitkom na masi. Kod nesilica se smanjuje proizvodnja jaja za 70%; jaja su manja, nejednakog oblika, s tankim, blijedim ljuskama. U većini slučajeva, nakon 8 tjedana se proizvodnja jaja i njihova kvaliteta vrati na stanje prije infekcije. Smrtnost ovisi o virulenciji serotipa, dobi, imunostom statusu (aktivni ili pasivni) te stresovima kao što je hladnoća i sekundarna koinfekcija. Umjeren do ozbiljna razina smrtnosti je primijećena kod sojeva koji izazivaju infekcije dišnog puta i bubrega kao što su sjevernoamerički Delaware 072 i australski soj T (Cavanagh i Naqi, 2003). Spol i način ishrane peradi su dodatni faktori koji doprinose bolestima bubrega (Cumming, 1969). Pilići mlađi od 6 tjedana umiru u 25% slučajeva, dok se nakon 6 tjedana starosti smrtnost znatno smanjuje. Međutim, postoje iznimke gdje je 45% uginuća pilića starih 10 tjedana prijavljeno na jednoj farmi (Lister, 1985), dok je na drugoj prijavljeno čak 15% uginuća odraslih kokoši. Koinfekcija s nefropatogenim bakterijama povećava smrtnost do 60% (Jackwood i sur, 2013). U slučaju infekcije s ispitivanim varijantom, QX kod nesilica dolazi do teškog oblika konjunktivitisa povezan s obilnim suženjem, naticanjem lica i celulitisom tkiva. Također, kod nesilica je primijećeno otežano kretanje i depresija. Simptomi traju do 96 h nakon infekcije kada se postepeno smanjuju do ozdravljenja (Terrerino, 2008). Kod infekcije s QX varijantom zabilježena je smrtnost od 20% (Cavanagh i Gelb, 2008). Embriji inficirani virusom ptičjeg infektivnog bronhitisa su patuljastog rasta, svijeni i ne razvijaju se pravilno što je prikazano na slici 4.



Slika 4. Usporedba izgleda zdravog 16-dnevnog embrija i 16-dnevnog embrija iste starosti inficiranog virusom ptičjeg infektivnog bronhitisa (Cavanagh i Gelb, 2008). Oboljeli 16-dnevni embrio ima zakrčljalo tijelo, savijeno i obavija ga deblja alantoisna membrana u odnosu na zdravi embrio.

2.3.3. Identifikacija virusa ptičjeg infektivnog bronhitisa

Uspješna identifikacija soja virusa ptičjeg infektivnog bronhitisa ovisi o nekoliko parametara; vremenski razmak između početka infekcije i uzorkovanja, razina imuniteta pilića u trenutku infekcije, broj uzrokovanih ptica, odabir i kvaliteta uzorkovanih organa, genetika ptice, sustav uzgoja ptica i moguća imunosupresija (de Witt, 2014). Pri identifikaciji se određuju serotip i genotip virusa.

Točan serotip virusa ptičjeg infektivnog bronhitisa se definira specifičnim antitijelima koje organizam proizvodi kao odgovor na epitope S proteina te se tradicionalno određuju reakcijom inhibicije hemaglutinacije ili neutralizacijskim testom virusa na embrioniranim jajima ili kulturama stanica (Jackwood i de Wit, 2013). Hemaglutinacija (HA) je postupak kojim se mjeri koncentracija virusa u alantoisnoj tekućini ili tekućoj fazi stanične kulture. Hemaglutinirajući epitopi virusa u alantoisnoj tekućini vežu se za sijalinsku kiselinu na eritrocitima kokoši te tvore agregate u obliku mrežice ili plašta. Kako bi se tipizirao izolirani virus koriste se specifična monoklonska protutijela u testu inhibicije hemaglutinacije (IH). Pozitivan ishod testa točnije dokaz serotipa virusa su eritrociti koji se talože na dno, jer su virusni hemaglutinini blokirani specifičnim monoklonskim protutijelima (Ruano, 2000). Test neutralizacije seruma detektira antitijela domaćina koja mogu inhibirati antigene soja virusa odgovorne za replikaciju virusa u stanicama domaćina, a razlikuju se od serotipa do serotipa virusa (Payne, 2017). Primjerice, ako postoje 3 antitijela koja neutraliziraju antigene virusa, zadovoljavajuće cjepivo mora imati sposobnost inducirati diferencijaciju sva 3 antitijela kako bi pružila adekvatnu zaštitu u dodiru s virusom (Cowen i Hitchner, 1975). Iako mogu pružiti točno utvrđivanje serotipova u većini slučajeva, te se metode detekcije virusa ptičjeg infektivnog bronhitisa izbjegavaju s obzirom na to da nisu specifične prema svim varijantima i nisu ekonomične. U svhu identifikacije antigena virusa mogu se koristiti ekonomičnije metode sa specifičnim monoklonskim antitijelima (eng. Monoclonal antibody; Mab). Prvi je takav test ELISA (eng. Enzyme Linked Immunosorbent Assay), koji se zasniva na vezanju epitopa (na antigenima) ispitivanog virusa s monoklonskim antitijelima prethodno povezanih s enzimom, nakon čega slijedi dodavanje supstrata i enzimska reakcija pri čemu dolazi do obojenja i dokazivanja postojanja antigena (Parvaanni, 2016). Druga metoda detektiranja antigena pomoću monoklonskih antitijela je imunofluorescencija kojom se vezanje antigena i specifičnog monoklonskog antitijela vizualizira fluorescencijom (OIE, 2018a). Mab stupa u interakcije samo s jednim ili manjim brojem epitopa antigena virusa, stoga test rezultira određivanjem specifičnog serotipa (Koch i sur., 1986). S druge strane, mutacija jednog nukleotida koja rezultira zamjenom aminokiseline u epitopu s kojim Mab stupa u interakciju

uzrokuje ne prepoznavanje epitopa. Problem se može reducirati upotrebom poliklonalnih antitijela usmjerenih prema više epitopa (Zwaagstra, 1992). Serotipovi se mogu razlikovati uspoređujući nukleotidne sekvence gena S1. Ako dva virusa dijele više od 95% sekvence, smatraju se virusima istog serotipa. S druge se pak strane virusi smatraju različitim serotipovima ako su im sekvence sličnosti manje od 85% (Cavanagh, 2005), međutim postoje iznimke. Primjerice, uspoređujući nukleotidne sekvence dva se soja razlikuju po svojim genomima 7%, no upotrebom testa neutralizacije virusa, ta dva soja ekspimiraju iste epitope što znači da su istog serotipa. To implicira postojanje mutacije u nukleotidima koja ne rezultira prevođenjem u novu aminokiselinu pri čemu je epitop konzerviran. Iz tog razloga je pri identifikaciji sojeva potrebna unakrsna analiza na razini nekoliko testova. Serotipovi virusa ptičjeg infektivnog bronhitisa nastaju kao odgovor na molekularne mehanizme evolucije poput genetičkog pomaka (eng. Genetic shift) tijekom rekombinacijskih događaja (Kusters i sur., 1990) te genetičkog strujanja (eng. Genetic drift) kao posljedica nakupljanja mutacija zbog prirodnog mehanizma replikacije virusa sa RNA polimerazom niske pouzdanosti (Hanada i sur., 2004). Također, zbog korištenja cjepiva, virus se zbog izloženosti selektivnom pritisku prilagođava na okoliš pri čemu nastaju mutacije (Jackwood i sur., 2012).

Precizna identifikacija viralnog genoma temelji se na metodi koja koristi analizu gena, mutiranih ili originalnih sojeva. Korak koji joj prethodi je RNA ekstrakcija iz obrisa renalne tekućine pilića na terenu. Za početak se pomoću RT-PCR-a (eng. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction; lančana reakcija polimeraze reverznom transkripcijom) s početnicama cilja regija 5'-UTR-a, konzervirana regija virusa ptičjeg infektivnog bronhitisa kako bi se dokazao virus (OIEa, 2018). PCR produkti pozitivni na virus potom se ponovno analiziraju pomoću drugog seta real-time PCR reakcija s početnicama koje umnažaju konzerviranu regiju gena koji kodira za podjedinicu S1 proteina S (Valastro i sur, 2010). Na tom dijelu gena S1 nalaze se 3 poznate regije hipervarijabilnih sekvenci (eng. hypervariable sequence region; HVR sekvenca) koje kodiraju epitope antigena koja stupaju u veze s antitijelima domaćina. Pomoću real-time PCR-a serotipovi se mogu razlikovati prema HVR sekvencama (Jordan, 2017). Komercijalno su dostupne početnice u oba smjera koje ciljaju dvije HVR sekvence podjedinice S1 kojima se dokazuju varijanti Massachusetts (Mass), Connecticut, Arkansas, JMK, DE/072/92 and California (Gelb, 2005). U slučaju potrebe razlikovanja novih varijanta i sojeva naručuju se posebno dizajnirane početnice za svaki soj. RT-PCR može se koristiti u slučajevima s ograničenom količinom RNA izuzete s brisa ptice na terenu te u slučajevima prethodne propagacije virusa u embrioniranim SPF jajima. Kod niske koncentracije genetičkog materijala, RNA iz uzorka se umnoži s RT-PCR-om nakon čega

slijedi restrikcija enzimima koji prepoznaju SNP-ove (eng. single nucleotide polymorphisms; SNPs) te na tim dijelovima cijepaju RT-PCR produkte. Oni se potom analiziraju pomoću elektroforeze u agaroznom gelu ili se koristi dostupna baza (GenBank) kako bi se uspoređivale sekvence. S obzirom na veliku stopu cijepjenja peradi živim cjepivom, prije postavljanja dijagnoze u laboratoriju potrebno je usporediti sekvence izoliranog „divljeg tipa“ s genomom živog cjepiva kako bi se eliminirao lažno pozitivan rezultat (Cavanagh i Gelb, 2008).

2.3.4. Kontrola infekcije

Ne postoji lijek koji bi promijenio tijek infekcije virusom ptičjeg infektivnog bronhitisa. Antimikrobna terapija usmjerena protiv oportunističkih patogena može reducirati stopu smrtnosti. Ipak, najučinkovitiji oblik zaštite je cijepjenje pilića starih od 1 do 14 dana u obliku spreja, u vodi za piće ili kapanjem u oči (Cargill, 1999). Cijepjenje se ponavlja s različitim serotipovima kako bi se inducirala zaštita protiv širokog broja različitih tipova virusa ptičjeg infektivnog bronhitisa. Atenuirana ili inaktivirana cjepiva primjenjuju se kod peradi uzgajane za meso i kod nesilica kako ne bi došlo do smanjenja u proizvodnji jaja.

Poznato je kako cjepiva sa samo jednim serotipom virusa nisu dovoljno adekvatna u zaštiti od infekcije heterolognim genomima. Iz tog razloga, proizvođači cjepiva na tržište stavljaju nekoliko cjepiva s različitim serotipovima virusa. Takva „multi – monovalentna“ strategija zahtjeva učestalo cijepjenje s najmanje dva različita serotipa. Tako se inducira diferencijacija neutralizirajućih antitijela protiv serotipova cjepiva i štiti organizam od sekundarne infekcije oportunističkim patogenima. Kako bi bila uspješna, ova strategija mora omogućiti cjepivo sa svakim novootkrivenim serotipom virusa (Jackwood i de Wit, 2013). Konstantna evolucija virusa predstavlja izazov za proizvođače cjepiva što je ujedno i najveći nedostatak ove strategije. Druga strategija, poznata pod nazivom „protektotip“, kroz cjepivo s dva serotipa virusa omogućuje zaštitu organizmu od širokog spektra heterolognih viralnih genoma (Cook, 1999). Ova se strategija, za razliku od prethodne, ne bazira na indukciji diferencijacije neutralizirajućih antitijela nego na reduciranju infekcije uzrokovane virusom ptičjeg infektivnog bronhitisa kako bi se reduciralo uništenje cilija u trahejama i tako spriječile sekundarne infekcije (Cook, 2012). „Protektotip“ strategija koristi serotipove Mass i 793/B kao najraširenije serotipove u svijetu, koji omogućuju najveću unakrsnu zaštitu, pogotovo ako se Mass serotip daje na dan izlijevanja pileta a 793/B 14 dana kasnije (Terregino i sur., 2008). Međutim, iako je Mass cjepivo dostupno u gotovo svim državama, serotip 793/B nije tako čest u državama diljem svijeta pa se njegovo uvođenje u države u kojima nije prirodno izoliran dovodi u kontroverziju. Iz tog je razloga nekoliko drugih kombinacija ispitano (Bru i sur.,

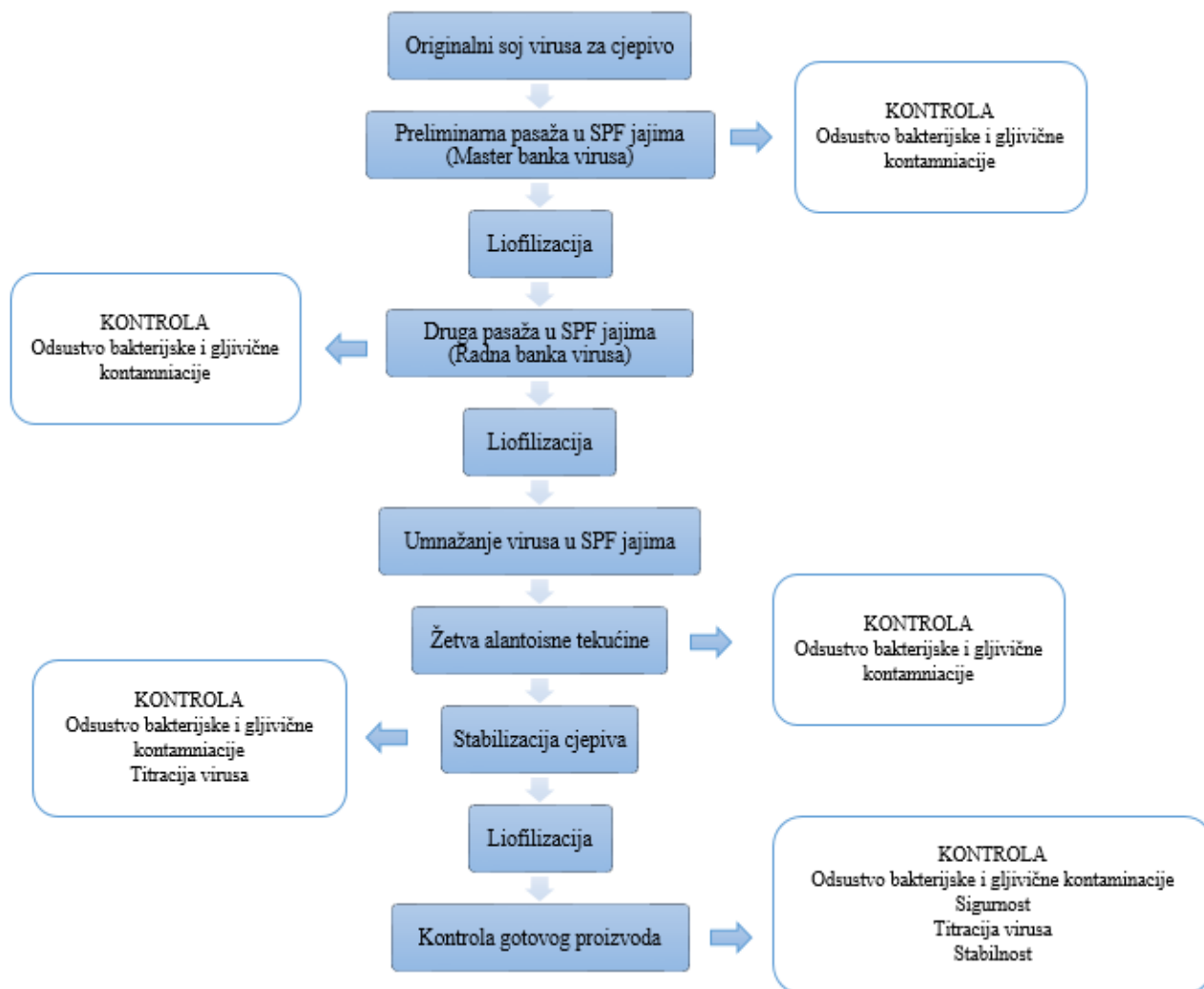
2016; Jackwood i sur., 2015), ali ni jedno nije pokazalo značaj kao kombinacija Mass i 793/B cjepiva.

U fazu kliničkih ispitivanja došla su rekombinantna cjepiva koja eksprimiraju antigene S proteina i kombinirana su s antigenima drugih patogena, no moraju pokazati ista zaštitna svojstva kao i živa oslabljena cjepiva (Yang i sur., 2016).

