USPOREDBA STANIČNIH IMUNOSNIH ODGOVORA POTAKNUTIH OKULONAZALNOM PRIMJENOM VIRUSA NEWCASTLESKE BOLESTI SOJ ZG1999HDS I CJEPNOG SOJA LA SOTA U PILIĆA U DOBI ČETIRI TJEDNA

Nedeljković, Gordana

Doctoral thesis / Disertacija

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:536805

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis

Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

Gordana Nedeljković

USPOREDBA STANIČNIH IMUNOSNIH ODGOVORA POTAKNUTIH OKULONAZALNOM PRIMJENOM VIRUSA NEWCASTLESKE BOLESTI SOJ ZG1999HDS I CJEPNOG SOJA LA SOTA U PILIĆA U DOBI ČETIRI TJEDNA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2014.



University of Zagreb
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Gordana Nedeljković

COMPARISON OF CELL-MEDIATED IMMUNE RESPONSE STIMULATED BY OCULONASAL APPLICATION OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS STRAIN ZG1999HDS AND VACCINAL STRAIN LA SOTA IN FOUR WEEKS OLD CHICKENS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2014

Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

Gordana Nedeljković

USPOREDBA STANIČNIH IMUNOSNIH ODGOVORA POTAKNUTIH OKULONAZALNOM PRIMJENOM VIRUSA NEWCASTLESKE BOLESTI SOJ ZG1999HDS I CJEPNOG SOJA LA SOTA U PILIĆA U DOBI ČETIRI TJEDNA

DOKTORSKI RAD

Mentori:
Doc.dr.sc. Željko Gottstein
Dr.sc. Krešo Bendelja

Zagreb, 2014.

University of Zagreb
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Gordana Nedeljković

COMPARISON OF CELL-MEDIATED IMMUNE RESPONSE STIMULATED BY OCULONASAL APPLICATION OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS STRAIN ZG1999HDS AND VACCINAL STRAIN LA SOTA IN FOUR WEEKS OLD CHICKENS

DOCTORAL THESIS

Supervisors:
Assist Prof Željko Gottstein
Krešo Bendelja, PhD

Zagreb, 2014

Doktorski rad je izrađen na Zavodu za bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom mentora doc.dr.sc. Željka Gottsteina i dr.sc. Kreše Bendelje.

Istraživanje je dio znanstvenog projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske „Imunoprofilaksa bolesti peradi i drugih ptica“ (053-0531863-1858) voditelja prvotno prof. emeritusa Hrvoja Mazije, a kasnije doc.dr.sc. Željka Gottsteina.

Rad ima 101 stranicu, 16 tablica i 27 slika.

Za Sunce Moje Malo, zauvijek u mom srcu

Zahvaljujem profesoru emeritusu Hrvoju Maziji, na ukazanom povjerenju pri zapošljavanju na projekt, te što mi je omogućio stjecanje novih praktičnih znanja i vještina u Hrvatskoj i inozemstvu. Nadasve sam zahvalna što mi je ustupio soj ZG1999HDS virusa newcastleske bolesti za sva istraživanja koja sam u proteklom razdoblju odradila.

Zahvaljujem mentorima doc.dr.sc. Željku Gottsteinu i dr.sc. Kreši Bendelji, na vođenju tijekom pokusa, na savjetima i plodnim raspravama. Posebno hvala doc.dr.sc. Gottsteinu na bezgraničnom strpljenju, na rješavanju problema, na svim ispravcima i dopunama ove disertacije.

Zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za bolesti peradi s klinikom što su mi svojim radom omogućili da nesmetano radim na vlastitom istraživanju.

Zahvaljujem doc.dr.sc. Tomislavu Mašeku i doc.dr.sc. Nataliji Filipović na inspiraciji, podršci, te konstruktivnoj i kreativnoj pomoći pri rješavanju problema.

I na kraju, posebno hvala mojoj obitelji, svim prijateljima i kolegama na podršci tijekom istraživanja i izrade disertacije.

.

SAŽETAK

NEDELJKOVIĆ, G. (2014.): Usporedba staničnih imunosnih odgovora potaknutih okulonazalnom primjenom virusa newcastleske bolesti soj ZG1999HDS i cjepnog soja La Sota u pilića u dobi četiri tjedna. Doktorska disertacija. Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.

Newcastleska bolest (NB) je vrlo kontagiozna zaraza ptica. Preventiva NB se temelji na cijepljenju peradi, a izbijanja NB u cijepljenim jatima upućuju na stalnu potrebu kontrole imunogenosti postojećih i razvoj novih cjepiva. Prethodna istraživanja primjene virusa NB soja ZG1999HDS u pilića ukazala su na imunogenost razvojem humorane imunosti i pripadnost lentogenom patotipu virusa NB. U ovom istraživanju smo usporedno okulonazalno primijenili komercijalno živo cjepivo koje sadrži La Sota soj VNB i suspenziju liofiliziranog soja ZG1999HDS muškim pilićima hibrida komercijalnih nesilica u dobi četiri tjedna. Stanični odgovor odredili smo na temelju proliferacije i razlikovanja subpopulacija leukocita protočnom citometrijom i mikroskopski, brojanjem u komorici za brojanje i na krvnim razmascima, a na razini proizvodnje interferona (IFN) ispoljavanjem gena za IFN-α i IFN- γ u uzorcima slezene pomoću reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (RT-qPCR). Oba primijenjena soja nisu izazvala kliničke znakove u pilića. Imunogenost oba soja potvrđena je tvorbom specifičnih protutijela koja je za čitavog pokusa bila jače potaknuta u pilića imuniziranih sojem ZG1999HDS nego u pilića s primijenjenim cjepnim La Sota sojem, a statistički značajno jače u obje skupine nego u kontrolnoj skupini. Stanična imunost, koja se očitovala jačom proliferacijom B- i T-pomoćničkih limfocita i ispoljavanjem IFN-γ, polučila je bolje rezultate u skupine imunizirane sojem ZG1999HDS nego u skupini cijepljenoj komercijalnim cjepnim La Sota sojem. Na temelju dobivenih rezultata zaključujemo da je soj ZG1999HDS imunogen i pogodan kandidat za daljnja istraživanja i razvoj cjepiva za perad.

Ključne riječi: newcastleska bolest, ZG1999HDS, stanična imunost, interferon-α, interferon- γ

NEDELJKOVIC, G. (2014.): Comparison of cell-mediated immune response stimulated by oculonasal application of Newcastle Disease Virus strain ZG1999HDS and vaccinal strain La Sota in four weeks old chickens. Doctoral thesis. Faculty of veterinary medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia.

Aim: The aim was to determine the ability of Newcastle disease virus (NDV) strain ZG1999HDS to induce protective cell-mediated immune response (CMI) in chickens as measured by interferon response in spleen and proliferation of leucocyte and lymphocyte subpopulations in peripheral blood. The extent of CMI induction achieved was compared to the CMI inducued by commonly used vaccinal La Sota strain and results were used to evaluate justification to consider ZG1999HDS strain as a prospective candidate for poultry vaccine development.

Background: Newcastle disease (ND) is a highly contagious viral infection of birds with significant economic impact on poultry industry. Clinical manifestation of ND varies from unapparent infection to peracute infection with 100% mortality.

Global control of ND is based on prophylactic measures, such as immunisation of poultry, non specific sanitary and biosafety measures, good management practice, depopulation and trade bans in case of outbreaks. Immunisation is performed with inactivated or live attenuated vaccines (LAV) composed of lentogenic or attenuated mesogenic NDV strains. Current commercially available vaccines are successful in disease and mortality prevention, but are unable to prevent infection, replication and shedding of virulent NDV. Predominant circulating strains are viscerotropic, which makes widely used vaccines based on pneumotropic strains, inadequate to protect the animals against ND. Thus, outbreaks of ND in vaccinated flocks occur and indicate the constant need to control immunogenicity of existing and develop new vaccines.

Hemagglutination inhibition (HI) tests or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) are commonly used 3 to 4 weeks post vaccination for assessment of developed humoral immunity. However, assessment of overall protection against ND requires also assessment of CMI. Available assays for CMI assessment include detection of total number of leukocytes, and different subpopulations (specifically B and T lymphocytes) in blood, and also by their functional assessment i.e. quantitative detection of cytokines and chemokines, antigen specific lymphocyte proliferation, heterofile activation and degranulation and production of oxygen reactive species.

Strain ZG1999HDS of NDV was isolated during the outbreak in July of 1999 at a broiler farm in Croatia. Previous application of this strain in chickens confirmed its

immunogenicity by induction of humoral immunity and lentogenic pathotype. Further characterisation by deduced amino acid sequence at the cleavage site of fusion protein, and *in vitro* tests in cell cultures revealed its lentogenic nature and oncolytic capacity, respectively.

Material and methods: Trial involved the total of 150 male chickens of light breed type. Chickens were held in cages with water and feed supplied *ad libitum.* The decision about the trial onset at the age of 28 days was based on HI antibodies titer (i.e. clearance) of maternal antibodies for NDV. Chickens were divided into 3 groups of 50 chickens. Suspension of freeze dried allantoic fluid containing NDV strain ZG1999HDS or freeze dried commercial vaccine of La Sota NDV strain were applied oculonasally to chickens in ZG or LS group, respectively. Control group was treated oculonasally with PBS. Blood and spleen samples (after sacrificing) were collected from randomly selected 6 chickens per group in intervals 6, 12, 24 hours and 2, 3, 5, 7 i 14 days post immunisation (DPI) for real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR), and blood samples for immunophenotyping and hemathology assay in intervals before immunisation and 3, 5, 7, and 14 DPI. Blood for separation of sera for seroconversion by HI assay were collected in weekly intervals. Blood samples with addition of heparine were used for hematological testing by microscopy, immunophenotyping of modified ficoll isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by flow cytometry. Heparinized blood samples with addition of preservative were intended for subsequent gene expression analysis by RT-qPCR. Total RNA was isolated by TRIzol method from preserved heparinezied full blood and spleen samples and the concentration determined by spectrophotometry. Relative quantification of IFN-α, IFN-γ mRNAs and genomic RNA for NDV strains was performed by RT-qPCR in total RNA samples.

Results and discussion: Application of both NDV strains in our trial didn't cause any adverse reactions in immunised chickens. The induction of humoral immunity was confirmed in both immunized groups with HI antibody titer significantlly higher to PBS treated group and higher in chickens immunised by ZG1999HDS strain compared to La Sota, thus confirming their imunogenicity. Proliferation of B- and T-helper cells in ZG group was significantlly higher compared to LS and control group, providing evidance of better CMI induction by ZG1999HDS strain in addition to higher expression of genes for IFN γ in both experimental groups compared to control. The abscence of both strains from the spleen was confirmed by inability to find viral genomic RNA in spleen samples

which is in accordance of their lentogenic nature and tendancy to localise and replicate at the site of infection.

Conclusion: Based on the results we found that both viral strains induced CMI and the strain ZG1999HDS to be imunogenic and, therefore prospective candidate for further research and vaccine development.

Key words: Newcastle disease, ZG1999HDS strain, cell-mediated immunity, interferon-α, interferon- γ.

Sadržaj

1. UVOD **1**

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA **3**

2.1. Newcastleska bolest 3
2.1.1. Povijest i zemljopisna rasprostranjenost 3
2.1.1.1. Newcastleska bolest u Hrvatskoj 4
2.1.2. Etiologija - virus newcastleske bolesti 5
2.1.2.1. Molekulska osnova patogenosti i tropizma 7
2.1.2.2. Klasifikacija VNB 8
a) Klasifikacija po patotipovima 8
b) Filogenetska klasifikacija u genotipove i epizootiološki značaj 10
2.1.2.3. Soj virusa NB ZG1999HDS 12
2.1.3.Epizootiologija 14
2.1.4. Klinička slika i patomorfološki nalaz 16
2.1.5. Sprječavanje i suzbijanje bolesti 16
2.1.5.1. Specifična imunoprofilaksa -cijepljenje 16
2.1.5.1.1. Živa cjepiva 19
2.1.5.1.2. Inaktivirana cjepiva 19
2.1.5.1.3. Rekombinantna cjepiva 19
2.1.6. Liječenje 20
2.2. Imunoreaktivnost peradi 20
2.2.1. Vanjske barijere infekciji 21
2.2.2. Morfologija imunološkog sustava ptica 21
2.2.3. Imunosne stanice 22
2.2.3.1. Stanice urođene imunosti 22
2.2.3.2. Stanice stečene imunosti 24
2.2.3.2.1. B-limfociti i protutijela 24
2.2.3.2.2.T-limfociti 25
2.2.4. Imunosni odgovor na zaražavanje patogenim mikroorganizmima 27
2.2.5. Citokini 29
2.2.5.1. Interferon-α 30
2.2.5.2. Interferon-γ 30
2.2.6. Imunost protiv newcastleske bolesti 31
2.2.7. Određivanje staničnog imunosnog odgovora 33
2.2.7.1. Određivanje fenotipskih i funkcionalnih svojstava subpopulacija leukocita i limfocita iz krvi i limfatičnih organa 33
2.2.7.2. Određivanje količine citokina 34

3. OBRAZLOŽENJE TEME **35**

4. MATERIJAL I METODE **36**

4.1. Pripravci korišteni u istraživanju 36
4.1.1. Terenski soj ZG1999HDS 36
4.1.2. Cjepni La Sota soj VNB 36
4.2. Određivanje podudarnosti primijenjenih sojeva VNB 37
4. 3. Plan pokusa 37
4.3.1. Imunizacija pilića 38
4.3.2. Uzorkovanje tkiva i krvi 39
4.4. Laboratorijske hematološke probe 39

4.4.1. Određivanje hematoloških pokazatelja 39
4.5. Određivanje humoralne imunosti 40
4.5.1. Određivanje titra antihemaglutinacijskih protutijela u serumu 40
4.6. Određivanje stanične imunosti 40
4.6.1. Određivanje ukupnog broja pilećih leukocita i pojedinih subpopulacija protočnom citometrijom 40
4.6.1.1. Izdvajanje leukocita iz heparinizirane pune krvi pilića 40
4.6.1.2. Obilježavanje stanica monoklonskim protutijelima i određivanje subppopulacija leukocita protočnom citometrijom (imunofenotipizacija) 42
4.6.2. Određivanje ispoljavanja gena za IFN-α i IFN-γ, te prisutnosti virusa u uzorcima slezene i pune krvi pilića 43
4.6.2.1. Izdvajanje ukupne RNK iz uzoraka 43
4.6.2.2. Određivanje relativne količine IFN-α i IFN-γ, te odsječka virusne RNK lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (RT-qPCR) 45
4.7. Statistička obrada podataka 47

5. REZULTATI 48

5.1. Podudarnost i razlike primijenjenih sojeva VNB 48
5.2. Klinička kontrola zdravstvenog stanja životinja u pokusu 49
5.3. Humoralna imunost 49
5.3.1. Titar materalnih protutijela specifičnih za VNB u serumu pilića prije početka pokusa 49
5.3.2.Titar protutijela specifičnih za VNB u pilećim serumima nakon imunizacije 50
5.4.Ukupna i diferencijalna krvna slika 51
5.4.1. Eritrociti 52
5.4.2. Leukociti 53
5.4.3. Trombociti 54
5.4.4. Heterofilni granulociti 55
5.4.5. Limfociti 56
5.4.6. Monociti 57
5.4.7. Eozinofilni i bazofilni granulociti 58
5.5. Imunofenotipizacija 60
5.5.1. Zastupljenost pojedinih subpopulacija leukocita u krvi pilića 60
5.5.1.1. Monociti 62
5.5.1.2. B- limfociti 63
5.5.1.3. T-limfociti 64
5.5.2. Relativna zastupljenost pojedinih subpopulacija T-limfocita u krvi pilića 65
5.5.2.1. γδ T - limfociti 67
5.5.2.2. αβ T-limfociti 68
5.5.2.3. γδ Th-limfociti 69
5.5.2.4. γδ Tc-limfociti 70
5.5.2.5. αβ Th-limfociti 71
5.5.2.6. αβ Tc-limfociti 72
5.6. Ispoljavanje gena za IFN-α i IFN-γ 73
5.6.1. Relativna promjena ispoljavanja gena IFN-α 74
5.6.2. Relativna promjena ispoljavanja gena IFN- γ 75
5.7. Količina VNB 75

