

Usporedba titra virusa EDSV na supstratima pogodnim za proizvodnju cjepiva

Uzelac, Tamara

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:159:905293>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-26**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2023.

Tamara Uzelac

**USPOREDBA TITRA VIRUSA
EDSV NA SUPSTRATIMA
POGODNIM ZA PROIZVODNJU
CJEPIVA**

Rad je izrađen pod mentorstvom prof. dr. sc. Igora Slivca (Prehrambeno-biotehnološki fakultet), u Laboratoriju za razvoj cjepiva, tvrtke Genera d.d., pod neposrednim voditeljstvom dr. sc. Katarine Huić Babić, znan. sur. te uz pomoć Lane Ljuma Skupnjak, mag. ing. biotechn. i Marije Cavrić, mag. ing. biotechn..

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Igoru Slivcu (Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, Zavod za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu) i dr. sc. Katarini Huić Babić, znan. sur. (Laboratorij za razvoj proizvoda Cjepiva, odjel Razvoj cjepiva, Genera d.d., Dechra Pharmaceuticals PLC) na ostvarenoj suradnji koja mi je omogućila izradu eksperimentalnog dijela diplomskog rada u Laboratoriju za razvoj proizvoda Cjepiva, Genera d.d..

Zahvaljujem svim djelatnicima odjela Razvoj cjepiva na svojoj pruženoj pomoći i Lani Ljuma Skupnjak, mag. ing. biotechn. na stručnoj pomoći prilikom pisanja diplomskog rada. Posebnu zahvalu dugujem Mariji Cavrić, mag. ing. biotechn. koja je cijelo vrijeme bila uz mene, savjetovala me prilikom izrade diplomskog rada i nesebično dijelila svoje znanje.

Zahvaljujem se prijateljima, kolegama i dečku koji su bili sve vrijeme uz mene, koji su sa mnom proživljavali sve moje ispite te mi olakšavali i uveseljavali studentsko razdoblje. Za kraj, najveću zahvalu dugujem svojoj obitelji bez kojih sve ovo ne bi bilo moguće i koji su bili uz mene u svim dobrim i lošim trenucima.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

USPOREDBA TITRA VIRUSA EDSV NA SUPSTRATIMA POGODNIM ZA PROIZVODNJU CJEPIVA

Tamara Uzelac, univ. bacc. ing. biotechn., 0058215633

Sažetak: Virusne infekcije kod domaćih životinja predstavljaju veliki zdravstveni i ekonomski problem u svijetu. Radi prevencije širenja zaraze, brojne farmaceutske tvrtke usmjeruju svoju proizvodnju k izradi cjepiva za životinje. Jedan od čestih virusa u peradi je virus sindroma pada nesivosti (EDSV) čije su posljedice značajno smanjenje i kvalitete jaja i proizvodnje. Cilj ovog rada bio je ispitati sklonosti infekcije EDSV virusom u tri različita modela u svrhu pronalaska alternative uzgoju virusa i titracijama virusa na embrioniranim kokošjim jajima. Infektivnost virusa EDSV ispitana je na embrioniranim pačjim jajima, stanicama jetre pilećeg embrija i stanicama hepatoma pijetla titracijom inokuluma virusa na navedene supstrate. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti kako su stanice jetre pilećeg embrija i stanice hepatoma pijetla podložnije infekciji virusom EDSV u odnosu na embrionirana pačja jaja te se mogu koristiti kao alternativa u istraživanjima i proizvodnji cjepiva.

Ključne riječi: *virus sindroma pada nesivosti, stanice jetre pilećeg embrija, stanice hepatoma pijetla, cjepivo, titar virusa*

Rad sadrži: 61 stranica, 30 slika, 8 tablica, 47 literaturnih 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. Igor Slivac

Komentor: dr. sc. Katarina Huić Babić, znan. sur., Genera d.d.

Pomoć pri izradi: Lana Ljuma Skupnjak, mag. ing. biotechn. i Marija Cavrić, mag. ing. biotechn.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček
2. prof. dr. sc. Igor Slivac
3. dr. sc. Katarina Huić Babić, znan. sur.
4. prof. dr. sc. Ksenija Durgo (zamjena)

Datum obrane: 28. studenog 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Cell Technology, Application and Biotransformation

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Bioprocess Engineering

COMPARISON OF EDSV VIRUS TITER ON SUBSTRATES SUITABLE FOR VACCINE PRODUCTION

Tamara Uzelac, univ. bacc. ing. biotechn. 0058215633

Abstract: Viral infections represent a major health and economic problem in the world, and in order to prevent the consequences of the spread and effects of such infections, many pharmaceutical companies have directed their production towards the production of vaccines. One of the common poultry viruses is the egg drop syndrome (EDSV), the consequences of which are a significant reduction in egg quality and production. Therefore, the aim of this study was to examine the EDSV virus infection tendencies in three different models in order to find an alternative to virus cultivation and virus titrations on embryonated chicken eggs. The infectivity of the EDSV virus was tested on embryonated duck eggs, chicken embryo liver cells and rooster hepatoma cells by titration of the virus inoculum on the mentioned substrates. According to the results, it can be concluded that chicken embryo liver cells and rooster hepatoma cells are more susceptible to infection with the EDSV virus compared to embryonated duck eggs and can be used as an alternative in research and production of vaccines.

Keywords: *egg drop syndrome virus, chicken embryo liver cells, rooster hepatoma cells, vaccine, virus titer*

Thesis contains: 61 pages, 30 figures, 8 tables, 47 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Igor Slivac, PhD, Full professor

Co-mentor: PhD Katarina Huić Babić, Scientific associate, Genera d.d.

Technical support and assistance: Lana Ljuma Skupnjak, *mag. ing. biotechn.* and Marija Cavrić, *mag.ing.biotechn.*

Reviewers:

1. Višnja Gaurina Srček, PhD, Full professor
2. Igor Slivac, PhD, Full professor
3. Katarina Huić Babić, PhD, Scientific associate
4. Ksenija Durgo, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: November 28th, 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. IMUNITET I CJEPIVA	3
2.1.1. Imunitet.....	3
2.1.2. Cjepiva.....	4
2.1.3. Proizvodnja peradarskih cjepiva.....	5
2.1.4. Vrste peradarskih virusnih cjepiva	5
2.1.4.1. Živa/atenuirana cjepiva	5
2.1.4.2. Neživa (inaktivirana) cjepiva	6
2.1.4.3. Podjedinčna cjepiva	7
2.1.4.4. DNA cjepiva	7
2.1.4.5. Peptidna cjepiva	8
2.1.4.6. Proizvodnja veterinarskih cjepiva na jajima	8
2.2. SINDROM PADA NESIVOSTI	9
2.2.1. Etiologija sindroma pada nesivosti.....	10
2.2.2. Epidemiologija i patogenezna	10
2.2.3. Klinička slika	12
2.2.4. Dijagnostika	13
2.2.5. Prevencija.....	14
2.3. KULTURE ŽIVOTINJSKIH STANICA	14
2.3.1. Povijest i definicija.....	14
2.3.2. Primarne i kontinuirane stanične kulture	15
2.3.2.1. Stanična kultura stanica hepatoma pijetla (SHP)	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. MATERIJALI	17
3.1.1. Kemikalije i otopine	17
3.1.2. Otopine	17
3.1.3. Oprema i uređaji.....	18
3.1.4. Pačja embrionirana jaja	19
3.1.5. Stanice CEL	19
3.1.6. Stanice SHP	19

3.2. METODE RADA	19
3.2.1. Dizajn eksperimenta.....	19
3.2.2. Titracija pačjih jaja virusom EDSV i hemaglutinacijski test	20
3.2.3. Uspostavljanje primarne stanične kulture jetre pilećih embrija	22
3.2.3.1. Određivanje broja kulture stanica jetre pilećih embrija	24
3.2.3.2. Infekcija kulture stanica jetre pilećih embrija.....	25
3.2.3.3. Određivanje titra virusa pomoću Reed-Münch postupka.....	26
3.2.3.4. Određivanje titra virusa pomoću Spearman-Kärber postupka	28
3.2.4. Komercijalna kultura stanica SHP.....	29
3.2.4.1. Otapanje viala	30
3.2.4.2. Optimizacija uzgoja komercijalne kontinuirane stanične linije SHP	30
3.2.4.2.1. Usporedba rasta na različitim medijima	31
3.2.4.2.2. Rast na želatini i necoatano – preliminarno istraživanje.....	31
3.2.4.2.4. Rast na želatini, kolagenu i necoatano	32
3.2.4.3 Titracija.....	33
3.2.4.3.1 Titracija suspenzije SHP stanica	33
3.2.4.3.2 Titracija SHP stanica	35
4. REZULTATI I RASPRAVA	36
4.1. REZULTATI BRZOG HEMAGLUTINACIJSKOG TESTA NA PAČJIM JAJIMA TITRIRANIM VIRUSOM EDSV	36
4.2. REZULTATI TITRACIJE NA CEL STANICAMA	38
4.3. REZULTATI RASTA SHP STANICA NA RAZLIČITIM PODLOGAMA	39
4.3.1 Preliminarno istraživanje – rast na želatini i <i>non-coated</i> podlozi	39
4.3.2. Rezultati rasta SHP stanica na želatini, kolagenu i <i>non-coated</i> podlozi	40
4.4. REZULTATI TITRACIJE EDSV NA STANICE HEPATOMA PLJETLA	43
4.4.1. Preliminarno istraživanje – ispitivanje utjecaja medija na rast SHP stanica	43
4.4.2. Preliminarno istraživanje – titracija suspenzije SHP stanica	45
4.4.3. Titracija stanica SHP nasadenih na želatini u koncentraciji stanica od 2×10^5 st/cm ² i 5×10^5 st/cm ²	53
5. ZAKLJUČCI	56
6. LITERATURA	57

1. UVOD

Cjepiva se diljem svijeta upotrebljavaju kao vrlo učinkovita zaštita od zaraznih bolesti te ujedno pomažu i kod sprječavanja širenja bolesti u zajednici, kako u ljudi tako i u životinja. Cjepiva djeluju tako što uče imunosti sustav (prirodnu obranu tijela) organizma kako se obraniti od određene bolesti. Uglavnom se upotrebljavaju protiv bolesti uzrokovanih virusima i bakterijama. Prvo cjepivo razvijeno je u 18. stoljeću u Ujedinjenom Kraljevstvu. Bilo je to cjepivo protiv velikih boginja, smrtonosne bolesti. Zahvaljujući cijepljenju, velike boginje u ljudi iskorijenjene su diljem svijeta. Posljednji poznati slučaj prirodne pojave velikih boginja zabilježen je 1977. u Somaliji. Kako bi se uspješno upravljalo virusnim bolestima ključan je razvoj i široka dostupnost cjepiva, te je u tu svrhu razvijen velik broj cjepiva u obliku živih ili atenuiranih, inaktiviranih, subjediničnih cjepiva (cjepiva na bazi podjedinica virusa), VLP cjepiva (eng. *virus-like particles*, čestice nalik virusima), te jestivih cjepiva. Međutim, zbog brzih mutacija virusa i međusobne izmjene genetskog materijala ubrzano se razvijaju tipovi virusa za koje ne postoji adekvatno cjepivo što predstavlja problem i veliki izazov u razvoju budućih generacija virusnih cjepiva. Također, jedna od poteškoća u suzbijanju virusnih infekcija predstavlja i neznanje ljudi o virusima, cjepivima, te uzrocima zaraznih bolesti što značajno utječe na njihovo prihvaćanje znanstvenih informacija o samom cjepivu i cijepljenju. Veterinarska cjepiva imaju ključnu ulogu u sprječavanju pojavnosti bolesti u životinja, jer uz prevenciju bolesti ona ujedno i poboljšavaju proizvodnost životinja, što osigurava potrebnu količinu namirnica životinjskog podrijetla koja se koriste za ljudsku ishranu. Prevencijom bolesti izbjegava se poskupljenje konačnog proizvoda zbog troškova liječenja. Isto tako sprječavaju kontaminaciju okoliša uzročnicima bolesti te neracionalnu upotrebu antibiotika koja dovodi do rezistencije. Cijepljenjem životinja protiv zoonoza štiti se zdravlje ljudi.

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 (Shahid i sur., 2017). Najčešće virusne bolesti u peradi su infektivni bronhitis, sindrom pada nesivosti,

Newcastleska bolest, ptičja gripa i ptičji metapneumovirus (sindrom natečene glave) (Hassan i Abdul-Careem, 2020).

Virus sindroma pada nesivosti (eng. *egg drop syndrome virus*, EDSV) je tipičan adenovirus grupe III koji pored smanjene nosivosti kokoški karakterizira i nošenje jaja s mekom ljuskom i jaja bez ljuske. Uzgoj peradarskih (animalnih) cjepiva provodi se kroz različite metode poput uzgoja u embrioniranim kokošnjim ili pačjim jajima i uzgoja na staničnim linijama. Klasična metoda uzgoja peradarskih cjepiva u jajima zahtjeva manje rada što se može pokazati učinkovitijim u odnosu na uzgoj na staničnim linijama no mnogo je sporija, a proizvodni prinosi su i nepredvidivi i vrlo varijabilni od soja do soja. Iako odsutnost specifičnih i nespecifičnih obrambenih čimbenika u embrioniranim jajnim stanicama pojednostavljuje uzgoj virusa, s etičkog aspekta, uzgoj u jajima se pokušava u potpunosti zamjeniti uzgojem na staničnim linijama. Cilj ovog diplomskog rada je bio ispitati sklonost infekcije virusom EDSV u tri različita modela: pačjim jajima, kulturi stanica jetre pilećih embrija (eng. CEL, *chicken embryo cells*) i kulturi stanica hepatoma pijetla (SHP) u svrhu pronalaska alternative uzgoju virusa i titracijama virusa na embrioniranim kokošnjim jajima.

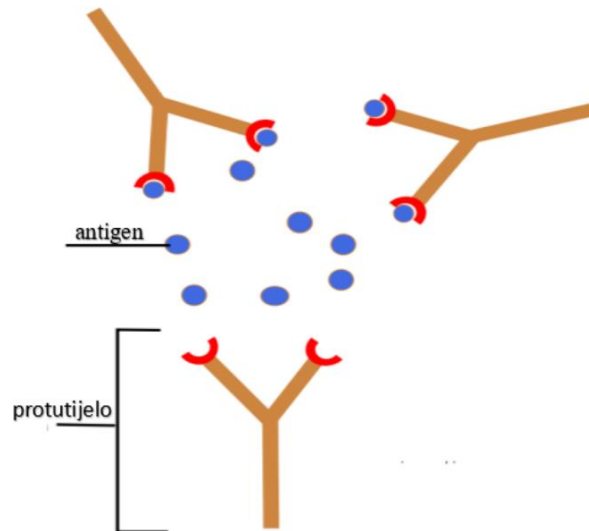
2. TEORIJSKI DIO

2.1. IMUNITET I CJEPIVA

2.1.1. Imunitet

Imunosni sustav vrlo je složen obrambeni sustav sačinjen od bioloških procesa u međusobnoj interakciji koji se pokreću nakon izlaganja organizma stranoj tvari, odnosno antigenu. Svrha imunosnog sustava zaštita je organizma od patogenih mikroorganizama, a čine ga dvije povezane cjeline, urođena i stečena imunost. Prirođeni imunitet dijeli se na vanjsku obranu (koža, sekreti i mukozne membrane) i unutrašnju obranu (fagocitne stanice, antimikrobni protein, upalne reakcije, stanice prirođene ubojice). Adaptivni imunitet dijeli se na humoralni i stanično posredovani imunitet. Humoralni imunitet je posredovan protutijelima koje proizvode B limfociti te je osnovni obrambeni mehanizam organizma protiv patogena i njihovih toksina pri čemu se izlučena protutijela vežu na njih i sudjeluju u njihovom uklanjanju. Stanično posredovani imunitet je obrana organizma od patogena djelovanjem T stanica koje: a) aktiviraju makrofage koji fagocitiraju patogenom inficiranu stanicu, b) izravno uništavaju inficiranu stanicu i c) oslobađaju citokine koji uništavaju inficiranu stanicu (Andreis i sur., 2010). Kad organizam ponovo dođe u doticaj s istim mikroorganizmom, imunosno pamćenje omogućuje sekundarni imunosni odgovor koji je brži i učinkovitiji od primarnoga imunološkog odgovora. Primjena ovog fenomena najznačajnija je u uspješnoj primjeni cijepljenja (Day i Schultz, 2011.).

Antigeni su proteinske ili polisaharidne molekule koje se nalaze na površini virusa, bakterija i drugih organizama ili su slobodne molekule. Svaki antigen ima ograničene dijelove koji se nazivaju epitopi i svaki epitop veže specifičnu molekulu protutijela (slika 1).



Slika 1. Prikaz vezanja protutijela i antigena (Anonymus, 2023)

2.1.2. Cjepiva

Cijepljenje je postupak kojim se određeni antigeni materijal unosi u organizam putem cjepiva radi stvaranja specifične imunosti na određenog uzročnika zarazne bolesti. Cjepivo je lijekoviti pripravak koji sadržava žive oslabljene ili mrtve uzročnike zaraznih bolesti, njihove izlučevine, dijelove ili upute za biosintezu antigena zapisane u nukleinskoj kiselini ili rekombinantnom virusu (Pollard i Bijker, 2020.). Djelotvornost cjepiva ovisi o stvorenom imunitetu kojeg čine protutijela i o stvaranju memorijskih stanica koje će u ponovljenoj interakciji s antigenom protiv kojeg je cijepljenje obavljeno potaknuti imunološki odgovor, te osigurati dugotrajnost otpornosti na infekciju. Virusna cjepiva možemo podijeliti na 4 skupine: a) živa atenuirana cjepiva, b) neživa/inaktivirana cjepiva, c) podjedinična cjepiva i d) cjepiva na bazi nukleinskih kiselina.