Centar za životinjsko zdravlje u Deventer-u proveo je istraživanje koje je pokazalo kako jedna primjena živog cjepiva serotipa Mass 41 ne pruža dovoljnu zaštitu protiv izolata QX, soja D388 (Landman i sur., 2005). Bolja zaštita omogućena je ako se u program cijepjenja uključe drugi serotipovi virusa. Primjerice, cijepjenje pilića starih jedan dan s cjepivom serotipa Mass, popraćeno s cjepivom serotipa 4/91 nakon 13 dana. Ta činjenica ide u prilog strategiji „protektotipa“. Nedavna istraživanja pokazala su kako su sojevi SZ130 (Yan, 2018), YN (Zhao, 2015) i L1148 (Listorti, 2017) povoljni kandidati za izradu živih monovalentnih cjepiva varijanta QX.

2.4. Razvoj i proizvodnja živog cjepiva ptičjeg infektivnog bronhitisa

Proizvodnom ciklusu u industrijskom mjerilu prethodi razvoj cjepiva u laboratoriju te kliničko ispitivanje. Proces razvoja cjepiva za virus ptičjeg infektivnog bronhitisa sastoji se od uzgoja virusa, određivanja doze koja izaziva promjene kod 50 % inficiranih supstrata (kulture stanica ili eksperimentalnih životinja), te optimizacije procesa kako bi cjepivo s virusom imuniziralo pile bez smrtnog ishoda. Optimizacija je ispitivanje uvjeta uzgoja virusa kako bi se dobio dovoljno visok titar koji uzrokuje imuni odgovor pilića. Ispituju se bitni faktori uzgoja (starost embrija, mjesto izolacije virusa, mjesta vezanja virusa, temperatura i trajanje inkubacije inokuliranih jaja), titracije (različiti dobavljači embrija/ staničnih kultura, pasaža stanica, početna koncentracija stanica prije inokulacije virusom, vrijeme adsorpcije virusa, utjecaj svjetla i tame, temperatura i trajanje inkubacije), skladištenja (temperatura i vrijeme čuvanja, utjecaj svjetlosti). Proizvodni proces u malom i velikom mjerilu razlikuju se u količini pripremljenog cjepiva i korištenih resursa. Slikom 5 prikazani su glavni koraci u proizvodnji cjepiva virusa ptičjeg infektivnog bronhitisa.



Slika 5. Shematski prikaz slijeda postupaka u proizvodnji cjepiva ptičjeg infektivnog bronhitisa (Mowat i Rweyemamu, 1997). Svaki proces proizvodnje cjepiva započinje odabirom soja kandidata, stvaranjem matičnog virusa, radnog virusa koji se koristi za proizvodnju cjepiva u pojedinim šaržama. Kako bi se virus umnožio u dovoljnoj količini razvija se u embrioniranim SPF jajima, inficirana alantoisna tekućina se miješa sa stabilizatorom te liofilizira. Liofilizacijom se osigurava produljenje roka valjanosti cjepiva, lakše skladištenje i transport. Kontrola gotovog proizvoda se provodi kako bi se osiguralo odsustvo bakterijske i gljivične kontaminacije, sigurnost, stabilnost i zadovoljavajući titar virusa cjepiva.

Originalni virusi za proizvodnju cjepiva čuvaju se sustavom takozvanih „banki sojeva“ (OIE, 2018d). Ishodni virus za proizvodnju cjepiva naziva se matični virus i čuva se u kontroliranim uvjetima te testira nakon određenog vremena u svrhu kontrole kvalitete. Matični virus umnaža se najčešće u 10-dnevnim do 12-dnevnim embrioniranim SPF jajima kako bi se dobile velike količine. Alikvoti matičnog virusa čuvaju se na -80°C . Iz tih alikvota pasažom se

dobije radni virus koji se umnaža do količine dostatne za proizvodnju cjepiva tijekom najmanje 6 do 12 mjeseci. Daljnjom pasažom iz alikvota radnog virusa nastaje virus za proizvodnju cjepiva serije (šarže). Na taj se način osigurava genetički jednak soj virusa za proizvodnju svake šarže cjepiva, jer svaki virus u cjepivu potječe iz istog originala matičnog virusa. Virus u pojedinoj šarži cjepiva smije biti samo do 5 pasaža udaljen od matičnog virusa. Ako matični virus sadrži bilo kakve strane agense, osim specifičnog virusa, odbacuje se za proizvodnju cjepiva.

Virus ptičjeg infektivnog bronhitisa u svijetu je rasprostranjen u obliku različitih serotipova. „Divlji tip“ izolira se uzimanjem brisa mukozne sluzi traheja bolesnih ptica ili kao homogenat virusom zahvaćenog tkiva traheja ili bubrega suspendiran u PBS-u (eng. Phosphate Buffered Saline; PBS). Izolat se transportira u hladnom mediju s penicilinom i streptomycinom, dodaje se antibiotik specifičan za virus cjepiva, pročisti u laboratoriju te se uzgaja u 12-dnevnim SPF embrioniranim jajima kako bi se utvrdio serotip i genotip soja varijanta virusa. Podaci o podrijetlu, datum izolacije iz okoliša, povijest o broju pasaža (uključujući postupke karakterizacije i uvjeta skladištenja) te uvjeti čuvanja bilježe se za svaki virus u sustavu (OIE, 2018b).

Oslabljena živa cjepiva ptičjeg infektivnog bronhitisa razlikuju se na razini atenuacije. Atenuacija se definira kao nedostatak kliničkih poteškoća u disanju koji bi bili povezani s bolešću, odnosno cjepivom (Jordan, 2017). Postoje slabo virulentni sojevi koje nije potrebno oslabljivati, te visoko virulentni sojevi koje je potrebno atenuirati nekom od metoda; pasažiranjem u embrioniranim jajima, inkubacijom pod visokom temperaturom (Jackwood, 2010) ili kemijskim agensima. Visoko virulentna cjepiva koriste se za pojačavanje imunizacijskog učinka, primjenjuju se kroz 7 do 10 dana obično putem vode za piće. Slabo virulentna cjepiva pogodna su za piliće s niskom razinom urođenog imuniteta, a dodatna prednost pred visoko virulentnim cjepivima je odsustvo reakcije respiratornog sustava te ne dovode do pada brzine rasta pilića. Nedostatak slabo virulentnih cjepiva u odnosu na visoko virulentna cjepiva je niska razina imuniteta koji cjepivo omogućuje, kao i zaštita koju pruža samo tkivu respiratornog trakta. U slučaju infekcije s drugim sojem virusa organizmu stradaju bubrezi ili reproduktivni trakt (Ignjatović, 2000). Kako se virus najbolje umnaža u embrijima, metoda oslabljivanja cjepiva zadržala se od 1950. godine kada je uzgojeno prvo cjepivo do danas. Titar čak do 100 puta veći dobije se uzgojem virusa ptičjeg infektivnog bronhitisa u embrioniranim SPF jajima u odnosu na virus umnožen u staničnoj kulturi embrija pilećih bubrega (eng. Chicken Embryonic Kidney cells; CEK) (Cavanagh i Gelb, 2008). Inokulirana SPF jaja se inkubiraju u inkubatoru za jaja te se lampiranjem prati preživljenje embrija. Prvi dan

kada se primijeti uginuće jednog ili više embrija, izolat alantiosne tekućine uginulih embrija inokulira se dalje u embrionirana SPF jaja. Nakon određenog niza pasaža, što ovisi od soja do soja varijanta virusa ptičjeg infektivnog bronhitisa, izolati alantoinskih tekućina tih embrija ispituju se kao moguća cjepiva (Cavanagh i Gelb, 2008). Do oslabljivanja dolazi uslijed prilagodbe virusa na embrije brojnim mutacijama u genomu zbog kojih više ne može izazvati bolest kod odraslih ptica, za razliku od originalnog soja „divljeg tipa“ virusa. Virus sličan varijantu QX ispitivan u ovom diplomskom radu, atenuiran je kroz više od 50 pasaže.

Nakon identifikacije i oslabljivanja virusa pristupa se propagaciji virusa u embrioniranim jajima. U industriji se koristi velik broj takvih jaja svaki dan kako bi se proizvela dostatna količina cjepiva. Inokulacija jaja virusom i žetva alantoinse tekućine s umnoženim virusom odvijaju se kao i u laboratorijskim uvjetima samo s povećanim količinama. Zato se ispitivanjem optimalnih uvjeta uzgoja u embrioniranim jajima u laboratoriju postavljaju temelji proizvodnje u industrijskom mjerilu.

Nadalje, cjepivo je potrebno skladištiti i transportirati do veterinarskih stanica, najbolja metoda održavanja virulencije je liofilizacija (Apontoweil i Krasselt, 1987). Liofilizacija je sušenje u smrznutom stanju sublimacijom leda u vakuumu i uglavnom se primjenjuje u procesu proizvodnje cjepiva jer su ona osjetljiva na toplinu. Liofilizirana cjepiva svake šarže pakiraju se u staklene ampule i uglavnom se skladište na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kod proizvođača te na $2 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom upotrebe. S obzirom na to da se virulencija živog cjepiva može proporcionalno smanjivati tijekom čuvanja i skladištenja, u medij za liofilizaciju se dodaju stabilizatori, kako bi cjepivo održalo svoju efektivnost. Stabilnost cjepiva je bitna pogotovo u mjestima gdje je nemoguće održavati potrebnu hladnoću za skladištenje. Neke bitne karakteristike stabilizatora su imunološka i farmakološka inertnost, termostabilnost, niska cijena, dostupnost, brza rehidracija, jednostavna sterilizacija. Stabilizatori za živa virusna cjepiva za veterinu uglavnom sadržavaju disaharid, protein i pufer (Mowat i Rweyemamu, 1997). Disaharidi (saharoza, trehaloza) se ponašaju kao stabilizatori proteina tijekom smrzavanja i sušenja jer zamjenjuju vodu na mjestima za vezanje vodika. Također, tijekom sušenja stabiliziraju i fosfolipidnu membranu jer stupaju u interakcije s polarnim dijelovima fosfolipidnih grupa, tako zamjenjujući vodu (Ohtake i sur, 2011). Proteini (lizozim, goveđi serumski albumin, triptoza) imaju ulogu povećanja strukturalne stabilnosti liofilizacijskog kolačića kako ne bi došlo do raspadanja kolačića. U svrhu stabilizacije često se koristi 0,2% obrano mlijeko koje produljuje virulentnost cjepiva nakon rehidracije.

Tijekom razvoja cjepiva potrebno je provesti testove u skladu s Europskom farmakopejom kako bi se pokazalo da je cjepivo sigurno, učinkovito i odgovarajuće kvalitete (Europska farmakopeja, 2017a, Europska farmakopeja, 2017b):

1. Testovi dokazivanja **sigurnosti** obuhvaćaju testove sigurnosti cjepiva za dišni i reproduktivni sustav te bubrege. Primjenjuje se cjepivo koje je atenuirano najmanjim brojem pasaža, odnosno cjepivo radnog virusa. To cjepivo mora imati najmanje 10 puta veći titar virusa nego što maksimalno može sadržavati jedna doza cjepiva. Kod određivanja utjecaja cjepiva na dišni sustav i bubrege koriste se SPF pilići minimalne preporučene starosti za cijepljenje i zabilježava im se cilijarna aktivnost. Izolati bubrega se ispituju histopatološki na postojanje inflamatornih lezija kao posljedicu infekcije virusom. Ako ni jedna ispitana životinja nije umrla od posljedica povezanih s cjepivom ili se inficirala virusom ptičjeg infektivnog bronhitisa, cjepivo se smatra sigurnim. Dokazivanje utjecaja cjepiva na reproduktivni trakt izvodi se cijepljenjem ženskih SPF pilića mlađih od 3 tjedna koje su resproduktivno zrele. Ako su abnormalnosti uočene kod manje od 5% ovidukta, cjepivo je sigurno.
2. **Učinkovitost** cjepiva ispituje se na dva moguća načina; određivanjem cilijarne aktivnosti i ponovnom izolacijom virusa iz cijepljene peradi. U oba slučaja koristi se cjepivo minimalnog titra virusa označenog na gotovom proizvodu atenuirano kroz najveći broj pasaža, odnosno cjepivo jedne šarže. Cilijarna aktivnost se određuje cijepljenjem SPF pilića, koji se nakon 21. dana od cijepljenja zaraze virusom ptičjeg infektivnog bronhitisa istog virusa koji je u cjepivu. Cjepivo se smatra učinkovitim ako više od 80% inficiranih cijepljenih pilića ima normalnu cilijarnu aktivnost. Ponovna izolacija uključuje cijepljenje SPF pilića, infekciju tih pilića virusom soja cjepiva te uzimanje briseva mukozne sluzi iz traheja inficiranih, cijepljenih pilića. Nakon toga se suspenzija mukozne sluzi uzgaja u embrioniranim SPF jajima. Ako se iz alantoinnih tekućina izolira virus iz više od 20% cijepljenih pilića, cjepivo nije učinkovito.
3. Testovi na svakoj **šarži cjepiva** uključuju (i ne ograničavaju se na) identifikaciju antigena virusa, određivanje titra virusa i udjela vlage, koji mora biti u skladu s navedenim vrijednostima na proizvodu. U slučaju kad se radi o živom virusnom cjepivu proizvedenom na embrioniranim jajima i namijenjenom za ne-parenteralnu primjenu, umjesto sterilnosti ispituje se odsustvo bakterijske i gljivične kontaminacije. Nakon kultivacije jedne doze cjepiva na podlogama, ne smije biti identificiran ni jedan patogeni mikroorganizam niti više od jednog nepatogenog mikroorganizma kako bi cjepivo bilo

valjano. Nadalje, kod živih virusnih cjepiva potrebno je provesti testove odsutnosti stranih agenasa te mikoplazmi.

4. Testovi **stabilnosti** provode se kako bi proizvođač opravdao rok valjanosti cjepiva. Dokazuje se u vidu rezultata titracija virusa gotovog cjepiva najmanje tri uzastopne šarže testirane tijekom redovnih vremenskih intervala sve do 3 mjeseca nakon isteka roka valjanosti. Također, tim rezultatima se dodaju podaci o udjelu vlage u liofilizatu. Cjepiva koja se testiraju su čuvana pod uvjetima propisanim od proizvođača.

2.5. Dizajn eksperimenata

Dizajn eksperimenta (eng. Design of Experiments; DoE) 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). Dizajnom eksperimenta čine se namjerne ili svrhovite promjene varijabli koje se mogu kontrolirati u nekom sustavu ili procesu, promatraju se povratne informacije rezultata te se na temelju toga zaključuje i odlučuje koje su varijable odgovorne za promjene rezultata. Kako bi se zaključci statistički potkrijepili, važno je integrirati jednostavne ali moćne statističke metode u metodologiju dizajna eksperimenta. Osnovni razlog implementacije dizajna eksperimenta je reducirati utrošeno vrijeme i resurse na ispitivanje svih mogućih kombinacija parametara pojedinačno i njihovih međusobnih utjecaja na ukupni prinos procesa (Coffey i Yang, 2018). DoE započinje određivanjem ciljeva i odabirom procesnih faktora koji se žele ispitati. Dobro odabran DoE povećava količinu informacija koje se mogu prikupiti za date eksperimente. Neki od glavnih ciljeva dizajna eksperimenata mogu biti (Anderson i Withcomb, 2015):

- Utvrđivanje varijable ili seta varijabli koje imaju utjecaj na rezultat Y
- Utvrđivanje optimalne vrijednosti svih važnih faktora X kako bi uvijek davale približno istu vrijednost rezultata Y
- Utvrđivanje optimalne vrijednosti svih važnih faktora X kako bi varijacija između rezultata Y bila mala.

Eksperimenti mogu biti statistički dizajnirani koristeći klasični pristup Sir Ronaldalda Fishera (Preece, 1990), pristup ortogonalnih kolona dr. Genichi Taguchi (Roy, 2001) ili pristup pretraživanja varijabli kojeg zagovara dr. Dorian Shainin (Ledolter i Swersey, 1997). Ovaj rad fokusiran je na klasični pristup kojeg je predložio Sir Ronald Fisher. Na ovom pristupu temeljen je, među ostalim, faktorijalni dizajn eksperimenata (Montgomery, 2017).

2.5.1. Osnovni pojmovi dizajna eksperimenata

Faktori su procesni ulazni parametri koji se ispituju na razinama. Ulazni parametri se najčešće označavaju sa „X“ i dodjeljuju im se brojevi kako bi se razlikovali. Mogu biti numerički (primjerice temperatura) ili kategorički (primjerice dobavljač kemikalija). Razine su kvalitativno i kvantitativno mjerljive vrijednosti, odnosno postavljene granice faktora koje se pomoću DoE-a ispituju (Anderson i Whitcomb, 2015). Tako se faktori mogu ispitivati na dvije, tri ili više razina, ovisno o samom faktoru.

Ako se u sklopu dizajna eksperimenta pravilno primjene nasumičnost izvedbe pokusa, ponavljanje i podjela pokusa na blokove, dolazi do poboljšanja učinkovitosti ispitivanja (Antony, 2003a). Ta tri principa reduciraju ili čak otklanjaju eksperimentalnu pristranost. Važno je naglasiti kako bi eksperimentalna pristranost mogla rezultirati pogrešnim optimalnim vrijednostima ili maskirati učinke značajnih faktora.