6. RASPRAVA 76

7. ZAKLJUČCI 82

8. POPIS LITERATURE 83
9. ŽIVOTOPIS 99
10. POPIS OBJAVLJENIH RADOVA AUTORA 100

POPIS SLIKA I TABLICA

Slika 1. Virion ptičjeg paramiksovirusa serotip-1 (APMV-1), odnosno VNB-a 5
Slika 2. Ishod infekcije virusom NB-a s obzirom na slijed aminokiselina na mjestu cijepanja prekursora F0 proteina 7
Slika 3. Filogenetska analiza usporedbe sekvenci varijabilnog dijela F gena (47-421 nt) VNB primjenom Neighbour Joining metode 14
Slika 4. Izdvajanje leukocita postupkom gradijenta gustoće pomoću naslojavanja na fikol i centrifugiranja 41
Slika 5. Titar materalnih protutijela specifičnih za VNB u serumu pilića po tjednima prije početka pokusa 49
Slika 6. Titar protutijela specifičnih za VNB u serumu pilića po danima nakon početka pokusa 50
Slika 7. Ukupan broj eritrocita u krvi pilića po danima tijekom pokusa 52
Slika 8. Ukupan broj leukocita u krvi pilića po danima tijekom pokusa 53
Slika 9.Ukupan broj trombocita u krvi pilića po danima tijekom pokusa 54
Slika 10. Zastupljenost heterofila u populaciji leukocita u krvi pilića po danima tijekom pokusa . 55
Slika 11. Zastupljenost limfocita u populaciji leukocita u krvi pilića po danima tijekom pokusa ... 56
Slika 12. Zastupljenost monocita u populaciji leukocita u krvi pilića po danima tijekom pokusa ... 57
Slika 13. Zastupljenost eozinofila u populaciji leukocita u krvi pilića po danima tijekom pokusa .. 58
Slika 14. Zastupljenost bazofila u populaciji leukocita u krvi pilića po danima tijekom pokusa 59
Slika 15. Postavljanje elektronskih okvira za mjerenje subpopulacija leukocita 60
Slika 16. Relativni udio (%) monocita u krvi pilića po danima tijekom pokusa 62
Slika 17. Relativni udio (%) B limfocita u krvi pilića po danima tijekom pokusa 63
Slika 18. Relativni udio (%) T limfocita u krvi pilića po danima tijekom pokusa 64
Slika 19. Postavljanje elektronskih okvira za mjerenje subpopulacija T- limfocita 65
Slika 20. Relativni udio (%) γδ T - limfocita u krvi pilića po danima tijekom pokusa 67
Slika 21. Relativni udio (%) αβ T-limfocita u krvi pilića po danima tijekom pokusa 68
Slika 22. Relativni udio (%) γδ Th-limfocita u krvi pilića po danima tijekom pokusa 69
Slika 23. Relativni udio (%) γδ Tc-limfocita u krvi pilića po danima tijekom pokusa 70
Slika 24. Relativni udio (%) αβ Th-limfocita u krvi pilića po danima tijekom pokusa 71
Slika 25. Relativni udio (%) αβ Tc-limfocita u krvi pilića po danima tijekom pokusa 72
Slika 26. Relativna promjena ispoljavanja gRNK IFN-α kod skupine ZG i LS u odnosu na kontrolnu skupinu čija je razina ispoljavanja 0 74
Slika 27. Relativna promjena ispoljavanja gRNK IFN-g kod skupine ZG i LS u odnosu na kontrolnu skupinu (0) 75

Tablica 1. Klasifikacija sojeva VNB-a s obzirom na indekse patogenosti i primjeri 9
Tablica 2. Filogenetska klasifikacija sojeva VNB 11
Tablica 3. Uginuće tovnih pilića u srpnju 1999. godine 13
Tablica 4. Usporedba živih i inaktiviranih cjepiva protiv NB-a 17
Tablica 5. Odnos razine titra protutijela specifičnih za VNB i otpornosti peradi na izazivačko zaražavanje patogenim virusom NB-a 18
Tablica 6. Hematološki pokazatelji u zdrave kokoši 24
Tablica 7. Plan istraživanja - životinje i postupci 38
Tablica 8. Monoklonska protutijela korištena za višebojnu protočnu citometriju 42
Tablica 9. Specifične početnice i TaqMan probe 45
Tablica 10. Podudarnost i razlike nukleotidnog slijeda varijabilnog dijela F gena (var F gen) i izvedenog slijeda aminokiselina odabranih sojeva VNB 48

Tablica 11. Dinamika iščezavanja materalnih protutijela specifičnih za VNB praćena IHA probom (log 2) u pilećim serumima u tjednim razmacima prije početka pokusa 49
Tablica 12. Vrijednosti titra protutijela specifičnih za VNB u pilećim serumima u tjednim intervalima nakon imunizacije pilića u dobi 28 dana 50
Tablica 13. Ukupan broj krvnih stanica i relativni udio pojedinih leukocita u uzorcima pileće krvi 51
Tablica 14. Leukocitni panel – relativni udio (%) subpopulacija leukocita u krvi pilića po danima tijekom pokusa 61
Tablica 15. T-limfocitni panel – relativni udio (%) pojedinih subpopulacija T-limfocita u krvi pilića po danima tijekom pokusa 66
Tablica 16. Relativna promjena ispoljavanja gRNK za IFN-α i IFN-γ kod skupina ZG i LS (srednja vrijednost±SE) normaliziranih u odnosu na kontrolnu (kalibrator) skupinu s razinom ispoljavanja 0 73

1. UVOD

Newcastleska bolest (NB) je, uz influencu ptica, najznačajnija bolest domaće peradi na svijetu. Intenzivnom, ali i seoskom uzgoju peradi, poglavito kokoši, donosi značajne ekonomske gubitke u vidu troškova sprječavanja pojave bolesti (cijepljenje), suzbijanja i sprječavanja širenja (neškodljivo uklanjanje bolesnih životinja i lešina, odmor objekta), zabrana prometa peradi i proizvoda od peradi i ograničenja kretanja ljudi.

Bitan preduvjet za uspješnu proizvodnju peradi je zdravlje životinje, pa se, uz nespecifične mjere sanitacije i biosigurnosti, bolest najčešće suzbija specifičnom imunoprofilaksom. U tu svrhu se primjenjuju živa cjepiva, od lentogenih, asimptomatskih crijevnih ili atenuiranih mezogenih sojeva virusa NB (VNB) ili inaktivirana cjepiva. Međutim, komercijalno dostupna cjepiva sprječavaju pojavu bolesti i uginuća, ali ne sprječavaju infekciju, umnažanje i širenje virusa. Nadalje, cirkulirajući vrlo patogeni VNB koji prevladava u svijetu je viscerotropan, dok su se današnja cjepiva bazirana pretežno na pneumotropnim sojevima pokazala nedostatnim da zaštite perad. Tome svjedoče pojave bolesti s velikom ekonomskom štetom u cijepljenim jatima u Egiptu 2005. godine (ABDEL-MONEIM i sur., 2006.) i SAD-u 2002. godine (WISE i sur., 2004.).

Protutijela se pojavljuju u serumu i sluznicama četiri do 10 dana nakon cijepljenja i dosežu najvišu razinu nakon trećeg ili četvrtog tjedna (ALEXANDER i SENNE, 2008.). Pored tvorbe protutijela u razvoju imunosti protiv VNB-a bitnu ulogu ima i stanični imunosni odgovor kojega je moguće detektirati već dva do tri dana nakon zaražavanja ili cijepljenja. Međutim, stanična imunost, iako bitna za uklanjanje virusne zaraze, nije dostatna da samostalno, bez tvorbe protutijela zaštiti perad od pojave bolesti (REYNOLDS i MARAQA, 2000.a). Imajući to u vidu, odlučili smo istražiti stanični odgovor na primjenu soja ZG1999HDS i usporediti ga sa staničnim odgovorom na primijenu komercijalnog cjepnog La Sota soja.

Stanična imunost može se procijeniti određivanjem ukupnog broja leukocita te pojedinih subpopulacija T-limfocita u krvi (BALENOVIĆ, 2008.; GOTTSTEIN, 2008.), ali i procjene njihove funkcionalne sposobnosti *in vitro*. Protočna citometrija je objektivna analitička metoda koja omogućava kvalitativno i kvantitativno određivanje bioloških i fenotipskih obilježja prokariotskih i eukariotskih pa tako i krvnih stanica (CIGLAR GROZDANIĆ, 2005.; BALENOVIĆ, 2008.; GOTTSTEIN, 2008.; DALGAARD i sur., 2010.; POPOVIĆ i sur., 2010.). Pri tom se pojedine subpopulacije imunosnih stanica

diferenciraju na osnovu kombinacije razlikovnih antigena (biljega) koje ističu na površini (engl. *cluster of differentiation,* CD) primjenom više specifičnih monoklonskih protutijela za određene CD. Funkcionalna sposobnost imunosnih stanica procjenjuje se *in vitro* testom nakon stimulacije na osnovu proliferacije specifičnih stanica, te proizvodnje citokina i kemokina koji sudjeluju u urođenom i stečenom imunosnom odgovoru (RUE i sur., 2011.; LIU i sur., 2012.), primjerice interferona (IFN) tipa I i II (DALGAARD i sur., 2010.).

IFN-α pripada u skupinu IFN tip I i ima antivirusno djelovanje koje očituje na autokrini, parakrini i endokrini način. Antivirusna aktivnost zasniva se na aktivaciji enzima potrebnih za razgradnju virusnog genoma, inhibiciju virusne transkripcije i translacije. Potiče staničnu imunost poticanjem ispoljavanja MHC I molekula uz koje ispoljeni virusni antigeni označavaju virusom zaraženu stanicu i pretvaraju je u metu za citotoksične T limfocite. Sposoban je aktivirati makrofage i prirodno-ubilačke stanice (NK stanice), te djelovati na neoplastične stanice usporavajući stanični ciklus, djelujući na ispoljavanje onkogena i diferencijaciju samih neoplastičnih stanica.

IFN- γ ili tzv. imunosni interferon pripada skupini interferona tipa II. Pored antivirusne aktivnosti, sudjeluje u aktivaciji makrofaga i modulaciji imunosnog odgovora. Primarno ga proizvode T- limfociti i NK stanice čime dovode do aktivacije antimikrobne aktivnosti makrofaga, potičući obradu antigena i ispoljavanje MHC II u makrofagima i drugim stanicama, te time humoralni odgovor. Također sudjeluje u promjeni klase imunoglobulina (WIGLEY i KAISER, 2003.). Pokazalo se da IFN-γ, uz interleukin -2 (IL-2), ima važnu ulogu u Th1 tipu imunosnog odgovora koji je osnova razvoja stanične imunosti.

Količinu citokina u perifernoj krvi i limfoidnim organima moguće je odrediti imunotestovima koji se baziraju na primjeni specifičnih protutijela (LAMBRECHT i sur., 2004.; ARIAANS i sur., 2008.) ili određivanjem ekspresije gena tj. količine glasničke RNK (gRNK) lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (RUE i sur., 2011.; LIU i sur., 2012.). Iako određivanje gRNK u stanicama znači ekspresiju gena, ali ne nužno i proizvodnju bioreaktivnog proteina (citokina ili kemokina), pokazalo se kao najosjetljivija dostupna metoda kojom se u kratkom vremenu može pretražiti veliki broj uzoraka (SWAGGERTY i sur., 2006.). Ipak, postoji pozitivna korelacija između količine gRNK i količine reaktivnog proteina za IFN-γ i IL-6 (KAPCZYNSKI i KOGUT, 2008.).

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. Newcastleska bolest

Newcastleska bolest (NB) je izrazito kontagiozna, akutna virusna zaraza domaće peradi, ali i mnogih divljih, kaveznih i domaćih 241 vrste ptica širom svijeta (KALETA i BALDAUF, 1988.; ALEXANDER i SENNE, 2008.; ALEXANDER, 2009.). NB je uzrokovana infekcijom vrlo virulentnim sojevima virusa newcastlske bolesti (vVNB). Nalaz virulentnih tj. mezogenih i velogenih sojeva VNB-a, prema definiciji, podliježe obveznoj nacionalnoj i međunarodnoj (OIE – Svjetska organizacija za zdravlje životinja, EC – Europska komisija) prijavi pojave NB-a (ANONYMUS, 1992.; 2007.; 2012.). Za infekciju su najosjetljiviji kokoši i purani svih dobi, dok su patke i guske otpornije, a kavezne ptice (npr. papige iz roda *Psittacinae)* i divlje vodarice mogu biti latentni kliconoše. Divlje vodarice selice smatraju se rezervoarom slabo patogenih VNB-a u prirodi (ALEXANDER, 2009.; MUNIR i sur., 2010.). Uzročni virus može još zaraziti gmazove, sisavce i ljude (ALEXANDER i sur., 2004.). NB ima izuzetan gospodarski značaj zbog negativnog učinka na peradarsku proizvodnju uzrokovanog troškovima sprječavanja pojave, kao i gubitaka nastalih uslijed ograničenja u prometu životinja i proizvoda od peradi, neškodljivog uklanjanja bolesnih životinja i drugih mjera sprječavanja i suzbijanja bolesti (ANONYMUS, 2007.; 2012.).

2.1.1. Povijest i zemljopisna rasprostranjenost

Globalno raširena zaraza je i, od prve pojave 1926. godine (ALEXANDER, 2001.), NB prijavljena je na gotovo svim kontinentima, osim Antarktike. Danas se bolest pojavljuje kao enzootija u pojedinim dijelovima Azije, na Bliskom Istoku, u Srednjoj i dijelovima Južne Amerike i Africi, a u dijelovima Zapadne Europe i SAD-a s razvijenim intenzivnim komercijalnim uzgojem peradi zabilježeni su pojedini slučajevi pojave NB-a s velikim ekonomskim štetama (MILLER i sur., 2010.). Međutim, stvarno stanje pojavnosti NB-a je teško odrediti zbog primijene atenuiranih mezogenih sojeva kao živog cjepiva u nekim zemljama (SENNE i sur., 2004.; MILLER i KOCH, 2013.). U Hrvatskoj se bolest suzbija po zakonu, a cijepljenje domaće peradi i golubova u uzgoju je obavezno (ANONYMUS, 2013.).

Prvi službeni zapisi opisuju dva izdvojena slučaja pojave NB-a iz 1926. godine: jedan na otoku Javi u Indoneziji i drugi u Newcastle-upon-Tyne u Engleskoj (ALEXANDER, 2009.). Međutim, podatci iz literature upućuju da je bolesti sa sličnim

simptomima bilo i prije 1926. godine (ALEXANDER, 2001.). Ta dva zabilježena slučaja označavaju početak prve panzootije (1926. – 1960.) u kojoj je sudjelovala serološki homogena skupina virusa, pripadnika „ranih“ genotipova (gt II, III i IV). Sporo se širila, trebalo je 20 godina da se s Dalekog istoka proširi diljem svijeta. Druga panzootija (1960. – 1973.) započela je na Bliskom Istoku kasnih 1960.-ih godina i, uslijed naglog razvoja komercijalne peradarske proizvodnje i transporta, proširila se svijetom u četiri godine putem svjetskog prometa peradi i proizvoda od peradi, golubova i egzotičnih ptica. Obilježena je pojavom virusa iz gt VI na Bliskom istoku i u Aziji 1960.-ih godina, te virusa iz gt V u Europi 1970.-ih godina. Treća panzotija započela je u kasnim '70.-ima nakon uvođenja imunoprofilakse u široku primjenu diljem svijeta. Cjepiva su uspješno zaštitila ptice od bolesti, ali nisu spriječila replikaciju i izlučivanje virulentnih virusa. Četvrta epizootija započela je na Bliskom istoku krajem 1970.-ih godina i traje do danas, a uzrokovana je antigeno varijantnim sojem VNB-a iz gt VI koji prvenstveno zaražava golubove i grlice (MOHAMMED i sur., 1978.; KALETA i sur., 1985.; UJVARI, 2003.). Taj varijantni soj, poznat kao golublji paramiksovirus (engl. *pigeon paramyxovirus type* 1, PPMV-1), stigao je u Europu 1981. i dalje se proširio globalnim prometom živih golubova u svrhu trgovine, utrka, uzgoja i izložbi ptica (ALDOUS i sur., 2004.). Zabilježen je prijenos PPMV-1 na necijepljena jata nesilica i pilića putem hrane kontaminirane golubljim izmetom (ALEXANDER i PARSONS, 1986.; ALEXANDER, 2001.). Prema nekim autorima, u tijeku je peta panzootija, obilježena epizootijama, uzrokovanim sojevima VNB-a iz gt VII, u Zapadnoj i Južnoj Europi, Južnoj Africi, te na Tajvanu u 1990.-im godinama, a ti sojevi još i danas kruže u Aziji, Africi i Europi (LOMNICZI i sur., 1998.; MILLER i sur., 2010.; MUNIR i sur., 2010.).