U Republici Hrvatskoj, kao zemlji članici Europske unije, Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane Ministarstva poljoprivrede donosi strategiju nadzora i osiguravanja zdravlja životinja, propisuje mjere za rano otkrivanje i sprječavanje pojave, kontrolu, nadziranje, praćenje te istraživanje izbijanja zaraznih bolesti životinja uključujući i zoonoze, analizira podatke o pojavi bolesti životinja i iste dostavlja Europskoj komisiji, Svjetskoj organizaciji za zdravlje životinja (WOAH), susjednim zemljama i drugim zainteresiranim stranama u zemlji i inozemstvu. Mjere

uključuju i propisivanje pojedinih zaštitnih cijepljenja, a njihovo provođenje ima važnost kako u gospodarstvu tako i u međunarodnom prometu i trgovini životinjama te proizvodima životinjskog podrijetla. Iz svega navedenog proizilazi koliko je cijepljenje životinja važna i najisplativija metoda sprječavanja zaraznih bolesti, ali i značajan postupak za javno zdravstvo zbog suzbijanja zoonoza i posljedično očuvanja zdravlja ljudi (Manohar i sur., 2022.).

2.1.3. Proizvodnja peradarskih cjepiva

Proizvodnja cjepiva obuhvaća 3 osnovne faze: 1. uzgoj virusa, 2. postupke pročišćavanja proizvoda i 3. formulaciju proizvoda. Za uzgoj virusa zahtijeva se prisutnost supstrata odnosno živog domaćina da bi se mogao replicirati, a mogući supstrati su tkivo životinje, pileći embriji i stanične kulture. Kod *in vivo* uzgoja virusa antigen se inokulira u organ životinje i nakon inkubacije uzima se inficirani organ. Postupak proizvodnje cjepiva ovisi o samom virusu prema kojem se određuje vremenski period uzgoja, tkivo u koje će se virus inokulirati i sl.. Na primjer, kod uzgoja virusa EDSV u pačjem embriju, virus se inokulira u alantoisnu vrećicu 9 do 11 dana starih pačjih embrija. Jaja se inkubiraju 6 do 7 dana, pomoću ovoskopa se lampiraju da se provjeri vitalnost embrija i je li došlo do kontaminacije virusom. Nakon toga slijedi žetva alantoisne tekućine, pročišćavanja i oblikovanja cjepiva. Kod proizvodnje virusnih čestica u kulturama životinjskih stanica dolazi do usmjeravanja staničnih funkcija k proizvodnji virusnih čestica koja se odvija nakon infekcije kulture virusom. Nema proizvodnje stanične biomase, već samo virusnih čestica te nutritivni i metabolički uvjeti se razlikuju od faze rasta stanične kulture. Stanična kultura mora biti osjetljiva na određeni virus kako bi se taj virus mogao umnažati u vrlo visokim koncentracijama (Leland i Ginocchio, 2007).

2.1.4. Vrste peradarskih virusnih cjepiva

2.1.4.1. Živa/atenuirana cjepiva

Dobivaju se od virusa koji se umnožavaju u stanici, mogu biti genetički izmijenjeni odnosno atenuirani tako da ne izazivaju bolest ili sojevi izolirani iz prirode koji su apatogeni. Virus posjeduje proteine (antigene) koji izazivaju imunološki odgovor koji štiti organizam od bolesti izazvane patogenim virusom. Prednosti primjene živih cjepiva su: a) jednokratna doza je dovoljna da izazove dugotrajni imunitet, b) osiguravaju veću količinu antigena koji se u organizmu može umnažati, c) duže vrijeme izlaganje imunološkog sustava antigenu i d) jeftina proizvodnja.

Nedostaci su da ponekad virusi mogu revertirati ili mutirati u oblike koje izazivaju bolest te se tako širiti, zahtijevaju čuvanje u hladnjaku kako bi se zadržala aktivnost cjepiva (Bande i sur., 2015), kod imunih ptica *booster* doza nema efekt te postoji opasnost od kontaminacije (često kod cjepiva za virus EDSV) (Marangon i Busani, 2006).

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

2.1.4.2. Neživa (inaktivirana) cjepiva

Patogeni virus se kao i kod živih cjepiva uzgaja na živim supstratima, ali se na kraju procesa kemijski inaktivira. Prednost primjene inaktiviranih cjepiva je to što antigen ne može mutirati ili revertirati u oblik koji može dovesti do pojave simptoma bolesti. Nedostaci su to što se virus ne može umnažati u organizmu pa je jačina imunološkog odgovora ograničena, zahtijevaju primjenu većeg broja doza kako bi se postigla razina zaštitnog imuniteta i vrlo su visoki troškovi proizvodnje. Inaktivirana ili neživa cjepiva mogu se upotrebljavati kao pojedinačna ili u kombinaciji s živim atenuiranim cjepivima (Finney i sur., 1990). Inaktivirana cjepiva najčešće se primjenjuju ubrizgavanjem kod pilića starih 13 do 18 tjedana. Može se zaključiti da primjena inaktiviranih cjepiva nije praktična u peradarskoj industriji iz više razloga, kao npr. ako nisu u kombinaciji s živim atenuiranim cjepivom izazivaju manji imunološki odgovor, potrebna je velika

doza i/ili višekratno cijepljenje te sami način primjene injektiranjem nije praktičan u velikim peradarskim farmama (Bande i sur., 2015).

2.1.4.3. Podjedinična cjepiva

Podjedinična cjepiva su cjepiva koja sadrže proteinske fragmente virusa bitnih za stvaranje imuniteta, a ne cijele čestice virusa, odnosno dolazi do uklanjanja DNA ili RNA molekule. Prednost primjene ovih cjepiva je da ne sadrže dijelove antigena koji mogu izazvati neželjene reakcije. Rekombinantno cjepivo je podjedinično cjepivo dobiveno tehnologijom rDNA pomoću ekspresijskih sustava (bakterije, kvasci i stanice kukaca). Fingerut i sur. (2003) su u svojem radu predstavili istraživanje učinkovitosti djelovanja rekombinantnog cjepiva na tri različita rekombinantna proteina virusa EDSV: hekson, proteinska vlakna i dijelove vlakana adenovirusa sindroma pada nesivosti. Proteinsko vlakno odgovorno je za vezanje virusa na ciljnu stanicu, čvor fragmenta vlakna sadrži karboksilnu skupinu i 34 aminokiseline neposredno susjedne domeni proteinskog vlakna adenovirusa. Čvorovi fragmenta vlakana su proizveli antitijela virusa koja induciraju inhibiciju hemaglutinacije i neutralizaciju seruma te su brzinom djelovanja slična atenuiranim cjepivima. Rekombinantni proteinski čvorovi se mogu koristiti kao cjepivo protiv patogenih infekcija uzrokovanih adenovirusima odnosno EDSV-om. (Fingerut i sur., 2003).

2.1.4.4. DNA cjepiva

Cjepiva na osnovi nukleinskih kiselina sadrže plazmidne DNA vektore (rjeđe RNA) koji kodiraju za antigen ili antigene od interesa. Nakon unosa plazmida, antigen se ekspirira *in situ* i dolazi do stvaranja specifičnog imunološkog odgovora. Prednosti primjene DNA cjepiva su da se plazmidi lako proizvode u velikim količinama, DNA je stabilna i podnosi visoke temperature tako da su čuvanje i transport cjepiva olakšani, lako se može odgovoriti na promjene infektivnog agensa budući da se DNA sekvenca može dobiti u laboratorijskim uvjetima, mogu se koristiti smjese plazmida koje kodiraju brojne proteinske fragmente jednog ili više virusa pa se može proizvesti širok spektar cjepiva te nemaju proteinsku komponentu pa nema imunogenih reakcija. Nedostaci primjene su mogućnost ugradnje plazmida u genom primatelja (mutageneza), stvaranje autoimunog odgovora (patogena anti DNA-protutijela), stvaranje imunološke tolerancije

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

2.1.4.5. Peptidna cjepiva

Proizvodnja peptidnih cjepiva je temeljena na izravnoj kemijskoj sintezi peptidne sekvence. Cjepiva sadrže peptide (imunogene epitope) koji mogu izazvati jak imunološki odgovor kad se unose u organizam pomoću nosača ili adjuvansa jer ako se unese samo peptid onda ne dolazi do značajnog imunološkog odgovora budući da se brzo izlučuje iz organizma. Peptidna cjepiva koja se nalaze u eksperimentalnom stadiju razvoja pokazuju obećavajuću ulogu u kontroli i borbi protiv IBV-a. Nekoliko istraživanja fokusirana su na razvijanju peptidnih cjepiva s većim brojem epitopa za primjenu protiv različitih serotipova virusa diljem svijeta (Bande i sur., 2015). Yang i sur. (2009) su razvili IBV cjepivo bazirano na velikom broju epitopa iz S1 i N gena. Analize ekspresije i imunizacije pokazale su da sintetički dizajnirani peptidi izazivaju imunološki odgovor koji štiti organizam od virusa u 80 % slučajeva (Bende i sur., 2015). Kako bi se u budućnosti dizajnirala klinički učinkovita peptidna cjepiva, potrebno je pozabaviti se različitim problemima i optimizirati ih, uključujući izbor ciljanog antigena, kao i izbor optimalnih adjuvansa i rasporeda cijepljenja (Nelde i sur., 2021).

2.1.4.6. Proizvodnja veterinarskih cjepiva na jajima

U konvencionalnoj metodi razvoja cjepiva, patogen se inaktivira ili oslabi, koncentrira i pročišćava da bi se razvilo cjepivo. Metode proizvodnje cjepiva mogu se općenito kategorizirati u tri kategorije: cjepiva na bazi SPF jaja (eng. *specific pathogen free*, SPF), cjepiva na bazi stanica i cjepiva proizvedena pomoću sustava za ispitivanje i proizvodnju (Laere i sur., 2016). Svaka

tehnologija cjepiva ima svoje prednosti i nedostatke koji se odnose na sposobnost induciranja određenih imunoloških odgovora, kapacitet proizvodnje i sigurnost za ljudsku upotrebu. Najčešći primjer cjepiva na bazi jaja je cjepivo protiv gripe proizvedeno u embrioniranim kokošjim jajima starim 9 do 12 dana (Huda i sur., 2011). Neka od cjepiva na bazi jaja koja se koriste su i protiv Newcastleške bolesti te infektivnog ptičjeg bronhitisa.

Ova konvencionalna metoda primjenjuje se više od 60 godina i obuhvaća sljedeće osnovne korake u proizvodnji: 1) bušenje rupe pomoću svrdla u embrioniranim SPF jajima starim 5 do 14 dana (ovisno o virusu koji inokuliramo), 2) ubrizgavanje (inokuliranje) čestica virusa na mjesto pogodno za njegovu replikaciju – žumanjčanu vrećicu, korioalantoisna membrana, amniotska tekućina ili alantoisna tekućina, 3) inkubiranje jaja pri temperaturi od 37.5 °C i vlažnosti zraka ≥ 50 % (trajanje inkubacije ovisi o korištenom virusu i vrsti od koje je poteklo jaje), 4) lampiranje jaja (pregled jaja pomoću ovoskopa kako bi se uklonila sva neoplođena i ona sa mrtvim embrijima) kako bi se provjerila vitalnost embrija i provjerilo da nije došlo do kontaminacije, 5) žetva virusa iz jajeta, 6) centrifugiranje i pročišćavanje (kromatografija, filtracija). Nakon koraka pročišćavanja virus je inaktiviran kroz kemijske procese te u tom obliku može još dodatno biti pročišćen (Hendriks i sur, 2011).

Međutim, odabir najprikladnijih sojeva pojedinog virusa koji se repliciraju za proizvodnju cjepiva ostaje glavno ograničenje u ovoj metodi jer se svi sojevi virusa ne mogu replicirati u embrioniranim jajima, što utječe na količinu cjepiva proizvedenog u jajima (Greer, 2015). Proizvodnja u jajima je relativno spor proces, a proizvodni prinosi su i nepredvidivi i vrlo varijabilni od soja do soja (Manini i sur., 2017). Osim toga, za proizvodnju cjepiva potreban je velik broj jaja, dok je regulatorno odobrenje za cjepiva proizvedena metodom na bazi jaja prilično dugotrajno.

2.2. SINDROM PADA NESIVOSTI

Sindrom pada nesivosti (eng. EDS, *egg drop syndrome*) je bolest izazvana adenovirusom koju karakterizira proizvodnja blijedih jaja s tankom ljuskom, mekom ljuskom ili jaja bez ljuske od strane naizgled zdravih kokoši nesilica. Bolest su prvi opisali Van Eck i sur. (1976) u Nizozemskoj. Godine 2001. pokazalo se da virus EDSV uzrokuje teške akutne respiratorne bolesti mladih guščića u Mađarskoj. Bolest je zahvatila guščiće između 4. i 20. dana starosti. Simptomi

su uključivali anoreksiju, depresiju, kihanje, kašalj, dispneji i hropce (Ivanics i sur., 2001.). Prema Biđin i sur. (2007) došlo je do prirodne pojave virusa EDSV-a u rasplodnim jatima purana u Hrvatskoj, što je bilo popraćeno značajnim smanjenjem i kvalitete jaja i proizvodnje.

2.2.1. Etiologija sindroma pada nesivosti

Virus sindroma pada nesivosti jedini je član ptičje skupine adenovirusa III i ima tipičnu morfologiju adenovirusa (Huang i sur., 2015.). Virus obično zarazi divlje i domaće patke i guske; međutim, dokazi infekcije također su pronađeni kod liski, gnjuraca, galebova, sova, roda, labudova i prepelica. Antigen skupine adenovirusa ne može se otkriti konvencionalnim metodama, a virus EDSV se razlikuje od ostalih adenovirusa ptica po tome što snažno aglutinira eritrocite ptica; stoga se test inhibicije hemaglutinacije može koristiti za otkrivanje protutijela protiv virusa (Smyth, 2022). Virus može narasti do visokih titara u embrioniranim pačjim i gušćjim jajima te u kulturama stanica pačjeg ili gušćjeg podrijetla. Virus se replicirao do visokih titara u kulturama stanica pačjih bubrega, jetre pačjeg embrija i fibroblasta pačjeg embrija. Također, dobro je rastao u stanicama jetre pilećeg embrija, a slabije u stanicama pilećeg bubrega i slabo u stanicama fibroblasta pilećeg embrija (Smyth, 2022). Može se razmnožavati u fibroblastima embrija patke, stanicama bubrega bebe hrčka (BHK-21), stanicama bubrega afričkog zelenog majmuna (Vero), fibroblastu kokoši (DF-1) i stanicama azijskog tigrastog komarca (*Aedes albopictus*) (C6/36) (Liu i sur., 2013). Virus je otporan na raspon pH 3-10 i na zagrijavanje tijekom 3 sata na 56 °C (132,8 °F). Infektivnost se gubi nakon tretmana s 0,5 % formaldehidom ili 0,5 % glutaraldehidom (Smyth i McFerran, 2000).

2.2.2. Epidemiologija i patogeneza

Prirodni domaćini virusa sindroma pada nesivosti su patke i guske, a virus EDSV je pronađen kod ovih vrsta diljem svijeta. Smatra se da je virus uveden u kokoši putem cjepiva koje je uzgojeno u kontaminiranim fibroblastima pačjeg embrija (Bartha i sur., 1982). Virus se udomaćio u kokošima, uzrokujući znatne probleme s kvalitetom ljuske jaja i gubitkom prodajnih i valivih jaja. Iako je virus pronađen kod ptica močvarica u Sjevernoj Americi, virus EDSV nije prijavljen u jatima nesilica u SAD-u do 2019. Sve dobi i pasmine kokoši osjetljive su na infekciju. Bolest ima tendenciju da bude najteža kod teških rasplodnih tovnih pilića i kokoši koje proizvode

smeđa jaja. Japanske prepelice (*Coturnix coturnix japonica*) također razvijaju bolest. Kod pilića se prepoznaju tri obrasca bolesti:

1. **Klasični virus EDSV**, koji se javlja kada je primarno rasplodno grlo zaraženo i virus se prenosi vertikalno kroz jaje. Virus često ostaje latentan sve dok potomstvo ne dostigne spolnu zrelost, a tada se virus izlučuje u jajima i izmetu inficirajući osjetljive kontakte.
2. **Endemični virus EDSV**, koji je rezultat horizontalne infekcije jata tijekom nesenja. Obično se javlja kod komercijalnih nesilica. Kontaminirane ladice za sakupljanje jaja jedan su od glavnih prijenosnika horizontalnog prijenosa između jata, a izbijanja su često povezana sa zajedničkom stanicom za pakiranje jaja.
3. **Sporadični virus EDSV**, koji je povremeno prepoznat u jatima. Ovaj oblik virusa nastaje zbog izravnog kontakta s domaćim patkama ili guskama ili, češće, zbog korištenja izvora vode kontaminiranog izmetom divljih ptica. Iako je infekcija ovim putem neuobičajena, takvo unošenje virusa moglo bi na kraju dovesti do endemske bolesti.

Glavni način horizontalnog prijenosa je putem kontaminiranih jaja, osoblja i opreme kao što su ladice, sanduci i kamioni. Izmet je također zarazan. Virus se može prenijeti krvlju ili iglama za cijepljenje. Pretpostavlja se prijenos putem vektora kukaca, ali nije dokazan.

Nakon horizontalnog prijenosa EDSV-a, virus se replicira u niskim titrima u nosnoj sluznici. Nakon ovog rasta slijedi viremija, replikacija virusa u limfoidnom tkivu, a zatim masivna replikacija tijekom ~5 dana u žlijezdi ljuske vrećice. Može doći do ozbiljne degeneracije i deskvamacije epitelnih stanica, atrofije žlijezde maternice i infiltracija heterofila, limfocita i plazmocita. Intranuklearna inkluzijska tijela se mogu naći u epitelnim stanicama maternice, istmusa i regija vaginalne žlijezde (McNulty i Smyth, 2002).