Ponavljjanje je proces izvođenja eksperimentalnih pokusa nasumičnim redoslijedom. Implicira se ponavljanje cijelog seta eksperimentalnih pokusa ili samo dijela seta pod različitim uvjetima. Ponavljjanje je važno zbog dva svojstva. Prvo svojstvo je što omogućuje izračun procjene eksperimentalne standardne greške (S_E). Drugo je svojstvo što dozvoljava osobi koja vrši eksperimente precizniju procjenu učinka faktora ili međudjelovanja. U suprotnom slučaju, kada bi broj ponavljanja bio jednak 0 ili 1, ne bi se moglo sa sigurnošću valjano zaključiti (Montgomery i Runger, 2003e).

Podjela pokusa na blokove metoda je kojom se eliminira učinak vanjskih varijacija zbog pozadinskih faktora i tako povećava se učinkovitost dizajna eksperimenta. Glavni cilj je otklanjanje neželjenih izvora varijabilnosti kao što su razlike između dvije šarže ili dva dana. Ideja je grupirati slične eksperimentalne pokuse u blokove koji se izvode u različitim uvjetima.

U industriji se najčešće koriste potpuni faktorijski dizajn eksperimenata te djelomični faktorijski dizajn eksperimenata na dvije ili tri razine (Antony, 2014). Faktorijski dizajn omogućuje ispitivanje zajedničkog učinka faktora (odnosno procesnih parametara) na rezultate. Potpuni faktorijski dizajn eksperimenata sastoji se od izvođenja pokusa svih mogućih kombinacija na svim razinama za sve faktore. Djelomični faktorijski dizajn je DoE u kojem se izvode eksperimentalni pokusi samo adekvatno odabranih frakcija (dijelova) svih kombinacija sveukupnog dizajna eksperimenta (Montgomery, 2005). Ako je broj faktora, k , ispitivanih na dvije razine onda je broj ukupnih pokusa za ispitivanje svih kombinacija 2^k , što znači da broj ukupnih pokusa u potpunom faktorijskom dizajnu može postati velik. Primjerice, za dva faktora na dvije razine to je $2^2 = 4$ pokusa. No, za četiri faktora na tri razine, to je $3^4 = 81$ pokus. U industriji, to je puno utrošenog vremena i resursa za mali broj ispitanih faktora. Taj se

problem rješava odabiranjem $\frac{1}{2}$ ili $\frac{1}{4}$ kombinacija potpunog faktorijalnog dizajna, odnosno jedne frakcije dizajna. Postoji nekoliko strategija koje, ako su pravilno implementirane u dizajn osiguravaju odabir frakcija kako bi se objektivno dobilo najviše moguće podataka o učincima. Svim strategijama je zajedničko što su ortogonalne i uravnotežene (NIST, 2012a).

U ovom radu, kako bi se ispitale granice uzgoja virusa infektivnog ptičjeg bronhitisa u svrhu razvoja cjepiva, korišten je potpuni faktorijalni dizajn eksperimenata s tri faktora na dvije razine s ponavljanjem pokusa u tri replikata.

2.5.2. Potpuni faktorijalni dizajn

Kao što je prethodnim odlomkom rada navedeno, potpuni faktorijalni dizajn sastoji se od izvođenja pokusa svih mogućih kombinacija na svim razinama. Jedan od najčešćih dizajna koristi 2^k potpuni faktorijalni dizajn, posebice u početku eksperimentalnog rada kada je broj faktora manji ili jednak 4. Pretpostavka na kojoj se temelji dizajn na dvije razine je skoro potpuna linearanost odziva za cijeli skup odabranih faktora (Antony, 2003a). Empirijski model koji odgovara eksperimentalnim podacima može biti linearni ili kvadratni (Montgomery i Rugner, 2003g). S obzirom na to da moderni softveri izostavljaju kvadratni model, za potrebe ovog rada korišten je linearni model s tri faktora, X_1 , X_2 i X_3 , koji se može se zapisati :

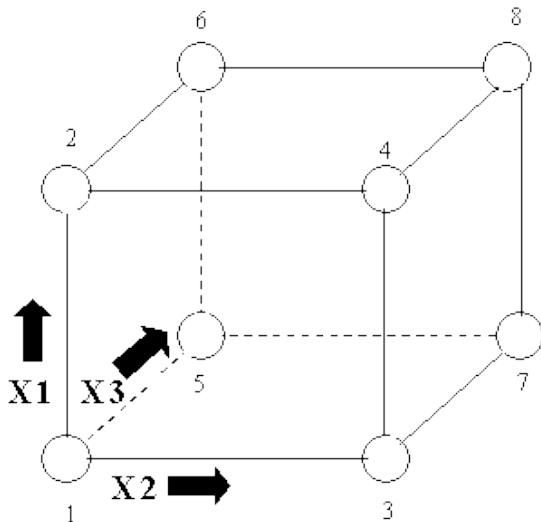
$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{123} X_1 X_2 X_3 + \varepsilon \quad (1)$$

gdje je Y = rezultat za dane razine glavnih učinaka X_1 , X_2 i X_3 , postoje $k(k-1)/2 = 3*2/2 = 3$ interakcije između 2 faktora; $X_1 X_2$, $X_1 X_3$, $X_2 X_3$, te 1 interakcija između 3 faktora; $X_1 X_2 X_3$. Tijekom analize konačnih rezultata eksperimenata svi nepoznati parametri „ β “ procjenjuju se kao koeficijenti glavnih učinaka. Oni se koriste u određivanju glavnih učinaka koji se značajno razlikuju od 0, a konstanta „ β_0 “ je rezultat Y dobiven kada su svi glavni efekti jednaki 0. ε predstavlja eksperimentalnu grešku (NIST, 2012a).

2.5.2.1. 2^3 Potpuni faktorijalni dizajn

U radu, 2^3 potpuni faktorijalni dizajn izabran je zbog važnosti analize učinaka glavnih faktora ali i njihovih međusobnih interakcija (Anderson i Whitcomb, 2015). Dakle, potpuni trofaktorski faktorijalni dizajn eksperimenata na dvije razine uključuje $2^3 = 8$ eksperimentalnih pokusa. Svaki pokus ponovljen je u tri replikata kako bi se točno procijenila eksperimentalna greška. Ovakva se vrsta dizajna može prikazati u obliku kocke (Montgomery, 2017) na slici 7.

Strelice pokazuju smjer povećanja faktora. Brojevi od 1 do 8 prikazani u kutevima kutije dizajna (eng. design box) predstavljaju standardni red pokusa. Standardni red pokusa je redni broj izvedbe pokusa i kod ponavljanja replikata bitno je održati konstante redne brojeve pokusa (NIST, 2012b).



Slika 6. Prikaz kutije dizajna za potpuni faktorijalni dizajn s tri faktora X1, X2, X3 na dvije razine (Montgomery, 2017). Strelice pokazuju smjer povećanja razina faktora. Brojevi od 1 do 8 prikazani u kutevima kutije dizajna predstavljaju standardni red pokusa.

Kad su svi faktori kodirani tako da „+1“ predstavlja „visoku“ i „-1“ predstavlja „nisku“ razinu, matrica dizajna svakog potpunog faktorijalnog dizajna eksperimenata ima stupce koji se ortogonalno uparuju te je zbroj svih stupaca jednak 0. Ortogonalnost je važna jer eliminira korelaciju (međudjelovanje) između glavnih učinaka i njihovih interakcija (Montgomery i Rugner, 2003b). Na tablici 2 prikazana je matrica dizajna za trofaktorski potpuni faktorijalni dizajn na dvije razine. Matrica je dobivena pomoću programa StatSoft Inc. Statistica 6.1. Kod 2^3 potpunog faktorijalnog dizajna razine se nazivaju „visoka“ i „niska“, a u matričnom sustavu zapisuju u obliku „+1“ za „visoku“ i „-1“ za „nisku“ razinu. Prvi stupac lijevo prikazuje ne-nasumične pokuse od 1 do 8 nazvane standardnim redom. Primjerice pokus 1 izvodi se na „niskoj“ razini sva 3 faktora, što se vidi i na slici 6.

Tablica 2. Primjer matrice dizajna eksperimenata. (Antony, 2003a)

Pokus	Faktor		
	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1

2.5.3. Primjena dizajna eksperimenata

Dizajn eksperimenata je višefunkcionalni alat koji može pomoći u brojnim situacijama u industrijskoj proizvodnji i razvoju novih proizvoda. Neke od primjena su izbor između alternativnih opcija, odabir ključnih faktora koji imaju utjecaj na odgovor (rezultate), testiranja robusnosti procesa (Kutle i sur., 2010), povećanja ili smanjenja odgovora rezultata, ispitivanje više ciljeva odjednom (Markušić i sur., 2013) te modeliranje regresijskih sustava.

Primjenom dizajna proizvodnja se poboljšava u smislu povećanja prinosa i stabilnosti procesa, povrata uloženog kapitala i povećanog profita. Također, moguće je smanjiti varijabilnosti procesa što dovodi do pozitivnog utjecaja na krajnji proizvod, smanjiti vrijeme proizvodnje i količinu resursa te omogućiti opće razumijevanje ključnih parametara procesa (Antony, 2003a).

Kako bi se ujednačilo implementiranje dizajna eksperimenata postoje određeni koraci pri praktičnom korištenju metodologije: faze planiranja, dizajniranja, izrade pokusa te analize rezultata (Montgomery, 2017).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije i oprema

3.1.1. Kemikalije

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

3.1.2. Oprema

- Laminarni kabinet s vertikalnim strujanjem zraka (eng. Laminar-flow cabinet; LF kabinet)
- Inkubatori za jaja (Fiem, Italija)
- Inkubator za kulture stanica (Memmert, Njemačka)
- Hladnjak
- Ultrazamrzivač (New Brunswick Scientific™ Innova U 725-G Upright Freezer, Fischer Scientific, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Vortkes mješalica
- Standardno sterilno posuđe za rad u laboratoriju s virusima, kulturama stanica i jajima
- Automatske pipete (5-50 μ L, 10-100 μ L, 20-200 μ L, 100-1000 μ L, 500-5000 μ L)
- Inverzni mikroskop (Olympus, Japan)
- Laboratorijska centrifuga (Andreas Hettich GmbH, Universal 320, Njemačka)

3.2. Metode rada

3.2.1. Dizajn eksperimenta

Dizajnom eksperimenata ispituju se 3 faktora i njihov utjecaj na rezultate uzgoja:

- X1 - starost embrija (starost embrioniranih SPF jaja za vrijeme inokulacije virusa; 10 ili 13 dana stari)
- X2 - titar inokuluma (titar virusa kojim se inokuliraju embrionirana SPF jaja; 2,0 ili 3,0 log TCID₅₀ mL⁻¹)
- X3 - vrijeme inkubacije inokuliranih embrioniranih SPF jaja; 18 ili 30h.

Viša i niža razina su navedene u odnosu na postojeće uvjete razvoja cjepiva za varijantu QX slične viruse ptičjeg infektivnog bronhitisa. 12-dnevni embriji inokuliraju se s 4,0 log TCID₅₀ mL⁻¹ te inkubiraju tijekom 24h. Dizajnom eksperimenta su ispitane gornje i donje granice uvjeta uzgoja virusa, odnosno faktori su ispitani na dvije razine kao što je navedeno u tablici 3. Niža razina je označena oznakom (-), dok je viša razina označena oznakom (+).

Tablica 3. Ispitani faktori i njihove razine

Faktori		Razina	
Oznaka	Opis	Niža razina (-)	Viša razina (+)
X1	Starost embrija (dani)	10	13
X2	Inokulum (log TCID ₅₀ mL ⁻¹)	2,0	3,0
X3	Vrijeme inkubacije (h)	18	30

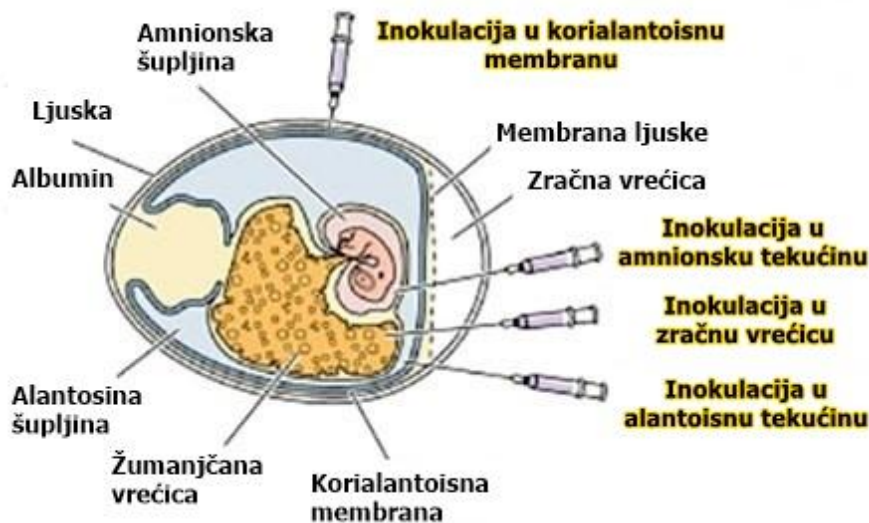
Za dizajn eksperimenta korišten je program StatSoft Inc. Statistica 6.1 (TIBCO) kako bi se predvidjeli bitni učinci i njihove interakcije na ukupni rezultat uzgoja virusa ptičjeg infektivnog bronhitisa sličnom varijantu QX. Korišten je potpuni faktorijalni dizajn eksperimenata s ponavljanjem na dvije razine s tri faktora, 2^{3-2} (2-broj razina, 3- broj faktora, 2- broj razina za svaki faktor) s ukupnim brojem pokusa $2^3 = 8$. Pokusi su označeni slovima od „A“ do „H“ te su svi izrađeni istovremeno unutar jednog ponavljanja. Cjelokupni eksperiment je ponovljen tri puta, zbog bolje procjene rezultata. U tablici 4 prikazane su kombinacije procjenjenih bitnih učinaka pri uzgoju virusa ptičjeg infektivnog bronhitisa sličnog varijantu QX prema matrici potpunog faktorijalnog dizajna 2^3 .

Tablica 4. Matrica potpunog faktorijalnog dizajna 2^3 korištena pri ispitivanju uzgoja virusa ptičjeg infektivnog bronhitisa sličnom varijantu QX

Oznaka pokusa	Faktori		
	X1	X2	X3
A	-1	-1	-1
B	-1	-1	+1
C	-1	+1	-1
D	-1	+1	+1
E	+1	-1	-1
F	+1	-1	+1
G	+1	+1	-1
H	+1	+1	+1

3.2.2. Uzgoj virusa sličnog varijantu QX

Uzgoj se izvodi pri aseptičnim uvjetima u LF kabinetu (OIE, 2018c). Virus infektivnog ptičjeg bronhitisa sličan varijantu QX, u vlasništvu tvrtke Genera d.d., čuvan je na -80°C (OIE, 2018b). Nakon otapanja, razrijeđivanjem početnog titra virusa od $8,0 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$ s kompletnim EMEM medijem pripremljeni su inokulumi $2,0$ i $3,0 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$. TCID (eng. Tissue Culture Infectious Dose 50) je recipročna vrijednost razrjeđenja doze koja dovodi do promjene (citopatskog učinka; eng. cytopathic effect = CPE) kod 50% inficiranih staničnih kultura. Korišteno je 24 SPF jaja starih 10 dana i 24 SPF jaja starih 13 dana. SPF jaja, točnije embriji starosti 10 i 13 dana su inficirani inokulumima $2,0$ i $3,0 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$ prema shemi na tablici 5. Inokulacija je vršena pomoću šprice s iglom kroz zračnu vrećicu do alantoisne tekućine (slika 7), pri čemu je svako jaje inokulirano s $0,1 \text{ mL}$ odgovarajućeg inokuluma.



Slika 7. Putevi inokulacije virusa u jaja (Aryal, 2018). Virus ptičjeg infektivnog bronhitisa sličan varijantu QX najbolje raste u alantoisnoj tekućini, pa se inokulacija vrši preko ljuske jajeta, kalcificirane membrane ljuske te korialantoisne membrane u alantoisnu vrećicu.

Jaja su tako podijeljena u 4 grupe: 12 10-dnevnih i 12 13-dnevnih jaja inficirano s inokulumom $2,0 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$, te je 12 10-dnevnih i 12 13-dnevnih jaja inficirano s inokulumom $3,0 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$. Jaja označena prije inkubacije prikazana su na slici 8. S obzirom na kombinaciju faktora uzgoja određenih tablicom 5, svaka kombinacija dobila je slovnju oznaku. Primjerice, kombinacija koja uključuje 10-dnevna jaja, inokulirana s $2,0 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$ te inkubirana tijekom 18h u inkubatoru za jaja ima oznaku „A“. Potom su sva inokulirana jaja uložena u inkubator za jaja pri vlažnosti zraka $\geq 50\%$ i temperaturi od 37.5°C . Inkubacija je trajala u skladu sa shemom tijekom 18h i 30h, pri čemu su jaja podijeljena u 8 konačnih grupa: svaka grupa imala je 6 jaja određene starosti (10 ili 13 dana), inficirana s određenim inokulumom ($2,0$ ili $3,0 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$) te uložena na određeno vrijeme (18 ili 30h). Nakon inkubacije sva su jaja ohlađena na temperaturu od 2 do 8°C preko noći ili par sati na -20°C kako bi se izazvala smrt embrija, stisnule krvne žile i tako smanjila krvarenja prilikom žetve (Grimes, 2002).