2.1.1.1. Newcastleska bolest u Hrvatskoj

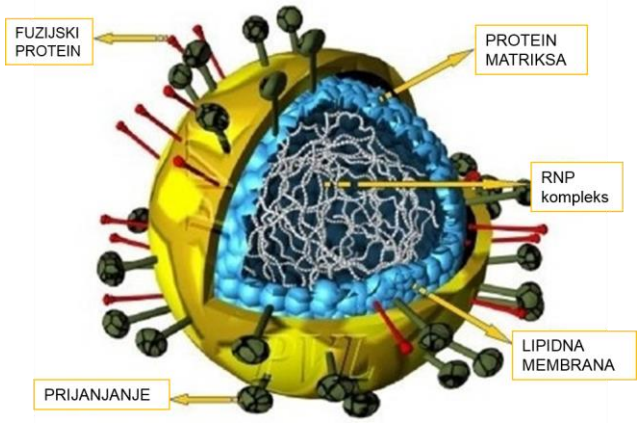
Newcastleska bolest je prvi put zabilježena u Hrvatskoj 1941. godine. HUPBAUER i TOPOLNIK (1944.) su detaljno opisali bolest od koje su uginule kokoši i purani u blizini Savskog Marofa, ali ne i patke i guske. Smatra se da su zarazu unijele njemačke i talijanske trupe za vrijeme Drugog svjetskog rata. U narednim desetljećima bolest se redovito javljala do 1994. godine, kada je zabilježena tek jedna epizootija u kokoši, te dva izdvojena slučaja pojave NB-a u golubova iz uzgoja 2009. i 2011. godine. Obzirom da izdvajanje lentogenih sojeva ne podliježe obveznoj prijavi i teško ih je razlikovati od cjepnih sojeva koji su u širokoj primijeni, nema prijava slučajeva iz 1999. i

2000. godine u kojima su izdvojeni lentogeni sojevi (SAVIĆ, 2003.; MAZIJA i sur., 2011.).

2.1.2. Etiologija - virus newcastleske bolesti

Uzročnik NB-a je ptičji paramiksovirus serotipa 1 (engl. *Avian paramyxovirus serotype-1*, APMV-1), poznatiji kao virus newcastlske bolesti (VNB). Na osnovu građe i osobina genoma virus pripada redu *Mononegavirales* (čine ga virusi s jednostrukim, nesegmetiranim RNK genomom negativnog polariteta), porodici *Paramyxoviridae*, podporodici *Paramyxovirinae* i zasebnom redu *Avulavirus* (de LEEUW i PEETERS, 1999.; MAYO, 2002.; SWAYNE, 2011.). Do danas je utvrđeno 11 različitih serotipova ptičjih paramyxovirusa (MILLER i KOCH, 2013.). Također, postoji prije spomenuti varijantni tip VNB-a, golublji paramiksovirus serotipa 1 (PPMV-1) koji je odgovoran za panzootiju u golubova i antigeno se može razlikovati od ostalih VNB-a (COLLINS i sur., 1994.; 1998.; ALEXANDER, 2001.; 2009.).

Virion VNB-a je pleomorfnog oblika, najčešće kuglastog, ali ponekad se javljaju filamentni oblici. Veličina viriona iznosi 100 do 500 nm (180 nm). Virus ima dvoslojnu lipidnu ovojnicu podrijetlom od stanične membrane domaćina u koju su ugrađeni izdanci na površini (virusni hemaglutinin/neuraminidaza, HN i fuzijski, F proteini), odgovorni za infektivnost viriona. Helikalna nukleokapsida oblika je riblje kosti i otporna na djelovanje RNaza, a čini je kompleks virusne transkriptaze (RNP-kompleks) tj. genomska ribonukleinska kiselina (RNK) povezana s nukleoproteinom (NP), fosfoproteinom (P) i RNK-ovisnom RNK polimerazom (L) (Slika 1.) (YUSSOF i TAN, 2000.; SAVIĆ, 2003.; ALEXANDER, 2009.).



Slika 1. Virion ptičjeg paramiksovirusa serotip-1 (APMV-1), odnosno VNB-a (Izvor: www. cancervirotherapy.wordpress.com).

Genom VNB-a čini jednolančana nesegmentirana molekula ribonukleinske kiseline (RNK) negativnog polariteta. Dužina genoma tj. lanca RNK može iznositi 15 186, 15 192 ili 15 198 nukleotida (nt) (CZEGLÉDI i sur., 2006.; MUNIR i sur., 2010.). Nađene dužine genoma su u skladu s "pravilom šest" prema kojem je nužan preduvjet za uspješnu replikaciju virusa da broj nt u genomu mora biti djeljiv sa šest. Naime, RNK genom je čvrsto vezan u helikalnu nukleokapsidu, a u RNP kompleksu svaki NP monomer veže točno jedan heksamer (šest nt) na RNK molekuli (PEETERS i sur., 2000.; KOLAKOFSKY i sur., 2005.; MUNIR i sur., 2010.). Različite dužine genoma posljedica su umetanja jednog ili dva heksamera u genom virusa tijekom evolucije. Tako razred II VNB-a čine stariji genotipovi (gt I-IV, IX) s genomom dugačkim 15 186 nt, a mlađi genotipovi (gt V-VIII, X-XII) imaju genom od 15 192 nt, što je posljedica umetanja heksamera u 5′ regiju NP gena koja se ne prepisuje (engl. *untranslated region*, 5′UTR) (MAMINIAINA i sur., 2010.; MILLER i sur., 2010.). Virusi NB-a iz razreda I imaju genome dužine 15 198 nt i, uz prethodno spomenut umetnuti heksamer, sadrže još heksamerni umetak u otvorenom okviru čitanja P gena (engl. *open reading frame*, ORF) (CZEGLÉDI i sur., 2006.; MAMINIAINA i sur., 2010.).

Genom čini šest gena redom 3' NP-P-M-F-HN-L-5'. Geni nose poruku za sintezu šest strukturnih proteina: nukleokapsidni protein (NP), fosfoprotein (P), protein matriksa (M), fuzijski protein (F) odgovoran za spajanje virusne ovojnice sa staničnom membranom, protein hemaglutinin/neuraminidaza odgovoran za hemaglutinaciju i eluciju (HN), i o RNK ovisna RNK polimeraza tzv. veliki protein (L). Prepisivanje genoma ide start-stop-restart mehanizmom sintetizirajući odvojene glasničke (gRNK) molekule. Prepisivanje započinje od 3' vodeće regije i usmjeravano je evolucijski očuvanim kontrolnim oligonukleotidima na početku (engl. *gene start*, GS) i na kraju svakog gena (engl. *gene end*, GE), uz dodatni utjecaj nekodirajućg slijeda nukleotida između gena (engl. *intergenic sequences*, IGS) (KOLAKOFSKY i sur., 2005.; PALDURAI i sur., 2010.). Veliki kapacitet kodiranja, koji karakterizira čitavu *Paramyxoviridae* porodicu virusa, dodatno povećava mehanizam transkripcijskog preuređivanja gRNK policistroničkog P gena što je osnova za sintezu ne-strukturnih proteina V i W. Do preuređivanja dolazi uslijed „zastajkivanja" o RNK ovisne RNK polimeraze i umetanjem jednog ili dva gvanidina (G) na mjestu preuređivanja označenom slijedom nukleotida 3'-^{2280}UUUUUCCC^{2287}-5' (PALDURAI i sur., 2010.) na genomskoj RNK molekuli (KOLAKOFSKY i sur., 2005.; MILLER i sur., 2010.).

2.1.2.1. Molekulska osnova patogenosti i tropizma

Molekulska osnova patogenosti virusa NB-a predmet je istraživanja dugi niz godina (ROTT i KLENK, 1988.), a zanimanje ne prestaje ni danas (KIM i sur., 2011.). Različita virulencija i tropizam sojeva VNB se povezuje sa specifičnim slijedom aminokiselina (ak, engl. *amino acids*, aa) na mjestu cijepanja prekursora fuzijskog proteina (F0) smještenog između aminokiselinskih ostataka (ak-ostataka) 112 i 117 (COLLINS i sur., 1993.; BALLAGI-PORDÁNY i sur., 1996.; PEETERS i sur., 1999.; de LEEUW i sur., 2005.). Fuzijski protein je, uz HN, zaslužan za infektivnost viriona NB-a (PANDA i sur., 2004.; KIM i sur., 2011.). Tijekom replikacije sintetizira se nefunkcionalan prekursor F0 koji za aktivaciju zahtjeva proteolitičko cijepanje između ak-ostataka 116 i 117 na F1 i F2 peptide povezane disulfidnim vezama (Slika 2.). Proteolitičko cijepanje vrše proteaze stanica domaćina. Nalaz višestrukih bazičnih aminokiselina (tj. barem tri arginina, R ili lizina, K) na mjestu cijepanja i fenilalanina (F) na mjestu 117 služi kao molekularna oznaka (^{112}R/K-R-Q-R/K-R↓F^{117}) velogenih i mezogenih sojeva (GLICKMAN i sur., 1988.; CHOI i sur., 2010.). Takav sastav aminokiselina omogućava cijepanje F0 prekursora ubikvitarnim staničnim proteazama (poput furina i njemu sličnih proteaza), čime doprinosi pantropizmu tj. sustavnom širenju virusa u organizmu i smrtnom ishodu infekcije. Lentogeni sojevi VNB-a na mjestu cijepanja F0 prekursora nose sekvencu ^{112}G/E-K/R-Q-G/E-R↓L^{117} i leucin (L) na mjestu '117, koju prepoznaju tripsinu slične proteaze prisutne samo u dišnom i probavnom sustavu. Tako je tropizam i umnažanje lentogenih sojeva ograničen samo na dišni (pneumotropni sojevi) i probavni sustav (enterotopni sojevi) (de LEEUW i sur., 2005.; ALEXANDER, 2009.; MILLER i sur., 2009.).



Slika 2. Ishod infekcije virusom NB-a s obzirom na slijed aminokiselina na mjestu cijepanja prekursora F0 proteina (preuzeto i prilagođeno od ZOHARI, 2010.).

Međutim, neki sojevi ne slijede u potpunosti načelo virulencije na osnovu sekvence cijepanja F0 proteina. DORTMANS i sur. (2009.) opisali su golublje sojeve koji nisu bili patogeni za kokoši (nizak ICPI), unatoč nalazu tipičnog motiva virulentnih sojeva u njihovom F proteinu. I obrnuto, MEULEMANS i sur. (2002.) su opisali golublje sojeve s molekulranim motivom lentogenih sojeva, ali visokim ICPI.

Nadalje, čini se da i HN ima ulogu u tropizmu i virulenciji virusa (de LEEUV i sur., 2005.; KIM i sur., 2011.). Tako apatogeni sojevi VNB-a (npr. Ulster 2C) sintetiziraju prekursor HN proteina (HN0) koji sadrži 616 ak. Nakon posttranslacijskog cijepanja proteazama na karboksilnom kraju postaje biološki aktivan protein. Nasuprot tomu, virulentniji sojevi imaju stop kodon smješten prije kraja ORF na HN0 genu i sintetiziraju HN proteine duge 577 ak (lentogeni sojevi) ili 571 ak (mezogeni i velogeni sojevi) (MILLER i KOCH, 2013.).

Uloga P gena u patogenosti VNB nije izravna, već se odnosi na prije spomenuto posttranskripcijsko preuređivanje gRNK kojim nastaje informacija za sintezu V proteina. Nastali V protein se ponaša kao antagonist sinteze interferona i time sprječava interferonski odgovor (GOTOH i sur., 2001.; HORVATH, 2004.). To ga čini važnim čimbenikom virulencije (HUANG i sur., 2003.).

Novija istraživanja ukazuju da bi i kompleks virusne transkriptaze (RNP kompleks) mogao imati ulogu u virulenciji virusa (DORTMANS i sur., 2010.).

2.1.2.2. Klasifikacija VNB

a) Klasifikacija po patotipovima

Obzirom na kliničko očitovanje i tropizam u kokoši, razlikuju se slijedeći patotipovi VNB: (1) *asimptomatski crijevni*, (2) *lentogeni* (slabo patogen), (3) *mezogeni* (srednjeg stupnja patogenosti), (4) *velogeni viscerotropni* (jako patogen s primarno visceralnim očitovanjem hemoragičnog enteritisa) te (5) *velogeni neurotopni* (jako patogen sa simptomima od strane dišnog i živčanog sustava) (BEARD i HANSON, 1984.; ALEXANDER i SENNE, 2008.). Međutim, određivanje patotipa na osnovu kliničke slike nije uvijek pouzdano jer se simptomi zaraze slabo patogenim sojem mogu pojačati pogodovnim, lošim uvjetima okoliša ili postojanjem superinfekcije (ALEXANDER i ALLAN, 1974.; ANONYMUS, 2012.).

Osim kliničkim očitovanjem, virulencija VNB-a određuje se i *in vivo* laboratorijskim postupcima koji uključuju: određivanje srednjeg vremena uginuća pilećih zametaka (engl. *Mean death time*, MDT), indeksa intracerebralne patogenosti (engl. *Intracerebral pathogenicity index*, ICPI) u jednodnevnih pilića, te indeksa intravenske patogenosti (engl. *Intravenus pathogenicity index*, IVPI) u pilića dobi šest tjedana (ALEXANDER, 1998.; CATTOLI i sur., 2011.; ANONYMUS, 2012.). Tablica 1. prikazuje kriterije za klasifikaciju VNB-a po patotipovima i primjere sojeva.

Tablica 1. Klasifikacija sojeva VNB-a s obzirom na indekse patogenosti i primjeri (prilagođeno prema BEARD i HANSON, 1984.; ALEXANDER, 1998.; CATOLLI i sur. 2011.; MILLER i KOCH, 2013.).

Patotip VNB-a	Patogenost			Kliničko očitovanje
	MDT (h)[a]	ICPI[b]	IVPI[c]	
Velogeni viscerotropni	**< 60**	**1,5 – 2,0**	**2,0 – 3,0**	**DOYELOV oblik**
Herts 33/56**	48	2,00	2,70	Akutna zaraza; 100% pomor peradi svih dobi; hemoragična upala žlijezdanog želuca i tankog crijeva
Italien	50	1,85	2,80	
Milano**	50	1,90	2,80	
NY Parrot 70181/1972	51	1,80	2,60	
Velogeni neurotropni	**< 60**	**1,5 – 2,0**	**2,0 – 3,0**	**BEACHOV oblik:**
Texas GB**	55	1,75	2,70	akutna zaraza; 100% pomor; dišni, pa živčani znakovi pred smrt
Mezogeni	**60 – 90**	**0,7 –1,5**	**0 – 0,5**	**BEAUDETTOV oblik:**
H*	48	1,20-1,40	0	Akutna zaraza; pomor niži, uglavnom ptice mlađe dobi; Dišni i živčani znakovi
Mukteswar*	46	1,40	0	
Komarov (ili Haifa-soj)	69	1,41	0	
Roakin*	68	1,45	0	
Beaudette C	62	1,60	1,45	
Lentogeni	**> 90**	**0,2 – 0,5**	**0**	**HITCHNEROV oblik**
Hitchner B1*	120	0,20	0,00	Inaparentna dišna zaraza odrasle peradi; pomor mlađe peradi do 30%
F(Aspin)*	119	0,25	0,00	
La Sota*	103	0,40	0,00	
Asimptomatski crijevni	**> 90**	**0 – 0,2**	**0**	**LANCASTEROV oblik**
Ulster 2C*	> 150	0,00	0,00	Inaparentna zaraza koja zahvaća probavni sustav
Queensland V4*	> 150	0,00	0,00	

[a] MDT = srednje vrijeme ugibanja pilećih zametaka (u satima); [b] ICPI = indeks intracerebralne patogenosti za jednodnevne piliće; [c] IVPI = indeks intravenske patogenosti za piliće u dobi od šest tjedana
* sojevi u komercijalnim cjepivima; ** sojevi koji se koriste za izazivačke infekcije pri provjeri zaštite potaknute cijepljenjem

Definicija NB-a prema Svjetskoj organizaciji za zdravlje životinja (OIE) glasi:

„Newcastleska bolest je zarazna bolest ptica koju uzrokuje ptičji paramiksovirus serotipa- 1 koji zadovoljava jedan od slijedećih kriterija:

a) Virus ima indeks intracerebralne patogenosti (ICPI) u vrijednosti 0,7 ili većoj kod jednodnevnih pilića (Gallus gallus)

b) Više bazičnih aminokiselina se nalazi na C- kraju proteina F2 i aminokiselina fenil alanin se nalazi na N-kraju proteina F1.

Termin "više bazičnih aminokiselina" se odnosi na najmanje tri arginina ili lizin između ostataka 113 – 116.“ (ANONYMUS, 2012.).