Ptice koje su se oporavile od EDSV-a mogu imati povremene rezidualne limfoidne nakupine jajovoda. Promjene u ljusci jajeta koincidiraju s replikacijom virusa u žlijezdi ljuske. Virus je prisutan i u ljusci i u unutrašnjosti jaja proizvedenih između 8 i 18 dana nakon infekcije. Eksudat i sekret iz jajovoda bogati su virusom i prelaze u izmet koji može postati blago do umjereno vodenast tijekom 2-3 dana. Za razliku od nekih aviadenovirusa, virus EDSV nije pronađen u replikaciji u epitelnim stanicama crijeva. Pilići koji se izlegu iz zaraženih jaja mogu izlučiti virus

i razviti antitijela. Međutim, češće virus ostaje latentan, a protutijela se ne razvijaju sve dok ptica ne počne nesti, a tada se virus reaktivira i raste u jajovodu, ponavljajući ciklus (Smyth, 2022).

2.2.3. Klinička slika

U seronegativnim jatima koja se zaraze, prvi klinički znak bolesti je proizvodnja jaja blijede ljuske, a ubrzo zatim slijede jaja s tankom ljuskom, mekom ljuskom ili bez ljuske (slika 2). Unutarnja kakvoća jajašaca ostaje nepromijenjena kod eksperimentalno izazvane bolesti. Jaja s tankom ljuskom i bez ljuske su krhka i ptice ih obično pojedu, ta se jaja također mogu zgaziti u stelju i mogu se previdjeti ako se ne izvrši pažljiv pregled. Virus EDSV uglavnom uzrokuje nagli pad proizvodnje jaja kod nesilica praćen smanjenjem kvalitete jaja. Nekoliko je studija otkrilo da je virus EDSV uzrokovao nekoliko respiratornih simptoma u pekinških pačića (Cha i sur., 2013). U jatima u kojima je došlo do određenog širenja virusa i neke od ptica imaju virusna EDSV antitijela (a ujedno i usporavaju prijenos virusa), stanje se manifestira kao neuspjeh u postizanju predviđenih proizvodnih ciljeva; pažljivo ispitivanje pokazuje da ova jata doživljavaju niz epizoda infekcije i bolesti u malim skupinama.



Slika 2. Jaja proizvedena od kokoši u jatima zaraženim virusom EDSV (prisutno je jedno normalno jaje (gore u sredini), zahvaćena jaja uključuju blijeda jaja, jaja s tankom ili mekom ljuskom i jaja bez ljuske, sadržaj jajeta u donjem desnom kutu je izgubljen, ostavljajući debelu, srušenu membranu ljuske. Takve se membrane mogu naći pomiješane s izmetom i mogu se lako previdjeti) (izvor: Merck Manual, Dr. Joan A. Smyth)

2.2.4. Dijagnostika

Proizvodnja blijedih jaja s tankom ljuskom, mekom ljuskom ili bez ljuske od strane jata koje inače izgleda zdravo trebalo bi izazvati jaku sumnju na infekciju EDSV-om. Mogu se primijetiti prolazni blagi znakovi depresije, blagi proljev ili oboje. Rebrasta i deformirana (izdužena) jaja nisu karakteristike virusa EDSV (Smyth, 2022). Loša kvaliteta ljuske jaja na vrhuncu proizvodnje kod zdravih kokoši također bi trebala izazvati jaku sumnju na klasični virus EDSV. Uz endemski ili sporadični EDSV, bolest se može razviti u nesilica bilo koje dobi. U kaveznim jedinicama prijenos može biti spor, a klinički se znakovi mogu predvidjeti ili percipirati kao malo smanjenje (2 %–4 %) u prinosu jaja.

Klinički, virus EDSV se može razlikovati od Newcastleške bolesti i ptičje influence po odsutnosti bolesti, a od infektivnog bronhitisa po odsutnosti respiratornih znakova, odsutnosti izbočenih i nepravilno oblikovanih jaja i odsutnosti loše unutarnje kvalitete jaja. Za konačnu dijagnozu potrebna je potvrдна laboratorijska pretraga. Traženje dokaza serokonverzije je najlakši dijagnostički pristup za necijepljena jata. Prilikom odabira ptica za dijagnozu, posebno u kaveznim jedinicama, važno je ciljati kokoši koje su proizvele zaražena jaja, jer ako je problem uzrokovan infekcijom EDSV-om, te će kokoši već imati serokonverziju.

Serološki testovi su test inhibicije hemaglutinacije na eritrocitima peradi i ELISA. Osim toga, za potvrdu se može koristiti serum neutralizacijski test. Korišten je i dvostruki imunodifuzijski test. PCR testovi i ELISA testovi za hvatanje antigena korišteni su za otkrivanje virusne DNA, odnosno antigena. Opet, vrlo je važan odgovarajući odabir kokoši koje će se pregledati (McFerran and Adair, 2003). Virus EDSV se može izolirati inokulacijom embrija pačjih ili guščjih jaja ili staničnih kultura stanica jetre embrija patke ili pileta. Važno je odabrati aktivno zaražene ptice za testiranje; međutim, može ih biti teško prepoznati, osobito kod ptica koje nisu u kavezu. Jednostavnija metoda je hraniti kokoši bez antitijela jajima koja su zaražena virusom EDSV. Te se kokoši zatim mogu testirati na serokonverziju nakon što se proizvedu prva abnormalna jaja ili testirati na dokaz EDSV DNK ili antigen PCR testom ili ELISA testom za hvatanje antigena. Alternativno, moguće je izolirati virus iz žlijezda ljuske vrećice (eng. pouch shell gland) ovih kokoši (Hassan i Abdul-Careem, 2020).

2.2.5. Prevencija

Ne postoji određeno liječenje sindroma pada nesivosti. Klasični oblik je iskorijenjen iz primarnih rasplodnih grla. Korištenje posebne opreme i ladica za jaja za svaku farmu i/ili pranje i dezinfekcija plastičnih ladica za jaja prije upotrebe može pomoći u kontroli endemskog oblika. Sporadični oblik može se spriječiti odvajanjem kokoši od ostalih ptica, posebice ptica močvarica. Indicirane su opće sanitarne mjere opreza, a potencijalno kontaminiranu vodu treba klorirati prije uporabe. Dostupna su inaktivirana cjepiva s uljnim adjuvansom koja, ako se pravilno primjenjuju, uspješno sprječavaju bolest. Ona smanjuju, ali ne sprječavaju širenje virusa. Ova se cjepiva primjenjuju tijekom razdoblja rasta, obično kada su pilići stari 14-18 tjedana, a mogu se kombinirati s drugim cjepivima, poput onih za Newcastlešku bolest. Sentinel pilići (pilići slobodni od infekcije virusom sindroma pada nesivosti ili slobodni od bolesti sindroma pada nesivosti, koji se u određenom razdoblju jednom ili više puta uzastopno pretražuju na prisutnost protutijela za EDS virus) mogu se smjestiti zajedno s cijepljenim pilićima i povremeno im se mogu provjeravati antitijela, što omogućuje otkrivanje virusa u jatu.

2.3. KULTURE ŽIVOTINJSKIH STANICA

2.3.1. Povijest i definicija

Više od 100 godina prošlo je od početka “uzgoja” kultura životinjskih stanica do široke primjene stanica i proizvodnje vezane uz iste. Uzgoj životinjskih stanica u kulturi započeo je tijekom devedesetih godina 19. stoljeća s prvim eksperimentima kojima je bio cilj održati komadiće tkiva *in vitro* u laboratoriju u tjelesnoj tekućini tijekom nekoliko dana ili čak nekoliko tjedana. Uspjeh prvih eksperimenata ovisio je o kvaliteti upotrijebljene hranjive tekućine i sterilnosti eksperimenta. Ross Harrison je 1907. prvi zabilježio održavanje i rast živčane stanice u visećoj kapi tijekom 30 dana, čime je pokazao da se normalne funkcije stanica mogu nastaviti *in vitro*. Stoga se upravo 1907. godina najčešće uzima kao početak uzgoja kulture životinjskih stanica. Već su tada Harrison i njegovi nasljednici primijetili da su strogi aseptični uvjeti rada presudni za uspjeh rada s kulturama stanica (Radošević, 2020). Prvi velik iskorak ka primjeni kultura životinjskih stanica u raznim biotehnološkim procesima bio je rad Endersa i suradnika iz 1949., kojim je pokazano da se virus poliomijelitisa može uzgajati u životinjskim stanicama i rabiti kao cjepivo.

Životinjske stanične linije predstavljaju korisne alate za niz studija uključujući stanični metabolizam i regulaciju, replikaciju virusa i karcinogenezu u standardiziranim uvjetima. U ove svrhe uspostavljene su brojne stanične linije različitih vrsta. Kultura stanica opći je idiom koji se primjenjuje za izuzimanje stanica, tkiva ili organa iz organizma, životinje ili čovjeka, i njihov uzgoj u umjetnom okruženju, odnosno u laboratoriju. Uzgoj stanica izvan živog organizma omogućen je upotrebom odgovarajućeg medija za uzgoj koji sadrži sve potrebne hranjive tvari za rast stanica u kulturi *in vitro* te osiguravanjem odgovarajućih fizikalno-kemijskih uvjeta. Današnja moderna znanost, biotehnologija i biomedicina bila bi svakako nezamisliva bez otkrića i primjene kulture životinjskih stanica (Radošević, 2020). Područja primjene kultura životinjskih stanica uključuju: *in vitro* toksikologiju, biologiju matičnih stanica proizvodnju cjepiva, razvoj i odabir novih lijekova, gensku terapiju, proizvodnju monoklonskih protutijela, istraživanja karcinoma, izvantjelesnu oplodnju (IVF) te proizvodnju rekombinantnih proteina.

Prema načinu uzgoja razlikujemo dvije vrste kultura životinjskih stanica ovisno o tome je li im za rast potrebno osigurati čvrstu površinu za prihvaćanje ili ne. Stanice koje rastu jedino ako su prihvaćene za površinu zovu se adherentne stanice, a one koje mogu rasti neovisno o površini suspenzijske stanice. Svojstvo stanica iz višestaničnog organizma je adhezijski i kontaktom ograničen rast u prisutnosti drugih stanica te su zbog toga u počecima tehnologije životinjskih stanica dominirale upravo adherentne kulture. Tek su nekoliko desetljeća kasnije transformacijama i selekcijom uspostavljene prve suspenzijske stanične kulture. Njihova primjena od iznimne je važnosti za uspješnost i ekonomičnost biotehnološkog procesa u industrijskom mjerilu (Radošević, 2020).

2.3.2. Primarne i kontinuirane stanične kulture

Kulture stanica pripravljene iz tkiva ili organa uzetih neposredno iz organizma nazivaju se primarnim kulturama sve dok se subkultiviranjem i imortalizacijom ne postignu svojstva stanične linije. Takve su kulture obično fenotipski heterogene, imaju diploidan karakter i malu specifičnu brzinu rasta. Osim toga one zadržavaju specifične funkcije tkiva iz kojeg su potekle te u *in vitro* uvjetima najbolje odražavaju svojstva *in vivo*. Takve su kulture pogodne za ispitivanja svojstava i odgovora koje daju diferencirane stanice (Vunjak-Novaković i Freshney, 2006). Osnovni koraci uspostavljanja primarne stanične kulture obuhvaćaju izolaciju tkiva, mehaničko usitnjavanje tkiva

i razgradnju komadića tkiva proteolitičkim enzimima, odvajanje pojedinačnih stanica od ostataka tkiva (filtriranje) te uspostavljanje kulture-inkubacija, prihvaćanje i rast stanica. Stanice zahtijevaju čvrstu površinu za prihvaćanje prije nego dođe do njihova rasta u laboratorijskim uvjetima, i za to se koriste sterilne, posebno obrađene plastične ili staklene posude (Petrijeve zdjelice, T-boce) (Slivac i sur., 2016).

Subkultiviranje (precjepljivanje) primarne kulture dovodi do razvoja sekundarne stanične kulture. Prednost tog postupka je dobivanje velike količine jednolikog materijala pogodnog za dugotrajnu uporabu. Međutim već nakon nekoliko subkultiviranja, stanična kultura ulazi u fazu replikativne senescencije koja završava odumiranjem stanica. Zato takve stanice zovemo još i konačnom ili smrtnom staničnom linijom. Postupak pretvorbe u kontinuiranu ili besmrtnu staničnu liniju poznat je kao imortalizacija. Velika većina staničnih linija komercijalno dostupnih iz banki stanica jesu besmrtne. K tome, većina njih je klonalna što znači da su sve stanice jedne stanične linije genotipski identične, tj. potječu od jedne zajedničke „parentalne“ stanice. Oba svojstva, besmrtnost i klonalnost, su nužna za rad sa stanicama jer jamče potrebnu stabilnost i predvidljivost u ponašanju kulture. Zbog dediferencijacije, koja se može javiti kao posljedica imortalizacije stanica, kontinuirane stanične linije *in vitro* ne preporučuje održavati u kulturi više od 100 generacija.

2.3.2.1. Stanična kultura stanica hepatoma pijetla (SHP)

Stanice hepatoma pijetla (SHP) su izvedene iz tumorskih kvržica jetre mužjaka Leghorn pilića te je njihova kontinuirana stanična linija zaprimljena iz vanjske istraživačke ustanove u svrhu ispitivanja prikladnosti metode. Stanice SHP su transformirane, što omogućuje njihovu besmrtnost i kontinuirano razmnožavanje u kulturi. Stanice hepatoma pijetla imaju epitelni fenotip i osobito su korisne za proučavanje interakcija domaćin-patogen u gastrointestinalnom traktu peradi. Stanice SHP su adherentne i pokazuju morfologiju sličnu dendritima.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije i otopine

- Medij DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- PBS - Phosphate Buffered Saline (1 x Dulbecco's, PanReac AppliChem, AppliChem GmbH, Darmstadt, Njemačka)
- FBS - Fetalni goveđi serum (Cytiva, Global Life Sciences Solutions USA LLC, , Sjedinjene Američke Države)
- BSA - Goveđi serumski albumin (VWR, Sjedinjene Američke Države)
- Neomicin Ph Eur (AppliChem GmbH, Njemačka)
- MEM Neesencijalne aminokiseline (Sigma-Aldrich, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Trypsin - EDTA otopina (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- TPCK Trypsin (Thermo Scientific, , Sjedinjene Američke Države)
- HEPES (Gibco, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Tripan blue bojilo (Corning, Sjedinjene Američke Države)
- Voda za injekcije (Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Hrvatska)
- Sterilna voda
- Želatina (Gelita AG, Njemačka)
- L-glutamin 200mM (biowest, Francuska)

3.1.2. Otopine

- 10 %-tna suspenzija eritrocita pijetla (Genera dd, Hrvatska)
- 0.1 % otopina želatine
 - 0.1 g želatine
 - 100 mL vode za injekcije
 - Autoklaviranje na 121 °C, 15 minuta

- Medij DMEM
 - DMEM 500 mL
 - Otopina L-glutamina 5 mL
 - MEM NEAA 5 mL
 - Otopina neomicin-sulfata 1 mL
 - DMEM-2 - medij DMEM uz dodatak 2 % FBS-a
 - DMEM-5 – medij DMEM uz dodatak 5 % FBS-a
 - DMEM-10 – medij DMEM uz dodatak 10 % FBS-a

3.1.3. Oprema i uređaji

- LF kabinet (eng. *Laminar-flow cabinet*) – laminarni kabinet s vertikalnim strujanjem zraka
- Inkubatori za jaja (Fiem, Italija)
- CO₂ inkubator za kulture stanica (Mettler, Njemačka)
- Hladnjak
- Vortex Mikser ZX4 (Velp Scientifica, Usmate Velate. Italija)
- Ultra zamrzivač (New Brunswick Scientific™ Innova U 725-G Upright Freezer, Fischer Scientific, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Standardno sterilno posuđe za rad u laboratoriju s jajima, virusima i kulturama stanica
- Automatske pipete (5 – 50 µL, 10 – 100 µL, 20 – 200 µL, 100 – 1000 µL, 500 – 5000 µL)
- Petrijevke prekrivene kolagenom (Corning, Sjedinjene Američke Države)
- Netretirane kultivacijske boce T75 (VWR, Kina)
- Mikrotitarske ploče s jažicama (sa 6 jažica i sa 96 jažica)
- Standardno sterilno posuđe za rad laboratoriju s jajima, virusima i kulturama stanica
- Laboratorijska centrifuga (Andreas Hettich GmbH, Universal 320, Njemačka)
- Inverzni mikroskop (Olympus, Japan)
- Inverzni transmisijski svjetlosni mikroskop Axiovert 25 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Njemačka)

3.1.4. Pačja embrionirana jaja

Tijekom izrade ovog rada korištena su komercijalna pačja jaja dobivena od lokalnog proizvođača.

3.1.5. Stanice CEL

Tijekom istraživanja korištena je primarna stanična kultura stanica jetre pilećeg embrija (CEL) koja je uspostavljena u Laboratoriju za razvoj proizvoda Cjepiva, odjel Razvoj cjepiva, Genera d.d.

3.1.6. Stanice SHP

Prilikom provođenja ovog istraživanja korištena je svestrana komercijalna stanična linija stanica hepatoma pijetla (SHP) koja je čuvana u tekućem dušiku na oko $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ u banci stanica Laboratorija za razvoj proizvoda Cjepiva, odjel Razvoj cjepiva, Genera d.d..