Tablica 5. Shema provedbe eksperimenta

Starost embrija (dani)	Inokulum ($\log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$)*	Vrijeme inkubacije (h)	Oznaka uzorka
10	2,0	18	A
		30	B
	3,0	18	C
		30	D
13	2,0	18	E
		30	F
	3,0	18	G
		30	H

$\log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$ = logaritam recipročne vrijednosti razrjeđenja koje uzrokuje promjene okarakterizirane kao citopatski učinci 50% inficiranih staničnih kultura



Slika 8. Prikaz označenih SPF jaja spremnih za inkubaciju (vlastita fotografija). Jaja su označena slovima od A do H prema odgovarajućoj kombinaciji faktora prikazanoj na shemi u tablici 5.

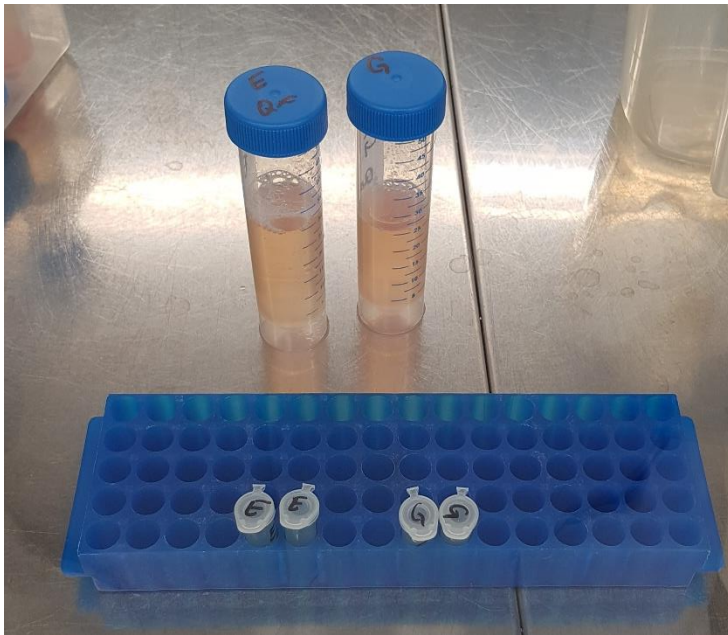
3.2.3. Žetva virusa kultiviranog u jajima

Jaja, prethodno dezinficirana sa 70%-tnim etanolom, otvaraju se u LF kabinetu (OIE, 2018b) skidanjem ljuske, kalcificirane membrane te korioalantiosne membrane kao što je

prikazano na slici 9. Potom se pomoću pipete iz svakog jaja određene kombinacije faktora primjerice „A“, prebaci 0,9 mL alantosine tekućine u jednu zajedničku Falcon epruvetu pod oznakom „A“. Falcon epruvete su potom centrifugirane, te je iz svake uzeto po 2 alikvota od 1,5 mL u 2 Eppendorf epruvete s poklopcem. Takve epruvete su imale oznaku u skladu s kombinacijom faktora uzgoja, primjerice „A“. Na slici 10. prikazane su složene Eppendorf epruvetice, koje su spremljene na -80 °C do daljnjih koraka provedbe eksperimenta (OIE, 2018a).



Slika 9. Prikaz otvorenih jaja u LF kabinetu spremna za žetvu virusa (vlastita fotografija).



Slika 10. Eppendorf epruvete s uzgojenim virusom u alantoisnoj tekućini, označene odgovarajućim slovnim oznakama (vlastita fotografija).

3.2.4. Priprema kulture stanica bubrega pilećih embrija

Kultura stanica bubrega pilećih embrija (eng. Chicken Embryo Kidney; CEK) priprema se postupkom izolacije i kultiviranja stanica primarne kulture iz 17-dnevnih pilećih embrija (OIE, 2018a). Izolacija započinje odstranjivanjem i ispiranjem pilećih bubrega u otopini 0,25% PBS-a dekantiranjem 2 puta u čaši. Nakon toga vrši se disocijacija organa na stanice miješanjem u otopini tripsina na sobnoj temperaturi. Suspenzija stanica se filtrira u bocu, koja ima membranu za filtraciju debljine pora 105 μm . Potom se dobivena suspenzija stanica centrifugira na 300 rcf-a (eng. relative centrifugal force; relativna centrifugalna sila), tijekom 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja, supernatant se dekantira te se na talog dodaje medij s fetalnim goveđim serumom (eng. Fetal Bovine Serum; FBS) kao medij za rast stanica. Nakon određivanja broja stanica na hemocitometru, stanice se nacijepuju na 96-jažične ploče. Broj stanica se razrjeđivanjem po potrebi podesi na red veličine 10^6 , kako bi broj stanica po jednoj jažici bio jednak 10^5 . Suspenzija stanica se razrjeđuje s DMEM medijem s 5% FBS-om. Tako dobivena suspenzija stanica CEK kulture s medijem se nacijepuje na potreban broj jažičnih ploča, s ukupnim volumenom po jažici od 0,1 mL. Ploče se sa stanicama inkubiraju tijekom 24 h na temperaturi od 37°C u inkubatoru.

3.2.5. Određivanje broja stanica CEK kulture

Nakon izolacije primarne kulture stanica pilećih bubrega potrebno je odrediti početni broj stanica prije daljnje manipulacije. Brojanje se radi neizravnom metodom na hemocitometru po Neubauer-u (OIE, 2018a). Iz primarne kulture se uzelo 10 μ L primarne kulture suspenzije CEK stanica te razrijedilo u omjeru 1:20 s tripan plavim bojilom koje ulazi u mrtve stanice i boja ih. Potom se po 10 μ 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 na povećanju 10x.

Jednadžba za izračun ukupnog broja stanica po mL uzorka glasi :

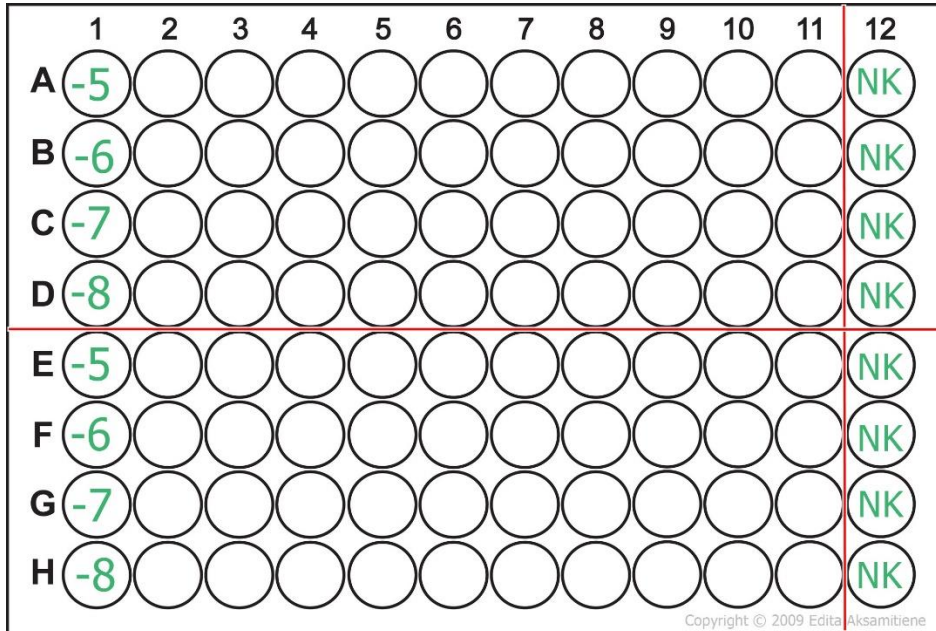
$$\frac{n \text{ stanica}}{\text{mL}} = \frac{\sum \text{stanica} * R * F}{n \text{ kvadrata}} \quad (2)$$

Gdje je: $\sum \text{stanica}$: suma svih stanica izbrojanih u oba dijela komorice, R : faktor razrjeđenja, F : faktor komorice (10^4), $n \text{ kvadrata}$: ukupni broj kvadrata sa svake strane komorice u kojima su stanice brojane

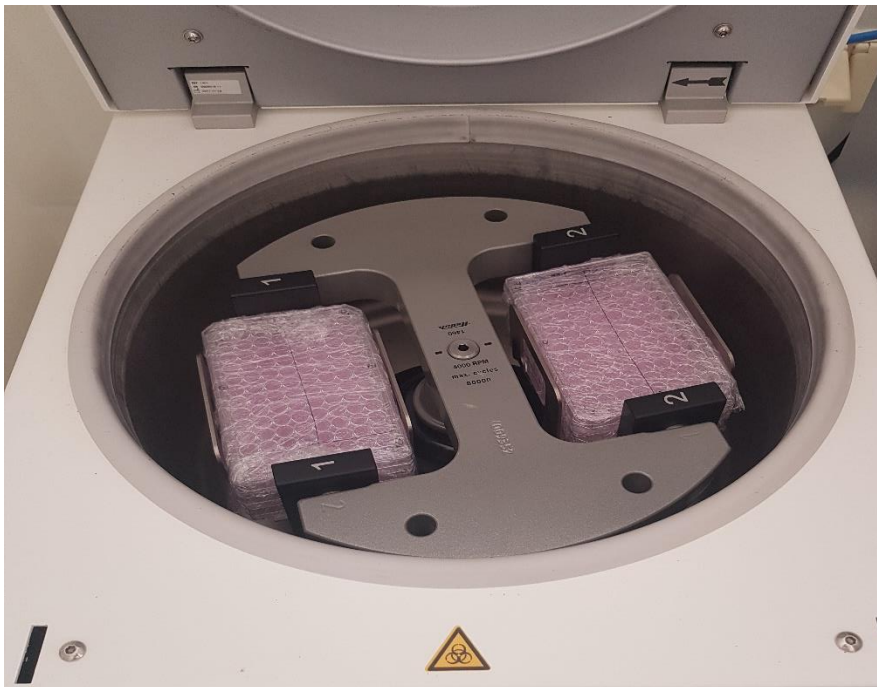
3.2.6. Infekcija kulture stanica bubrega pilećih embrija (titracija)

Kvaliteta monosloja kulture stanica bubrega pilećih embrija kultiviranih tijekom 24 h se provjeri na inverznom mikroskopu što uključuje provjeru svih 96-jažičnih ploča pripremljenih za kultivaciju virusa, odnosno infekciju. Tako se eliminira učinak grube greške u mjerenju jer se u slučaju rasutih rezultata eliminira mogućnost ljudske pogreške pri pripremi kulture stanica za infekciju. Stanice bubrega pilećih embrija su male, okrugle i često povezane u nakupine nepravilnog oblika, okružene stanicama fibroblasta koje su vretenastog oblika. Pripreme se razrjeđenja virusa uzgojenog u jajima pomoću kompletnog DMEM medija za uzgoj stanica koji sadrži neesencijalne aminokiseline i neomicin te otopinu 1M HEPES-a u omjeru 1:5. Za titraciju pripremaju se deseterostruka razrjeđenja virusa uzgojenog u jajima u svim kombinacijama (od slovne oznake „A“ do „H“). U titraciju se stavljaju 4 razrjeđenja; od 5. do 8. deseterostrukog razrjeđenja. Standard virusa uzgojen u optimalnim uvjetima u jajima (embriji stari 12 dana, inokuluma 4,0 log TCID₅₀ mL⁻¹, inkubirani tijekom 24h) se razrijeđuje od 4. do 7. deseterostrukog razrjeđenja i služi kao pozitivna kontrola infektivnosti virusa. Virus se naciepljuje na mikrotitarske pločice u 3 replikata svake slovne oznake od „A“ do „H“, te 4 replikata standarda. Jedna mikrotitarska pločica podijeli se na 2 replikata kao što je prikazano na shemi na slici 11, te se sva 4 razrjeđenja naciepljuju na 11 jažica tako da je jedan red jedno razrjeđenje naciepljeno u svih 11 jažica. Od reda A do reda D je jedan replikat, dok je od reda E do reda H drugi replikat na pločici, redom po slovničkim oznakama. Dvanaesti stupac na svakoj

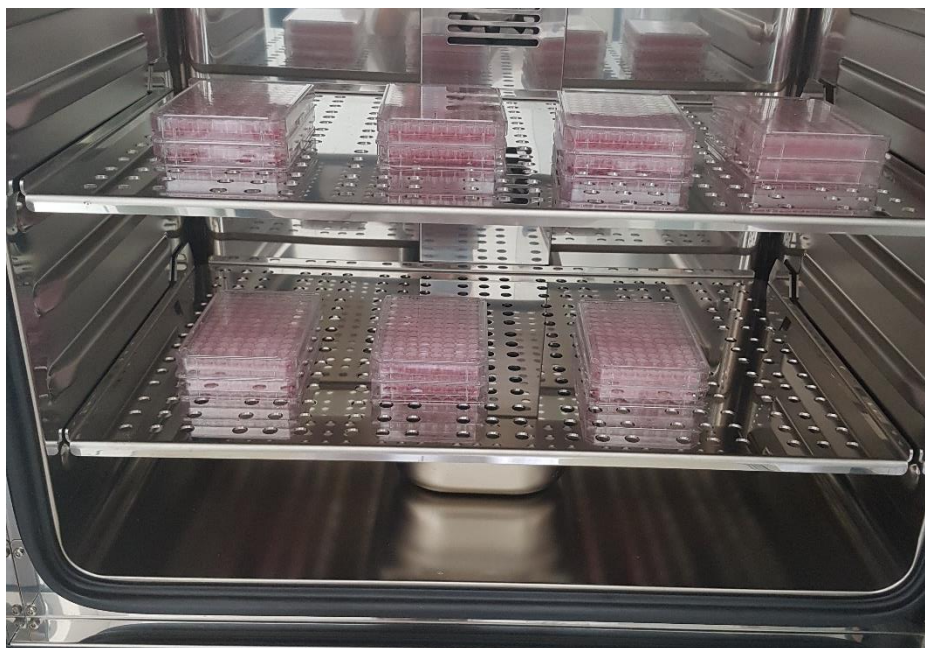
pločici je medij za uzgoj stanica kao negativna kontrola. Nakon toga se pločice centrifugiraju pri 1000 rcf tijekom 30 min kako bi se olakšao kontakt virusa sa stanicama (slika 12). Pločice su inkubirane tijekom 72h u inkubatoru na 37°C kako je prikazano na slici 13.



Slika 11. Shema 96-jažične pločice (Anonymous, 2017). Oznake -5 do -8 označavaju 5. do 8. deseterostruko razrjeđenje početnog uzorka virusa.



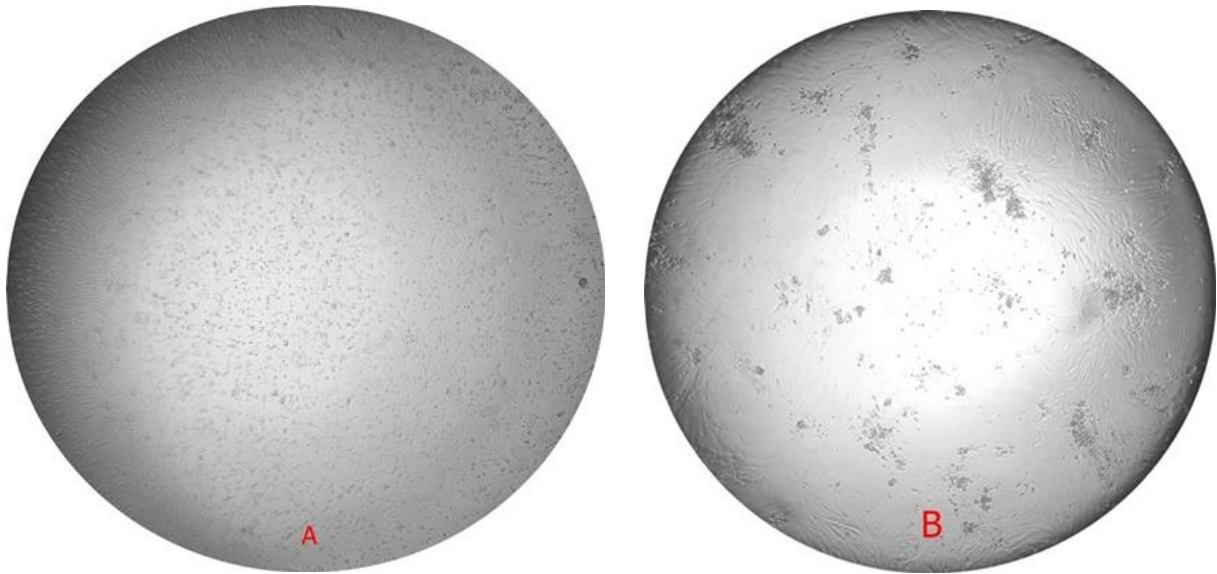
Slika 12. Centrifugiranje 96-jažičnih pločica s CEK staničnom kulturom inficiranom virusom ptičjeg infektivnog bronhitisa sličnog varijantu QX (vlastita fotografija).