Molekulska metoda reverzne transkripcije i lančane reakcije u stvarnom vremenu (RT – qPCR), određivanja slijeda nt i izvođenja prije opisanog slijeda ak na mjestu cijepanja F0 proteina (112 – 116↓117 ak) danas se koriste kao prihvatljive metode za dijagnostiku i određivanje patotipa soja uzročnog virusa u svrhu prijave NB-a nadležnim tijelima (WISE i sur., 2004.; ANONYMUS, 2012.).

Pritom se nalaz višestrukih ak na mjestu cijepanja F0 prihvaća kao dokaz nazočnosti virulentnog ili potencijalno virulentnog VNB-a i potvrdu NB-a za prijavu. Međutim, ako se molekulskom metodom ne ustanovi nazočnost VNB-a ili se nađe VNB s lentogenim motivom, to ne isključuje nazočnost virulentnog VNB-a i u tim slučajevima potrebno je izdvojiti virus i učiniti *in vivo* ICPI test (ANONYMUS, 2012.). Uzrok tomu može biti nepodudarnost početnica i probe sa sekvencom pretraživanog VNB-a (CATOLLI i sur., 2010.) ili miješana populacija virulentnih i avirulentnih VNB-a u uzorku (ALEXANDER i sur., 2004.; ANONYMUS, 2012.).

b) Filogenetska klasifikacija u genotipove i epizootiološki značaj

Iako svi VNB pripadaju istom serotipu (APMV-1), te postoji unakrižna reakcija protutijela (Pt) nastalih na jedan soj prema svim ostalima (ALDOUS i ALEXANDER, 2001.), ipak postoje određene antigene varijacije koje se otkrivaju monoklonskim protutijelima (ALEXANDER i sur., 1997.) i genetske razlike prema kojima je moguće grupirati sojeve VNB-a (genotipizirati). Sojevi pojedine skupine tako dijele vremenske, zemljopisne, antigene, biološke i epizootiološke parametre, a izvođenjem slijeda ak na mjestu cijepanja prekursorskog F0 proteina moguće je predvidjeti i patogenost soja (ANONYMUS, 2012.; MILLER i KOCH, 2013.).

Trenutno je u primjeni više načina filogenetske klasifikacije VNB-a (Tablica 2.). Najčešće korišten način klasifikacije koristi usporedbu sljedova nt čitavog genoma,

parcijalnih sljedova nt varijabilnog dijela F gena (374 nt na pozicijama 47 do 420 nt u F genu) i izvedenih sljedova ak F0 proteina. Prema njemu, do danas analizirani sojevi VNB-a svrstavaju se u dva razreda, s devet gt u razredu I i 12 gt u razredu II (LOMNICZI i sur., 1998.; MILLER i sur., 2010.; MAMINIAINA i sur., 2010.; COURTNEY i sur., 2012.). Razred II čine sojevi patogeni za perad, uključujući i lentogene, koji se koriste u cjepivima, i velogene, koji se koriste u izazivčkim pokusnim infekcijama. Genotipovi VI i VII se dalje dijele u podgenotipove, i to gt VI u osam (a–h) i gt VII u pet (a–e). Razred I čine VNB najdužeg genoma, koji su, izuzev jednog soja (ALEXANDER, 2001.), apatogeni za perad, a najčešće su izdvojeni iz divljih vodarica (CZEGLÉDI i sur., 2006.; KIM i sur., 2007.; MILLER i sur., 2010.).

Drugi način klasifikacije predložili su ALDOUS i sur. (2003.) i pritom su također koristili usporedbu varijabilne regije F gena (375 nt). Izolate i sojeve VNB-a su podijelili u 6 zasebnih linija, a linije 3 i 4 u četiri podlinije (a-d) i liniju 5 u pet podlinija. Oba modela se preklapaju, kako je prikazano u tablici 2. (ALDOUS i sur., 2003.; ALEXANDER, 2009.; CATTOLI i sur., 2010. MILLER i sur., 2010.). Svi sojevi razreda I odgovaraju liniji 6 (CZEGLÉDI i sur., 2006.).

Tablica 2. Filogenetska klasifikacija sojeva VNB.

AUTORI	CZEGLÉDI i sur., 2006.; LOMNICZI i sur., 1998.; ALEXANDER, 2001. COURTNEY i sur., 2012.	ALDOUS i sur., 2003.; ALEXANDER, 2009.; CATTOLI i sur., 2010.	DIEL i sur., 2012.; SNOECK i sur. 2013.
KRITERIJ	1) veličina genoma 2) varijabilna regija F gena	1) varijabilna regija F gena	1) Cijela sekvenca ORF F gena
RAZRED I	– veličina=15198nt* – 9 gt** – samo 1 soj patogen za perad NDV/Ch/Irska/1990	linija 6	– 1 gt – 3 podgenotipa
RAZRED II	– 12 gt (2012.) – rani – 15186 nt – I –V (bez III) i IX – nedavni – 15192 nt – gt III, VI–VIII, X–XII	linije 1,2, 3b, 3c, 3e linije 3a, 4,5,3d,3f,3g, 3h	– 18 gt

*nt= nukleotidi; **gt= genotip

Treći način je novijeg datuma, opisali su ga DIEL i sur. (2012.) i na osnovu filogenetske analize cijelog F gena klasificirali izolate VNB-a u dva razreda: razred I koji čine 3 podgenotipa i razred II koji danas broji 18 gt (DIEL i sur., 2012.; SNOECK i sur., 2013.; KAPCZYNSKI i sur., 2013.).

Genetska analiza 25 hrvatskih sojeva VNB-a (HR) izdvojenih tijekom enzootskog razdoblja NB-a (1979. – 1994.) pokazala je da svi pripadaju gt V (SAVIĆ, 2003.; WEHMANN i sur., 2003.), a golublji sojevi izdvojeni na istom području pripadaju gt VIb (UJVARI, 2003.). Dva HR izolata izdvojena iz pilića 1999. i 2000. godine, koje SAVIĆ (2003.) smatra reizolatima cjepnog La Sota soja VNB-a, pripadaju gt II (Slika 3.).

Epizootiološki značaj. Kao što je već spomenuto, sojevi pojedine skupine dijele vremenske, zemljopisne, antigene, biološke i epizootiološke parametre (ANONYMUS, 2012.; MILLER i KOCH, 2013.). Nadalje, divlje vodarice smatraju se, pored virusa ptičje influence, prirodnim rezervoarima slabo patogenih VNB, asimptomatskog crijevnog patotipa (ALEXANDER, 2009.). Ti sojevi koriste duže preživljavanje domaćina za replikaciju i izlučivanje viriona (MILLER i sur., 2009.a; MUNIR i sur., 2010.). Dokazano je da slabo patogeni cirkulirajući sojevi mogu postati virulentniji pasažama u kokoši (SHENGQING i sur., 2002.). Takav slučaj zabilježen je u epizootijama u Irskoj 1990. godine (COLLINS i sur., 1998.; ALEXANDER, 2001.; ALEXANDER i sur. 2004.) i Australiji u razdoblju od 1998 do 2000. godine (GOULD, 2001.; MILLER i sur., 2009.a). Za to je bila dovoljna točkasta mutacija samo 2 nt u F genu što se u prirodi to na sreću rijetko događa (GOULD i sur., 2001.; ALEXANDER i sur., 2004.; MILLER i sur., 2009.a). Nadalje, ZANETTI i sur. (2008.) uspjeli su izolat apatogen za kokoši i izdvojen iz divljih ptica učiniti virulentnim nakon 20 pasaža u pilećim zametcima.

2.1.2.3. Soj virusa NB ZG1999HDS

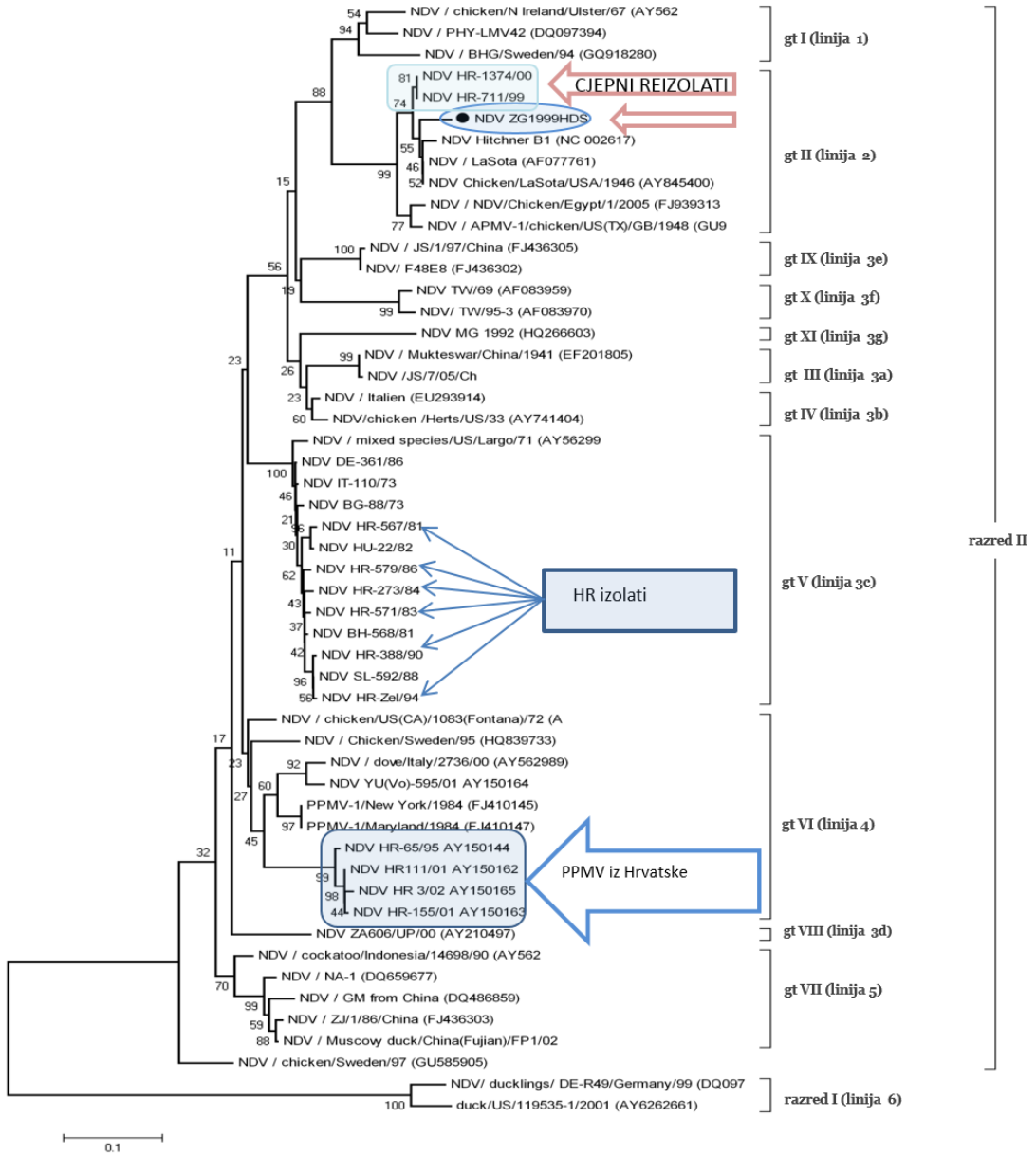
Anamnestički podatci. Soj virusa NB ZG1999HDS je izdvojen tijekom pomora tovnih pilića u srpnju 1999. godine na farmi u sjeverozapadnoj Hrvatskoj (Tablica 3.). Izdvojen je iz pluća uginulih pilića dobi 28 dana (17 dana od pojave zaraze) tako što je SPF pilećim zametcima inkubiranim 9-10 dana inokulirana suspenzija plućnog tkiva uginulih pilića; zatim su inkubirani na 37°C. Određeni su početni pokazatelji patogenosti i to MDT koji je iznosio 120 sati i hemaglutinacijski (HA) titar koji je iznosio 1:64.

Tablica 3. Uginuće tovnih pilića u srpnju 1999. godine (preuzeto iz MAZIJA i sur., 2011.).

15.6.1999 Useljeno jato jednodnevnih brojlera (16.150) **Uginuće pilića tijekom 4 tjedna (broj jedinki)**	
16.6.1999. (dan nakon useljenja)	51
1. tjedan	198
2. tjedan	93
3. tjedan	10.783
4. tjedan	1.343
UKUPNO	**12.416 (76,87%)**

Do sada je ovom soju određen ICPI, MDT, i IVPI (MAZIJA i sur., neobjavljeni podatci), izlučivanje virusa nakon intravenske (i/v) primjene (STUPAR, 2012.), slijed nt u genomu (NEDELJKOVIĆ, 2011.), kao i slijed nt varijabilnog dijela F gena i iz njega izvedenog slijeda ak, te slijed ak na mjestu cijepanja fuzijskog proteina (RUNJIĆ, 2006.; NEDELJKOVIĆ, 2011.). Nadalje, soj ZG1999HDS se pokazao imunogenim nakon primjene postupkom nebulizacije (zamagljivanja) jednodnevnim pilićima (BIĐIN i MAZIJA, 2009.). Isto tako, soj je postigao statistički značajno bolje rezultate lize tumorskih stanica u usporedbi s La Sota sojem (MAZIJA i sur., 2011.).

Filogenetska analiza potvrdila je predviđanjem slijeda ak na mjestu cijepanja F0 prekursor proteina da se radi o lentogenom soju VNB-a. Filogenetski se soj smješta među sojeve genotipa II unutar razreda II virusa NB-a (Slika 3.). Blisko je srodan cjepnom soju La Sota i hrvatskim (HR) cjepnim reizolatima izdvojenim u istom razdoblju (SAVIĆ, 2003.), ali je usporedbom slijeda nt čitavog genoma (97% podudarnosti u slijedu nt u genomu) i varijabilnog dijela F gena, srodniji velogenim sojevima izoliranim 2005. godine iz cijepljenog jata u Egiptu, (ABDEL-MONEIM i sur., 2006.; MOHAMMED i sur., 2009.) i u Kini (dostupna samo sekvenca izolata iz GenBank baze) (NEDELJKOVIĆ, 2011.). Nađena je srodnost i s virusima izoliranim iz svinja (DING i sur., 2010.). Zbog manjka anamnestičkih podataka nije isključeno da je postojala superinfekcija koja je mogla pogodovati utvrđenom pomoru pilića.



Slika 3. Filogenetska analiza usporedbe sekvenci varijabilnog dijela F gena (47-421 nt) VNB primjenom Neighbour Joining metode. Analiza je uključivala 36 sekvenci iz GenBank, ZG1999HDS (crvena strelica), prijašnji hrvatski izolati (plave strelice, HR izolati) = 6 sekvenci, PPMV-1 hrvatski izolati = 4 sekvence, HR izolati cjepnog soja = 2 sekvence (crvena strelica s tekstom).

2.1.3.Epizootiologija

Virus NB-a može zaraziti domaću perad, pernatu divljač, druge divlje i kavezne ptice, ali i gmazove, sisavce te čovjeka (ALEXANDER, 2009.). Prirodne ili pokusne infekcije zabilježene su u oko 241 vrste ptica, ali je vrlo vjerojatno da su sve vrste ptica prijemljive za zarazu virusom NB-a, s različitim kliničkim očitovanjem i ishodom (KALETA i BALDAUF, 1988.). Kokoši i purani su najosjetljiviji na zarazu, dok su

domaće patke i guske otporne. Divlje vodarice najčešće su inficirane slabo patogenim sojevima, poput asimptomatskih crijevnih sojeva te se, kao i u slučaju ptičje influence, smatraju rezervoarima i predstavljaju stalnu prijetnju domaćoj peradi (ALEXANDER i sur., 2004.; MUNIR i sur., 2010.). Među kaveznim i egzotičnim pticama zabilježena je pojava latentnih kliconoša (ALEXANDER i sur., 2004.). Stalnu značajnu prijetnju za širenje NB na perad također predstavljaju divlji i trkači golubovi, nosioci PPMV-1 (ALEXANDER, 2009.).