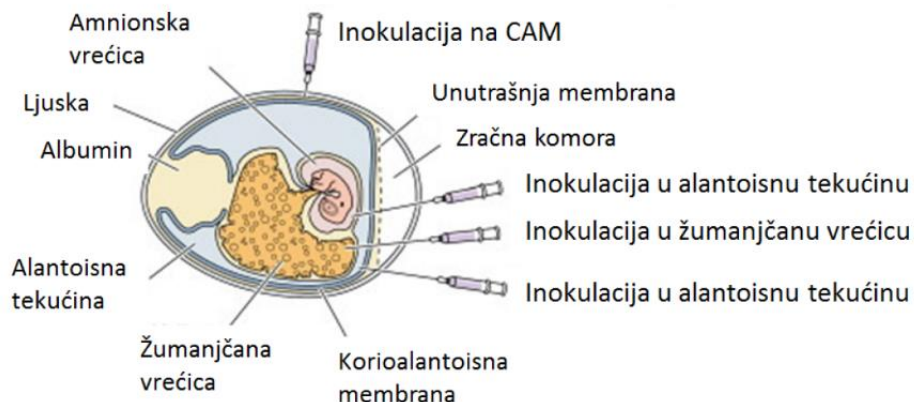
3.2. METODE RADA

3.2.1. Dizajn eksperimenta

Titracijom virusa na embrioniranim pačjim jajima (i hemaglutinacijskim testom kao metodom očitavanja), titracijom virusa na stanicama CEL (čija je primarna stanična kultura uspostavljena u Laboratoriju za razvoj proizvoda Cjepiva, odjel Razvoj cjepiva, Genera d.d.) te titracijom virusa na komercijalnoj kontinuiranoj staničnoj liniji, SHP, ispitane su sklonosti infekcije EDS-om u svrhu pronalaska alternative uzgoju virusa i titracijama virusa na embrioniranim pačjim jajima. U okviru eksperimenta izvršena je i optimizacija uzgoja stanične linije SHP gdje su ispitivani uvjeti rasta na različitim medijima (promjena koncentracije seruma), pri različitim koncentracijama stanica te na tri različite podloge: podloga prekrivena želatinom, podloga prekrivena kolagenom te *non-coated* podloga.

3.2.2. Titracija embrioniranih pačjih jaja virusom EDSV i hemaglutinacijski test

Titracija se provodi pri aseptičnim uvjetima u LF kabinetu. Virus sindroma pada nesivosti, u vlasništvu tvrtke Genera d.d., čuvan je na ≤ -15 °C. Titracija kreće od bočice u kojoj je 7 logEID₅₀/osušak virusa koji se otapa u 10 mL medija (DMEM-5) i iz te otopine se kreću raditi razrjeđenja od -1 do -6 (900 µL medija + 100 µL virusa). Jaja se inokuliraju razrjeđenjima od -3 do -6. Za ovaj eksperiment su korištena ukupno 72 embrionirana pačja jaja starih 11 dana: postavljene su 3 paralele od kojih svaka sadrži 6 jaja po razrjeđenju, što ukupno daje 24 jaja po paraleli. Inokulacija je vršena pomoću šprice s iglom kroz zračnu vrećicu do alantoisne tekućine (prikaz na slici 3), pri čemu je u svako jaje inokulirano 0,1 mL odgovarajućeg inokuluma. Nakon inokulacije, jaja su uložena u inkubator za jaja pri temperaturi od 37.5 °C i vlažnosti zraka ≥ 50 % te se nakon 24 h lampiraju kako bi se odbacila nespecifična uginuća.



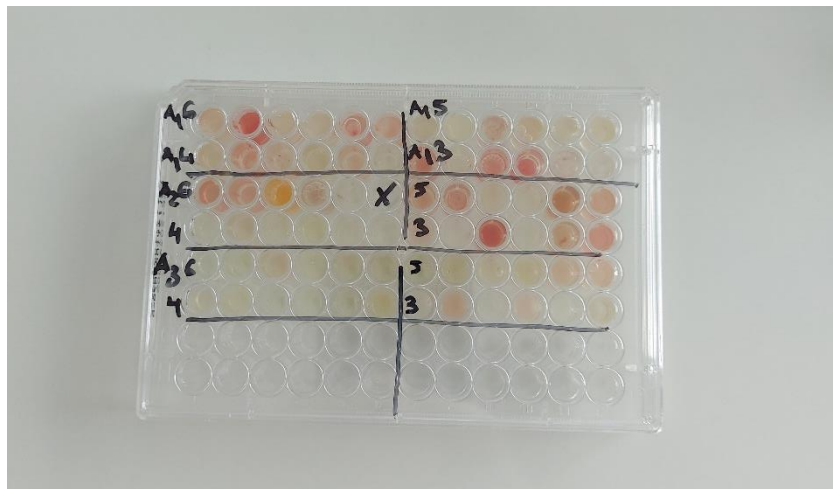
Slika 3. Prikaz puteva inokulacije virusa u jaje (Aryal, 2018). Inokulacija virusa koji uzrokuje sindrom pada nesivosti provodi se u alantoisnu tekućinu jer se tamo najbolje razmnožava.

Nakon 6 dana jajima se otklanja ljuska i membrane kao što je prikazano na slici 4.



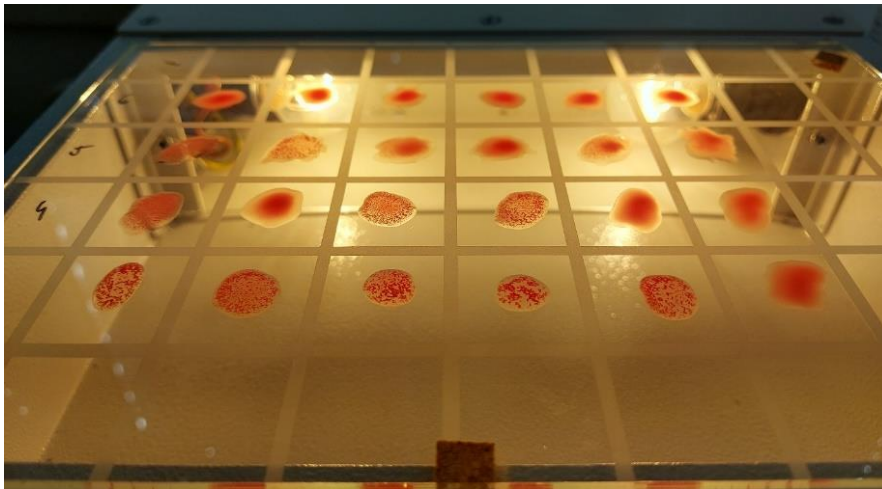
Slika 4. Prikaz prvog koraka žetve; uklanjanje ljuske i membrana sterilnom pincetom (vlastita fotografija)

Potom se pomoću pipete iz svakog jajeta prebaci otprilike 0,2 mL alantoinne tekućine u jažicu na mikrotitarsku ploču sa 96 jažica. Jaja su prethodno označena simbolima za lakše raspoznavanje paraleli i razrjeđenja (npr. A_{1,6} – 1 označava prvu paralelu; 6 označava -6 razrjeđenje) te su ti isti simboli ispisani na mikrotitarsku ploču što se i može vidjeti na slici 5.



Slika 5. Prikaz obilježavanja mikrotitarske ploče sa 96 jažica u kojoj se nalaze uzorci alantoinne tekućine (vlastita fotografija)

Brzi hemaglutinacijski test se provodi pomoću uzoraka alantoidne tekućine i otopine eritrocita pijetla. Koristi se ploča koja je podijeljena na 54 polja, za potrebe ovog eksperimenta korištena su 24 polja (6 jaja po razrijeđenju kojih je 4). Po kap (20 μ L) svakog uzorka prethodno izvađene alantoidne tekućine kapnuta je na polje te zatim nasvaku od kapljica dodana je kap otopine eritrocita. Kako bi došlo do reakcije potrebno je laganim kruženjem cijele ploče izmiješati uzorke sa dodanom otopinom eritrocita, a ako ni to nije dovoljno, onda s nastavkom za pipetu lagano pomiješati svaki uzorak. Na slici 6 mogu se vidjeti rezultati hemaglutinacijskog testa. Ako je u uzorku alantoidne tekućine prisutan virus, on će se uhvatiti za membranu eritrocita te će doći do zgrušavanja otopine eritrocita što je vidljivo na primjerima na ploči. Ako u alantoidnoj tekućini nije prisutan virus, ne dolazi do reakcije te otopina ostaje ujednačene crvenkaste boje.



Slika 6. Ploča na kojoj je proveden hemaglutinacijski test (vlastita fotografija)

3.2.3. Uspostavljanje primarne stanične kulture jetre pilećih embrija

Uspostavljanje primarne stanične kulture jetre pilećih embrija (eng. *Chicken Embryo Liver*, CEL) započinje izolacijom stanica primarne kulture iz pilećih embrija (OIE, 2018).

Stanice su izolirane iz embrija starih 15 dana čemu je prethodila inkubacija jaja u inkubatoru na 37,5 °C i ≥ 50 % vlage. Jaja su pregledana ovoskopom kako bi se utvrdila vitalnost embrija te su jaja sa živim embrijima odvojena i dezinficirana etanolom (70 %). Nakon

dezinfekcije, svi sljedeći postupci se odvijaju u laminaru. Lagano velikom pincetom lupanjem je probijena ljuska jajeta u području zračnog mjehura te uklonjena ljuska iznad zračnog mjehura. Pincetom je odstranjena bijela opna jajeta te je pomoću velike pincete izvađen embrij i položen u petrijevu zdjelicu. Ukoliko je žumanjak ostao vezan uz embrij, odstrani se pomoću škara. Embriju polegnutom na trbuh je škarama odstranjena glava i prerezana kralježnica odmah ispod krila. Embriju koji je okrenut trbuhom prema gore je potrebno škarama razrezati trbuh od kloake prema vratu i isprati s PBS-om. Embriju se zatim ukloni srce i izvadi jetra. Jetra su pomoću male pincete prebačena u čašu s PBS-om dok se ne obrade svi embriji. Uzorci jetre se dobro usitne pomoću škara u PBS-u. Nakon što su sve jetre odstranjene i usitnjene, uzorci su isprani u PBS-u i dobro promiješani nakon čega je potrebno pustiti tkivo jetre da se slegne i dekantirati. Ovaj postupak se ponavlja tri puta. Nakon ispiranja u PBS-u, jetra je isprana u 20 mL zagrijane 0,25 %-tne otopine tripsina uz dobro miješanje nakon čega su se uzorci istaložili i dekantirali. Nakon toga je provedeno razlaganje organa na stanice u 30 mL zagrijanoj 0,25 %-tnoj otopini tripsina pri sobnoj temperaturi uz vorteksiranje 10 min pri 500 rpm. Tako priređena suspenzija stanica je filtrirana, a zatim centrifugirana 5 min pri 300 rcf-a (eng. *relative centrifugal force*). Dobiveni supernatant se odbacuje, a preostali talog dodaje u medij s fetalnim goveđim serumom (FBS , eng. *Fetal Bovine Serum*) koji služi kao podloga za rast stanica. Broj stanica u priređenim uzorcima je određivan na hemocitometru, a zatim su stanice u određenim koncentracijama inokulirane na mikrotitarske ploče s 96 jažica. Ploče se zatim inkubiraju na temperaturi od 37 °C u inkubatoru te su spremne za daljnju upotrebu.



Slika 7. CEL stanična kultura nasadena u koncentraciji 1×10^6 st/cm² linija gledana neporedno nakon nasađivanja inverznim transmisijskim svjetlosnim mikroskopom Axiovert 25 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Njemačka), uvećanje 100 x (vlastita fotografija)

3.2.3.1. Određivanje broja kulture stanica jetre pilećih embrija

Određivanje početnog broj stanica kulture stanica jetre pilećih embrija vrši se brojanjem neizravnom metodom na hemocitometru po Neubauer-u (OIE, 2018). Iz primarne kulture se uzelo 10 μ L primarne kulture suspenzije stanica jetre pilećih embrija te pomiješalo u željenom omjeru s tripan plavim bojilom koji boja mrtve stanice. 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 i onda se određuje broj stanica po mililitru. Nakon inkubacije potrebno je provjeriti kvalitetu monosloja kulture stanica jetre pilećih embrija također pod inverznim mikroskopom. Stanice jetre pilećih embrija su male, okrugle i povezane u nakupine nepravilnog oblika, okružene stanicama fibroblasta koje su vretenastog oblika.

Jednadžba izračuna ukupnog broja stanica po mL uzorka:

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

Gdje je:

- R – čimbenik razrjeđenja
- F – čimbenik komorice (10^4)
- Σ stanica – suma svih stanica izbrojanih u oba dijela komorice
- n kvadrata – ukupni broj kvadrata sa svake strane komorice u kojima su stanice brojane

3.2.3.2. Infekcija kulture stanica jetre pilećih embrija

Razrjeđenja virusa EDSV pripremaju se pomoću kompletnog DMEM medija za uzgoj stanica koji sadrži neesencijalne aminokiseline i neomicin te otopinu 1M HEPES-a u omjeru 1:5. Za titraciju se koriste 4 razrjeđenja odnosno od 3. do 6. deseterostrukog razrjeđenja. Virus se naciepljuje na mikrotitarske pločice. Jedna mikrotitarska pločica podijeli se na 2 djela te se sva 4 razrjeđenja naciepljuju u 11 jažica tako da je jedan red jedno razrjeđenje što se vidi na slici 8. Od reda A do reda D je jedna paralela, dok je od reda E do reda H druga paralela na pločici, redom po slovnim oznakama. Negativna kontrola nalazi se u dvanaestom stupcu, a čine ju samo medij za uzgoj stanica i HEPES.

Stanice su nasađene u tri različite koncentracije: 1×10^6 st/mL, 2×10^5 st/mL i 5×10^5 st/mL uz dodatak DMEM podloge s 5 % FBS-a, te je na kraju ukupni volumen po jažici iznosio 0,1 mL. Ploče su inkubirane tijekom 24 sata pri 37 °C uz 5 % CO₂ u inkubatoru te nakon toga titrirane virusom EDSV uz dvije različite koncentracije FBS seruma – 0 % i 2 %. Iz svake jažice se odsiše medij i doda po 30 µL virusne suspenzije, zatim slijedi centrifugiranje 30 min/1000 g, nakon centrifuge dodaje se 170 µL medija u jažice te ploče idu u inkubator i očitavaju se nakon 7 dana. Titracija kreće od bočice u kojoj je 7 log/osušak virusa koji se otapa u 10 mL DMEM-5 medija i iz te otopine se kreću raditi razrjeđenja od -1 do -6 (900 µL medija + 100 µL suspenzije virusa). Ploče se titriraju sa razrjeđenjima od -3 do -6 (na svakoj ploči po dvije paralele).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-3											NK
B	-4											NK
C	-5											NK
D	-6											NK
E	-3											NK
F	-4											NK
G	-5											NK
H	-6											NK

Copyright © 2009 Editra aksamitiene

Slika 8. Shema mikrotitarske ploče s 96 jažica podijeljene na dva replikanta (dvije paralele). Prikazane su pozicije nanošenja 4 deseterostruka razrjeđenja (-3, -4, -5, -6) i negativne kontrole (NK) (Anonymous, 2017).

3.2.3.3. Određivanje titra virusa pomoću Reed-Münch postupka

Titir virusa izražava se kao broj infektivnih doza koje uzrokuju pojavu citopatskog učinka kod 50 % inficiranih staničnih kultura tkiva. Računa se kao logaritam recipročne vrijednosti razrjeđenja kod takozvane infektivne doze 50. Nakon inkubacije, mikrotitarske pločice se pregledavaju pod inverznim mikroskopom te se uočavaju moguće promjene na stanicama. Rezultati se bilježe kao pozitivni kod onih jažica gdje se uočava citopatski učinak u odnosu na negativnu kontrolu te negativni kod jažica kod kojih se ne uočava citopatski učinak u odnosu na negativnu kontrolu. Nakon što su sve jažice pregledane potrebno je odrediti titar virusa Reed-Münch-ovom metodom (tablica 1) koja glasi:

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

Kako bi mogli dobiti izračun, potrebni su sljedeći podatci:

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

Tablica 1. Izračunavanje titra virusa prema Reed – Münch postupku (iz vlastitih rezultata)

Razrjeđenje virusa	Broj jažica	Apsolutni rezultati		Kumulativni rezultati		% infektivnosti
		Pozitivni	Negativni	Pozitivni	Negativni	
10^{-3}	11	11	0	30	0	100,0
10^{-4}	11	11	0	19	0	100,0
10^{-5}	11	8	3	8	3	72,7
10^{-6}	11	0	11	0	14	0,0

Izračun:

$$a = \% \text{infektivnosti (doza A)} = (8/11) \times 100 = 72,7$$

$$b = \% \text{infektivnosti (doza B)} = (0/14) \times 100 = 0,0$$

$$\text{proporcionalna distanca} = \frac{72,7-50}{72,7-0,0} = 0,31$$

$$\log TCID_{50}/inokulum = 5+0,31 = 5,31$$

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

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

$$\text{otopljeno u (mL)} = 10$$

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

$$\text{omjer otapanja/inokulum} = 333,333333$$

$$\log TCID_{50}/osušak = 5,31 + \log (333,333333) = 7,84$$

3.2.3.4. Određivanje titra virusa pomoću Spearman-Kärber postupka

Određivanje titra virusa na embrioniranim jajima računa se pomoću Spearman-Kärber-ove jednadžbe koja glasi:

$$\log ID_{50}/inokulum = X - d\left(0,5 - \frac{\sum p}{n}\right) \quad (3)$$

Gdje je:

$\log ID_{50}/inokulum$ = logaritam virusa u odnosu na inokulum u testu

X = logaritam recipročne vrijednosti najmanjeg razrjeđenja

d = logaritam omjera dva susjedna razrjeđenja u nizu

$\sum p$ = suma supstrata s promjenom (suma CPE pozitivnih staničnih kultura/specifičnih promjena)

n = ukupan broj inficiranih supstrata po razrjeđenju

Titlar prema Spearman-Kärberu može se izračunati i prema slijedećem primjeru:

$$X_{50} = 0.5 \sum [(X_i + X_{i+1}) \times (P_{i+1} + P_i)] \quad (4)$$

Gdje je:

X_i = logaritam i-tog razrjeđenja

P_i = proporcija pozitivnih embrija (uginulih) kod i-tog razrjeđenja i ukupnog broja inokuliranih jaja (bez nespecifično uginulih) u i-tom razrjeđenju

Tablica 2. Izračunvanje titra virusa prema Spearman-Kärberu (iz vlastitih rezultata)

X_i	$X_i + X_{i+1}$	pozitivno	negativno	P_i	$P_{i+1} + P_i$	$(X_i + X_{i+1}) \times (P_{i+1} + P_i)$
7		0	6	0,000		
6	13	0	6	0,000	0,000	0,000
5	11	2	4	0,333	0,333	3,667
4	9	3	3	0,500	0,167	1,500
3	7	6	0	1,000	0,500	3,500
2	5	6	0	1,000	0,000	0,000
	2					$\Sigma 8,667$

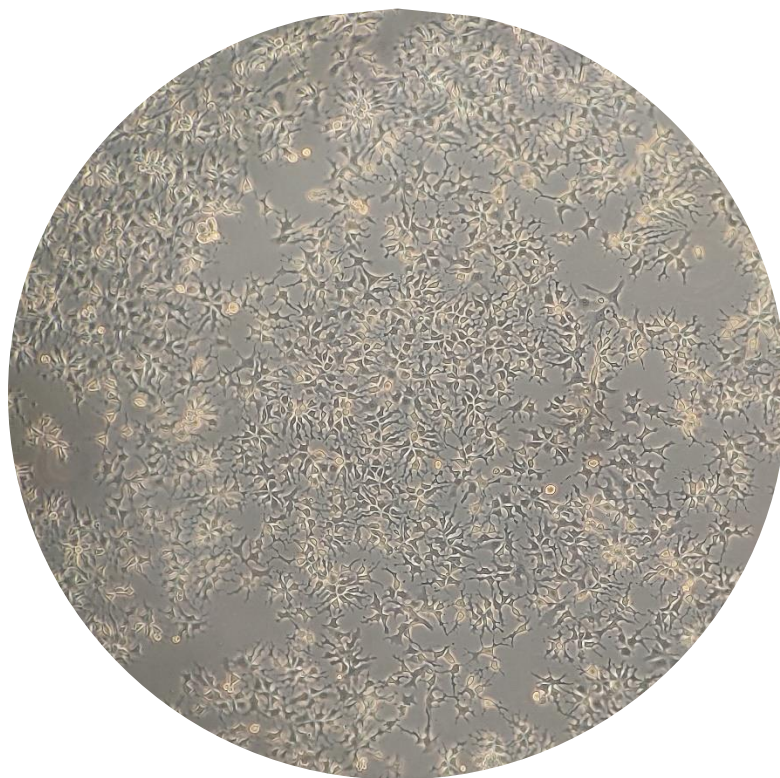
$$X_{50} = 8,667/2$$

$$EID_{50} = 10^{4,334} / \text{inokulirani volumen}$$

$$\log EID_{50}/inokulumu = 4,334$$

3.2.4. Komercijalna kultura stanica SHP

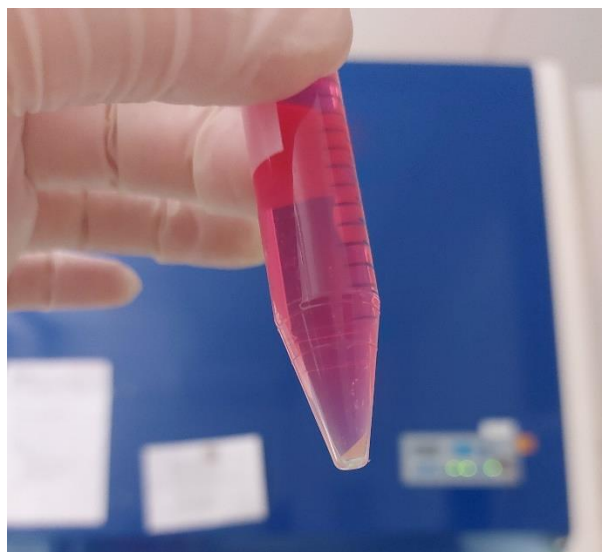
Stanice hepatoma pijetla (SHP) su izvedene iz tumorskih kvržica jetre Leghorn pilića te je njihova kontinuirana stanična linija zaprimljena iz vanjske istraživačke ustanove u svrhu ispitivanja prikladnosti metode. SHP stanice su transformirane, što omogućuje njihovu besmrtnost i kontinuirano razmnožavanje u kulturi. Stanice hepatoma pijetla imaju epitelni fenotip i osobito su korisne za proučavanje interakcija domaćin-patogen u gastrointestinalnom traktu peradi. SHP stanice su adherentne i pokazuju morfologiju sličnu dendritima što je i vidljivo na slici 9. Stanična adhezija ključna je u staničnoj komunikaciji i regulaciji te je od temeljne važnosti u razvoju i održavanju tkiva. Mehaničke interakcije između stanice i njezinog izvanstaničnog matriksa mogu utjecati i kontrolirati ponašanje i funkciju stanica (Khalili i Ahmad, 2015). Upravo zbog osnovne funkcije stanične adhezije u ovom radu je uključeno istraživanje utjecaja različitih podloga na adheziju i rast SHP stanica s ciljem što uspješnijih daljnjih istraživanja.



Slika 9. SHP stanična linija gledana inverznim transmisivskim svjetlosnim mikroskopom Axiovert 25 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Njemačka), uvećanje 2 000 x (vlastita fotografija)

3.2.4.1. Otapanje viala

Medij koji je preporučen za uzgoj SHP stanica je EMEM + 10% FBS + 2 mM L-glutamin uz dodatak 1 mL neomicina u bocu od 500 mL. Medij za rast stanica prethodno se zagrije na 37 °C i odvoji 9 mL u epruvetu. Boca ugrijanog medija i epruveta prebrišu se etanolom (70 %) i unesu u LF-kabinet. Ampula sa stanicama se izvadi iz tekućeg dušika te se brzo odmrzne grijanjem u ruci. Odmrznuta ampula prebriše se etanolom (70 %) i unese u LF kabinet. Suspenzija stanica prebaci se u epruvetu s 9 mL prethodno ugrijanog medija. Resuspendira se 3-5 puta i centrifugira na 300 g tijekom 5 min. Talog je resuspendiran u 25 mL medija, te je 10 mL prebačeno u Petrijevke obložene kolagenom (komercijalne), a 15 mL je prebačeno u bocu T75.



Slika 10. Falcon epruveta koja sadrži talog SHP stanica nakon centrifugiranja (vlastita fotografija)

3.2.4.2. Optimizacija uzgoja komercijalne kontinuirane stanične linije SHP

Kako bi istraživanja na staničnoj liniji SHP protekla uspješno, potrebno je provesti istraživanja vezano za uvjete rasta tih stanica. Ispituju se rast na različitim medijima, rast pri različitim koncentracijama seruma, rast pri različitoj koncentraciji stanica i sl.

3.2.4.2.1. Usporedba rasta na različitim medijima

Cilj je isprobati različite medije za rast SHP stanica: preporučeni medij, EMEM sa 10 % seruma te DMEM sa 10 % seruma i DMEM sa 5 % seruma. Na petrijevke su nasađene stanice u koncentraciji od 150 000 st/mL u dvije paralele za svaki od medija. Zatim su stanice inkubirane pri 37 °C u inkubatoru i brojane nakon 3 dana. Kako bi se stanice izbrojale potrebno je odvojiti stanice sa dna petrijevki. Postupak kreće izuzimanjem medija iz petrijevke te dodatkom 2 mL 0,05 %-tnog tripsina nakon čega slijedi inkubacija od 5 min u inkubatoru pri 37 °C. Tripsin se dodaje kako bi odvojio stanice koje su adherirale za podlogu. Nakon inkubacije stanice se resuspendiraju pomoću pipete kako bi se razbile nakupine stanice uz dodatak 8 mL medija. Iz petrijevke je izuzeta suspenzija stanica te se u željenom omjeru pomiješa uzorak suspenzije stanica s tripan plavim bojilom koji boja mrtve stanice. Potom se po 10 µL obojene suspenzije stanica stavi sa svake strane komorice, stanice se broje pod inverznim mikroskopom i onda se određuje broj stanica po mililitru.

3.2.4.2.2. Rast na želatini i non-coated – preliminarno istraživanje

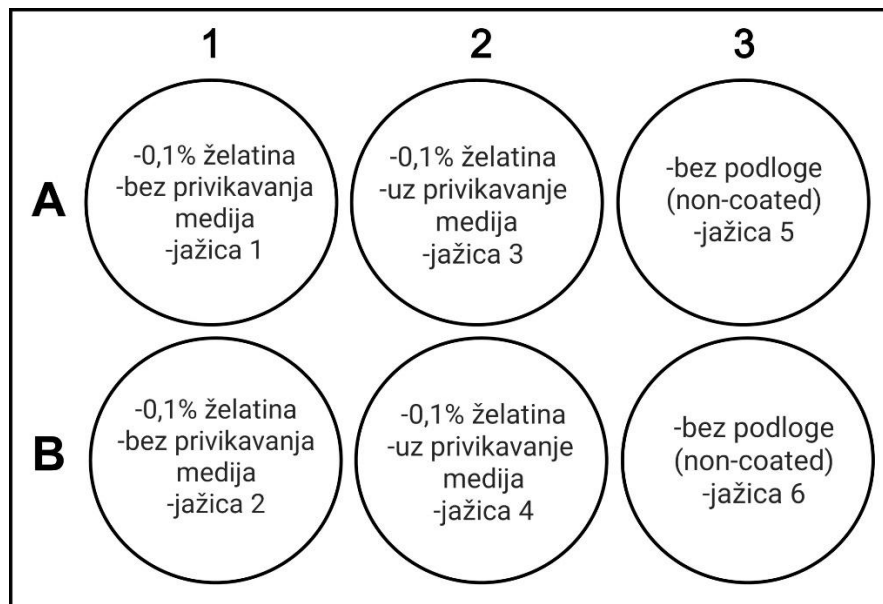
Ispitivan je rast stanica SHP na želatini kao podlozi i bez podloge. Želatina je pripravljena kao 0,1 % otopina, 1 g u 100 mL WFI, nakon čega slijedi autoklaviranje 15 min na 121 °C te se zatim drži na sobnoj temperaturi. Suspenzija stanica je pripravljena iz T75 boce u kojoj su porasle stanice. Iz boce T75 je uklonjen medij, površina T boce gdje su porasle stanice je dva puta isprana sa PBS-om te je dodano 2 mL tripsina kako bi se stanice odvojile od podloge. Boca je zatim inkubirana cca 5min, nadodano je 8 mL medija (DMEM-10), stanice su resuspendirane te je suspenzija odvojena. Korištena je mikrotitarska ploča sa 6 jažica te je u svih 6 jažica nasađeno po 3×10^4 st/cm² stanica SHP (slika 11):

- 2 paralele: 1 mL otopine želatine, inkubacija 30 min pri 37 °C u CO₂ inkubatoru; uklonjena želatina, inokulirano 1860 µL medija (DMEM-5) i 140 µL stanične suspenzije – volumeni dobiveni na temelju početne koncentracije stanica kako bi se zadovoljio ukupni volumen (2 mL) (jažice 1 i 2)
- 2 paralele: 1 mL želatine, inkubacija 30 min pri 37 °C u CO₂ inkubatoru; uklonjena želatina; dodano 2 mL medija i inkubirano 60 min pri 37 °C u CO₂ inkubatoru; zatim je

izuzeto 140 μL medija (DMEM-5) i dodano 140 μL stanične suspenzije - volumeni dobiveni na temelju početne koncentracije stanica kako bi se zadovoljio ukupni volumen (2 mL) (jažice 3 i 4)

- 2 paralele: nisu tretirane, inokuliran je medij (1860 μl , DMEM-5) i izračunat volumen stanične suspenzije (140 μL) da zadovolji početnu koncentraciju ukupnog volumena 2 mL (jažice 5 i 6)

Nakon tri dana stanice su gledane pod mikroskopom i brojane. Iz jažice je izuzeta suspenzija stanica te se u omjeru 1:4 pomiješa uzorak suspenzije stanica (25 μL) s PBS-om (75 μL) i zatim broje stanice pod mikroskopom.



Slika 11. Prikaz mikrotitarske ploče sa 6 jažica označenih u odnosu na eksperiment. (vlastita fotografija)

3.2.4.2.4. Rast na želatini, kolagenu i necoatano

Provedeno je istraživanje rasta stanica na želatini, kolagenu i necoatano gdje je praćen broj živih i mrtvih stanica 3. i 6. dan nakon nasađivanja. Na komercijalne petrijevke coatane kolagenom, jedna mikrotitarska ploča sa 6 jažica sa želatinom i jedna bez ičega na dnu nasađene su stanice SHP u dvije koncentracije stanica: 1×10^4 st/cm² i 3×10^4 st/cm².

Suspenzija stanica je pripremljena iz boce T75 u kojoj su porasle stanice prema postupku navedenom u poglavlju 3.2.4.2.2. Površina dna petrijevke iznosi 58,1 cm² uz radni volumen 12,5 mL te površina jažice mikrotitarske ploče sa 6 jažica 9,6 cm² uz radni volumen od 2 do 5 mL. Želatina je pripremljena kao 0,1 % otopina, 1 g u 100 mL WFI, nakon čega slijedi autoklaviranje 15 min na 121 °C te se zatim drži na sobnoj temperaturi. Pripremljena 0,1 % otopina želatine u vodi se nanese u jažice, inkubira 45 min u CO₂ inkubatoru, odsisa se višak želatine te je ploča spremna za korištenje. Na svaku jažicu unutar mikrotitarske ploče sa 6 jažica se nanosi suspenzija stanica i inkubira u inkubatoru, isto tako i na ploče čije su jažice *non-coated* i na komercijalne petrijevke obložene kolagenom. 3. i 6. dan nakon nasađivanja stanice su brojane. Iz jažice/petrijevke je izuzeta suspenzija stanica te se u željenom omjeru pomiješa uzorak suspenzije stanica s PBS-om. Potom se po 10 µL suspenzije stanica stavi sa svake strane komorice i stanice se broje u jednakom broju kvadrata sa svake strane komorice. Stanice se broje pod inverznim mikroskopom i onda se određuje broj stanica po cm².

3.2.4.3 Titracija

Titracija je provedena na dva načina kod kojih su promatrani različiti uvjeti: titracija virusa direkt u suspenziju stanica sa resuspendiranjem i bez resuspendiranja nakon dodatka virusa te titracija stanica 24 h i 48 h nakon nasađivanja.

3.2.4.3.1 Titracija suspenzije SHP stanica

Pokus I

Na mikrotitarsku ploču sa 96 jažica nasađeno je po 100 µL stanične suspenzije koncentracije 2x10⁵ st/ml. Ispitane su dvije različite koncentracije seruma u mediju: 2 % i 5 % FBS-a. Suspenzija stanica je pripremljena iz boce T75 u kojoj su porasle stanice. Iz boce T75 je uklonjen medij, površina T boce gdje su porasle stanice je dva puta isprana sa PBS-om te je dodano 2 mL tripsina kako bi se stanice odvojile od podloge. Boca je zatim inkubirana cca 5 min, nadodano je 8 mL medija (DMEM-10), stanice su resuspendirane te je suspenzija odvojena.

Pripremljene su 4 pločice te ispitujemo uz različit postotak seruma u mediju i utjecaj resuspendiranja suspenzije stanica sa otopinom virusa: po dvije pločice sa istim medijem od kojih je jedna resuspendirana druga nije.

Titracija kreće od bočice u kojoj je 7 log EID₅₀/osušak virusa koji se otapa u 10 mL medija i iz te otopine se kreću raditi razrijeđenja od -1 do -6 (900 µL medija + 100 µL suspenzije virusa). Ploče se titriraju sa razrijeđenjima od -3 do -6 (na svakoj ploči po dvije paralele). Razrijeđenja virusa se rade sa medijem koji se ispituje, u ovom slučaju imamo 2 različita medija. Ploče su titrirane isti dan, a očitane nakon 7 dana. Očitava se citopatski učinak virusa na stanice, uspoređujući sa kontrolnim jažicama (jažice u kojima se nalazi samo medija).

Pokus II

Na mikrotitarsku ploču sa 96 jažica nasadeno je po 100 µL stanične suspenzije u dvije različite koncentracije: 2×10^5 st/mL i 5×10^5 st/mL. Ispitane su i tri različite koncentracije seruma u mediju: 0 %, 2 % i 5 %. Suspenzija stanica je pripremljena iz boce T75 u kojoj su porasle stanice. Iz boce T75 je uklonjen medij, površina T boce gdje su porasle stanice je dva puta isprana sa PBS-om te je dodano 2 mL tripsina kako bi se stanice odvojile od podloge. Boca je zatim inkubirana cca 5 min, nadodano je 8 mL medija (DMEM-10), stanice su resuspendirane te je suspenzija odvojena.

Titracija kreće od bočice u kojoj je 7 log/осушак virusa koji se otapa u 10 mL medija bez seruma (DMEM) i iz te otopine se kreću raditi razrijeđenja od -1 do -6 (900 µL medija + 100 µL suspenzije virusa). Ploče se titriraju sa razrijeđenjima od -3 do -6 (na svakoj ploči po dvije paralele). Ploče su titrirane isti dan, a očitane nakon 7 dana. Razrijeđenja virusa se rade sa medijem koji se ispituje, u ovom slučaju imamo 3 različita medija. Očitava se citopatski učinak virusa na stanice, uspoređujući sa kontrolnim jažicama (jažice u kojima se nalazi samo medij).