Slika 13. 96-jažične pločice s CEK staničnom kulturom inficiranom virusom ptičjeg infektivnog bronhitisa sličnog varijantu QX u inkubatoru (vlastita fotografija)

3.2.7. Određivanje titra virusa pomoću Reed-Munch-ove metode

Titar virusa izražava se kao broj infektivnih doza koje uzrokuju pojavu promjena (citopatskog učinka) kod 50% inficiranih supstrata (stanične kulture tkiva). Računa se kao logaritam recipročne vrijednosti razrjeđenja kod takozvane infektivne doze 50. Mikrotitarske pločice se nakon inkubacije pregledavaju pod inverznim mikroskopom i rezultati se bilježe kao pozitivni (uočava se citopatski učinak, odnosno promjene na stanicama) u odnosu na negativnu kontrolu, te negativni (ne uočava se citopatski učinak) u odnosu na negativnu kontrolu. Na slici 14 prikazan je izgled CEK stanica negativne kontrole i CEK stanica na kojima se vidi citopatski učinak.



Slika 14. A-izgled CEK stanica negativne kontrole, B-izgled CEK stanica sa citopatskim učinkom (vlastita fotografija)

Reed-Munch jednadžba glasi:

$$\% \text{ infektivnosti} = \frac{\text{broj supstrata s promjenom u kumulativnom nizu}}{\text{ukupan broj inficiranih supstrata kumulativnog niza}} * 100 \quad (3)$$

Podaci koji su potrebni za izračun:

- $\text{proporcionalna distanca} = \frac{a-50}{a-b} \quad (4)$

gdje je $a = \% \text{ infektivnosti doze A}$ i $b = \% \text{ infektivnosti doze B}$. Doza A je ona doza koja izaziva infekciju najbliže 50%, ali jednako ili iznad 50% inficiranih supstrata, dok je doza B doza koja izaziva infekciju najbliže 50%, ali ispod 50% inficiranih supstrata

- $\log \text{ TCID}_{50}/\text{inokulum} = \text{logaritam recipročne vrijednosti razrjeđenja doze A} + \text{proporcionalna distanca} \quad (5)$

$\log \text{ TCID}_{50}/\text{inokulum}$ predstavlja logaritam recipročne vrijednosti razrjeđenja koje uzrokuje promjene okarakterizirane kao citopatski učinak 50% inficirane populacije stanica u kulturi bubrega pilećih embrija.

Primjer proračuna titra virusa pomoću Reed-Munch-ove metode prikazan je u tablici 6.

Tablica 6. Primjer proračuna titra u pojedinoj titraciji (paraleli) po Reed- Munch-u

Razrjeđenje virusa	Broj jažica	Apsolutni rezultati		Kumulativni rezultati		% infektivnosti
		Pozitivni	Negativni	Pozitivni	Negativni	
$10^{-5,0}$	11	11	0	23	0	100
$10^{-6,0}$	11	10	1	12	1	92,3
$10^{-7,0}$	11	2	9	2	10	16,7
$10^{-8,0}$	11	0	11	0	21	0,0

$$a = \% \text{ infektivnosti (doza A)} = \frac{12}{13} * 100 = 92,3077$$

$$b = \% \text{ infektivnosti (doza B)} = \frac{2}{12} * 100 = 16,6667$$

$$\text{proporcionalna distanca} = \frac{92,3077 - 50}{92,3077 - 16,6667} = 0,5593$$

$$\log \text{TCID}_{50} / \text{inokulum} = 6 + 0,5593 = 6,5593$$

Podatak dobiven izračunom logaritma titra po inokulumu potrebno je preračunati na broj doza, odnosno volumen kojim su inokulirane jažice s CEK staničnom linijom

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

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

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

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

$$\log \text{TCID}_{50} / \text{dozi} = 6,5593 + \log(33,3333) = 6,5593 + 1,5228 = 8,0822 \quad (6)$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

Eksperimentalni dio uzgoja virusa ptičjeg infektivnog bronhitisa sličnog varijantu QX u SPF embrioniranim jajima zaokružen je titracijom na CEK staničnoj liniji. Tako se određivao titar svim zabilježenim pojedinim pokusima koji su zadovoljavali dva kriterija:

- a) Najmanje 3 razrjeđenja u nizu inficirala su između 90% i 10% inokulirane kulture stanica
- b) Zadovoljen kriterij doze i odgovora; iako se preferira da svako sljedeće razrjeđenje u nizu ima niži broj jažica u kojima je vidljiv citopatski učinak, dozvoljava se da dva razrjeđenja u nizu imaju jednak broj jažica s citoptaskim učinkom, kao i da više razrjeđenja rezultira s jednom jažicom više od susjednog nižeg razrjeđenja (Doel, 1997).

Svi su pokusi zadovoljili kriterije stoga su svi uzeti u izračun titra virusa prema Reed-Munch metodi. Zabilježenim titrima tada su se prema formuli izračunale prosječne vrijednosti kao ukupan rezultat eksperimentalnog dijela. Kako bi se izračunala srednja aritmetička vrijednost titra svakog pokusa korištena je formula;

$$\bar{y} (\log TCID_{50}/mL) = \frac{\sum y}{r}, \quad (7)$$

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

U tablici 7 prikazani su pojedini rezultati po paralelama poredani po odgovarajućim slovnim oznakama od A do H, kao i ukupni rezultat.

Tablica 7. Pojedini rezultati i ukupni rezultat po ponavljanjima i paralelama

Kombinacija faktora : Starost embrija (dani) / Inokulum (log TCID₅₀ mL⁻¹) / Vrijeme inkubacije (h)	Oznaka pokusa	Broj replikata, r	Titar svakog ponavljanja, y (log TCID₅₀ mL⁻¹)	Srednja vrijednost titra, \bar{y} (log TCID₅₀ mL⁻¹)
10 / 2,0 / 18	A	3	8,1233	7,7022
			7,1033	
			7,8800	
10 / 2,0 / 30	B	3	8,4366	8,0594
			7,8350	
			7,9066	
10 / 3,0 / 18	C	3	8,1500	8,0055
			8,0966	
			7,7700	
10 / 3,0 / 30	D	3	8,5433	8,0938
			7,8050	
			7,9333	
13 / 2,0 / 18	E	3	6,9300	6,3588
			5,9550	
			6,1916	
13 / 2,0 / 30	F	3	8,3233	8,1200
			8,0000	
			8,0366	
13 / 3,0 / 18	G	3	7,3766	7,1405
			6,8550	
			7,1900	
13 / 3,0 / 30	H	3	7,7933	7,8200
			7,7400	
			7,9266	

Standardna greška srednje vrijednosti izračunata je prema formuli:

$$S_{\bar{y}} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (8)$$

gdje je $S_{\bar{y}}$ oznaka standardne greške srednje vrijednosti, SD oznaka standardne devijacije i n broj uzoraka jednak 8. Standardna devijacija, koja je mjera disperzije rezultata, izračunata prema formuli:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n-1}} \quad (9)$$

gdje je SD ; standardna devijacija, $\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$; suma kvadrata razlika između pojedinog pokusa i srednje vrijednosti svih pokusa te je n jednak broju uzoraka (Montgomery i Runger, 2003b). Standardna devijacija iznosi $0,6175 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$. Prema tome, standardna greška srednje vrijednosti iznosi $0,2183 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$. Standardna greška srednje vrijednosti dalje je korištena u računanju granica pouzdanosti, prema formuli:

$$GP = TINV(\alpha, DF) * S_{\bar{y}} \quad (10)$$

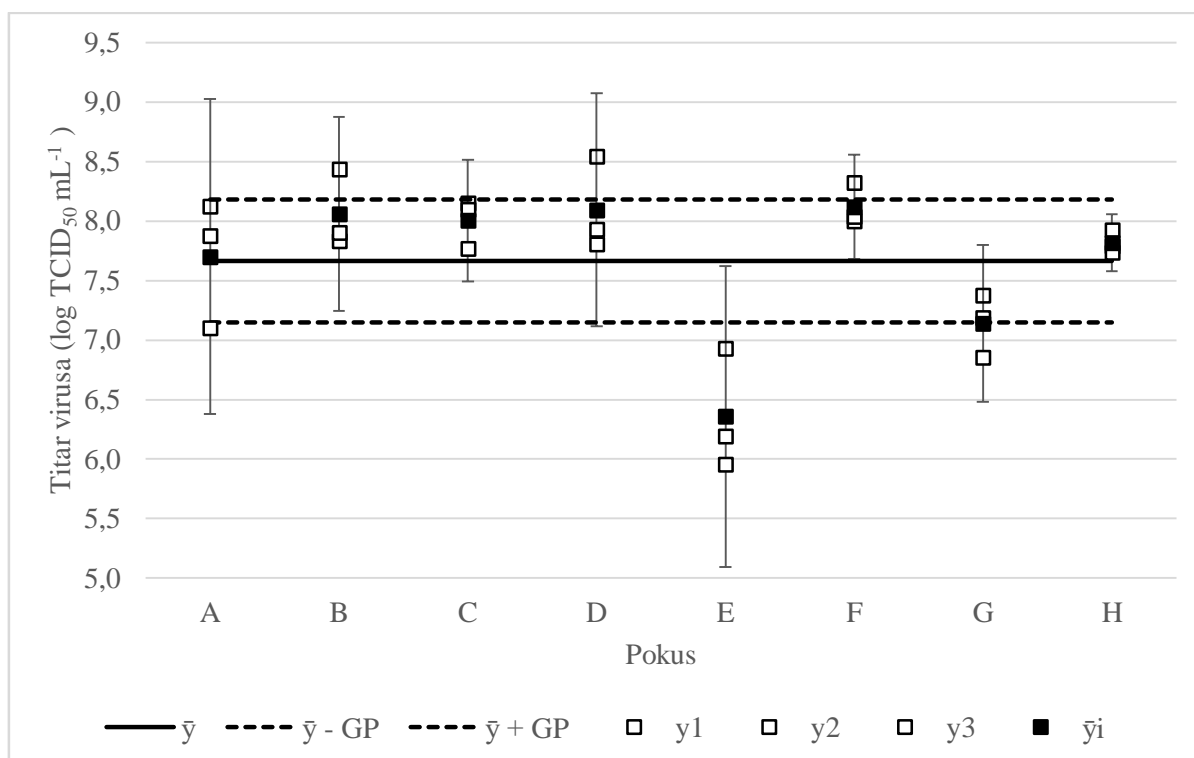
gdje GP označava granicu pouzdanosti, $TINV$ predstavlja Excelovu (Microsoft Excel, verzija 2016) funkciju inverzije dvostrane Studentove t-raspodjele. To je neprekidna raspodjela vjerojatnosti koja se koristi za testiranje hipoteza kod manjih skupova podataka, kao što je ovaj (Montgomery i Runger, 2003f). α predstavlja razinu značajnosti od 0,05 (što znači da je 95% rezultata pokusa sva tri ponavljanja unutar granica pouzdanosti). DF je broj stupnjeva slobode (eng. Degrees of Freedom) i računa se kao $n - 1$, odnosno broj pokusa -1, što u ovom slučaju iznosi 7.

Matrica korištenog dizajna eksperimenata s tri faktora na dvije razine skupa sa sažetim rezultatima i njihovom gornjom i donjom granicom pouzdanosti prikazana je tablicom 8.

Tablica 8. Matrica za korišteni dizajn eksperimenta (2^3) s pripadajućim rezultatima i 95%-tnim granicama pouzdanosti

Oznaka pokusa	Faktori			Rezultati		
	X1	X2	X3	Titar, \bar{y} (log TCID ₅₀ mL ⁻¹)	R	95% Granice pouzdanosti, GP (log TCID ₅₀ mL ⁻¹)
A	-	-	-	7,7022	3	1,3234
B	-	-	+	8,0594	3	0,8163
C	-	+	-	8,0056	3	0,5111
D	-	+	+	8,0939	3	0,9710
E	+	-	-	6,3589	3	1,2633
F	+	-	+	8,1200	3	0,4398
G	+	+	-	7,1406	3	0,6566
H	+	+	+	7,8200	3	0,2388

Procijenjene vrijednosti prikazane su slikom 15 na kojoj se vidi položaj rezultata u odnosu na srednju vrijednost titra svih pokusa koja iznosi 7,6626 log TCID₅₀ mL⁻¹ te gornje (8,1788 log TCID₅₀ mL⁻¹) i donje (7,1464 log TCID₅₀ mL⁻¹) granice pouzdanosti srednje vrijednosti.



Slika 15. Utjecaj različitih pokusnih uvjeta na titar virusa. Prikazane su vrijednosti titra tri ponavljanja (y_1 , y_2 i y_3) svakog pokusa od A do H praznim kvadratićima, dok su punim kvadratićima prikazane srednje vrijednosti titra svakog pokusa (\bar{y}_i). Pripadajuće granice pouzdanosti svakog pokusa prikazane su vertikalnim crtama s tupim završetkom (\top). Punom linijom prikazana je srednja vrijednosti titra svih pokusa ($7,6626 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$), a isprekidane linije predstavljaju gornju ($8,1788 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$) i donju ($7,1464 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$) granicu pouzdanosti srednje vrijednosti titra svih pokusa. Može se primjetiti kako su jedino vrijednosti titra pokusa E izvan intervala pouzdanosti srednje vrijednosti titra virusa.

Na slici 15 se vidi kako je većina rezultata pokusa unutar intervala pouzdanosti srednje vrijednosti titra svih pokusa, no pokus E izveden uzgojem virusa sličnog varijantu QX u 13-dnevnim embrijima početnog inokuluma $2,0 \text{ TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$ inkubiranih tijekom 18 sati je izvan intervala. Dakle, može se pretpostaviti da bi kombinacija faktora na tim razinama rezultirala nižim prinosom log titra virusa u odnosu na ostale pokuse. Također, primjećuje se kako starost embrija ima utjecaj na uzgoj virusa, što je bilo za očekivati jer 13-dnevni embriji imaju razvijeniji imunski sustav i veću količinu antitijela od embrija starih 10 dana (Janković i sur., 1975). Srednje vrijednosti titra virusa uzgojenog u 10-dnevnim embrijima u pokusima A, B, C i D općenito su više za prosječno $0,6054 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$ od titra virusa koji je uzgojen u 13-dnevnim embrijima u pokusima E, F, G i H. Pozitivan trend koji ukazuje na utjecaj doze inokuluma najizraženiji je kod embrija starih 13 dana gdje se vrijednosti titra između pokusa s

dva različita inokuluma razlikuju za 0,24 logaritamske jedinice. Ta je činjenica također u skladu s očekivanjima jer je veći inokulirani početni titar virusa rezultirao većim prinosom virusa za otprilike $0,2049 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$. Nadalje, bilo je za pretpostaviti kako će s duljim vremenom inkubacije nastati više virusa. Unutar podgrupe istog inokuluma primjetan je porast titra virusa inkubacijom u trajanju od 30 sati u odnosu na 18 sati gdje razlika u titru iznosi $0,7215 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$. Općenito se na temelju varijacija iznosa titra u pojedinim pokusima koji su prikazani slikom 15 može zaključiti kako su sva tri faktora važna za uzgoj virusa. Moglo bi se reći da su najveći prinosi titra virusa inkubiranih tijekom 30 sati, pogotovo ako se inficiraju embriji stariji 10 dana jer su zbog nedovoljno razvijenog imunskog sustava podložniji djelovanju virusa.

Srednja vrijednost titra svakog pokusa koristi se u daljnjoj statističkoj obradi podataka za izračun glavnih učinaka sva tri faktora i učinaka interakcija između dva faktora te između sva tri faktora. Učinci su izračunati prema formuli:

$$E_X = \frac{2 \sum \bar{y}_i^+}{n} - \frac{2 \sum \bar{y}_i^-}{n} \quad (11)$$

gdje je E_X oznaka učinka pri čemu indeks X predstavlja broj svih mogućih učinaka prikazanih tablicom 9, n je ukupan broj pokusa i iznosi 8, \bar{y}_i^+ je logaritam titra virusa na (+) razini za svaki faktor, dok je \bar{y}_i^- logaritam titra virusa na (-) razini za isti faktor (Antony, 2003c). Za izračun pojedinih učinaka korištena je matrica za analizu dizajna eksperimenata, prikazana tablicom 9. Učinci dobiveni korištenjem navedene formule i matrice za analizu prikazani su u tablici 10.