Prirodna zaraza nastupa preko sluznica probavnog i dišnog sustava, a isti putevi se koriste i kod masovne primijene oslabljenih živih cjepiva. Virus, čak i cjepni, se izlučuje iscjetkom iz očiju i nosa, sekretima dišnog sustava i izmetom. Također, imune životinje nakon ponovne infekcije virulentnijim virusom mogu izlučivati virus do 40 dana, a papige isprekidano čak i do godinu dana (ALEXANDER i sur., 2004.; ALEXANDER, 2009.). Inkubacija bolesti traje dva do 15 dana, u prosjeku tri do šest dana. Bolest se širi izravno, kontaktom s bolesnim životinjama (perad, druge vrste ptica), lešinama, latentnim kliconošama i životinjama u inkubaciji te posredno, hranom i vodom kontaminiranim sekretom iz nosa ili izmetom, steljom, prijevoznim sredstvima, osobljem (odjeća, obuća, oprema), ali i cjepivima protiv ostalih virusnih bolesti koja su kontaminirana virulentnim sojevima VNB-a. Širenje virusa putem zraka ograničenog je značaja zbog utjecaja okolišnih uvjeta poput temperature, relativne vlažnosti i strujanja zraka. Mjesto umnažanja virusa i nastup viremije, a time i ishod infekcije, prvenstveno ovisi o virulenciji i tropizmu uzročnika, ali i o zdravstvenom i imunosnom statusu, dobi i vrsti domaćina te uvjetima okoliša i držanja (ALEXANDER i SENNE, 2008.).

Javno zdravstveni značaj. Virus NB-a uzrokuje prolaznu infekciju oka u ljudi koji su bili u kontaktu s virusom, poput laboratorijskog osoblja, ekipa za cijepljenje peradi i ptica (GALLILI i BEN-NATHAN, 1998.), veterinara te radnika zaposlenih u uzgoju peradi i kaveznih ptica. Infekcija se očituje jednostranim ili obostranim konjuktivitisom, crvenilom, pojačanim suzenjem, otečenjem kapaka i subkonjunktivalnim krvarenjem (ALEXANDER i SENNE, 2008.; ALEXANDER, 2009.). U iste rizične skupine ljudi zabilježen je i značajno viši titar protutijela za VNB. Nije zabilježen prijenos s čovjeka na čovjeka (MILLER i KOCH, 2013.). Povremeno se infekcija može očitovati simptomima poput influence koji uključuju otečene limfnih čvorova, glavobolju, mučninu i drhtavicu (GALLILI i BEN-NATHAN, 1998.; ALEXANDER, 2009.), a golublja varijanta VNB-a

je izdvojena iz pluća, izmeta i mokraće imunokompromitiranog pacijenta koji je umro od upale pluća (GOEBEL i sur., 2007.).

2.1.4. Klinička slika i patomorfološki nalaz

Bolest se očituje širokim spektrom simptoma na što utječu već prije spomenuti čimbenici vezani uz uzročnika, domaćina te uvjete držanja i okoliša (ALEXANDER i SENNE, 2008.; ANONYMOUS, 2012.).

Sumnju na NB je moguće postaviti na temelju nalaza naglog povećanog uginuća, znakova općeg infekcijskog sindroma, pada ili prestanka nesivosti i jaja loše kvalitete ljuske u cijepljenih nesilica, zelenog proljeva boje špinata, otečene očne spojnice, podbratka i krijeste, dišnih i živčanih simptoma (MILLER i KOCH, 2013.).

Patomorfološki nalaz također nije specifičan i diferencijalno se teško razlikuje od nalaza kod influence ptica. Međutim, za viscerotropne velogene sojeve specifičan je nalaz krvarenja na otvorima žlijezdi u žljezdanom želudcu (proventriculus), nađu se i krvarenja po sluznicama crijeva i dišnog sustava (ANONYMUS, 2012.).

Obzirom na širok spektar kliničkih i patomorfoloških znakova ne postoje patognomonični znakovi za sigurnu dijagnozu NB-a (ALEXANDER i sur., 2004.; ANONYMUS, 2012.).

2.1.5. Sprječavanje i suzbijanje bolesti

Kontrola bolesti se u većem dijelu svijeta svodi na nespecifične higijenske mjere i mjere biosigurnosti, provođenje pravila dobre proizvodne prakse, te specifične mjere imunizacije peradi i neškodljivo uklanjanje u slučaju pojave bolesti („stamping-out“).

Nespecifičnim mjerama cilj je spriječiti unos VNB-a na farme i među seoske uzgoje peradi. One uključuju provođenje biosigurnosnih mjera i mjera dobre proizvodne prakse (all in-all out) na farmi, a zahtjeva i edukaciju osoblja (MILLER i KOCH, 2013.).

2.1.5.1. Specifična imunoprofilaksa -cijepljenje

Većina zemalja provodi politiku cijepljenja u svrhu kontrole NB-a (ANONYMUS, 1992.; 2013.). Programi cijepljenja i vrsta cjepiva koja se koriste različiti su, ovisno o

epizootiploškoj situaciji, cirkulirajućem terenskom soju i tipu proizvodnje (ALEXANDER i sur., 2004.; SENNE i sur., 2004.; MILLER i KOCH, 2013.).

Neke zemlje, poput Švedske, Danske i Finske, provode politiku ne cijepljenja i „stamping-out“ u slučaju pojave bolesti (MILLER i KOCH, 2013.). Razlog tomu može se naći u cirkuliranju apatogenih sojeva u divljih ptica koji mogu uzrokovati pojavu latentnih infekcija u komercijalne peradi te time nanijeti gospodarske štete uslijed pada nesivosti u nesilica ili smanjenog prirasta u broilera. Necijepljenjem moguće je utvrditi postojanje seropozitivnih i latentno inficiranih jedinki (MILLER i sur., 2013.).

Imunizacija se provodi primjenom inaktiviranih i atenuiranih živih cjepiva koja sadrže pretežnoasimptomatske crijevne i lentogene (Hitchner B1, La Sota, VG/GA, Ulster 2C i V4) ili atenuirane mezogene (Komarov, Mukteswar, Roakin) sojeve virusa NB-a (Tablica 4.). Uporaba živih cjepiva od mezogenih sojeva zabranjena je u zemljama EU (ANONYMUS, 1993.), tj. cjepni virus smije imati ICPI 0,4-0,5, odnosno manji od 0,7 prema OIE (ANONYMUS, 2012.) i danas je ograničena na zemlje s enzootskom pojavom NB-a.

Kod dugo živuće peradi (roditelji i nesilice) koristi se kombinacija, živo pa kod docjepljivanja inaktivirano cjepivo. Takva kombinirana uporaba cjepiva pruža bolju zaštitu od zaraze virulentnim sojevima, osobito u intenzivnom uzgoju peradi (SENNE i sur. 2004.).

Tablica 4. Usporedba živih i inaktiviranih cjepiva protiv NB-a (prema: GALLILI i BEN-NATHAN, 1998.).

	Inaktivirana cjepiva	**Živa cjepiva**
Primjena	Injekcijom, pojedinačno - pod kožu (s/c) - u mišić (i/m)	**masovno**- pitkom vodom, raspršivanjem (sprej, aerosol, nebulizacija); hranom **pojedinačno** - u nos; u oko, uranjanjem kljuna, u krilnu opnu
Pripravak	Uljna suspenzija, s/bez adjuvansa	Liofiliziran ili zamrznut
Potreba za adjuvansom	Da	Ne
Imunosna reakcija	Sustavna	Lokalna i sustavna
Humoralni odgovor	IgM, IgY	IgA, IgM, IgY
Titar Ag u dozi	Deseterostruko više	Jednostruki
Trajanje imunosti	Duže	Kraće

Komercijalno dostupna cjepiva štite od bolesti i uginuća u slučaju naknadne infekcije virulentnim sojevima, ali ne sprječavaju infekciju, umnažanje, izlučivanje i

širenje vVNB (KAPCZYNSKI i KING, 2005.; MILLER i sur., 2007.; ALEKSANDER i SENNE, 2008.; MILLER i sur., 2009.b; MILLER i KOCH, 2013.; MILLER i sur., 2013.). Nadalje, cirkulirajući virus NB-a koji prevladava u svijetu je viscerotropan, a cjepiva se pretežno baziraju na pneumotropnim virusima koja su se pokazala nedostatna da zaštite perad. Tomu svjedoče pojave bolesti u cijepljenim jatima s velikom ekonomskom štetom npr. u Egiptu 2005. godine (ABDEL-MONEIM i sur., 2006.). Osim toga, u komercijalnom uzgoju peradi provodi se plansko cijepljenje roditeljskih jata kako bi se osigurala pasivna zaštita pilića u prvim tjednima života. Prisutna materalna protutijela u serumu pilića, međutim, neutraliziraju cjepni virus i koče razvoj stečene imunosti tvorbom protutijela (RAUW i sur., 2009.), ali i smanjenim staničnim odzivom u prvim danima života (LOWENTHAL i sur., 1994.). Zato je nužno provesti docjepljivanje podmlatka u dobi dva do tri tjedna.

Stupanj zaštite postignute cijepljenjem procjenjuje se serološkim probama inhibicije hemaglutinacije (IHA) ili imunoenzimnom probom (ELISA) kojima se određuje titar stvorenih neutralizacijskih protutijela u serumu (Tablica 5.), tri do četiri tjedna nakon cijepljenja. Nakon toga titar opada i potrebno je provesti docjepljivanje. Kao okvirni pokazatelj, zaštitni titar nakon jednokratnog cijepljenja živim cjepivom ima vrijednost 2^4 do 2^6, ali inaktivirana cjepiva u uljnoj emulziji mogu potaći titar od 2^{11} čak i više (ALEXANDER i SENNE, 2008.; MILLER i KOCH, 2013.).

Tablica 5. Odnos razine titra protutijela specifičnih za VNB i otpornosti peradi na izazivačko zaražavanje patogenim virusom NB-a (preuzeto iz ALLAN i GOUGH,1974.; MAZIJA i sur., 1983.).

Titar protutijela specifičnih za VNB (log_2)	**Srednja vrijednost**	**Standardna devijacija**	**Posljedica zaražavanja patogenim virusom NB**
2^2 ili manje	–	–	Uginuće 100% zaražene peradi
$2^2 – 2^5$	$2^{3,75}$	0,4	Uginuće 100% zaražene peradi
$2^4 – 2^6$	$2^{5,2}$	0,35	0% uginuća zaražene peradi
$2^6 – 2^8$	$2^{6,5}$	1,2	Jak pad nesivosti bez ugibanja peradi, Nalaz titra Pt 2^{14} ili više
$2^9 – 2^{11}$	$2^{10,5}$	1,4	Nema pada nesivosti niti ugibanja peradi, Nalaz titra Pt $2^{11} – 2^{12}$
$2^{11} – 2^{13}$	$2^{11,2}$	1,3	Jato je sigurno zaštićeno od pada nesivosti u razdoblju od šest i više mjeseci

Međutim, obzirom na važnost stanične imunosti, procjena zaštite peradi od NB-a samo na osnovu određivanja stupnja humoralne imunosti pokazala se nedostatnom. Stoga se sve više istražuju mogućnosti procjene stanične imunost (DALGAARD i sur., 2010.).

2.1.5.1.1. Živa cjepiva

Živa atenuirana cjepiva se primjenjuju masovnim postupcima u hrani i vodi za piće, raspršivanjem (sprej, aerosol), nebulizacijiom (MAZIJA i sur., 2009.). Živi virus je sposoban za replikaciju pa snažno potiče imunosni odgovor, čime se postiže lokalna imunost na mjestu replikacije VNB-a u sluznicama, ali i sustavna humoralna zaštita (AL-GARIB i sur., 2003.), te, zbog širenja cjepnog virusa (STUPAR, 2012.), „imunost jata“ (VAN BOVEN i sur., 2008.). Loša strana živih cjepiva je što zbog izlučivanja cjepnog virusa, osobito atenuiranih mezogenih sojeva, otežava laboratorijsku dijagnostiku stvarnih infekcija terenskim sojem (SENNE i sur., 2004.). To se nastoji izbjeći primjenom molekularnih metoda (poput RT-qPCR) za određivanje patotipa virusa (YACOUB i sur., 2012.) ili primjenom rekombinantnih cjepiva (SUSTA i sur., 2013.).

2.1.5.1.2. Inaktivirana cjepiva

Inaktivirana cjepiva s adjuvansom primjenjuju se nakon primjene živog cjepiva individualno, parenteralno u mišić ili pod kožu, čime se dugotrajno potiče sustavna imunost. Inaktivirani virus se, nakon aplikacije, ne umnaža zbog čega je potrebna veća količina antigena za poticaj imunosnog odgovora (CIGLAR GROZDANIĆ, 2005.; BALENOVIĆ, 2008.), ali dodatkom adjuvansa postiže se solidna zaštita. Uz klasične adjuvanse, sve se više istražuje mogućnost primjene rekombinantnih citokina (DEGEN i sur., 2005.b), ali i drugi putevi primjene kao u nos (TAKADA i KIDA, 1996.), nebulizacijom (CIGLAR GROZDANIĆ, 2005.), kako bi se uz sustavnu, potakla i lokalna imunost.

2.1.5.1.3. Rekombinantna cjepiva

Razvoj molekularnih metoda potaknuo je istraživanja u polju kloniranja i doprinio razvoju rekombinantnih i subjediničnih (DNK) cjepiva. U tu svrhu su za izražavanje F i HN proteina VNB, kao virusni nosači, bili primijenjeni virus boginja (MEULMANS i sur., 1988.) i ptičji herpesvirusi (herpesvirus purana, RAUW i sur., 2010.). Rekombinantna cjepiva potiču zaštitnu imunost, ali je šira primijena u peradarskoj

proizvodnji onemogućena visokom cijenom zbog visokih troškova proizvodnje (MILLER i KOCH, 2013.).

Komercijalno dostupna ili eksperimentalna rekombinantna cjepiva za NB obično uključuju samo produkt F gena koji je ugrađen u virusni nosač, a cijepljenje rezultira tvorbom neutralizacijskih protutijela koja nemaju IHA aktivnost, što omogućava razlikovanje zaraženih i cijepljenih životinja (DIVA koncept) (PALYA i sur., 2012.). Premda jedan protein može inducirati zaštitnu imunost, bolji rezultati postignuti su kada su u cjepivu prisutna oba, i F i HN, proteina virusne ovojnice (MILLER i sur., 2009.; KUMAR i sur., 2011.).

S druge strane, primjena reverzne genetike omogućava izmjenu svojstava VNB-a (smanjenje patogenosti), ali i značajno doprinosi adjuvantnom učinku cjepiva. Naime, uspješno su u DNK cjepivo (plazmid ili sam genom VNB) ugrađeni geni za pileće citokine (IFN-γ i IL-4) koji su pokazali poticajne učinke na stvaranje zaštitne imunosti (SAWANT i sur., 2011., SUSTA i sur., 2013.)

2.1.6. Liječenje

Liječenje u slučaju NB-a se ne provodi, već se provode mjere „stamping out“, odnosno neškodljivog uklanjanja lešina, te dezinfekcije i odmora objekta.

2.2. Imunoreaktivnost peradi

Idealno stanje za preživljavanje peradi jest ravnoteža između ptice i vanjskog okoliša. Međutim, u modernoj peradarskoj proizvodnji uvriježeno je držanje peradi u gusto naseljenim nastambama i umjetno kontroliranim uvjetima okoliša, u kojima često različiti infektivni i okolišni čimbenici ugrožavaju dobrobit ptice, te tako predstavljaju jak pritisak na imunološki sustav. Stoga, je razvijen i funkcionalan imunološki sustav (imunokompetentnost) nužan preduvjet za očuvanje zdravlja i proizvodnosti jata peradi.

S druge strane, okolišni čimbenici (poput mikroklimatskih uvjeta, hranidbe, načina držanja) značajno utječu na prijemljivost, razvoj i proizvodna svojstva peradi. Iz tog razloga su biosigurnosne mjere (program održavanja higijene, mjere dezinfekcije i dekontaminacije, program cijepljenja) sastavni dio uspješne peradarske proizvodnje

kojima se nastoji spriječiti pojava imunosupresije u ptica (SHARMA i RAUTENSCHLEIN, 2013.).

2.2.1. Vanjske barijere infekciji

Vanjske barijere nisu i same nužno dio imunološkog sustava u užem smislu, ali znatno doprinose sveopćoj obrani organizma od infekcije različitim mikroorganizmima. Prije prodora u makroorganizam i ispoljavanja patoloških učinaka, mikroorganizam ih mora savladati.

Prije svega, izvana se nalazi koža s perjem i sekretima uropigijske žlijezde. Intaktna koža je neprobojna za većinu mikroorganizama. Međutim, različiti okolišni čimbenici (visoka temperatura, vlažnost ili štetni plinovi, NH_3) mogu smanjiti otpornost kože i dovesti do oštećenja koja će olakšati prodor mikroorganizma i pojavu bolesti (npr. ulcerozni dermatitis).