3.2.4.3.2 Titracija SHP stanica

Ispitivana je titracija stanica SHP na želatini kao podlozi 24 h i 48 h nakon nasađivanja. Želatina je pripremljena kao 0,1 % otopina, 1 g u 100 mL WFI, nakon čega slijedi autoklaviranje 15 min na 121 °C te se zatim drži na sobnoj temperaturi. U svaku jažicu mikrotitarske ploče sa 96 jažica je nadodano po 30 µL 0,1 % otopine želatine, slijedi inkubacija 45 min, odstranjuje se višak želatine te se na takvu podlogu nasađuju stanice. Stanice su nasađene u dvije različite koncentracije: 2×10^5 st/mL i 5×10^5 st/mL u mediju DMEM-10. Stanice su titrirane virusom EDSV u dvije različite koncentracije seruma u mediju: 0 % i 2 %.

24 h i 48 h nakon nasađivanja stanice su titrirane. Titracija kreće od bočice u kojoj je 7 log/osušak virusa koji se otapa u 10 mL mediju bez seruma (DMEM) i iz te otopine se kreću raditi razrijeđenja od -1 do -6 (900 µL medija + 100 µL suspenzije virusa). Ploče se titriraju sa razrijeđenjima od -3 do -6 (na svakoj ploči po dvije paralele). Prvo se u jažice dodaje po 30 µL odgovarajućeg inokuluma virusa, zatim slijedi centrifugiranje 30 min/1000 g. Nakon centrifugiranja se u jažice nadodaje po 170 µL medija i pločice idu u inkubator. Ploče se očitavaju sedmi, osmi, deveti i deseti dan od titracije.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog diplomskog rada bio je usporediti sklonost infekcije virusom EDSV na tri različita supstrata za proizvodnju cjepiva: embrioniranim pačjim jajima, kulturi stanica jetre pilećih embrija i kulturi stanica hepatoma pijetla (SHP) u svrhu pronalaska alternative uzgoju virusa i titracijama virusa na embrioniranim jajima.

U svrhu optimizacije uzgoja komercijalne kontinuirane stanične linije SHP provedena je usporedba rasta stanica SHP na različitim medijima (DMEM-10, DMEM-5 i EMEM-10) čiji su rezultati vidljivi na slikama 16 – 19 i tablici 6 te usporedba rasta na različitim podlogama – želatini, kolagenu i *non-coated*. Rezultati rasta stanica SHP na različitim podlogama prikazani su na slikama 13 – 15.

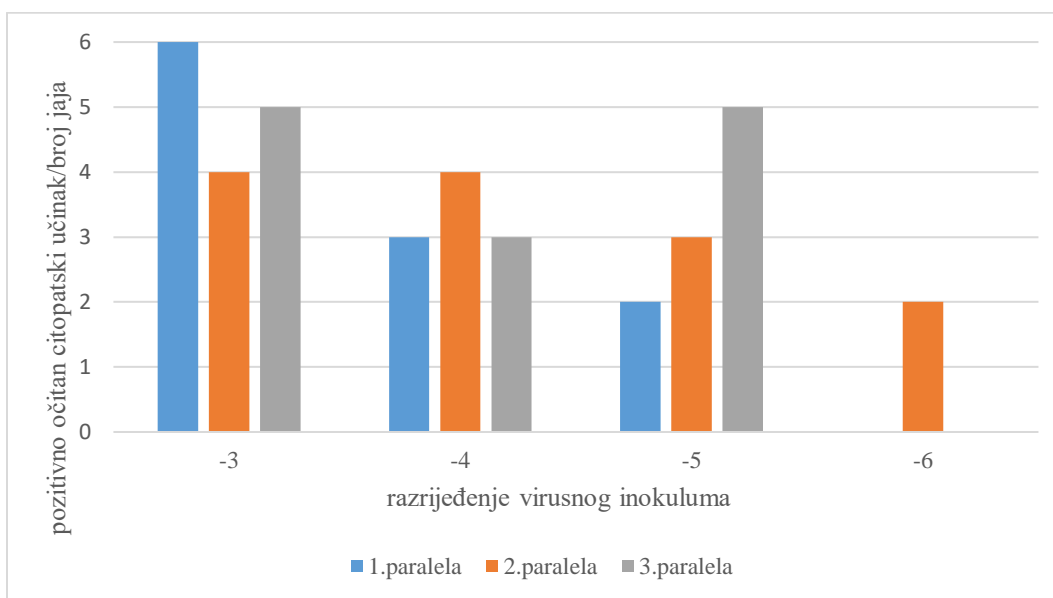
Embrionirana pačja jaja titrirana su virusom EDSV te su rezultati titracije prikazani na slici 12 i u tablici 3 gdje je vidljiva srednja vrijednost titra virusa EDSV. Također, provedena je titracija virusa EDSV na stanicama jetre pilećeg embrija čiji su rezultati prikazani u tablicama 4 i 5.

Stanice hepatoma pijetla titrirane su virusom EDSV u više uvjeta ovisno o koncentraciji seruma u mediju i početnoj koncentraciji stanica koje su nasadene na podlogu te su ti rezultati vidljivi na slikama 21 - 28. Kroz te eksperimente određeni su najbolji uvjeti za njihov rast te su primjenjeni u daljnjem istraživanju. U tablicama 7 i 8 te slikama 29 - 30 vidljivi su rezultati titra virusa EDSV na stanice SHP.

4.1. REZULTATI BRZOG HEMAGLUTINACIJSKOG TESTA NA PAČJIM JAJIMA TITRIRANIM VIRUSOM EDSV

Brzi hemaglutinacijski test proveden je na uzorcima alantoisne tekućine koji su žetvom sakupljeni 6 dana nakon inokulacije embrioniranih pačjih jaja virusom EDSV. Eksperiment je postavljen u 3 paralele – u svakoj 6 jaja po decimalnom razrijeđenju inokuluma virusa što ukupno daje 24 jaja po paraleli. Lampiranjem nije zabilježen nedostatak vitalnosti embrija niti u jednoj paraleli. Na slici 12 prikazani su rezultati očitavanja brzog hemaglutinacijskog testa – za svaku

paralelu i razrijeđenje prikazan je broj jaja u čijoj je alantoisnoj tekućini zabilježena prisutnost virusa.



Slika 12. Rezultat brzog hemaglutinacijskog testa u odnosu na pozitivni citopatski učinak virusa EDSV

Prema rezultatima, vidljiv je pad utjecaja virusa kako razrijeđenje virusnog inokuluma raste (pri -6 razrijeđenju virusnog inokuluma citopatski učinak je minimalan te prisutan samo u drugoj paraleli) upravo zbog manje koncentracije virusnih čestica u samom inokulumu.

U tablici 3 prikazani su rezultati titra virusa sve tri paralele kao i srednja vrijednost titra virusa izražena kao $\log EID_{50}/\text{osušku}$.

Tablica 3. Srednja vrijednost titra virusa

	$\log EID_{50}/\text{osušku}$	srednja vrijednost $\log EID_{50}/\text{osušku}$
1. paralela	6,33	6,60
2. paralela	6,73	
3. paralela	6,67	

U provedenom istraživanju Razmarai i sur. (2023) rezultat hemaglutinacijskog testa provedenog na pačjim jajima je iznosio 5,42 logEID₅₀/osušku što je značajna razlika u odnosu na rezultat 6,60 logEID₅₀/osušku, a sličan rezultat u svom istraživanju je dobila NB Rofail (2005) koji je iznosio 5 logEID₅₀/osušku. Kod inaktivacije patogena kao neophodne faze u proizvodnji antigena virusa zbog opasnosti širenja infekcije, moguća je pojava smanjenja antigenosti virusa (Banani i sur., 2005) što može uzrokovati manju vrijednost titra. Ovisno o izvoru antigena virusa može doći do razlike u vrijednosti titra virusa.

4.2. REZULTATI TIRACIJE NA CEL STANICAMA

Titracija EDS virusa na stanice jetre pilećeg embrija provedena je pri dvije različite koncentracije medija – DMEM i DMEM-2 te pri tri različite koncentracije stanica – 2×10^5 st/mL, 5×10^5 st/mL i 1×10^6 st/mL. Stanice su gledane i očitane 6. dana od titracije. Jažice na ploči sa DMEM-2 i 1×10^6 st/mL su bile većinski oguljene (stanica je u tim uvjetima previše, a medij je prebogat stoga je teško očitati citopatski učinak virusa) te je također i kontrolna jažica bila oguljena. Na ploči se izdvaja -3 razrijeđenje virusa na kojem nije bilo oguljenih jažica te je citopatski učinak bio čitljiv. Kod iste koncentracije seruma (DMEM-2) no uz koncentraciju stanica od 5×10^5 st/mL, jažice na razrijeđenjima -3 i -4 daju pregledan i čitljiv rezultat, bez oguljenih jažica. Kontrolne jažice su bile oguljene dok su jažice na razrijeđenjima -5 i -6 većinski oguljene. Na ploči gdje su nasadene stanice u koncentraciji od 2×10^5 st/mL i uz 2 % koncentraciju seruma stanice nisu konfluentne, kontrolne jažice nisu reprezentativne, oguljene su. Zadnji red jažica na ploči je najlošiji od svih što je moguće zbog isparavanja medija pri rubovima ploče.

Uz 0 % koncentraciju seruma u mediju i 1×10^6 st/mL izgled jažica je mnogo bolji. Od 8 kontrolnih jažica, samo je jedna oguljena. Jažice inokulirane -4 i -5 virusnim razrijeđenjima su sve pokazale pozitivan citopatski učinak virusa EDSV na stanice jetre pilećeg embrija. Najbolje rezultate je dala ploča sa koncentracijom stanica od 5×10^5 st/mL pri koncentraciji seruma 0 %. Na ploči nije bilo oguljenih jažica, stanice su konfluentne, lijepo prerasle podlogu te je citopatski učinak lako čitljiv u odnosu na kontrolne jažice te su rezultati na ovoj ploči korišteni za izračun titra virusa. Pri istoj koncentraciji seruma i koncentraciji stanica 2×10^5 st/mL ploča nije bila čitljiva zbog nekonfluentnih stanica i oguljenih jažica.

Tablica 4. Rezultati očitavanja citopatskog učinka virusa EDSV na stanicama CEL (DMEM i 5×10^5 st/ml) – 1.paralela

Apsolutni rezultati		Kumulativni rezultati		% infektivnosti
Pozitivni	Negativni	Pozitivni	Negativni	
11	0	30	0	100,0
11	0	19	0	100,0
8	3	8	3	72,7
0	11	0	14	0,00
logTCID ₅₀ /osušku		7,84		

Tablica 5. Rezultati očitavanja citopatskog učinka virusa EDSV na stanicama CEL (DMEM i 5×10^5 st/ml) – 2.paralela

Apsolutni rezultati		Kumulativni rezultati		% infektivnosti
Pozitivni	Negativni	Pozitivni	Negativni	
11	0	29	0	100,0
11	0	18	0	100,0
7	3	7	3	70,0
0	11	0	14	0,00
logTCID ₅₀ /osušku		7,81		
srednja vrijednost logTCID ₅₀ /osušku		7,83		

4.3. REZULTATI RASTA SHP STANICA NA RAZLIČITIM PODLOGAMA

4.3.1 Preliminarno istraživanje – rast na želatini i *non-coated* podlozi

Ovim istraživanjem cilj je bio utvrditi rastu li stanice SHP dobro na želatini kao podlozi te ima li značaja za njihov rast ako se primjeni i korak privikavanja medija u inkubatoru. Prema rezultatima u tablici 6 vidljiva je pozitivna razlika u rastu kada se jažice oblože želatinom. Primjećuje se i nešto bolji rast kad se provede korak privikavanja medija u inkubatoru no moguće da je i u pitanju slučajnost u brojanju stanica.

Tablica 6. Rezultati preliminarnog istraživanja rasta stanica SHP na želatini i *non-coated* podlozi

	0.1 % želatina (st/cm ²)	0.1 % želatina + privikavanje medija (st/cm ²)	<i>non-coated</i> (st/cm ²)
1.paralela	228 800	248 300	209 300
2.paralela	226 200	221 000	140 300
Srednja vrijednost	227 500	234 650	174 800

4.3.2. Rezultati rasta SHP stanica na želatini, kolagenu i *non-coated* podlozi

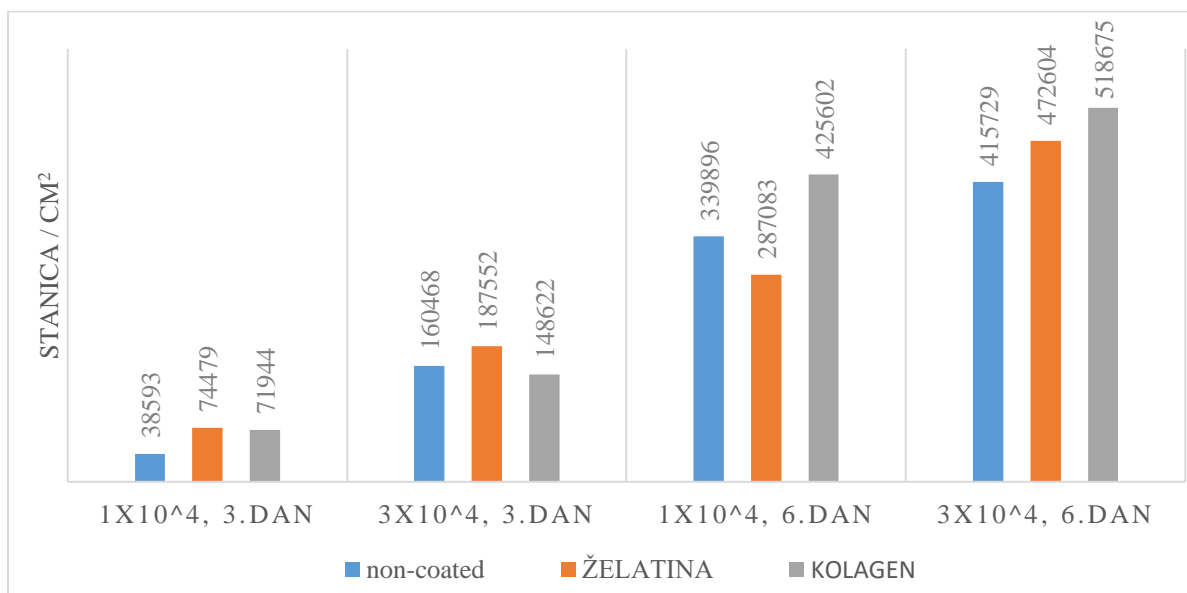
Ovim eksperimentom je isproban rast stanica SHP na tri različite podloge – želatini, kolagenu te *non-coated* uz dvije početne koncentracije stanica nasadenih na navedene podloge – 3×10^4 st/cm² i 1×10^4 st/cm². Nakon nasađivanja stanica na pojedine podloge tijekom šest dana praćen je vizualni izgled rasta stanica, a 3. i 6. dan su brojane mrtve i žive stanice. Cilj eksperimenta je usporediti broj stanica poraslih primarno na kolagenu i želatini s obzirom da je korištenje želatine kao podloge za rast puno jeftinija opcija u odnosu na kolagen (komercijalne petrijevke prekrivene kolagenom).

Na slici 13 prikazana je razlika u broju živih stanica na pojedinoj podlozi. Broj živih stanica SHP poraslih na kolagenu dominira 6. dan rasta te iznosi $4,16 \times 10^5$ st/cm² i $5,19 \times 10^5$ st/cm², pri obje početne koncentracije stanica, dok 3. dan rasta broj stanica na želatini je veći u odnosu na kolagen i *necoatano*. Stanice SHP koje su rasle na praznoj podlozi nisu mnogo zaostale rastom u odnosu na prekrivene podloge te su čak 6. dan nakon nasađivanja i sa početnom koncentracijom 1×10^4 st/cm² pokazale bolji rast u odnosu na želatinu.

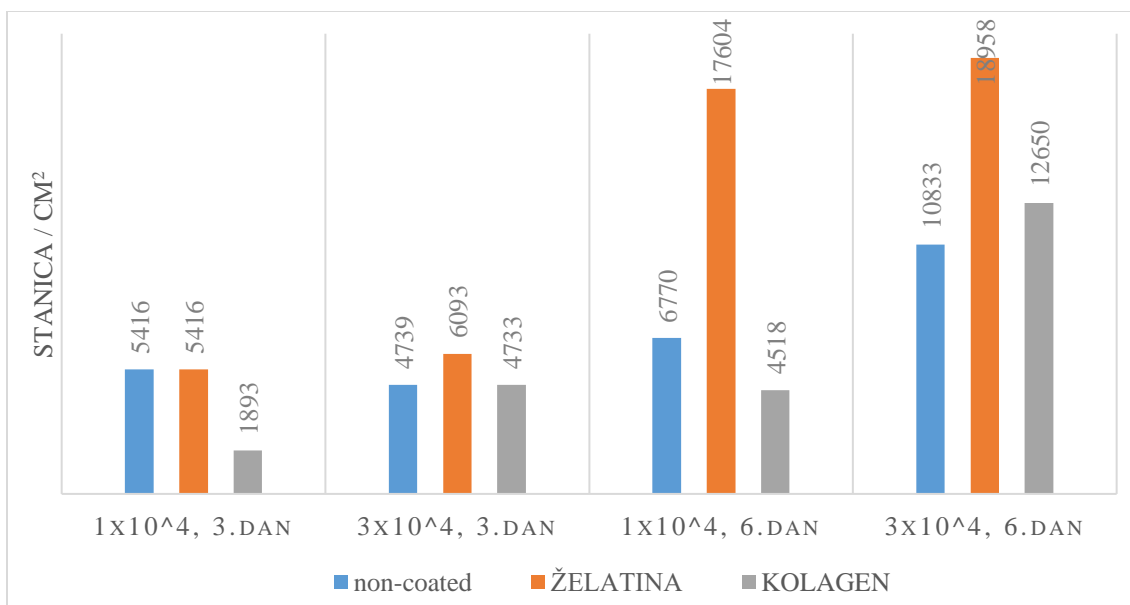
Broj mrtvih stanica SHP (slika 14) je najveći bio kod stanica nasadenih na podlogu prekrivenu želatinom šest dana nakon nasađivanja kod obje početne koncentracije stanica – $1,76 \times 10^4$ st/cm² i $1,89 \times 10^4$ st/cm², dok se kolagen kao podloga za rast pokazao dobar sa znatno manjim brojem mrtvih stanica u odnosu na želatinu – 6. dan rasta (početna koncentracija stanica 1×10^4 st/cm²) $6,78 \times 10^3$ st/cm². Broj mrtvih stanica na praznoj podlozi 3. dan nakon nasađivanja bio je podjednak broju mrtvih stanica na želatini – prosjek oko 5×10^2 st/cm².