Tablica 9. Matrica za analizu korištenog dizajna eksperimenata s pripadajućim rezultatima

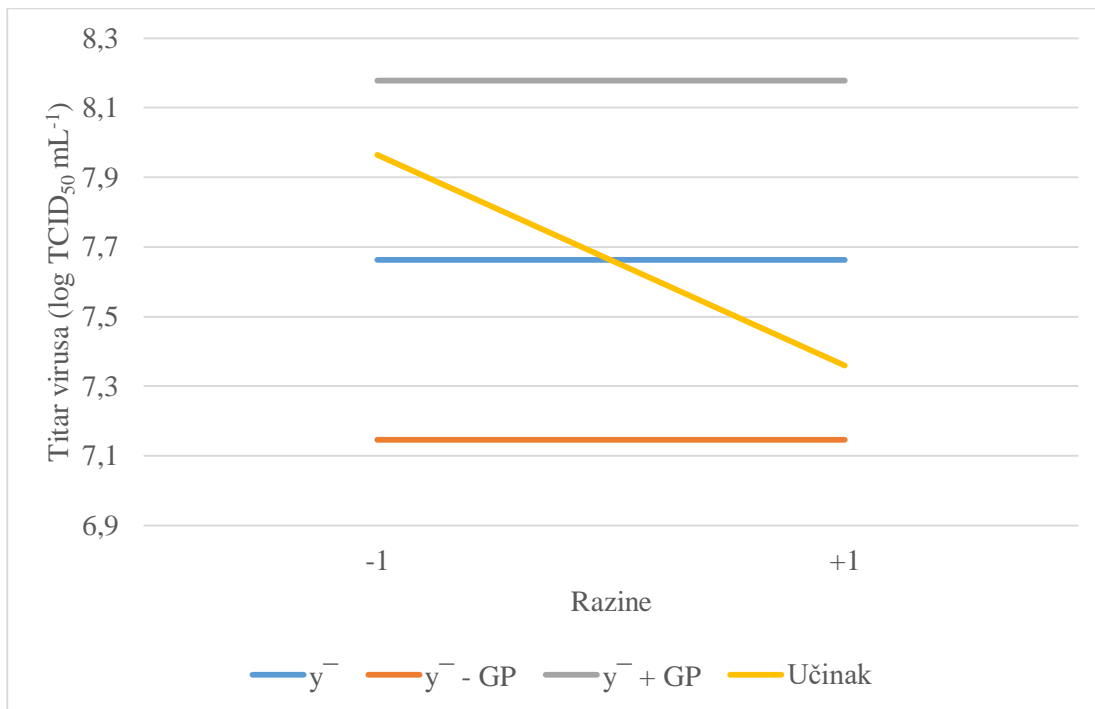
POKUS	Glavni učinci i učinci interakcija							Titar, \bar{y} (log TCID ₅₀ mL ⁻¹)
	X1	X2	X3	X1 * X2	X1 * X3	X2 * X3	X1 * X2 * X3	
A	-	-	-	+	+	+	-	7,7022
B	-	-	+	+	-	-	+	8,0594
C	-	+	-	-	+	-	+	8,0056
D	-	+	+	-	-	+	-	8,0939
E	+	-	-	-	-	+	+	6,3589
F	+	-	+	-	+	-	-	8,1200
G	+	+	-	+	-	-	-	7,1406
H	+	+	+	+	+	+	+	7,8200

Tablica 10. Procijenjeni učinci E_X za ispitane faktore.

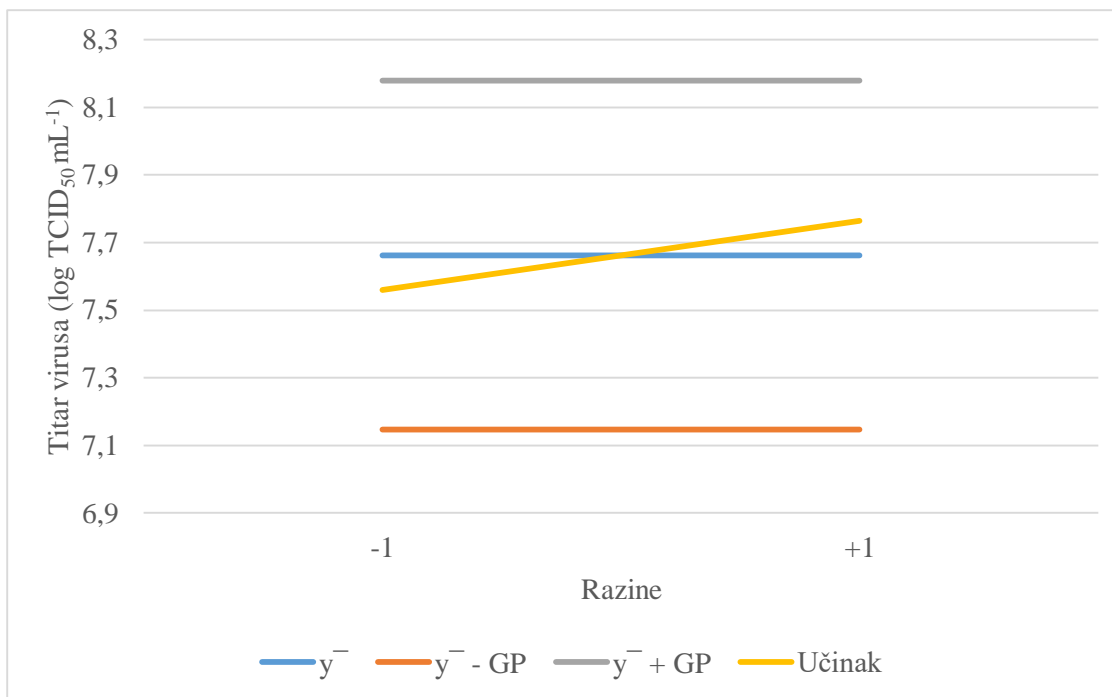
Oznaka učinka E_X	$\frac{2 \sum \bar{y}_i^+}{n}$ (log TCID ₅₀ mL ⁻¹)	$\frac{2 \sum \bar{y}_i^-}{n}$ (log TCID ₅₀ mL ⁻¹)	Učinak E_X (log TCID ₅₀ mL ⁻¹)
X1	7,3599	7,9653	-0,6054
X2	7,7650	7,5601	0,2049
X3	8,0233	7,3018	0,7215
X1 * X2	7,6806	7,6446	0,0360
X1 * X3	7,9119	7,4132	0,4988
X2 * X3	7,4938	7,8314	-0,3376
X1 * X2 * X3	7,5610	7,7642	-0,2032

Prvi način procjene važnih učinaka pojedinih faktora obrađen je u odnosu na 95%-tnu granicu pouzdanosti za sve pokuse. U tu svrhu, vrijednosti glavnih učinaka navedenih tablicom 10 posebno su prikazani u odnosu na srednju vrijednost svih eksperimentalnih očitavanja titra virusa i 95%-tna granica pouzdanosti te vrijednosti (Antony, 2003b). Faktor X1, starost embrija, ima negativni predznak učinka te na nižoj razini (-1) daje veće vrijednosti titra virusa, dok na višoj razini (+1) daje niže vrijednosti titra virusa što upućuje na njegovo negativno djelovanje na rezultate uzgoja virusa (slika 16). S druge strane, faktori X2 (inokulum) i X3

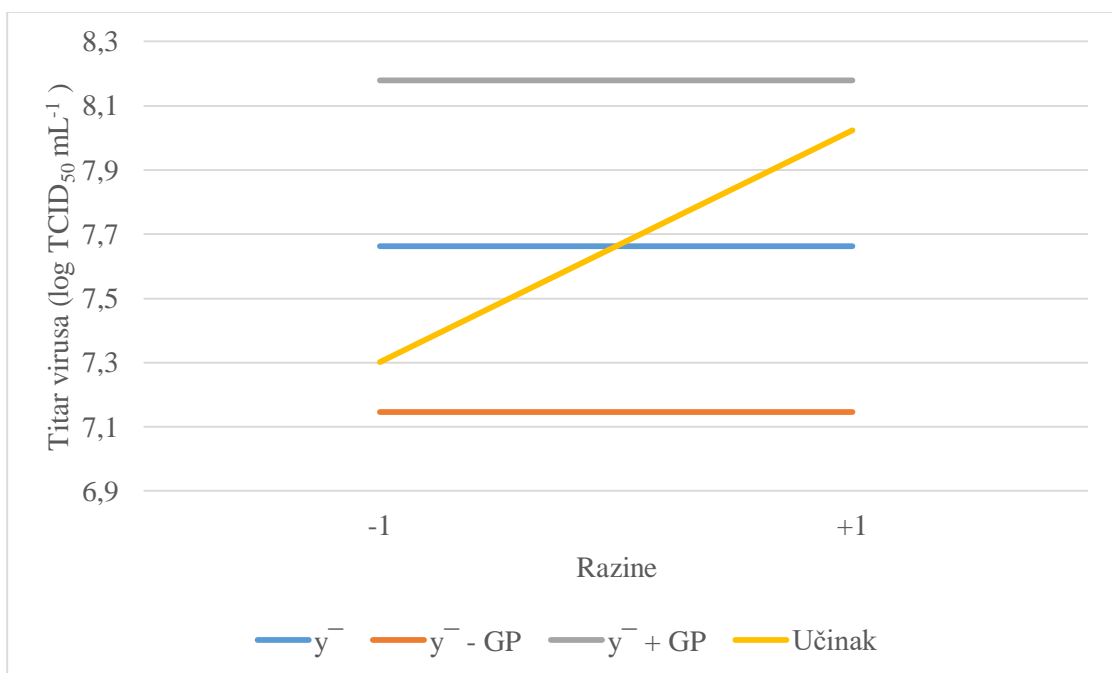
(trajanje inkubacije) imaju pozitivan predznak te namješteni na nižu razinu (-1) daju niže vrijednosti, dok na višoj razini (+1) daju više vrijednosti titra virusa što govori o njihovom pozitivnom djelovanju na rezultate uzgoja virusa. Utjecaj faktora X2 prikazan je slikom 17, dok je utjecaj faktora X3 prikazan slikom 18. Navedene procjene dodatno su prikazane slikom 19, gdje se vidi negativni odnosno pozitivni utjecaj procijenjenih učinaka za sva tri ispitana faktora na obje razine u obliku stupaca vrijednosti glavnih učinaka.



Slika 16. Utjecaj faktora X1 (starost embrija) na titar virusa. Plavom punom crtom prikazana je srednja vrijednost titra svih eksperimenata s 95%-tnom granicom pouzdanosti (narančasta i siva crta), dok žuta crta predstavlja glavni učinak faktora starosti embrija na nižoj (-1) i višoj (+1) razini. Primjetan je trend pada pravca glavnog učinka faktora starosti embrija što ukazuje na njegov negativni utjecaj na uzgoj virusa kad je na višem nivou.

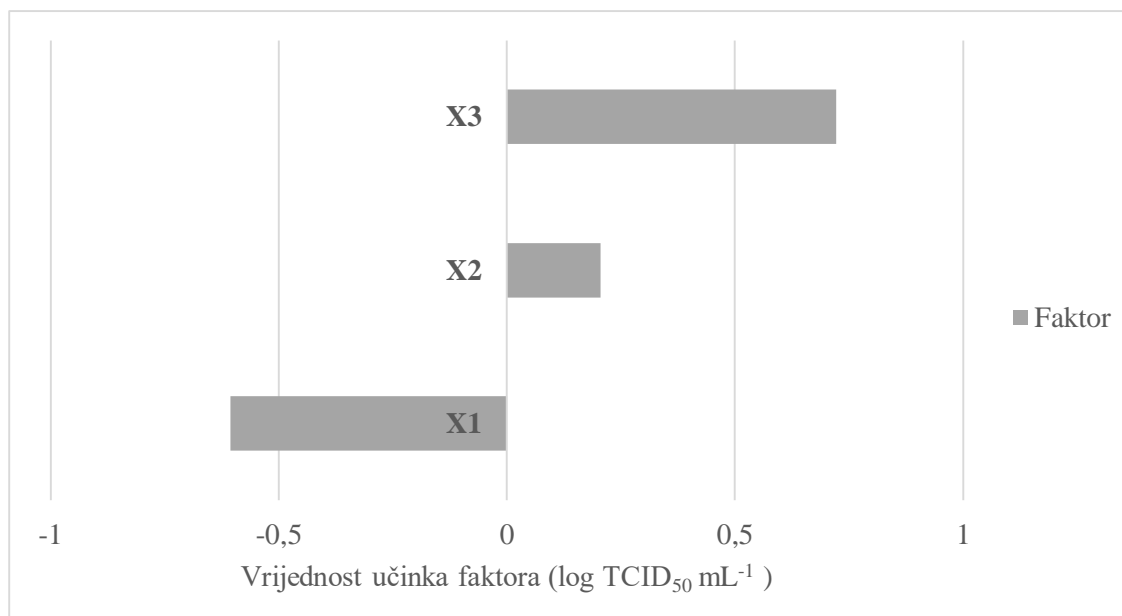


Slika 17. Utjecaj faktora X2 (inokulum) na titar virusa. Plavom crtom prikazana je srednja vrijednost titra svih eksperimenata s 95%-tnom granicom pouzdanosti (narančasta i siva crta), dok žuta crta predstavlja glavni učinak faktora inokuluma na nižoj (-1) i višoj (+1) razini. Pravac glavnog učinka inokuluma raste što ukazuje na njegov pozitivan utjecaj na uzgoj virusa kad je na višem nivou.



Slika 18. Utjecaj faktora X3 (vrijeme inkubacije) na titar virusa. Plavom punom crtom prikazana je srednja vrijednost titra svih eksperimenata s 95%-tnom granicom pouzdanosti

(narančasta i siva crta), dok žuta crta predstavlja glavni učinak faktora trajanja inkubacije na nižoj (-1) i višoj (+1) razini. Pravac glavnog učinka faktora trajanja inkubacije raste iz čega proizlazi njegov pozitivan utjecaj na uzgoj virusa kad je na višem nivou.



Slika 19. Utjecaj sva 3 faktora na titar virusa. X1 ima negativan utjecaj, dok X2 i X3 imaju pozitivan utjecaj na rezultate uzgoja virusa kad su postavljeni na višem nivou.

Drugi način procjene značajnosti učinaka je t-statistika koja je obuhvaćala procjenu utjecaja svih glavnih učinaka i njihovih interakcija (Montgomery i Runger, 2003f). Standardna greška računala se prema formuli:

$$SE = \frac{SD}{\sqrt{n}}, \quad (12)$$

gdje SE predstavlja standardnu grešku (eng. standard error) tri glavna učinka, SD standardnu devijaciju tri glavna učinka, a n broj uzoraka jednak 3 (Montgomery i Runger, 2003e). Prema formuli za standardnu devijaciju navedenu prije u ovom poglavlju, standardna devijacija iznosila je $0,2711 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$, a posljedično tome, standardna greška iznosi $0,1565 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$. Nakon toga, izračunata je t-vrijednost svakog učinka kao omjer apsolutne vrijednosti pojedinog učinka ($|E_X|$) i standardne greške, SE (Kutle i sur., 2010). Odnosno,

$$t = \frac{|E_X|}{SE}. \quad (13)$$

t-vrijednosti su prikazane tablicom 11.

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;

$$t_{krit.} = TINV(\alpha, DF), \quad (14)$$

$$E_{krit.} = t_{krit.} * SE, \quad (15)$$

gdje TINV predstavlja Excelovu (Microsoft Excel, verzija 2016) funkciju inverzije dvostrane Studentove t-raspodjele (Kutle i sur., 2010). α predstavlja razinu značajnosti, DF je broj stupnjeva slobode (eng. Degrees of Freedom) i u ovom slučaju iznosi 2, a SE je standardna greška. Hipoteza proglašava valjanim rezultate koji su veći ili jednaki nekoj referentnoj vrijednosti (Montgomery, 2005). U ovom slučaju, učinak je značajan za određeni α , ako je $|E_X| > E_{krit.}$ ili $t > t_{krit.}$. Tako je za $t_{krit.}$ određen iznos od 4,3027 za $\alpha=0,05$, a $E_{krit.}$ onda iznosi 0,6734 log TCID₅₀ mL⁻¹. To znači da je samo učinak faktora trajanja inkubacije statistički važan jer mu je apsolutna vrijednost veća od $E_{krit.}$, a t-vrijednost veća od $t_{krit.}$. Međutim, ako se uzme u obzir $\alpha=0,1$ onda $t_{krit.}$ iznosi 2,9200 i $E_{krit.}$ iznosi 0,4570 log TCID₅₀ mL⁻¹, pri čemu statistički značajan postaje učinak faktora starosti embrija te učinak interakcije starosti embrija i trajanja inkubacije. Važni učinci su u tablici 11 podebljani.

Za dodatnu provjeru procjene važnih učinaka pomoću kritične vrijednosti učinaka i t-vrijednosti, izračunala se p -vrijednost t-raspodjele, prema formuli;

$$p = TDIST (|E_X|, DF, 2), \quad (16)$$

$TDIST$ je Excelova funkcija koja rezultira postotnom vjerojatnošću za Studentovu t-raspodjelu gdje je varijabla numerička t-vrijednost za koju se želi odrediti p -vrijednost. DF je broj stupnjeva slobode (6), a broj 2 označuje dvostranost statističke procjene raspodjele (Anderson i Whitcomb, 2015). p -vrijednosti su prikazane tablicom 11. Statistički značajne p -vrijednosti svih učinaka su za $\alpha=0,05$ one koje su manje od 0,05 te za $\alpha=0,1$ one koje su manje od 0,1. To potvrđuje značajnost učinka faktora starosti embrija, trajanja inkubacije i učinka interakcije starosti embrija i trajanja inkubacije. No, uz $\alpha=0,1$, p -vrijednost učinka interakcije inokuluma i trajanja inkubacije nameće se kao statistički značajna uz već navedene. To je u skladu s prethodno navedenim očekivanjima. Sve statistički važne p -vrijednosti u tablici 11 su naglašene crvenom bojom.