Sluznice i sluz također sprječavaju prodor mikroorganizama. Impozantan primjer toga je obrambeni sustav nosno-usne šupljine koji se nastavlja u grlo i dušnik. Anatomska građa nosnih otvora, turbinalija i dalje usna šupljina stvaraju vrtloženje zraka koje tjera udahnute čestice uz sluznice gdje se u suradnji s vrtičastim stanicama sluznice povežu sa sluzi, te kretanjem trepetljika i tjelesnim reakcijama, poput kihanja i kašljanja, bivaju izbačene van iz organizma (GERLACH, 1994.).

Sluz nadalje sprječava adsorpciju određenih virusa, a tjelesne tekućine, poput krvi, sline, suza, izlučevine dišnog i probavnog trakta i bjelanjak jajeta, sadrže enzim lizozim sposoban razoriti stjenku nekih bakterija. Interferoni sprječavaju unutarstanično umnažanje i širenje virusa. Opsonini i čimbenici komplementnog sustava potpomažu fagocitozu mijenjajući svojstva korpuskularnih antigena (bakterija) (SHARMA i RAUTENSCHLEIN, 2013.).

2.2.2. Morfologija imunološkog sustava ptica

Iako u mnogočemu nalikuje imunološkom sustavu sisavaca, imunološki sustav ptica očituje jedinstvene morfološke, molekularne i funkcionalne osobitosti. U ptica, humoralni i stanični imunosni odgovor ovise o dva anatomski odvojena organa, timusu i Fabricijevoj burzi. To su središnji ili primarni limfatični organi (PLO) u kojima tijekom

embrionalnog razvoja sazrijevaju T- i B- limfociti. Svaki od PLO može biti izdvojen i stimuliran zasebno, te tako omogućiti izučavanje specifičnosti staničnih, odnosno humoralnih imunosnih mehanizama. Tako je kokoš još u prošlom stoljeću poslužila kao prikladan pokusni model u komparativnoj imunologiji, a danas služi i u istraživanjima imunologije i virologije tumora (SHARMA i RAUTENSCHLEIN, 2013.).

U kasnoj fazi embrionalnog razvoja T- i B-limfociti migriraju u periferne (sekundarne) limfatične organe (SLO), kao što su slezena, cekalne tonzile, limfatične nakupine u sluznici crijeva (engl. *gut-associated lymphoid tissue,* GALT) i bronha (engl. *bronchial associate lymphoid tissue*, BALT), oro-okulo-nazalni sustav s Harderovom žlijezdom (engl. *head associated lymphoid tissues*, HALT). Ptice nemaju limfne čvorove (KAISER, 2010.) pa periferno limfatično tkivo čine nakupine limfnih čvorića duž sluznica (SHARMA i RAUTENSCHLEIN, 2013.).

Proces periferizacije omogućava imunološkom sustavu da reagira u suradnji s fagocitnim sustavom protiv infektivnih uzročnika na ulaznim vratima, te po potrebi pokrene opći imunosni odgovor organizma na antigen. Logičan slijed događaja je smanjenje središnje uloge timusa i Fabricijeve burze nakon periferizacije i uspostave „samostalnih“ perifernih imunoloških središta diljem organizma. Kao posljedica toga dolazi do postupne involucije i potpunog nestanka timusa i Fabricijeve burze u odraslih jedinki. Limfoidne stanice naseljavaju i organe koji primarno nisu dio imunološkog sustava (bubrezi, jajnici, štitnjača, jetra, hipofiza, gušterača), a u neposrednoj blizini limfatičnih stanica nalaze se tkivni makrofagi. Time je čitav organizam pokriven isprepletenom mrežom sastavnica imunosnog odgovora (SHARMA i RAUTENSCHLEIN, 2013.).

2.2.3. Imunosne stanice

2.2.3.1. Stanice urođene imunosti

Prirodno ubilačke (engl. *natural killer*, NK) stanice, makrofagi i heterofili su stanice nespecifičnog djelovanja koje sudjeluju u urođenom i stečenom imunosnom odgovoru (KAISER, 2010.; SHARMA i RAUTENSCHLEIN, 2013.). Na svojoj površini ili u citoplazmi ističu receptore (engl. *pathogen recognition receptors*, PRR) kojima prepoznaju specifične evolucijski očuvane molekularne obrasce svojstvene patogenima

(eng. *pathogen associated patterns,* PAMPs), poput nukleinskih kiselina i glikoproteina virusa ili lipopolisaharida bakterija (KAISER, 2010.).

NK stanice su ne-limfoidne, ne makrofagne citolitičke stanice koje sudjeluju u lizi virusom inficiranih i tumorskih stanica. Prisutne su u slezeni, perifernom krvnom optoku, timusu, burzi i crijevnom epitelu. Na osnovu spoznaja o imunosnom sustavu sisavaca može se pretpostaviti da navedena populacija imunosnih stanica potječe od dijela imunosnog sustava neovisnog o timusu. Prema TIZARDU (2013.), NK stanice vjerojatno potječu od istih hematopoetskih matičnih stanica kao i T-limfociti, ali nisu prošle proces sazrijevanja u timusu pa ne posjeduju receptore za antigene. Međutim, NK stanice posjeduju receptore za površinske stanične molekule koje ističu normalne, zdrave stanice, a nedostatak ili promjena konfiguracije istih na inficiranim ili tumorskim stanicama pokreće signal u NK stanicama za citotoksično uništenje (ERF, 2004.; TIZARD, 2013.).

Makrofagi pripadaju populaciji stanica mononuklearnog fagocitnog sustava. U ptica također razlikujemo pokretne (monociti u krvi) i sesilne tkivne (Kupferove stanice jetre, epitelne stanice seroza, mikroglija u CNS-u, histiociti, epiteloidne i divovske stanice) makrofage. Makrofagi su tkivni oblik krvnih monocita koji započinju diferencijaciju u koštanoj srži (QURESHI i sur., 2000.). Trombociti ptica također posjeduju sposobnost fagocitoze (RIES i sur., 1984.; St. PAUL i sur., 2012.).

Heterofili su polimorfonuklearni granulociti ptica koji se smatraju ekvivalentnim neutrofilima sisavaca jer vrlo učinkovito fagocitiraju strane tvari i ubijaju prvenstveno bakterije. U granulama sadrže različite enzime (proteaze, peroksidaze, hidrolaze), lizozim i laktoferin. Poslije eritrocita, druge su najbrojnije stanice u krvi ptica (MAXWELL i ROBERTSON, 1998.). Heterofili su izvršne stanice humoralnog imunosnog odgovora i čini se glavne izvršne stanice u okviru reakciju stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima (engl. *antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) i prirodne citotoksičnosti (SHARMA i RAUTENSCHLEIN, 2013.). Brzo odgovaraju na kemotaktične podražaje i često su prve stanice koje se nađu na mjestu upale. Međutim, oni nakon fagocitoze bakterija i oštećenih stanice, ne pripremaju niti predočavaju antigene stanicama stečenog imunosnog odgovora. Osim kemotaktičnog podražaja, porast udjela heterofila može biti uzrokovan fiziološkim stresom ili upalnom reakcijom (MAXWELL i ROBERTSON, 1998.). Kao pokazatelj stresa, najčešće se koristi omjer broja ili udjela heterofila i limfocita (H/L) u krvi (GROSS i SIEGEL, 1983.).

Bazofili se rijetko nađu u krvi ptica. Prema GERLACH (1994.) su istovjetni vezivno-tkivnim mastocitima i potiču upalnu reakciju oslobađanjem vazoaktivnih amina, proteina, prostaglandina i čimbenika koagulacije iz svojih granula. Oslobođene molekule dovode do širenja krvnih žila, pojačane propusnosti kapilara, a kemotaktične tvari privlače heterofile na mjesto upale.

Eozinofilni leukociti u sisavaca imaju važnu ulogu u nametničkim invazijama i u reakcijama preosjetljivosti, no čini se da u ptica nema funkcionalnih eozinofila (KAISER, 2010.).

Patološka stanja u organizmu uzrokuju promjene u broju krvnih stanica i biokemijskom sastavu krvi. Tablica 6. prikazuje srednje vrijednosti za hematološke pokazatelje u zdrave kokoši, međutim te vrijednosti se razlikuju s obzirom na dob, spol, pasminu (ABDI-HACHESOO i sur., 2011.), ali i sezonu (ALBOKHADAIN, 2012.).

Tablica 6. Hematološki pokazatelji u zdrave kokoši (preuzeto iz: NAGLIĆ i HAJSIG, 1993.).

Hematološki pokazatelj	Raspon vrijednosti
Eritrociti (10^{12}/L)	2,5-4
Leukociti (10^{9}/L)	20-30
Heterofili (%)	25-30
Limfociti (%)	55-60
Monociti (%)	10 (9,1-13)
Eozinifili (%)	3-8
Bazofili (%)	rijetko (1-4)

2.2.3.2. Stanice stečene imunosti

2.2.3.2.1. B-limfociti i protutijela

B-limfociti potječu iz limfoidnih folikula Fabricijeve burze gdje hematopetske matične stanice prolaze proces konverzije gena kojim nastaju višestruke stanice-kćeri, svaka sposobna prepoznati njoj svojstveni antigen putem površinskih imunoglobulinskih receptora (engl. *B cell receptor*, BCR). Pretpostavlja se da postoji 10^9 antigen-specifičnih BCR receptora tj. B-limfocita. B-limfociti nakon prepoznavanja antigena, i uz pomoć T-limfocita, sazrijevaju, proliferiraju i diferenciraju u konačne izvršne oblike, plazma stanice ili prisjetne stanice. Ova dva oblika B-limfocita će sintetizirati i izlučivati

protutijela sposobna aglutinirati ili neutralizirati antigen i osnova su humoralne imunosti (SHARMA i RAUTENSCHLEIN, 2013.).

Protutijela su osnovne funkcionalne jedinice humoralne imunosti. Njih izlučuju izvršni oblici B-limfocita tj. plazma stanice. Kao površinske molekule na B- limfocitima imunoglobulini su dio receptora za antigen (BCR), a kao topljivi oblik nakon sekrecije nalazimo ih kao slobodna humoralna protutijela u tjelesnim tekućinama i krvi. U ptica su dokazana tri razreda ili izotipa imunoglobulina: imunoglobulin M (IgM), IgY (IgG) i IgA. IgM se prvi izlučuju nakon cijepljenja, nalazimo ih u serumu, kao i na površini B-limfocita, a funkcija im je vezati i aktivirati sustav komplementa. IgY protutijela analogna su IgG protutijelima sisavaca, a izlučuju se nakon sinteze IgM. Nalazimo ih u serumu, i u žumanjku jajeta kao materalna protutijela. Sudjeluju u prisjetnom odgovoru vežući antigen, aktivirajući fagocite i sustav komplementa**.** IgA protutijela se konstantno sintetiziraju, najviše na površini sluznica odakle se izlučuju u krv, žuč, slinu, suze i sluz. Zaslužni su za imunost sluznica tako što neutraliziraju viruse i mikrobne toksine, te sprječavaju prianjanje i kolonizaciju patogenih mikroorganizama (SHARMA i RAUTENSCHLEIN, 2013.).

2.2.3.2.2.T-limfociti

Pileći T-limfociti su biološki i fenotipski heterogena populacija limfocita. Kao antigen-specifične stanice uključene su u stanični imunosni odgovor i sposobne prepoznati široki raspon patogena prepoznavanjem epitopa predočenih u okviru glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex,* MHC, odnosno B-complex u kokoši) na antigen-predočnoj stanici (engl. *antigen presenting cells*, APC). MHC su transmembranski heterodimerni glikoproteini iz superporodice imunoglobulina. Vanstanični dio molekule čine dvije N- terminalne domene koje prepoznaju i vežu epitop i dvije konstantne domene koje vežu analogne ko-receptore na T-limfocitima. MHC I molekule (B-F) su prisutne na svim stanicama i izražavaju peptide sintetizirane u stanici, bilo stanične ili virusne. MHC II molekule (B-L) s obrađenim egzogenim antigenima (poput bakterija) ističu samo APC (ZEKARIAS i sur., 2002.).

Brojne subpopulacije T-limfocita su identificirane u kokoši (PFOHL i sur., 1997). Svaka od subpopulacija ističe jedinstvene stanične površinske antigene (biljege) (engl. *cluster of differentiation,* CD) koji se mogu identificirati primjenom monoklonskih

protutijela (ERF i sur.,1998.; BALENOVIĆ i sur., 2007.; FAIR i sur., 2008.). Te stanične površinske bjelančevine najčešće su receptori (za antigene epitope, citokine, imunoglobuline ili druge stanice), neke služe u provođenju signala ili imaju fiziološke funkcije (enzimi, transportni proteini) (TIZARD, 2013.).

Svi T-limfociti ptica izražavaju površinski T stanični receptor (engl. *T cell receptor*, TCR) kojim prepoznaju antigene epitope u okviru MHC na APC. Kao i TCR sisavaca, TCR ptica se pojavljuje u dva tipa TCR (TCRαβ ili TCRγδ), ali s većim udjelom γδ – limfocita nego kod miša ili čovjeka, čak do 30%–50% cirkulirajućih limfocita (PIEPER i sur., 2008). Oba tipa TCR-a su transmembranski heterodimeri koje čine dva polipeptidna lanca: α i β lanac, odnosno γ i δ, koji su dodatno stabilizirani u kompleksu s CD3 molekulom, zajedničkom svim T – limfocitima. Raznolikost TCR molekula postiže se prerazmještajem pojedinih V, D, J segmenata iz višestrukih polimorfonih kopija gena. Pileći TCR β lokus razlikuje se od istog u sisavaca i sadrži dvije Vβ familije gena: Vβ1 i Vβ2, te tako postoje TCRαβ 1(klon TCR 2) i TCRαβ 2 (klon TCR 3) (SHARMA i RAUTENSCHLEIN, 2013.). Samo TCR dio kompleksa TCR-CD3 se veže s epitiopom, dok CD3 molekula, građena od složenog sklopa bjelančevina, provodi signal o međudjelovanju antigena i TCR u stanicu i aktivira T-limfocit (TIZARD, 2013.).

Ovisno o izražaju površinskih biljega CD4 i CD8, T-limfociti se mogu grupirati u dvije funkcionalno različite podskupine. CD4 molekulu izražavaju pomoćnički T-limfociti (engl. *helper T lymphocytes*, Th), za razliku od CD8 koja je površinski stanični biljeg za citotoksične T-limfocite (engl. *cytotoxic T lymphocytes*, Tc). Postoje značajne razlike između vrsta ptica, ali i MHC- haplotipova kokoši u udjelu cirkulirajućih Th- i Tc-limfocita (DALGAARD i sur., 2010), a s tim u svezi je i otpornost, odnosno prijemljivost za neke bolesti (npr. Marekova bolest). Dvostruko pozitivne $CD4^+CD8^+$ stanice najčešće se nađu u timusu i predstavljaju nezrele oblike T-limfocita, ali je moguć i njihov nalaz u periferiji (ERF i sur., 1994.). $CD4^+$ limfociti koji istodobno ističu i CD25 nazivaju se regulatornim T – limfocitima ($CD4^+CD25^+$; engl. *regulatory T cells*, Tregs). Treg limfociti zaustavljaju imunosnu reakciju, a svaka smetnja ili nedostatak u njihovoj funkciji može dovesti do razvoja autoimunih bolesti i drugih upalnih poremećaja (SHANMUGASUNDARAM i SELVARAJ, 2012.).

Pomoćnički Th-limfociti. Th-limfociti ($CD4^+$ limfociti) specifično prepoznaju epitope u sklopu MHC II (B-L u kokoši) i drugih kostimulirajućih molekula (citokini).

Th-limfocit se aktivira nakon što površinski TCR veže specifičn epitop u sklopu MHC II molekule na površini APC. Nakon aktivacije, Th-limfociti proliferiraju i započinju imunosni odgovor specifično usmjeren prema antigenu (KAISER, 2010.). Kao u sisavaca, istraživanja u pilića dokazala su da antigenom izazvana aktivacija imunosno naivnih Th0-limfocita potiče njihovu diferencijaciju u dva tipa izvršnih Th- limfocita: Th1 i Th2 (DEGEN i sur., 2005.a). Priroda antigena određuje u koji tip će se Th-limfociti diferencirati, a posredovana je topivim bjelančevinama tzv. citokinima. Unutarstanični patogeni (virusi, bakterije, protozoe) koji se nagomilavaju u makrofagima, dendritičnim i drugim APC stanicama potiču diferencijaciju Th1-limfocita, a izvanstanični patogeni potiču diferencijaciju Th2-limfocita. Slijedom zbivanja, izvršni Th1- limfociti potiču proliferaciju Tc-limfocita, aktiviraju makrofage i pojačavaju njihovo mikrobicidno djelovanje. Glavna funkcija izvršnih Th2 – limfocita je pomoći B – limfocitima da sintetiziraju antigen-specifične imunoglobuline različitih izotipova.