Na temelju izračuna vijabilnosti, vidljivo je da stanicama odgovara rast na kolagenu (slika 15) – 6.dan (početna koncentracija stanica 1×10^4 st/ml) iznosi 98,95 %. Također, vijabilnost

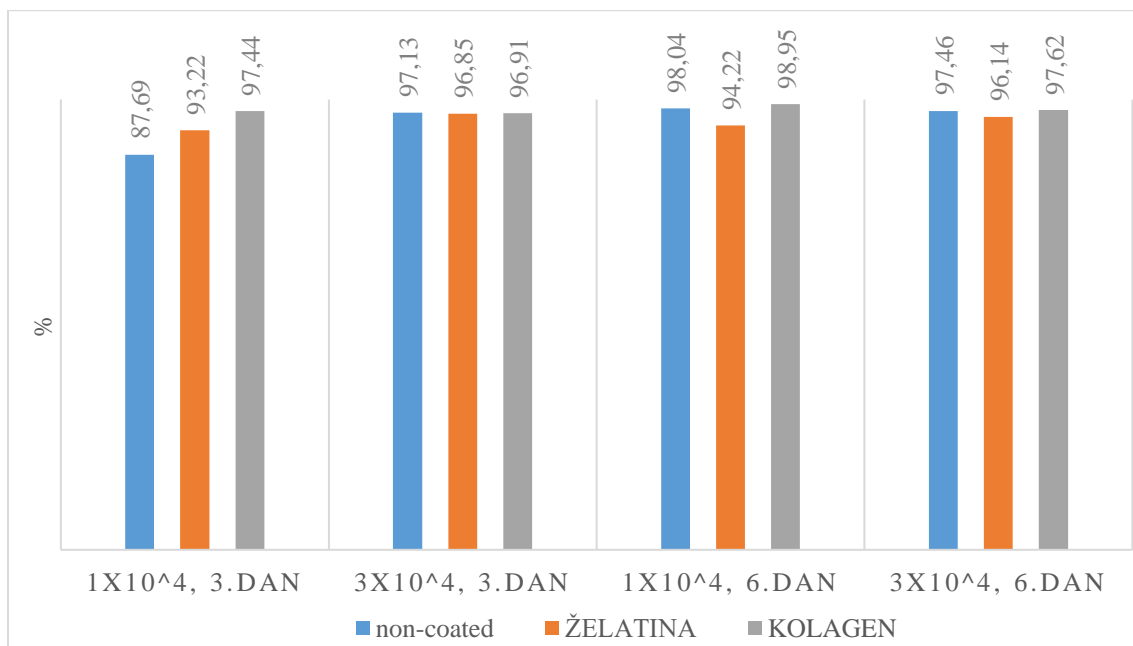
stanica je veća na praznoj podlozi u odnosu na vijabilnost na podlozi prekrivenoj želatinom – najveća razlika je primjećena 6. dan nakon nasađivanja (pri početnoj koncentraciji stanica 1×10^4 st/cm²) gdje je vijabilnost stanica poraslih na želatini iznosila 94,22 %, a na praznoj podlozi 98,04 %.



Slika 13. Grafički prikaz broja živih stanica SHP poraslih na različitim podlogama (stanice SHP su nasađene u dvije različite koncentracije – 1×10^4 st/cm² i 3×10^4 st/cm², na tri različite podloge – *non-coated*, želatini i kolagenu te brojane treći i šesti dan nakon nasađivanja).



Slika 14. Grafički prikaz broja mrtvih stanica SHP izbrojanih na različitim podlogama (stanice SHP su nasađene u dvije različite koncentracije – 1x10⁴ st/cm² i 3x10⁴ st/cm², na tri različite podloge – *non-coated*, želatini i kolagenu te brojane treći i šesti dan nakon nasađivanja).



Slika 15. Grafički prikaz vijabilnosti stanica SHP (stanice SHP su nasađene u dvije različite koncentracije – 1x10⁴ st/cm² i 3x10⁴ st/cm², na tri različite podloge – *non-coated*, želatini i kolagenu te brojane treći i šesti dan nakon nasađivanja) (%)

4.4. REZULTATI TITRACIJE EDSV NA STANICE HEPATOMA PIJETLA

4.4.1. Preliminarno istraživanje – ispitivanje utjecaja medija na rast SHP stanica

Mediji kao što su MEM, DMEM ili EMEM, uz dodatak seruma, koriste se za uzgoj adherentnih stanica kako bi se proizvele suspenzije virusa (Farges-Haddani i sur., 2006). Prisutnost seruma u mediju omogućuje oponašanje stanične okoline *in vivo* i potiče njihov rast. Serum sadrži mnogo korisnih komponenti uključujući faktore rasta, citokine, hormone, faktore vezivanja, bitne hranjive tvari kao što su elementi u tragovima i druge komponente koje promiču preživljavanje i proliferaciju stanica *in vitro* (Rourou i sur., 2009). Stoga je cilj ovog eksperimenta isprobati različite medije za rast stanica SHP kako bi daljnja istraživanja bila što uspješnija.

Rast stanica je isproban na tri različita medija: EMEM s 10 % seruma, DMEM s 10 % seruma i DMEM s 5 % seruma. Stanice su nasađene u početnoj koncentraciji od 30 000 st/cm² i brojane 3 dana nakon nasađivanja. Na slikama 16-18 vidi se rast stanica ovisno o korištenom mediju.



Slika 16. Populacija stanica SHP uzgojenih u mediju EMEM s 10 % seruma gledano inverznim transmisijskim svjetlosnim mikroskopom Axiovert 25 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Njemačka), uvećanje 100 x (vlastita fotografija)

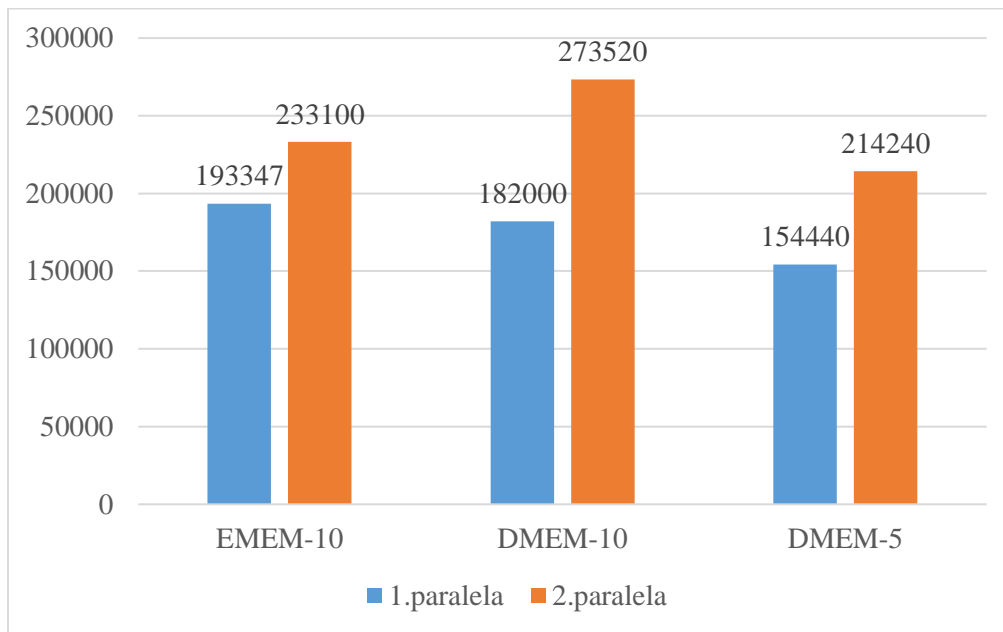


Slika 17. Populacija stanica SHP uzgojenih na mediju DMEM s 10 % seruma gledano inverznim transmisijskim svjetlosnim mikroskopom Axiovert 25 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Njemačka), uvećanje 100 x (vlastita fotografija)



Slika 18. Populacija stanica SHP uzgjenih u DMEM s 5 % seruma gledano inverznim transmisijskim svjetlosnim mikroskopom Axiovert 25 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Njemačka), uvećanje 100 x (vlastita fotografija)

Prema rezultatima (slika 19) vidljivo je da broj stanica u uzorcima paralela nije jednak no pokazuje se sličan trend. Medij s 10 % seruma omogućuje bolji rast stanica u odnosu na medij s 5 % seruma. Razlike između EMEM-10 i DMEM-10 su vrlo male u prvoj paraleli dok se u drugoj paraleli pokazao bolji DMEM-10 uz veći broj poraslih stanica. DMEM s 5 % seruma se pokazao kao najlošiji u oba uzorka.. Na temelju rezultata za daljnji rast SHP stanica najbolje bi odgovaralo korištenje DMEM medija s 10 % seruma.

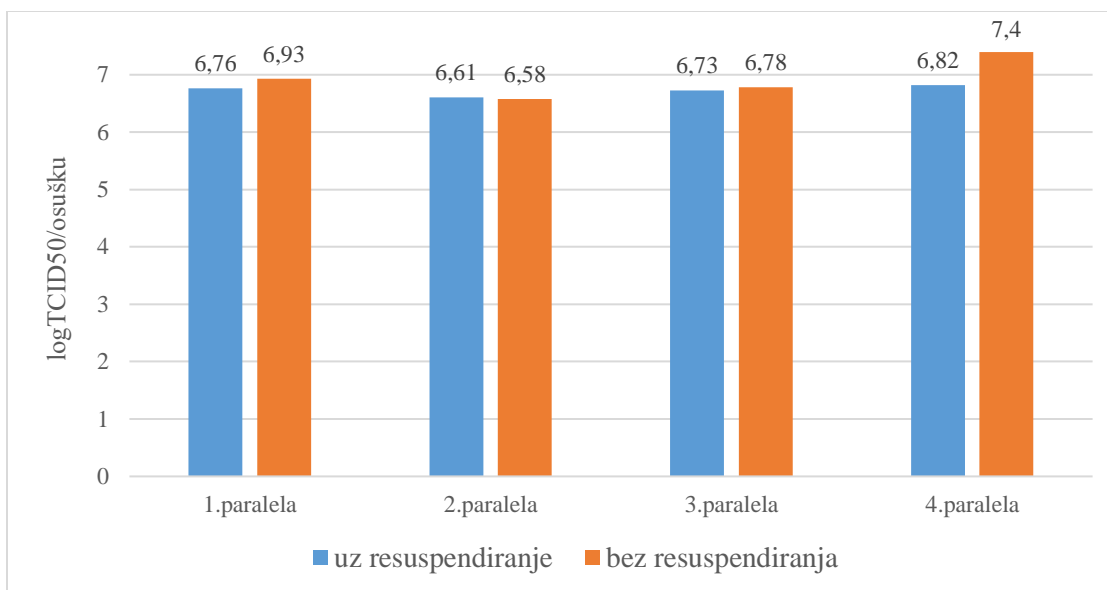


Slika 19. Prikaz rezultata rasta stanica SHP na različitim medijima i pri različitoj koncentraciji seruma ($C_0=30\ 000\ \text{st/cm}^2$)

4.4.2. Preliminarno istraživanje – titracija suspenzije SHP stanica

Pokus I

Cilj ovog eksperimenta je bio ispitati utjecaj različitog postotka seruma u mediju DMEM i utječe li resuspendiranje stanica SHP zajedno s nadodanim razrijeđenjem virusa na uspješnost istraživanja odnosno rast stanica SHP.



Slika 20. Prikaz rezultata titracije kao logTCID₅₀/osušku

Ploče na kojima su nasadene stanice s DMEM-2 medijem su izgledale dobro. Nije bilo mnogo razlike između ploča na kojima se resuspendiralo i nije. Jažice su ujednačene te je citopatski učinak virusa lako čitljiv na razrijeđenju -3 što je vidljivo na slici 21. Kod jažica na većim razrijeđenjima vidljivi su goli dijelovi, stanice su se odvojile od podloge te se samo na dijelovima vidi citopatski efekt virusa. Očitane ploče s DMEM-2 medijem korištene su za izračun titra virusa zbog loših ploča kod DMEM-5 medija. Na pločama s DMEM-5 medijem kontrolne jažice su se pokazale vrlo loše: stanice su bile u nakupinama, okrugle, isprane i vjerojatno ne prihvaćene za podlogu (slika 22). Moguće da stanicama nije odgovarao nutritivniji medij koji je uzorkovao njihovo razrastanje i potencijalno odumiranje. Zbog lošeg izgleda kontrolnih jažica vrlo je teško bilo očitati citopatski efekt na ostalim jažicama premda su i ostale jažice pokazale nekonfluentnost stanica.

Utjecaj resuspendiranja suspenzije stanica zajedno s virusnim inokulumom nije pokazalo razlike u odnosu na ne resuspendiranje.



Slika 21. Citopatski učinak virusa EDSV na stanice hepatoma pijetla (-3 razrijeđenje virusnog inokuluma) gledano inverznim transmisijskim svjetlosnim mikroskopom Axiovert 25 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Njemačka), uvećanje 100 x (vlastita fotografija)



Slika 22. Kontrolna jažica (DMEM-5), gledano inverznim transmisijskim svjetlosnim mikroskopom Axiovert 25 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Njemačka), uvećanje 100 x (vlastita fotografija)

Pokus II

Cilj ovog eksperimenta je bio titrirati suspenziju stanica SHP u dvije različite koncentracije - 2×10^5 st/mL i 5×10^5 st/mL i tri različite koncentracije seruma u mediju – 0 %, 2 % i 5 %.

Pri koncentraciji stanica 2×10^5 st/mL i DMEM mediju (bez seruma) ploče je vrlo teško za očitavati, kontrolne jažice dijeluju isprano te su se stanice grupirale uz rub jažice (slika 23). Stanice su također slabo porasle što govori da im DMEM medij ne odgovara i da nije dovoljno nutritivan za njihov rast.



Slika 23. Prikaz kontrolne jažice – nasadena koncentracija stanica 2×10^5 st/ml i DMEM medij, gledano inverznim transmisijskim svjetlosnim mikroskopom Axiovert 25 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Njemačka), uvećanje 100 x (vlastita fotografija)

Pri koncentraciji stanica 2×10^5 st/mL i DMEM-2 mediju lako je očitati citopatski učinak virusa, stanice su grupirane po površini jažice, nisu konfluentne (slika 25). Stanice u kontrolnim jažicama su rijetke, no svejedno se na ostatku ploče vidi jasna razlika u pozitivnom i negativnom citopatskom učinku.



Slika 24. Citopatski učinak EDSV na stanice SHP – -3 razrjeđenje virusnog inokuluma, nasađena koncentracija stanica 2×10^5 st/ml i DMEM-2 medij, gledano inverznim transmisijskim svjetlosnim mikroskopom Axiovert 25 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Njemačka), uvećanje 100 x (vlastita fotografija)

Pri koncentraciji stanica 2×10^5 st/mL i DMEM-5 mediju lako je očitati citopatski učinak virusa, stanice su grupirane po površini jažice (slika 25). Stanice u kontrolnim jažicama su ujednačene te čak i prerasle stanicama (slika 26).



Slika 25. Citopatski učinak virusa EDSV na stanice SHP – -3 razrjeđenje virusnog inokuluma, nasadena koncentracija stanica 2×10^5 st/mL i DMEM-5 medij, gledano inverznim transmisijskim svjetlosnim mikroskopom Axiovert 25 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Njemačka), uvećanje 100 x (vlastita fotografija)



Slika 26. Prikaz kontrolne jažice – nasadena koncentracija stanica 2×10^5 st/mL i DMEM-5 medij, gledano inverznim transmisijskim svjetlosnim mikroskopom Axiovert 25 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Njemačka), uvećanje 100 x (vlastita fotografija)

Pri koncentraciji stanica 5×10^5 st/mL i DMEM mediju kontrolne jažice su ujednačene, mjestimice se može vidjeti prazan prostor na površini jažice (slika 27). Jažice su lako čitljive na citopatski efekt. Pri istoj koncentraciji stanica, ali DMEM-2 mediju, situacija je slična. Kontrole su ujednačene, stanice porasle na ostalim jažicama su lako čitljive, čak i jasnije nego kod DMEM. Kod iste koncentracije stanica uz DMEM-5, kontrolne jažice su prerasle stanicama te je citopatski učinak virusa čitljiv. Kod pozitivnih jažica na citopatski učinak na svim pločama koncentracije stanica 5×10^5 st/mL nije vidljivo grupiranje stanica po cijeloj površini jažice već je vidljivo odvajanje i grupiranje stanica u sredini površine jažice što je vidljivo na slici 28.