Tablica 11. Prikaz apsolutnih vrijednosti svih učinaka i odgovarajućih t i p -vrijednosti. Statistički značajne t -vrijednosti su podebljane, dok su značajne p -vrijednosti označene crvenom bojom. Statistički značajne t -vrijednosti su određene prema $E_{krt.}$ i $t_{krt.}$ vrijednostima, dok su p -vrijednosti smatrane značajnima ukoliko su $<0,05$ odnosno $<0,1$.

Oznaka učinka E_X	Apsolutna vrijednost E_X (log TCID ₅₀ mL ⁻¹)	t-vrijednost	p-vrijednost
X1	0,6054	3,8684	0,0083
X2	0,2049	1,3090	0,2384
X3	0,7215	4,6103	0,0037
X1 * X2	0,0360	0,2299	0,8258
X1 * X3	0,4988	3,1869	0,0189
X2 * X3	0,3376	2,1574	0,0743
X1 * X2 * X3	0,2032	1,2984	0,2418

Grafički se ovaj način procjene statističke važnosti učinaka može prikazati slikom 20 pomoću raspodjele polu-normalne vjerojatnosti (Barton, 1990). U tu svrhu izračunata je polu-normalna vrijednost z pomoću ranga apsolutnih vrijednosti učinaka u programu Sigmaplot software package (verzija 11). Program je u izračunu koristio formule:

$$z = \text{norminv}(x, m, s), \quad (17)$$

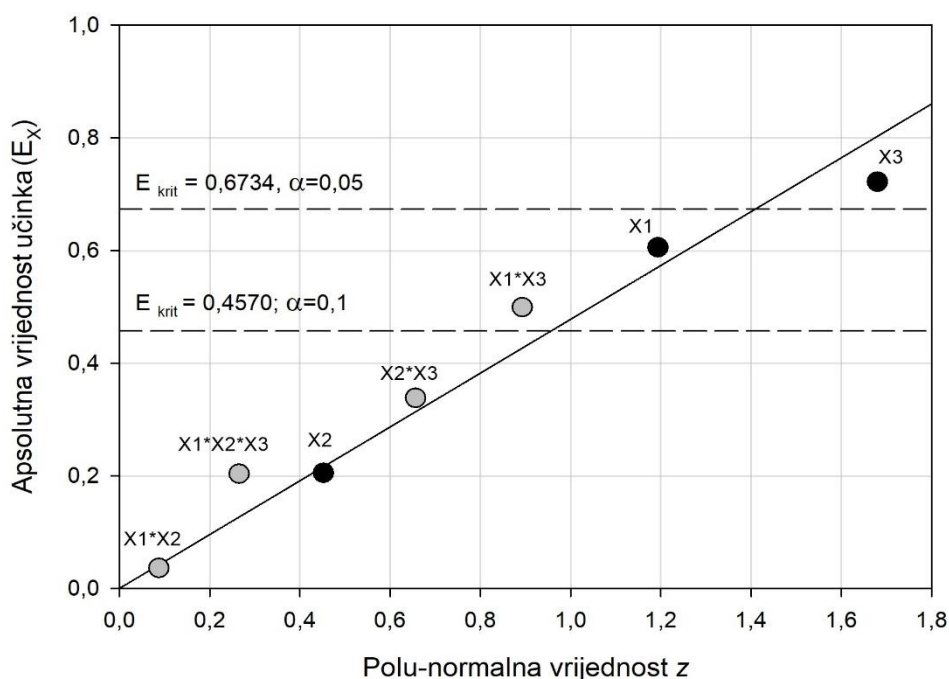
$$x = \frac{3*n_e + 3*r - 1}{6*n_e + 1}, \quad (18)$$

gdje je $\text{norminv}(x, m, s)$ inverzna kumulativna normalna (Gaussova) funkcija raspodjele s argumentima x koji predstavlja iznos vjerojatnosti, m srednju vrijednost (eng. mean) jednaku 0, te s predstavlja standardnu devijaciju raspodjele (eng. standard deviation of distribution) jednaku 1. n_e je ukupan broj učinaka (eng. effects), a r je oznaka za rang apsolutne vrijednosti nekog učinka prema ostalim učincima kada se oni poredaju od najmanjeg do najvećeg iznosa (Montgomery i Runger, 2003c). Polu-normalna raspodjela koristi apsolutne vrijednosti koje imaju normalnu raspodjelu (NIST, 2012c). Vrijednosti z prikazane su tablicom 12.

Tablica 12. Apsolutne vrijednosti procijenjenih učinaka, njihovi rangovi te polu-normalna vrijednost z korištena za procjenu raspodjele polu-normalne vjerojatnosti

Oznaka učinka E_X	E_X (log TCID ₅₀ mL ⁻¹)	Apsolutna vrijednost E_X (log TCID ₅₀ mL ⁻¹)	Rang E_X	Polu-normalna vrijednost z
X1	-0,6054	0,6054	6	1,1938
X2	0,2049	0,2049	3	0,4521
X3	0,7215	0,7215	7	1,6797
X1 * X2	0,0360	0,0360	1	0,0876
X1 * X3	0,4988	0,4988	5	0,8926
X2 * X3	-0,3376	0,3376	4	0,6563
X1 * X2 * X3	-0,2032	0,2032	2	0,2654

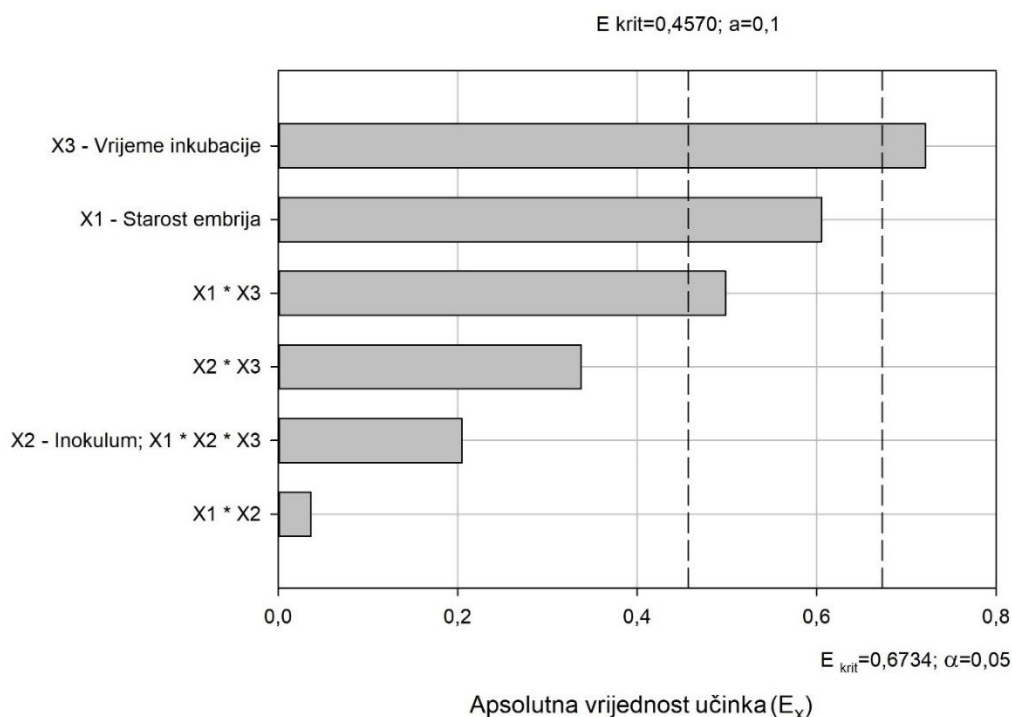
Prikaz raspodjele polu-normalne vjerojatnosti pomaže u razlikovanju faktora i njihovih interakcija koji su važni za proces od onih koji su manje važni. Za interpretaciju prikaza raspodjele polu-normalne vjerojatnosti program metodom najmanjih kvadrata određuje pravac koji minimizira kvadratne razlike između sirovih i procijenjenih vrijednosti. Taj pravac predstavlja linearni prikaz nule u normalnoj raspodjeli. Točnije, svi učinci čije su vrijednosti na tom pravcu ili u blizini pravca, smatraju se nevažnim učincima, dok se statistički važni učinci nalaze odmaknuti od pravca (Montgomery i Runger, 2003d). Dakle, slika 20 odgovara na pitanje postavljeno u poglavlju *Uvod*, a glasi : Koji glavni učinci ili učinci njihovih interakcija imaju utjecaj na rezultate uzgoja virusa u svrhu razvoja cjepiva? Ako se u obzir uzima da svi učinci manji ili jednaki od kritičnog učinka ($E_{krit.}$) koji iznosi 0,6734 log TCID₅₀ mL⁻¹, određen na razini značajnosti (α) 0,05 nisu važni, onda se može zaključiti kako je najvažniji glavni učinak trajanja inkubacije, te nakon njega dolaze manje važni učinci redom: učinak starosti embrija, učinak interakcija trajanja inkubacije i starosti embrija, učinak interakcije sva tri faktora, učinak korištenog titra inokuluma i trajanja inkubacije, glavni učinak korištenog inokuluma, a najmanje je važan učinak interakcije starosti embrija i korištenog inokuluma. S druge strane, ukoliko se u obzir uzima kritična vrijednost apsolutnih učinaka određena na razini značajnosti (α) 0,1, uz glavni učinak trajanja inkubacije važan je i glavni učinak starosti embrija.



Slika 20. Raspodjela polu-normalne vjerojatnosti. Prikazana je raspodjela apsolutnih vrijednosti učinaka u odnosu na polu-normalnu vrijednost z . Crnim kružićima prikazani su glavni učinci, dok su sivim kružićima prikazani učinci njihovih interakcija. Prikazan je pravac kvadratne jednadžbe koji prolazi kroz sjecište punom crtom. Isprekidanim linijama prikazana je vrijednost kritičnog učinka ($E_{krit.}$) koji iznosi $0,6734 \log TCID_{50} mL^{-1}$ određena na razini značajnosti $\alpha = 0,05$ te vrijednost kritičnog učinka ($E_{krit.}$) koji iznosi $0,4570 \log TCID_{50} mL^{-1}$ na razini značajnosti $\alpha = 0,1$. Vidljivo je kako je učinak faktora X3 statistički važan pri $\alpha = 0,05$, dok su pri $\alpha = 0,1$ značajni učinak faktora X1 te učinak interakcije faktora X1 i X3, jer se nalaze iznad vrijednosti kritičnog apsolutnog učinka i odmaknuti su od pravca kvadratne jednadžbe.

Drugi grafički prikaz procjene važnih učinaka pomoću t-statistike je Pareto prikaz stupaca koji predstavljaju iznose apsolutnih vrijednosti učinaka poredani od najvećeg do najmanjeg učinka odozgo prema dolje (slika 21). Učinci su dobiveni t-statistikom i testiraju nultu hipotezu koja pretpostavlja da su svi učinci jednaki referentnoj vrijednosti (Montgomery u Rugner, 2003d). Na slici 21 je prikazana referentna vrijednost kritičnog učinka, $E_{krit.} = 0,6734 \log TCID_{50} mL^{-1}$ određena na razini značajnosti 0,05 te referentna vrijednost kritičnog učinka, $E_{krit.} = 0,4570 \log TCID_{50} mL^{-1}$, pri razini značajnosti 0,1 kako bi se ukazalo na statistički značajne rezultate. Svaki učinak čiji stupac prelazi preko referentnog pravca smatra se značajnim. Kada se uzima u obzir kritična vrijednost dobivena pri $\alpha = 0,05$, važan je samo

glavni učinak trajanja inkubacije. S druge strane, kada se uzima u obzir kritična vrijednost dobivena pri $\alpha = 0,1$, važni su glavni učinci trajanja inkubacije i starosti embrija kao i učinak interakcije ta dva glavna učinka.



Slika 21. Prikaz apsolutnih vrijednosti učinaka. Stupcima su prikazani glavni učinci i učinci interakcija. Isprekidanim linijama prikazana je vrijednost kritičnog učinka ($E_{krit.}$) koji iznosi $0,6734 \log TCID_{50} mL^{-1}$ određena na razini značajnosti $\alpha = 0,05$ te vrijednost kritičnog učinka ($E_{krit.}$) koji iznosi $0,4570 \log TCID_{50} mL^{-1}$ pri razini značajnosti $\alpha = 0,1$. Statistički značajni su učinci faktora X1 i X3 te učinak interakcije ta dva faktora jer njihovi stupci prelaze granice postavljene kritičnim apsolutnim vrijednostima učinaka pri razinama značajnosti 0,05 i 0,1.

Dakle, iz statističke obrade rezultata može se zaključiti kako trajanje inkubacije, starost embrija i međudjelovanje ta dva faktora imaju najveći utjecaj na prinos virusa tijekom uzgoja. Ako promotrimo samo faktor starosti embrija, koji ima negativan utjecaj na proces, pretpostavlja se da je u svrhu uzgoja virusa bolje imati faktor podešen na nižoj razini nego na višoj. Suprotno tome, kod promatranja samo faktora trajanja inkubacije, koji ima pozitivan utjecaj na proces, za optimalni uzgoj pretpostavka ide u korist višeg nivoa. Jednostavnije rečeno, dizajnom eksperimenta nisu samo određeni važni faktori od svih ispitanih, nego i optimalni uvjeti uzgoja. Iako su eksperimentalni podaci pokazali da najveći prinos virusa nastaje 30-satnom inkubacijom 13-dnevnih embrija inokuliranih s $2,0 \log TCID_{50} mL^{-1}$ virusa, utjecaj starosti embrija statistički je značajan tek pri vjerojatnosti od 90% ($\alpha=0,1$), dok je utjecaj inokuluma

najmanje važan što dovodi do zaključka da bi se ipak najveći prinos virusa dobio kombinacijom faktora uzgoja virusa ptičjeg infektivnog bronhitisa sličnog varijantu QX u 10-dnevnim embrijima inficiranih s $3,0 \log \text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$ virusa inkubiranog tijekom 30h pri temperaturi od $37,5^{\circ}\text{C}$ i $\geq 50\%$ vlage u zraku.

5. ZAKLJUČCI

1. Primjenom živog virusnog cjepiva protiv poznatih serotipova učinkovito se sprječava pojava bolesti peradi. Međutim, virus infektivnog ptičjeg bronhitisa brzo mutacijom generira nove varijante, stoga je potrebno razvijati cjepiva protiv novootkrivenih serotipova, odnosno varijanata.
2. Dizajnom eksperimenta reduciraju se vrijeme i resursi potrebni za razvoj novih i optimizaciju postojećih cjepiva.
3. Dizajnom eksperimenata su ispitane gornje i donje granice tri faktora (starost SPF embrija u kojima je uzgajan virus, inokulum virusa korišten za infekciju embrija i trajanje inkubacije virusa u embriju) koja imaju utjecaj na uzgoj virusa ptičjeg infektivnog bronhitisa sličnog varijantu QX.
4. Utjecaj faktora starosti SPF embrija za uzgoj virusa ispitan je pri uzgoju virusa u 13-dnevnim i 10-dnevnim embrijima.
5. Utjecaj faktora početnog titra inokuluma ispitan je infekcijom SPF embrija s dva različita logaritma titra $TCID_{50} \text{ mL}^{-1}$; 2,0 i 3,0.
6. Utjecaj faktora trajanja inkubacije ispitan je inkubacijom inficiranih SPF embrija tijekom 18 i 30 sati.
7. Analizom rezultata dobivenih dizajnom eksperimenta predviđeno je kako najveći utjecaj na uzgoj virusa ima trajanje inkubacije te nakon njega starost embrija.
8. Učinak trajanja inkubacije ima pozitivan utjecaj na uzgoj, odnosno što je duže vrijeme uzgoja virusa u embrijima, viši je logaritam titra virusa i obratno.
9. Učinak starosti embrija ima negativan utjecaj na uzgoj, odnosno stariji embriji imaju razvijeniji imunski sustav koji ne dozvoljava umnažanje virusa kao što je slučaj s mlađim embrijima.

6. LITERATURA

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.

Anonymous (2017) <<http://www.cellsignet.com/media/templ.html>>. Pristupljeno: 17. srpnja 2019.

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.

Apontoweil, P., Krasselt, M., M. Gist-Brocades NV. (1987) *Live infectious bronchitis vaccine for poultry*. Nizozemska. Patent broj 4,645,665.

Aryal, S. (2018) Techniques of Virus Cultivation, <<https://microbiologyinfo.com/wp-content/uploads/2015/05/Inoculation-into-embryonated-egg.jpg>>. Pristupljeno: 17. srpnja 2019.

Baltimore, D. (1971) Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev.* 35, 235–241.