Citotoksični T-limfociti. Većina Tc-limfocita ističe CD8 površinske biljege. Manji dio $CD4^+$ T – limfocita u sisavaca može djelovati citotoksično, iako u ptica takvi Th-limfociti nisu pronađeni. Tc-limfociti prepoznaju endogene antigene u sklopu MHC I (ERF, 2004.). Jedna od najvažnijih funkcija Tc-limfocita jest uklanjanje virusom inficiranih stanica. S obzirom da većina stanica s jezgrom ističe MHC I molekule na površini, virusna infekcija bilo koje stanice može potencijalno dovesti do prepoznavanja i lize stanice od strane Tc-limfocita. Dokazano je da citotoksična aktivnost Tc-limfocita regulira patogenezu virusnih i tumorskih bolesti ptica (JEURISSEN i sur., 2000.).

2.2.4. Imunosni odgovor na zaražavanje patogenim mikroorganizmima

Imunosni odgovor na infekciju nastupa nakon prodora patogena u organizam i uključuje složeno međudjelovanje između različitih populacija i subpopulacija imunosnih stanica, usklađenih djelovanjem različitih topivih molekula (citokina). Imunokompetentan (ili imunoreaktivan) organizam na dodir s antigenom odgovara fagocitima, T- i B-limfocitima i NK stanicama.

Na ulaznim vratima aktiviraju se mehanizmi urođene imunosti, prije svega fagocitoza i citolitičko uništavanje zaraženih stanica (NK stanice). Pri fagocitozi patogena ili strane tvari antigeni se razgrade u manje peptide (antigenske determinante ili epitopi) unutar proteolitičkog kompleksa, tzv. proteosoma. Mali peptidi, građeni obično od 7 do

13 ak se nakon toga prenose do endoplasmatskog retikuluma gdje se vežu s MHC I. Kompleks peptid-MHC I se prenosi na površinu stanice u cilju prepoznavanja od strane antigen-specifičnih Tc-limfocita.

NK stanice prepoznaju stanice izmijenjenih karakteristika stanične površine (npr. nedostatak MHC kao rezultat prethodne virusne infekcije) kao „ne-svojstvene“ tj. tuđe i uništavaju ih. Uz to, one upotpunjuju i završavaju ADCC (KAISER, 2010.).

Nakon prezentacije antigena od strane APC i njegova vezanja za receptore na T- i B-limfocitima, pokreću se transmembranski signali koji posljedično dovode do njihove proliferacije i diferencijacije u izvršne ili prisjetne stanice. Prisjetne stanice posjeduju imunosno pamćenje, tj. pri ponovnom susretu s istim antigenom prisjećaju se konfiguracije antigena iz prethodnog dodira, te u vrlo kratkom vremenu odgovaraju jačom imunosnom reakcijom. Ta reakcija, koju karakterizira tzv. „booster učinak“, se još naziva „anamnestička imunosna reakcija“. Sposobnost pamćenja u okviru stečenog imunosnog odgovora od praktičnog je značaja za primijenjenu imunologiju, budući je temelj za primjenu cjepiva u imunoprofilaksi peradi (ERF, 2004.; PEI i sur., 2003.).

Osim diferencijacije u prisjetne stanice, T-limfociti istovremeno diferenciraju u izvršne T- limfocite, a B-limfociti u plazma stanice koje proizvode i izlučuju protutijela. Plazma stanice su sposobne proizvesti oko 2000 molekula protutijela u sekundi. Humoralni imunosni odgovor *in vivo* poliklonalnog je karaktera što znači da različite antigene determinante jednog antigena aktiviraju različite B limfocite (klonove) pa nastale raznovrsne plazma stanice proizvode širok spektar specifičnih protutijela.

Humoralni imunosni odgovor zasniva se na vezanju protutijela s površinskim bjelančevinama bakterija, parazita i virusa. Nakon interakcije s antigenom, protutijelo pokreće ili pojačava imunosne mehanizme kojima pomaže uklanjanje patogena. Te mehanizme čine: (1) klasični put aktivacije sustava komplementa usmjerenog protiv antigena; (2) priprema antigena, putem opsonizacije, aglutinacije ili precipitacije, za fagocitozu; (3) neutralizacija antigena i time sprječavanje prodora u stanicu (4) vežući se za površinske antigene na inficiranim stanica, potiču citotoksične stanice na uklanjanje zaraženih ili tumorskih stanica u ADCC (ERF, 2004.).

Stanična imunost posredovana je citotoksičnim T-limfocitima. Primjeri staničnog imunosnog odgovora su: (1) aktivacija makrofaga; (2) liza stanica posredovana Tc-limfocitima i NK- stanicama, a sve to usmjeravano citokinima koje otpuštaju pomoćnički T-limfociti ili druge stanice.

Obje grane, humoralna i stanična, imunosnog odgovora međusobno blisko surađuju što se usklađuje topivim molekulama (citokini i kemokini). Prevladavanje humoralnog ili staničnog imunosnog odgovora ovisi o uzročniku infekcije, a određuje ga tip pomoćničkih T-limfocita (DEGEN i sur., 2005.a). Humoralni imunosni odgovor je uglavnom usmjeren na izvanstaničnu fazu bakterijske i virusne infekcije, a stanični prema gljivicama, parazitima, unutarstaničnoj fazi virusnih infekcija, tumorskim stanicama i presađenom tkivu (DEGEN i sur., 2005.a; KEISER, 2010.; SHARMA i RAUTENSCHLEIN, 2013.).

2.2.5. Citokini

Citokini su male, biološki aktivne molekule, nalčešće bječančevine, koje izlučuju brojne stanice. Imaju brojne funkcije jedna od kojih kontrola i koordinacija međudjelovanja imunosnih stanica tijekom imunosnog odgovora, ali i njihove diferencijacije i homeostaze (KAISER, 2010.). Također su i ključni stimulatori početka i održavanja imunosnog odgovora te igraju ulogu izvršnih molekula koje utječu na njegovo trajanje i jačinu (WIGLEY i KAISER, 2003.).

Citokini se vežu na specifične receptore na ciljnoj stanici i usmjeravaju imunosni odgovor prijenosom signala među stanicama. Njihov učinak je sistemski, endokrini ili lokalni, autokrini i parakrini pa ih zovu lokalnim hormonima (BALENOVIĆ, 2008.). Citokin vezan za receptor i druge membranske molekule često zajedno potiču izvršnu funkciju u ciljnoj stanici. T– limfociti, B – limfociti, makrofagi i dendritične stanice izlučuju citokine.

Citokini koje izlučuju Th- limfociti imaju osobito ključnu ulogu u oblikovanju imunosnog odgovora. Th1 – limfociti, koji potiču stanični imunosni odgovor, većinom sintetiziraju interferon gama (IFN-γ) koji aktivira makrofage i pojačava uništavanje unutarstaničnih patogena (virusi, protozoe). Ostali važni citokini koje izlučuju Th1-limfociti su interleukin – 2 (IL-2) i čimbenik tumorske nekroze alfa (engl. *tumor necrosis factor-α*, TNF-α). IL-2 je ključan za proliferaciju imunosnih stanica: naivnih Th0-, Th1- i

Th2- limfocita, Tc-limfocita, NK stanica i B – limfocita. Aktivnost Th1 – limfocita i lučenje citokina potiču IL-12 i IL-18, koje sintetiziraju i luče makrofagi, dendritične stanice i B – limfociti (KAISER, 2010.; SHARMA i RAUTENSCHLEIN, 2013.). Citokini koje luče Th2 – limfociti, a potiču aktivaciju B – limfocita, su IL-4, IL- 13 i IL-19, a izlučuju se kod infekcija uglavnom vanstaničnih patogena (DEGEN et al, 2005.a; KAISRER, 2010.).

Geni koji kodiraju za većinu glavnih ptičjih citokina i njihovih receptora uspješno su klonirani i sekvencirani, a dostupni su i brojni rekombinanti citokini za primijenu u terapiji te kao adjuvansi u cjepivima. Biološka aktivnost ptičjih citokina je uglavnom prilično nalik njihovim homolozima u sisavaca, iako ptičji citokini pokazuju slabu unakrižnu reakciju među vrstama (KAISER i STÄHELI, 2014.).

Važnu ulogu u imunosnoj reakciji na virusne antigene, kao što je spomenuto, imaju interferoni (IFN) koji, pored antivirusnog djelovanja, posreduju među stanicama u imunosnoj reakciji. Dijele se na IFN tip I (IFN-α, –β) i IFN tip II (IFN- γ).

2.2.5.1. Interferon-α

IFN-α pripada skupini IFN tip I koje luče sve stanice s jezgrom. Ima dominantni antivirusni učinak i pojačava ispoljavanje MHC I molekula (WIGLEY i KAISER, 2003.). Aktivira niz antivirusnih mehanizama poput enzima oligoadenilat sintetaze (OAS), koja aktivira endonukleaze koje razgrade virusni genom, proteinkinazu R (PKR), koja inhibira virusnu transkripciju i translaciju te citoplazmatske Mx proteine, koji također djeluju antivirusno. Potiče ispoljavanje MHC I molekula u sklopu kojih ispoljeni virusni antigeni označavaju virusom zaraženu stanicu i pretvaraju je u metu za Tc-limfocite. Također IFN-α može aktivirati makrofage i NK stanice, te djelovati na neoplastične stanice usporavajući stanični ciklus, djelujući na ispoljavanje onkogena i diferencijaciju samih neoplastičnih stanica (KAISER, 20210.).

2.2.5.2. Interferon-γ

IFN- γ kao tzv. imunosni interferon ima važnu ulogu u aktivaciji makrofaga i modulaciji imunosne reakcije uz antivirusnu aktivnost. Primarno ga proizvode T limfociti i NK stanice čime dovode do antimikrobne aktivacije makrofaga, potičući obradu antigena i ispoljavanje MHC II u makrofagima i drugim stanicama. Također sudjeluje u

promjeni klasa (engl. *„class switch“*) prilikom tvorbe imunoglobulina (WIGLEY i KAISER, 2003.). Pokazalo se da IFN-γ uz IL-2 ima važnu ulogu u Th1 tipu imunosnog odgovora koji je osnova razvoja stanične imunosti.

2.2.6. Imunost protiv newcastleske bolesti

Kokoši koje prežive infekciju VNB-om razvijaju dugotrajnu zaštitu. Temelj nastale zaštite su serumska i sekretorna (sIgA) protutijela, kao nosioci humoralne i imunosti sluznica, te stanice urođenog (NK stanice, heterofili, makrofagi, dendritične stanice) i stečenog (T-limfociti i neutralizacijska protutijela) imunosnog odgovora čije se djelovanje međusobno nadopunjuje.

Većinu spoznaja o imunoreaktivnosti prema VNB-u možemo zahvaliti ispitivanjima učinkovitosti imunosti potaknute cijepljenjem da perad zaštiti nakon izazivačkog zaražavanja virulentnim sojevima VNB-a (SAWANT i sur., 2011.).

Aktivna imunost. Početni imunosni odgovor aktivira se u sluznicama dišnog ili probavnog sustava na mjestu prodora VNB-a. Karakterizira ga infiltracija epitela limfocitima, makrofagima i heterofilima (AL-GARIB i sur., 2003.). Već 6 sati nakon izlaganja vVNB-u, ali ne i lentogenim VNB-ima, splenociti proizvode IFN-α i IFN-β, interleukin 6 (IL-6) (RUE i sur., 2011.; KAPCZYNSKI i sur., 2013.), a raste i razina IFN-γ u punoj krvi (BALENOVIĆ, 2008.). Dan nakon infekcije NK stanice počinju lučiti IFN-γ, koji aktivira makrofage i potiče stanični imunosni odgovor (DEGEN i sur., 2005.a). Imunosni odgovor kokoši na VNB prvi i drugi dan nakon infekcije, analiziran putem mikroarraya cjelokupnog kokošjeg genoma, pokazuje indukciju interferona tipa I i II, citokina, kemokina i inducibilne sintetaze dušičnog oksida (iNOS) (AHMED i sur., 2007.; RUE i sur., 2011.). Nakon infekcije, pileći zametni fibroblasti sintetiziraju IFN-α, te malo do ništa IFN-β (HELLER i sur., 1997.; AL-GARIB i sur., 2003.). Urođeni imunosni odgovor sam nije dostatan da osigura opstanak domaćina nakon izlaganja vVNB-u. Aktivnost NK stanica, koje su u stanju uništiti virusom zaražene stanice, poboljšava se s dobi kokoši i to bi moglo dati objašnjenje za smanjenu osjetljivost odraslih ptica prema NB-i (MILLER i KOCH, 2013.).

Nakon što virus nadiđe urođeni imunosni odgovor, pokreću se stanični (REYNOLDS i MARAQA, 2000.a; LAMBRECHT i sur., 2004.) i humoralni odgovor. Dolazi do diferencijacije T-limfocita u timusu, a nastale stanice sposobne su brzo

proliferirati nakon ponovnog izlaganja antigenu. Nastala stanična imunost može se mjeriti proliferacijom limfocita ili proizvodnjom citokina nakon *in vitro* poticaja antigenom (LAMBRECHT i sur., 2004.).

Nakon dvokratnog zaražavanja kokoši s virusom NB-a, u slezeni se mogu identificirati specifični Tc-limfociti. Stanična imunost potaknuta staničnim odgovorom tipa 1 (Th1-limfociti), koju karakterizira proizvodnja IFN-γ od strane makrofaga, može se otkriti dva do tri dana nakon imunizacije živim cjepivom protiv NB-a, čime odašilje poticajne signale za razvoj humoralnog odgovora. Istodobno makrofagi potiču proizvodnju dušičnog oksida (NO), a količina proizvedenog NO je povišena u ptica s višim titrom protutijela, ukazujući na međudjelovanje stanične i humoralne imunosti (JEURISSEN i sur., 2000.). Poput urođene imunosti, niti stanična imunost nije dostatna da samostalno osigura opstanak domaćina nakon izlaganja vVNB-u (REYNOLDS i MARAQA, 2000.a). Međutim, znatna sinteza IFN-γ, koja prati replikaciju vVNB-a, zaslužna je za značajno smanjenje pomora i umjereno smanjenje pobola, čime dokazuje ulogu stanične imunosti u otpornosti prema NB-u (SUSTA i sur., 2013.).

Nakon izlaganja VNB-u, B-limfociti se diferenciraju u plazma stanice koje luče sva tri izotipa neutralizacijskih protutijela specifičnih za antigen (LAMBRECHT i sur., 2004.). Stvorena neutralizacijska protutijela za HN i/ili F glikoprotein vežu se za NB virion i sprječavaju njegovo vezanje za stanice domaćina, što smanjuje replikaciju virusa (TAYLOR i sur., 1990; LOKE i sur., 2005.) pa su sposobna zaštititi pticu od pobola i uginuća nakon zaraze vVNB-om (REYNOLDS i MARAQA, 2000.b; SAWANT i sur., 2011.). IgM su prva protutijela koja se mogu dokazati već 4 dana nakon cijepljenja, a nakon 7 dana i IgY i IgA protutijela, važna za lokalnu imunost Harderove žlijezde i cekalnih tonzila (AL-GARIB i sur., 2003.). Sedam dana nakon infekcije ili cijepljenja slezena sadrži 56% IgM, 37% IgY i 7% IgA protutijela (JEURISSON i sur., 2000.). Nastala protutijela dosežu najvišu razinu trećeg ili četvrtog tjedna nakon cijepljenja.

Primjena živih cjepiva dišnim putem (raspršivanje, okulonazalno, nebulizacijom) potiče stvaranje protutijela u svim sekretima i serumu. Za lokalnu imunost sluznica dišnog i probavnog trakta zaslužni su sIgA i IgY protutijela. Lokalna imunost procjenjuje se količinom stvorenih antigen-specifičnih IgA protutijela u suzama, ispirku dušnika i žuči nakon intranazalne ili intraokularne primjene živog cjepiva protiv NB (AL-GARIB i sur., 2003.). Lokalna imunost tj. stvorena sIgA protutijela bitna su za neutralizaciju

slobodnih viriona NB u dišnom i probavnom traktu (AL-GARIB i sur., 2003.; PEROZO i sur., 2008.).

Pasivna imunost. Materalna protutijela (MPt) omogućuju zaštitu piletu, ovisno o prenesenom titru protutijela, te dozi i viruleciji virusa kojem je pile izloženo. Ako su prisutna u vrijeme cijepljenja sa živim VNB cjepivom, Mpt mogu neutralizirati cjepni virus, a time i poticajni učinak cjepiva na imunosni odgovor (RAUW i sur., 2009.). Razina protutijela u jednodnevnih pilića izravno je ovisna o titru u kokoši. Količina materalnih protutijela smanjuje se, ovisno o pasmini, prosječno za polovicu svakih 4-5 dana. Mpt se u brojlera mogu dokazati obično do 14 dana starosti.