Slika 27. Prikaz kontrolne jažice – nasadena koncentracija stanica 5×10^5 st/ml i DMEM medij, gledano inverznim transmisijskim svjetlosnim mikroskopom Axiovert 25 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Njemačka), uvećanje 100 x (vlastita fotografija)



Slika 28. Citopatski učinak virusa EDSV na stanice SHP – 10^{-4} razrjeđenje virusnog inokuluma, – nasadena koncentracija stanica 5×10^5 st/mL i DMEM-2 medij, gledano inverznim transmisijskim svjetlosnim mikroskopom Axiovert 25 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Njemačka), uvećanje 100 x (vlastita fotografija)

Prema vizualnim rezultatima, najlošija je bila ploča na kojoj su nasadene stanice u koncentraciji 2×10^5 st/mL u DMEM mediju, citopatski učinak virusa je bilo teško za očitati. Na ploči iste koncentracije, ali uz DMEM-5 medij, vizualni rezultati su se pokazali najboljima i reprezentativnima u smislu kako bi kontrolne jažice trebale izgledati kao i one pozitivne na citopatski učinak. U tablici x su prikazani rezultati titra virusa izraženih kao $\log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{osušku}$. Prema rezultatima titra virusa najmanju vrijednost ima ploča s konc. stanica 5×10^5 st/mL i DMEM-5 medijem - 5,78 $\log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{osušku}$, dok najveću vrijednost titra - 6,74 $\log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{osušku}$, ima ploča s koncentracijom stanica 2×10^5 st/mL i DMEM medijem.

Tablica 7. Titracija u suspenziji

	logTCID ₅₀ /osušku 1.paralela; 2.paralela	srednja vrijednost logTCID ₅₀ /osušku
DMEM		
2x10 ⁵ st/cm ²	6,61; 6,86	6,74 logTCID ₅₀ /osušku
5x10 ⁵ st/cm ²	6,16; 6,34	6,25 logTCID ₅₀ /osušku
DMEM-2		
2x10 ⁵ st/cm ²	6,37; 6,00	6,19 logTCID ₅₀ /osušku
5x10 ⁵ st/cm ²	5,61; 6,28	5,95 logTCID ₅₀ /osušku
DMEM-5		
2x10 ⁵ st/cm ²	5,92; 6,31	6,12 logTCID ₅₀ /osušku
5x10 ⁵ st/cm ²	5,92; 5,63	5,78 logTCID ₅₀ /osušku

4.4.3. Titracija stanica SHP nasadenih na želatini u koncentraciji stanica od 2x10⁵ st/mL i 5x10⁵ st/mL

Cilj ovog eksperimenta je bio kombinirati dva prethodno provedena te najbolje rezultate ponoviti kao krajnji rezultat – titrirati stanice SHP koje su u koncentraciji od 2x10⁵ st/mL nasadene na mikrotitarske ploče sa 96 jažica koje su prekrivene želatinom kao podlogom za rast stanica.

Ploče su očitavane sedmi, osmi, deveti i deseti dan od titracije, a najoptimalnije se pokazalo očitavati ih deveti i deseti dan od titracije. Ploče na kojima su nasadene stanice u koncentraciji od 5x10⁵ st/mL nisu bile čitljive, stanice su prerasle površinu za rast, nije bilo vidljivo citopatskog učinka na stanicama te stoga nisu uzete u obzir prilikom računanja titra virusa. Također, vidljive su tamne površine na dnu jažice, vjerojatno nakupine stanica nastale upravo zbog njihove prevelike koncentracije na površini jažice što je vidljivo na slici 29.

Ploče na koje su nasadene stanice u koncentraciji od 2x10⁵ st/mL su pokazale dobre rezultate. Citopatski učinak je lako čitljiv, kontrolne jažice su konfluentne i ujednačene. Na slici 30 se vidi pozitivan citopatski učinak, stanice su skupljene, postoji prazan prostor na dnu jažice. Također, u ovom eksperimentu je opet potvrđeno da je titar virusa najveći kod DMEM medija i koncentracije stanica od 2x10⁵ st/mL.



Slika 29. Prikaz jažice prerasle stanicama – nasadena koncentracija stanica 5×10^5 st/mL i DMEM-2 medij, gledano inverznim transmisijskim svjetlosnim mikroskopom Axiovert 25 6. dan nakon titracije (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Njemačka), uvećanje 100 x (vlastita fotografija)



Slika 30. Citopatski učinak virusa EDSV na stanice SHP – -3 razrjeđenje virusnog inokuluma, nasadena koncentracija stanica 2×10^5 st/mL i DMEM medij, gledano inverznim transmisijskim svjetlosnim mikroskopom Axiovert 25 7.dan nakon titracije (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Njemačka), uvećanje 100 x (vlastita fotografija)

Tablica 8 prikazuje rezultate titra virusa izraženog kao logTCID₅₀/osušku. S obzirom da stanice koncentracije 5x10⁵ st/ml nisu bile reprezentativne i nisu bile čitljive, titar virusa izračunat je samo na temelju rezultata ploča na kojima je nasađena koncentracija stanica od 2x10⁵ st/cm².

Tablica 8. Titracija na želatini pri koncentraciji stanica 2x10⁵st/mL

	logTCID₅₀/ osušku 1.paralela; 2.paralela	srednja vrijednost logTCID₅₀/ osušku
titracija 24h od nacijepljivanja		
DMEM	6,44; 6,68	6,56 logTCID ₅₀ / osušku
DMEM-2	6,68; 6,31	6,50 logTCID ₅₀ / osušku
titracija 48h od nacijepljivanja		
DMEM	6,27; 5,89	6,08 logTCID ₅₀ / osušku
DMEM-2	6,21; 5,84	6,03 logTCID ₅₀ / osušku

5. ZAKLJUČCI

1. Želatina je prihvatljiva zamjena za kolagen pri uzgoju SHP stanica.
2. Od svih testiranih hranjivih medija u ovom istraživanju, za uzgoj stanica SHP najbolji je medij DMEM s 10 % seruma.
3. Brzim hemaglutinacijskim testom u kratkom se vremenu može potvrditi prisutnost virusa EDSV u uzorku. Prema titru virusa proizvedenom u embrioniranim pačjim jajima, a utvrđen brzim hemaglutinacijskim testom, pokazalo se da je osjetljivost pačjih jaja na virus EDS veća od ranije opisane u referentnim istraživanjima.
4. Stanice jetre pilećeg embrija podložnije su infekciji virusom EDSV od pačjih jaja i stanica SHP.
5. Titracijom virusa EDSV na kontinuiranu staničnu liniju SHP, najveći titar izračunat je na temelju rezultata stanica poraslih u DMEM mediju uz koncentraciju stanica od 2×10^5 st/mL. Prema rezultatima titra virusa, pokazalo se da je stanična linija SHP podložnija infekciji virusom EDSV u odnosu na embrionirana pačja jaja.
6. Za izračun infektivnosti i titra virusa EDSV umjesto embrioniranih pačjih jaja mogu se koristiti kontinuirane stanične linije koje su jednostavnije za upotrebu, postupak titracije i očitavanja titra virusa je brži i ne zahtijeva puno rada, a njihovo korištenje je i dalje precizno za detekciju virusa.

6. LITERATURA

Ahmad Khalili, A., & Ahmad, M. R. (2015). A review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 18149-18184. <https://doi.org/10.3390/ijms160818149>

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

Anonymous (2017) <<http://www.cellsignet.com/media/templ.html>>. Pristupljeno: 10. listopada 2023.

Aryal, S. (2018) Techniques of Virus Cultivation, < <https://microbiologyinfo.com/techniques-of-virus-cultivation/> >. Pristupljeno: 28. rujna 2023.

Banani, M., Pourbakhsh, S. A., Momayez, R., Ghodsian, N., Nouri, A., HAERIAN, A. B., & Akhavizadegan, M. A. (2005). Preparation of an inactivated egg drop syndrome antigen for using in hemagglutination inhibition test. *Arch. Razi. Ins.* **59**, 85-93. <https://doi.org/10.22092/ari.2005.103816>

Bande, F., Arshad, S. S., Bejo, M. H., Moeini H. (2015) Progress and Challenger toward the Development of Vaccines against Avian Infectious Bronchitis. *J. Immunol. Res.* **2015**, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2015/424860>

Bartha, A., Meszaros, J., & Tanyi, J. (1982). Antibodies against eds-76 avian adenovirus in bird species before 1975. *Avian Pathol.* **11**, 511-513. <https://doi.org/10.1080/03079458208436122>

Biđin, Z., Lojkić, I., Mikec, M., & Pokrić, B. (2007). Naturally occurring egg drop syndrome infection in turkeys. *Acta Vet. Brno* **76**, 415-421. <https://doi.org/10.2754/avb200776030415>

Cavanagh, D. (2003) Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Pathol.* **32**, 567-582. <https://doi.org/10.1080/03079450310001621198>

Cha, S. Y., Kang, M., Park, C. K., Choi, K. S., & Jang, H. K. (2013). Epidemiology of egg drop syndrome virus in ducks from South Korea. *Poult. Sci.* **92**, 1783-1789. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03067>

Day, M.J., & Schultz, R.D. (2011). Vakcinacija. U: Veterinarska imunologija, načela i primjena. Ur.: Šeol Martinec, B. Medicinska naklada, Zagreb, 192-202.

Dr. Joan A. Smyth, Egg drop syndrome '76 eggs, <https://www.msdtvetmanual.com/poultry/egg-drop-syndrome-76/egg-drop-syndrome-%E2%80%9976> Pristupljeno 28. rujna 2023.

Farges-Haddani, B., Tessier, B., Chenu, S., Chevalot, I., Harscoat, C., Marc, I., & Marc, A. (2006). Peptide fractions of rapeseed hydrolysates as an alternative to animal proteins in CHO cell culture media. *Process Biochem.* **41**, 2297-2304.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.06.002>

Farzaneh M, Hassani SN, Mozdziak P, Baharvand H. (2017). Avian embryos and related cell lines: A convenient platform for recombinant proteins and vaccine production. *Biotechnol. J.* **12**.

<https://doi.org/10.1002/biot.201600598>

Fingerut, E., Gutter, B., Gallili, G., Michael, A., & Pitcovski, J. (2003). A subunit vaccine against the adenovirus egg-drop syndrome using part of its fiber protein. *Vaccine* **21**, 2761-2766.

[https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00117-8](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00117-8)

Finney, P. M., Box, P. G., Holmes, H. C. (1990) Studies with a bivalent infectious bronchitis killed virus vaccine. *Avian Pathol.* **19**, 435-450. <https://doi.org/10.1080/03079459008418698>

Greer, A. L. (2015). Early vaccine availability represents an important public health advance for the control of pandemic influenza. *BMC Res. Notes* **8**, 1-13. <http://dx.doi.org/10.1186%2Fs13104-015-1157-1>

Hassan, M. S., & Abdul-Careem, M. F. (2020). Avian viruses that impact table egg production. *Animals* **10**, 1747. <https://doi.org/10.3390/ani10101747>

Hendriks, J., Holleman, M., de Boer, O., de Jong, P., & Luytjes, W. (2011). An international technology platform for influenza vaccines. *Vaccine* **29**, 8-11.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.04.124>

Huang, J., Tan, D., Wang, Y., Liu, C., Xu, J., & Wang, J. (2015). Egg drop syndrome virus enters duck embryonic fibroblast cells via clathrin-mediated endocytosis. *Virus Res.* **210**, 69-76.

<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.07.014>

- Huda, T., Nair, H., Theodoratou, E., Zgaga, L., Fattom, A., El Arifeen, S., & Rudan, I. (2011). An evaluation of the emerging vaccines and immunotherapy against staphylococcal pneumonia in children. *BMC public health* **11**, 1-14. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-11-S3-S27>
- Ivanics, E., Palya, V., Glávits, R., Dán, A., Pálfi, V., Rééeész, T., & Benkö, M. (2001). The role of egg drop syndrome virus in acute respiratory disease of goslings. *Avian Pathol.* **30**, 201-208. <https://doi.org/10.1080/03079450120054604>
- Laere, E., Ling, A. P. K., Wong, Y. P., Koh, R. Y., Mohd Lila, M. A., & Hussein, S. (2016). Plant-based vaccines: production and challenges. *J. Bot.* **2016**. <https://doi.org/10.1155/2016/4928637>
- Leland, D. S., Ginocchio C. C. (2007) Role of Cell culture for Virus Detection in the Age of Technology. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 49-78. <https://doi.org/10.1128/cmr.00002-06>
- Liu, M. A. (2011) DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol. Rev.* **239**, 62-84. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00980.x>
- Liu, P., Lu, H., Li, S., Wu, Y., Gao, G. F., & Su, J. (2013). Duck egg drop syndrome virus: an emerging Tembusu-related flavivirus in China. *Sci. China Life Sci.* **56**, 701-710. <https://doi.org/10.1007/s11427-013-4515-z>
- Manini, I., Trombetta, C. M., Lazzeri, G., Pozzi, T., Rossi, S., & Montomoli, E. (2017). Egg-independent influenza vaccines and vaccine candidates. *Vaccines* **5**, 18. <https://doi.org/10.3390/vaccines5030018>
- Manohar, M.M., Campbell, B.E., Walduck, A.K., Moore, R.J. (2022.) Enhancement of live vaccines by co-delivery of immune modulating proteins. *Vaccine* **40**, 5769-5780. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.08.059>
- Marangon, S., & Busani, L. (2006). The use of vaccination in poultry production. *Rev. Sci. et Tech. OIE* **26**, 265-274. <https://doi.org/10.1016/j.asj.2006.04.001>
- McConnell Adair, B. & Smyth, J.A. (2008). Egg drop syndrome. U: A.M. Fadly, J.R. Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan, D.E. Swayne & Y.M. Saif (Eds.), *Dis. of Poult.* 12th edn (pp. 266-276). Ames, IA: Blackwell Publishing

McFerran, J. B., & Adair, B. M. (2003). Hydropericardium syndrome. *Dis. of poult.* 11th ed. YM Saif, HJ Barnes, AM Fadly, JR Glisson, LR McDougald, and DE Swayne, eds. Iowa State University Press, Ames, IA, 220-221.

McFerran, J. B., & Smyth, J. A. (2000). Avian adenoviruses. *Rev. sci. et tech. OIE* **19**, 589-601. <https://dx.doi.org/10.20506/rst.19.2.1238>

McNulty, M.S. & Smyth, J.A. (2002). Egg drop syndrome 1976. In F. Jordan, M. Pattison, D. Alexander & T. Faragher (Eds.), *Poult. Dis.* 5th edn (pp. 334-337). London: W. B. Saunders.

Nelde, A., Rammensee, H. G., & Walz, J. S. (2021). The peptide vaccine of the future. *Mol. Cell. Proteomics* **20**, 1-11. <https://dx.doi.org/10.1074/MCP.R120.002309>

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

Pollard, A.J., Bijker, E.M. (2020) A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nat. Rev. Immunol.* **21**, 83-100. <https://dx.doi.org/10.1038/s41577-020-00479-7>

Radošević, K. (2020). Osvježimo znanje: Kulture životinjskih stanica. *Kemija u industriji: Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske*, **69**, 561-562.

Razmarai Iranagh, A. A., Razmaraii, N., Aghaei, R., Shayegh, J., Mousaviyan, M., & Ameghi Roudsary, A. (2023). Study on Propagation and Adaptation of EDS-76 Avian Adenovirus in Duck and SPF Primary Embryonic Chicken Cell Culture Comparison to Duck and SPF Embryonated Chicken Eggs. *Arch. Razi Inst.* **78**, 1095-1105. <https://dx.doi.org/10.22092/ARI.2022.359899.2511>

Rofail, N. B. (2005) Comparative studies on attenuated and inactivated oil emulsion egg drop syndrome (EDS) virus vaccine prepared on chicken liver cell and duck eggs vaccine. *Mansoura Vet. Med. J.* **1**, 113-124. <https://doi.org/10.21608/mvmj.2005.124718>

Rourou, S., van Der Ark, A., van Der Velden, T., & Kallel, H. (2009). Development of an animal-component free medium for vero cells culture. *Biotechnol. Prog.* **25**, 1752-1761. <https://dx.doi.org/10.1002/btpr.279>

- Sasipreeyajan, J., Pohuang, T., Sikikobkul, N. (2012) Efficacy of different vaccination programs against Thai QX-like infectious bronchitis virus. *Thai. J. Vet. Med.* **42**, 73-79. <https://dx.doi.org/10.56808/2985-1130.2370>
- Shahid, N., Rao, A. Q., Kristen, P. E., Ali, M. A., Tabassum, B., Umar, S., & Husnain, T. (2017). A concise review of poultry vaccination and future implementation of plant-based vaccines. *World's Poult. Sci. J.* **73**, 471-482. <https://dx.doi.org/10.1017/S0043933917000484>
- Slivac I., Gaurina-Srček V., Radošević K. Osnove tehnologije životinjskih stanica (2016). *Interna skripta Prehrambeno- biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu*
- Smyth, Joan A. (2013). Aviadenovirus infections. *Dis. of Poul.* 290-300.
- Swayne, D. E. (2013). Diseases of poultry. John Wiley & Sons.
- Yamaguchi, S., Imada, T., Kawamura, H., Taniguchi, S., Saio, H., & Shimamatsu, K. (1981). Outbreaks of egg-drop syndrome-1976 in Japan and its etiological agent. *Avian Diseases*, 628-641. <https://dx.doi.org/10.2307/1589993>
- Yang, T., Wang, H.-N., Wang, X. (2009) The protective immune response against infectious bronchitis virus induced by multiepitope based peptide vaccines. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 1500-1504. <https://doi.org/10.1271/bbb.80864>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja TAMARA UZELAC 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.

Vlastoručni potpis