Bande, F., Arshad, S., S., Hair Bejo, M., Moeini, H., Omar, A., R. (2015) Progress and Challenges toward the Development of Vaccines against Avian Infectious Bronchitis. *J. Immunol. Res.* **16**, 1–12.

Barton, R., R. (1990) Presenting the results Graphically, U: Graphical Methods for the Design of Experiments, Springer-Verlag, New York, str. 163.

Beach, J., R., Schalm, O., W. (1936) A filtrable virus distinct from that of laryngotracheitis: the cause of a respiratory disease of chicks. *Poultry Sci.* **15**, 199-206.

Beato, M., S., De Battisti, C., Terregino, C., Drago, A., Capua, I., Ortali, G. (2005) Evidence of circulation of a Chinese strain of infectious bronchitis virus (QXIBV) in Italy. *Vet. Rec.* **40**, 223-235.

Beaudette, F., R., Hudson, C., B. (1937) Cultivation of the virus of infectious bronchitis. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* **90**, 51-60.

Berche, P. (2012) Louis Pasteur, from crystals of life to vaccination. *Clin. Microbiol. Infec.* **18**, 1-6.

Bijlenga, G. (1960) Investigations on the activity of a living vaccine against infectious bronchitis of chickens with an embryonated egg-adapted autogenous virus strain applied in the drinking water. Doctor's thesis, Faculty of Veterinary Medicine, Bern.

Biozentrum (2019) University of Basel, <<https://swissmodel.expasy.org/>>. Pristupljeno: 6. kolovoza 2019.

Bottazzi, M., E., Hotez, P. (2013) Vaccine Nation: 10 most important diseases without a licensed vaccine, Houston, <<https://blogs.bcm.edu/2013/09/03/vaccine-nation-10-most-important-diseases-without-a-licensed-vaccine/>>. Pristupljeno: 17. srpnja 2019.

Boylston, A. (2012) The origins of inoculation. *J. R. Soc. Med.* **105**, 309–313.

Bru, T., Vila, R., Cabana, M., Geerligs, H.J. (2016) Protection of chickens vaccinated with combinations of commercial live infectious bronchitis vaccines containing Massachusetts, Dutch and QX-like serotypes against challenge with virulent infectious bronchitis viruses 793B and IS/1494/06 Israel variant 2. *Avian Pathol.* **46**, 58-58.

- Cargill, P. (1999) Vaccine administration in poultry. *In Practice* **21**, 323-328.
- Cavanagh, D. (2005) Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathol.* **34**, 439-448.
- Cavanagh, D., Casais, R., Armesto, M., Hodgson, T., Izadkhasti, S., Davies, M., Lin, F., Tarpey, I., Britton, P. (2007) Manipulation of the infectious bronchitis coronavirus genome for vaccine development and analysis of the accessory proteins. *Vaccine* **25**, 5558-5562.
- Cavanagh, D., Gelb, J.Jr. (2008) Infectious bronchitis, In Diseases of Poultry, (Saif, Y., M., Barnes, H., J., Glisson, J., R., Fadly, A., M., McDougald, L., R., Swayne, D., E., ured.), 12.izd., Iowa State Press Ames, str. 117-137.
- Cavanagh, D., Naqi, S. (2003) Infectious bronchitis. U: Diseases of Poultry, (Saif, Y., M., Barnes, H., J., Glisson, J., R., Fadly, A., M., McDougald, L., R., Swayne, D., E., ured.), 11.izd., Iowa State Press Ames, str. 101–119.
- Coffey, T., Yang, H., (2018) Statistics for Biotechnology Process Development. CRC Press, Boca Raton, str.15.
- Cook, J., K., A., Orbell, S., J., Woods, M., A., Huggins, M., B., (1999) Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathol.* **28**, 477-485.
- Cook, J., K., Jackwood, M., Jones, R., C. (2012) The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian Pathol.* **41**, 239-250.
- Cowen, B., S., Hitchner, S., B. (1975) Serotyping of Avian Infectious Bronchitis Viruses by the Virus-Neutralization Test. *Avian Dis.* **19**, 583-597.
- Cumming, R., B. (1969) The control of avian infectious bronchitis/ nephrosis in Australia. *Aust. Vet. J.* **45**, 200–203.
- de Wit, J., J. (2000) Detection of infectious bronchitis. *Avian Pathol.* **29**, 71–93.

de Wit, J., J., Cook, J., K., A. (2014) Factors influencing the outcome of infectious bronchitis vaccination and challenge experiments. *Avian Pathol.* **43**, 485-497.

de Wit, J., J., Nieuwenhuisen-van Wilgen, J., Hoogkamer, A., van de Sande, H., Zuidam, H., J., Fabri, T., H., F. (2011) Induction of cystic oviducts and protection against early challenge with infectious bronchitis virus serotype D388 (genotype QX) by maternally derived antibodies and by early vaccination. *Avian Pathol.* **40**, 463-471.

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.

EMBL-EBI, UK; SIB, Switzerland; PIR, US., Uniprot, (2019) <<https://www.uniprot.org/uniprot/P12651.fasta>>. Pristupljeno 6. kolovoza 2019.

Europska farmakopeja (2017a) European Medicines Agency <07/2018:0062> Vijeće Europe, Strasbourg, 9, 5574-5579.

Europska farmakopeja (2017b) European Medicines Agency <04/2013:0442> Vijeće Europe, Strasbourg, 9, 1008-1010.

Fontaine, J., Brun, A., Camand, R., Chappuis, G., Duret, C., Lombard, M., Moreau, Y., Precausta, P., Riviere, M., Roulet, C., Soulebot, J.P. & Stellman, C. (1985) Product testing: an introduction. U: Animal cell biotechnology (Spier, R., E., Griffiths, J., B., ured.), Academic Press, London, str. 312-314.

Gelb, J., Weisman Y., Ladman, B., S., Meir, R. (2005) S1 gene characteristics and efficacy of vaccination against infectious bronchitis virus field isolates from the United States and Israel (1996 to 2000). *Avian Pathol.* **34**, 194-203.

Goodpasture, E., W., Woodruff, A., M., Buddingh, G., J. (1931) The cultivation of vaccine and other viruses in the chorioallantoic membrane of chick embryos. *Science* **74**, 371-372.

Grimes, S., E. (2002) A basic laboratory manual for the small-scale production and testing of I-2 Newcastle disease vaccine. FAO Regional Office for Asia and the Pacific, str. 31-35.

Hanada, K., Suzuki, Y., Gojobori, T. (2004) A large variation in the rates of synonymous substitution for RNA viruses and its relationship to a diversity of viral infection and transmission modes. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 1074-1080.

Hendriksen, C., Spieser, J., C., Akkermans, A., Balls, M., Bruckner, L., Cussler, K., Daas, A., Descamps, J., Dobbelaer, R., Fentem, J., Halder, M., van der Kamp, M., Lucken, R., Milstien, J., Sesardic, D., Straughan D., Valadares, A. (1998) Validation of Alternative Methods for the Potency Testing of Vaccines. *Altern. Lab. Anim.* **26**, 747-761.

Hilleman, M., R. (2000) Vaccines in historic evolution and perspective: a narrative of vaccine discoveries. *Vaccine* **18**, 1436-1447.

ICTV (2019) International Committee on Taxonomy of viruses, <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Pristupljeno: 19. srpnja 2019.

Ignjatović, J., Sapats, S. (2000) Avian infectious bronchitis virus. *Rev. Sci. Tech.* **19**, 493-508.

Jackwood, M., W. (2012) Review of infectious bronchitis virus around the world. *Avian Dis.* **56**, 634-641.

Jackwood, M., W., de Wit., S. (2013) Infectious bronchitis. U: Diseases of poultry, (Swayne, D., E., Glisson, J., R., McDougald, L., R., Nolan, L., K., Suarez, D., L., Nair, V., ured.), John Wiley and Sons Inc., Ames, str. 139–159.

Jackwood, M., W., Hilt, D., A., Sellers, H., S., Williams, S., M., Lasher, H., N. (2010) Rapid heat-treatment attenuation of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* **39**, 227–233.

Jackwood, M., W., Jordan, B., J., Roh, H., J., Hilt, D., A., Williams, S., M. (2015) Evaluating Protection Against Infectious Bronchitis Virus by Clinical Signs, Ciliostasis, Challenge Virus Detection, and Histopathology. *Avian Dis.* **59**, 368–374.

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.

Jordan, B. (2017) Vaccination against infectious bronchitis virus: A continuous challenge. *Vet. Microbiol.* **206**, 137–143.

Koch, G., Hartog, L., Kant, A., van Roozelaar, D., de Boer, G., F. (1986) Antigenic differentiation of avian bronchitis virus variant strains employing monoclonal antibodies. *Isr. J. Vet. Med.* **42**, 89– 97.

Koch, G., Hartog, L., Kant, A., van Roozelaar, D.J. (1990) Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: correlation with biological functions. *J. Gen. Virol.* **71**, 1929-1935.

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.

Lai, M., M., C., Cavanagh, D. (1997) The Molecular Biology of Coronaviruses. *Adv. Virus Res.* **44**, 1–100.

Landman, W., J., M., Dwars, R., M., de Wit, J., J. (2005) High incidence of false layers in (re)production hens supposedly attributed to a juvenile infectious bronchitis virus infection. In Proceedings of the XIVth International Congress of the World Veterinary Poultry Association, Istanbul, str. 369-345.

Ledolter, J., Swersey, A. (1997) Dorian Shainin's Variables Search Procedure: A Critical Assessment. *J. Qual. Technol.* **29**, 237–247.

Lin, S., Chen, H. (2017) Infectious Bronchitis Virus Variants: Molecular Analysis and Pathogenicity Investigation. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2030-2048.

Lister, S., A., Beer, R., E., Gough, W., Holmes, R., G., Jones, J., M., Orton, R., G. (1985) Outbreaks of nephritis in pheasants (*Phasianus colchicus*) with a possible coronavirus aetiology. *Vet. Rec.* **117**, 612–613.

Listorti, V., Laconi, A., Catelli, E., Cecchinato, M., Lupini, C., Naylor, C. J. (2017) Identification of IBV QX vaccine markers: Should vaccine acceptance by authorities require similar identifications for all live IBV vaccines? *Vaccine* **35**, 5531–5534.

Lupiani, B., Reddy, S., M. (2009) The history of avian influenza. *Comp. Immunol. Microb.* **32**, 311–323.

Marangon S., Busani, L. (2006) The use of vaccination in poultry production. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **26**, 265-274.

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.

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. (2017) The 2k factorial design. U: Design and analysis of experiments, 9.izd., John Wiley & Sons Inc., New York, str. 245-228.

Montgomery, D., C., Runger, G., C. (2003a), Introduction. U: Applied Statistics and Probability for Engineers, 3.izd., John Wiley & Sons Inc., New York, str. 1-17.

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.

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. (2003g) Simple Linear Regression and correlation. U: Applied Statistics and Probability for Engineers, 3.izd., John Wiley & Sons Inc., New York, str. 372. -284.

Mowat, N., Rweyemamu, M. (1997) Vaccine Manual: The production and quality control of veterinary vaccines for use in developing countries. U: FAO Production and Health Series, Food and Agriculture Organization of the United Nations Animal, Rim, 35, str. 219-222.

NIST. (2012a) Full factorial design. U: National Institute of Standards and Technology. Engineering Statistics Handbook, <<https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section3/pri333.htm>>. Pristupljeno: 20. srpnja 2019.

NIST. (2012b) Two-level full factorial design. In: National Institute of Standards and Technology. Engineering Statistics Handbook. <<https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section3/pri3331.htm>>. Pristupljeno: 20. srpnja 2019.

NIST. (2012c) Half-normal probability plot. U: National Institute of Standards and Technology. Engineering Statistics Handbook. <<https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section5/pri598.htm>>. Pristupljeno: 20. srpnja 2019.

Nour, M., N. (2009) Cervical Cancer: A Preventable Death. *Rev. Obstet. Gynecol.* **2**, 240–244

Ohtake, S., Kita, Y., Arakawa, T. (2011) Interactions of formulation excipients with proteins in solution and in the dried state. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **63**, 1053–1073.

OIE (2018a) Avian Infectious Bronchitis. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, World Organisation for Animal Health, Pariz, str. 796-809.

OIE (2018b) Minimum requirements for aseptic production in vaccine manufacture, In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, World Organisation for Animal Health, Pariz, str. 298-306.

OIE (2018c) Minimum requirements for the organisation and management of a vaccine manufacturing facility, In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, World Organisation for Animal Health, Pariz, str. 274-276.

OIE (2018d) Principles of veterinary vaccine production, In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, World Organisation for Animal Health, Pariz, str. 94-108.

Payne, S. (2017) Methods to Study Viruses. U: Viruses, Academic Press, Cambridge, str. 37–52.

Preece D., B. (1990) R. A. Fisher and Experimental Design: A Review. *Biometrics.* **46**, 925-935.

Riedel, S. (2005) Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proc. Bayl. Univ. Med. Cent.* **18**, 21–25.

Roy, R., K. (2001) Design of Experiments Using The Taguchi Approach: 16 Steps to Product and Process Improvement, John Wiley & Sons, New York, str. 8.-10.

Ruano, M., El-Attrache, J., Villegas, P. (2000) A rapid-plate hemagglutination assay for the detection of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.* **44**, 99-104.

Schalk, A., F., Hawn, M., C. (1931) An apparently new respiratory disease of baby chicks. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* **78**, 413-422.

Shahid, N., Rao, A., Q., Kristen, P., E., Ali, M., Tabassum, B., Umar, S., Tahir, S., Latif, A., Ahad, A., Shahid, A., Husnain, T. (2017). A concise review of poultry vaccination and future implementation of plant-based vaccines. *World Poultry Sci. J.* **3**, 471-482.

Sun, C., Zongxi, H., Huijie M., Zhang, Q., Yan B., Shao Y., Xu, J., Kong, X., Liu, S. (2011) Phylogenetic analysis of infectious bronchitis coronaviruses newly isolated in China, and pathogenicity and evaluation of protection induced by Massachusetts serotype H120 vaccine against QX-like strains, *Avian Pathol.* **40**, 43-54.

Terregino, C., Toffan. A., Beato, M., S., De Nardi, M., Vascellari, M., Meini, A., Ortali, G., Mancin, M., Capua I. (2008) Pathogenicity of a QX strain of infectious bronchitis virus in specific pathogen free and commercial broiler chickens, and evaluation of protection induced by a vaccination programme based on the Ma5 and 4/91 serotypes, *Avian Pathol.* **37**, 487-493.

Toffan, A., Bonci, M., Bano, L., Valastro, V., Vascellari, M., Capua, I., Terregino, C., Valastro, V., Holmes, E. C., Britton, P., Fusaro, 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.

Valastro, V., Monne, I., Fasolato, M., Cecchettin, K., Parker, D., Terregino, C., & Cattoli, G. (2010) QX-type infectious bronchitis virus in commercial flocks in the UK. *Vet. Rec.* **167**, 865–866.

Wang, Y., D., Wang, Y., L., Zhang, Z., C., Fan, G., C., Jiang, Y., H., Liu, X., E. (1998) Isolation and identification of glandular stomach type IBV (QX IBV) in chickens. *Chin. J. Anim. Quarantine* **15**, 1–3.

Winterfield, R., W., Thacker, H., L. (1978) Immune Response and Pathogenicity of Different Strains of Infectious Bursal Disease Virus Applied as Vaccines. *Avian Dis.* **22**, 721-726.

Worthington, K., J., Currie, R., J., W., Jones, R., C. (2008) An RT-PCR survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. *Avian Pathol.* **37**, 221-234.

Yan, S., Zhao, J., Xie, D., Huang, X., Cheng, J., Guo, Y., Zhang, G. (2018) Attenuation, safety, and efficacy of a QX-like infectious bronchitis virus serotype vaccine. *Vaccine* **36**, 1880–1886.

Yang, X., Zhou, Y., Li, J., Fu, L., Ji, G., Zeng, F., Zhou, L., Gao, W., Wang, H., (2016) Recombinant infectious bronchitis virus (IBV) H120 vaccine strain expressing the hemagglutinin-neuraminidase (HN) protein of Newcastle disease virus (NDV) protects chickens against IBV and NDV challenge. *Arch. Virol.* **161**, 1209-1216.

Zhang, Z., Zhou, Y., Hongning, W., Zeng, F., Yang, X., Zhang, Y., Zhang, A. (2015) Molecular detection and Smoothing Spline Clustering of the IBV strains detected in China during 2011-2012. *Virus Res.* **211**, 145-150.

Zhao, Y., Cheng, J., Liu, X., Zhao, J., Hu, Y., & Zhang, G. (2015) Safety and efficacy of an attenuated Chinese QX-like infectious bronchitis virus strain as a candidate vaccine. *Vet. Microbiol.* **180**, 49–58.

Zwaagstra, K., A., Van Der Zeijst, B., A., M., Kusters, J. G. (1992) Rapid Detection and Identification of Avian Infectious Bronchitis Virus. *J. Clin. Microbiol.* **4**, 79-84.

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.

Ime i prezime studenta