Okolišni čimbenici, hranidba, stres, bakterijske superinfekcije i imunosupresivni virusi mogu uzrokovati imunosupresiju. Ako je Fabricijeva burza atrofirala zbog djelovanja virusa zarazne bolesti burze, imunosni odgovor prema bilo kojem primijenjenom cjepivu bit će smanjen (MUELMANS, 1988.). Također, zaraza virusom NB-a može djelovati imunosupresivno i spriječiti adekvatan imunosni odgovor na druga istodobno primijenjena cjepiva, primjerice na cjepivo za ZBB.

Neki VNB izolati tvore V protein koji sprječava sintezu IFN u zaraženoj stanici te tako učinkovito smanjuje intenzitet početnog urođenog i staničnog imunosnog odgovora na infekciju (MEBATSION i sur., 2001.; STEWARD i sur., 1993.).

2.2.7. Određivanje staničnog imunosnog odgovora

2.2.7.1. Određivanje fenotipskih i funkcionalnih svojstava subpopulacija leukocita i limfocita iz krvi i limfatičnih organa

Za određivanje ukupnog broja, ali i pojedinih subpopulacija limfocita u perifernoj krvi pilića kao primjerena metoda pokazala se protočna citometrija (FAIR i sur., 2008.; DALGAARD i sur., 2010; POPOVIĆ i sur., 2010.). Funkcionalna sposobnost imunosnih stanica procjenjuje se testom proliferacije limfocita kao odgovor na poticaj antigenom (specifična) ili mitogenom (nespecifična), testom degranulacije heterofila i proizvodnje reaktivnih spojeva kisika (NO), te proizvodnjom citokina i kemokina koji sudjeluju u urođenom, te stečenom Th1 i Th2 imunom odzivu (DALGAARD i sur., 2010.).

Klasični imunološki testovi za mjerenje staničnog imunosnog odgovora su dugotrajni i zahtjevni, što dodatno ograničava njihovu uporabu u istraživačke svrhe. Ispitivanja staničnog ili humoralnog imunosnog odgovora najčešće se vrše sprječavanjem diobe i sazrijevanja T- ili B-limfocita nakon što su kirurški uklonjeni timus ili burza.

Nove molekularne metode se primjenjuju za daljnje razumijevanje ptičjeg imunološkog sustava i razvoj potencijalnih dijagnostičkih testova. Monoklonska protutijela su razvijena za prepoznavanje i razlikovanje populacija ptičjih stanica (KAISER, 2010.) i danas se koriste za ispitivanje uloge različitih vrsta stanica u različitim organima i tkivima ptice (DALGAARD i sur., 2010.). Također su izolirani i klonirani citokini važni za funkciju T-limfocita, dostupni su i rekombinantni citokini za detekciju, određivanje količine i neutralizaciju proizvodnje citokina (ERF, 2004.; KAISER i STÄHELI, 2014.). Primjena tvari koje induciraju staničnu diobu se koristi za *in vitro* ispitivanje proliferacije i diferencijacije limfoidnih stanica nakon izlaganja U tu svrhu se koriste mitogeni (konkanavalin A, Con A ili fitohemaglutinin, PHA) ili specifični antigen (KAPCZYNSKI, 2008.; DALGAARD i sur., 2010).

2.2.7.2. Određivanje količine citokina

Količinu citokina u perifernoj krvi i limfoidnim organima moguće je odrediti primjenom specifičnih protutijela i enzima (ELISA, ELISPOT) (ARIAANS i sur., 2008.) ili određivanjem ekspresije gena tj. količine gRNK citokina reverznom transkripcijom i lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (BALENOVIĆ i sur., 2011.; LIU i sur., 2012.; RUE i sur., 2011.). Imunoenzimski test (ELISA) je razvijen za otkrivanje pilećeg interferona nakon prisjetne stimulacije antigenom ili cijepljenja. Iako određivanje gRNK u stanicama znači ekspresiju gena, ali ne nužno i proizvodnju bioreaktivnog proteina (citokina ili kemokina), metoda se pokazala kao najosjetljivija trenutno dostupna metoda kojom se u kratkom vremenu može pretražiti veliki broj uzoraka (SWAGGERTY i sur., 2006.). Međutim, nađena je pozitivna korelacija između ekspresije gena i količine reaktivnog proteina za IFN-γ i IL-6 (KAPCZYNSKI i KOGUT, 2008.).

3. OBRAZLOŽENJE TEME

Newcastleska bolest, uz influencu ptica, gospodarski je najzančajnija virusna bolest domaće peradi. Bolest se u Hrvatskoj suzbija po zakonu, uz obvezno cijepljenje sve peradi i golubova u uzgoju. Čini se da je takva politika u Hrvatskoj uspješna u sprječavanju pojave bolesti jer su nakon enzootskog razdoblja (1979. do 1991. godine) zabilježene tek jedna epizootija u kokoši 1994. godine, te dva izdvojena slučaja pojave NB u golubova iz uzgoja 2009. i 2011. godine. Međutim, infekcije lentogenim sojevima, koje ne podliježu obveznoj prijavi, se sporadično sigurno pojavljuju, kao što je bio slučaj 1999. i 2000. godine.

Soj virusa NB ZG1999HDS izdvojen je tijekom povećanog pomora na farmi tovnih pilića u srpnju 1999. godine. Do sada je virusu dokazana pripadnost lentogenom patotipu, imunogenost i citolitička aktivnost. Zbog svojstava imunogenosti i citolitičnosti soj ZG1999HDS pogodan je kandidat za razvoj cjepiva.

Ovim istraživanjem želimo nadopuniti spoznaje o imunogenosti soja određivanjem poticaja staničnog imunosnog odgovora u muških pilića lakog hibrida i njegove usporedbe sa staničnim imunosnim odgovorom potaknutim cjepnim sojem La Sota.

Kao hipotezu, postavljamo pretpostavku da soj virusa NB ZG1999HDS jače potiče stanični imunosni odgovor u usporedbi s cjepnim sojem La Sota.

Ciljevi istraživanja:

- odrediti te međusobno usporediti stanične imunosne odgovore potaknute pokusnom infekcijom sojem ZG1999HDS virusa newcastleske bolesti ili komercijalno korištenim cjepnim sojem La Sota u muških pilića lake pasmine

- ocijeniti opravdanost soja ZG1999HDS kao potencijalnog kandidata za razvoj cjepiva protiv NB

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Pripravci korišteni u istraživanju

4.1.1. Terenski soj ZG1999HDS

Terenski soj virusa NB ZG1999HDS je izdvojen tijekom pomora tovnih pilića u srpnju 1999. godine na farmi u sjeverozapadnoj Hrvatskoj. Pri tom je pomor iznosio gotovo 77% jata. Zbog manjka anamnestičkih podataka, nije isključeno postojanje virusne ili bakterijske superinfekcije koja je, uz nepovoljne uvjete okoliša, mogla pogodovati utvrđenom pomoru pilića.

Soj ZG1999HDS je izdvojen iz pluća uginulih pilića na kokošjim SPF (slobodan od specifičnih patogena) zametcima. Početni pokazatelji patogenosti iznosili su: MDT 120 sati i hemaglutinacijski (HA) titar 1:64 (1: 2^6). Pasažom na kokošjim SPF zametcima dobivena je virusna alantoisna tekućina (VAT) i liofilzirana. Određen HA titar za VAT iznosio je 1:256 (1: 2^8), a za potrebe određivanja slijeda nukleotida u genomu, uzorak suspenzije virusa dobiven umnažanjem liofiliziranog pripravka VAT na kokošjim SPF zametcima iznosio je 1:512 (1: 2^9). Suspenzija liofiliziranog pripravka sadrži titar virusa od $10^{6.5}$ EID_{50} u jednoj dozi (MAZIJA i sur., neobjavljeni podatci). Soj ZG1999HDS je lentogenih svojstava što je potvrđeno testovima *in vivo* (MAZIJA i sur., neobjavljeni podatci; STUPAR, 2012.) i genetskim analizama (RUNJIĆ, 2006.; NEDELJKOVIĆ, 2011.).

4.1.2. Cjepni La Sota soj VNB

Cjepni La Sota soj VNB-a podrijetla je iz komercijalnog živog liofiliziranog cjepiva PESTIKAL® La Sota SPF (Genera, Rakov potok, Hrvatska), koje je u širokoj primjeni u Republici Hrvatskoj, ali i na inozemnim tržištima

Cjepivo sadrži atenuirani živi soj La Sota VNB-a, uzgojen na SPF kokošjim zametcima i proizveden u skladu s GMP (dobra upravljačka praksa) zahtjevima. Jedna doza cjepiva sadrži virus u titru > $10^{6.0}$ EID_{50}, a dodan mu je i PPGF stabilizator, koji omogućuje dugotrajnu stabilnost bez posljedica na imunogenost cjepiva, čak i nakon dužeg izlaganja temperaturi od 37°C. Može se primijeniti za primovakcinaciju jednodnevnih pilića, a posebice u dugoživuće peradi (roditelji i nesilice), uz docjepljivanje inaktiviranim cjepivom, osigurava solidnu imunost. Ipak, preporuča ga se dati nakon živog cjepiva koje sadrži Hitchner B1 soj VNB-a, zbog cjepne reakcije koju soj La Sota može izazvati u jednodnevnih pilića.

4.2. Određivanje podudarnosti primijenjenih sojeva VNB

Obzirom na dosadašnje spoznaje o primijenjenim sojevima VNB-a, preliminarno je istražena njihova podudarnost uspoređivanjem nukleotidnih slijedova u varijabilnom dijelu F gena, kao i izvedenih slijedova aminokiselina.

Određen je slijed nukletida korištenog cjepnog soja La Sota (PESTIKAL® La Sota SPF, Genera, Hrvatska, kontrolni broj: 5034092, rok trajanja: 09/14) dužine 964 parova baza (eng. *base pairs*, bp) koji obuhvaća završni dio M gena i početni dio F gena (541 bp od 1792 bp) (SAVIĆ, neobjavljeni podatci, 2014.). Navedenu sekvencu sravnali smo primjenom metode Clustal W u računalnom programu BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999.) sa sekvencom genoma soja ZG1999HDS (NEDELJKOVIĆ, 2011.) i izolatima cjepnih sojeva (SAVIĆ, 2003.). Sravnate sekvence smo usporedili u području varijabilnog dijela F gena (374 bp) na osnovu određivanja matrice podudarnosti slijeda nukleotida, kao i izvedenih slijedova aminokiselina (% istovjetnih), te broja nukleotida i broja aminokiselina u kojima se razlikuju, u istom računalnom programu. Sojeve primijenjene u istraživanju dodatno smo usporedili i u čitavoj dužini dostupnih nukleotidnih slijedova (964 bp), te u početnom dijelu F gena (541bp).

4. 3. Plan pokusa

Pokus je proveden na ukupno 150 muških pilića komercijalnog hibrida nesilica TETRA-SL LL („long life“) (Bábolna Tetra Ltd-, Bábolna, Mađarska). Jednodnevni pilići su nabavljeni iz valionice Valipile, Sesvetski Kraljevec, Hrvatska i useljeni u pokusne prostorije Zavoda za bolesti peradi s klinikom, Veterinarski fakultet, Zagreb. Tijekom istraživanja pilići su držani kavezno (20 pilića na 0,268 m^2 prvi dan, a potom 12 pilića nakon 21. dana) u istoj prostoriji do 28. dana, uz *ad libitum* pristup vodi i hrani (komercijalna krmna smjesa za pripadnu kategoriju peradi). Mikroklimatski uvjeti držanja tijekom istraživanja bili su usklađeni s naputcima proizvođača hibrida.

Svi postupci s pilićima u istraživanju bili su u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja (NN 135/2006), Zakonom o izmjenama i dopunama Zakona o zaštiti životinja (NN 037/2013), Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 055/2013), te Etičkom kodeksu Sveučilišta u Zagrebu, a na temelju Rješenja o odobrenju izvođenja pokusa na životinjama (Uprava veterinarstva, 7. veljače 2013. godine) i odluke Povjerenstva za etiku u veterinarstvu, Veterinarskog fakulteta u Zagrebu, potvrđene na

sjednici Fakultetskog vijeća 26. travnja 2012. godine te njenih izmjena i dopuna potvrđenih na sjednici Fakultetskog vijeća 16. travnja 2014. godine.

Nakon useljenja nasumično smo odabrali 10 pilića kojima smo izvadili krv iz vratne vene (*v. jugularis*) prvog dana, a zatim u tjednim razmacima. Iz uzoraka krvi izdvojili smo serum za određivanje titra specifičnih materalnih protutijela za VNB probom inhibicije hemaglutinacije (IHA) koji je poslužio za procjenu interferencije pasivne imunosti s primijenjenim virusima. Piliće u dobi od četiri tjedna raspodijelili smo u tri skupine (ZG, LS, K), po 50 jedinki i smjestili ih u kaveze u zasebne prostorije (Tablica 7.). Zdravstveno stanje pilića je praćeno inspekcijskom metodom prilikom svakodnevnog rukovanja, hranjenja i čišćenja, te prema potrebi i drugim metodama kliničke pretrage.

Tablica 7. Plan istraživanja - životinje i postupci.

Skupina	Broj pilića	Poticaj	Postupak	Uzorkovanje	
ZG	50	Suspenzija liofiliziranog soja VNB ZG1999HDS	**Imunizacija** Okulonazalno po 0,02 ml u lijevo oko i lijevu nosnicu	Puna krv u heparinu; Slezena 6,12,24 h i 2,3,5,7 i 14 dana nakon imunizacije	Krv za izdvajanje seruma za IHA probu svakih 7 dana
LS	50	Komercijalno živo cjepivo protiv NB PESTIKAL®La Sota SPF			
K	50	PBS			

4.3.1. Imunizacija pilića

Imunizacija pilića u pokusnim skupinama provedena je primjenom komercijalnog cjepiva protiv NB PESTIKAL® La Sota SPF u dozi > $10^{6.0}$ EID_{50}/ptici (LS skupina) ili suspenzijom liofiliziranog pripravka soja ZG1999HDS virusa NB u dozi ~$10^{5.5}$ EID_{50}/ptici (ZG skupina). Neposredno prije primjene suspenzija virusa i cjepivo otopljeni su u sterilnoj fiziološkoj otopini (Zavod za bolesti peradi s klinikom, Zagreb, Hrvatska). Pripravci virusa su primijenjeni okulonazalno (~0,02ml u lijevo oko i ~0,02 ml u lijevu nosnicu) čime se nastojalo imitirati prirodni put zaražavanja. Pilićima kontrolne skupine (K skupina) primijenjena je puferirana fiziološka otopina u istoj količini i na isti način.

4.3.2. Uzorkovanje tkiva i krvi

Uzorkovanje smo proveli šest, 12, 24 sata, te dva, tri, pet, sedam i 14 dana nakon imunizacije nasumičnim odabirom šest pilića po skupini koji su kasnije žrtvovani, te je dodatno od jednog pileta po skupini (ukupno sedam uzoraka/skupini) uzeta krv za hematološku pretragu, te sedmog i 14. dana od dodatna četiri pileta (ukupno 10 uzoraka/skupini) za izdvajanje seruma za IHA probu.

Uzorke pune krvi uz dodatak heparina (PLIVA d.d., Zagreb, Hrvatska) uzeli smo neposredno prije žrtvovanja životinja primjenom 80% mješavine CO_2, uz poštivanje svih propisanih mjera o zaštiti životinja u pokusu. Uzorke uzete prije imunizacije, tri, pet sedam i 14 dana nakon imunizacije smo koristili za određivanje hematoloških parametra (7 uzoraka, jedno pile nije žrtvovano) i protočnu citometriju (5 uzoraka).

Uzorcima heparinizirane pune krvi uzetih prije žrtvovanja životinja, te 6,12,24 sata i 2,3,5,7,14 dana poslije imunizacije (6 uzoraka) dodali smo u Cetavlon V (Genera d.d., Rakov Potok, Hrvatska) u omjeru 1: 5 i pohranili na 2 – 8 °C za molekulsku probu. Aktivna tvar u Cetavlonu V je kvarterni amonijski spoj cetrimid tj. mješavina tri-metil-tetradecil-amonij - bromida i manjih količina dodecil- i heksadeciltri-metil-amonij bromida. Dodatkom Cetavlona konzervirali smo ukupnu RNK uz istodobnu razgradnju elemenata krvnog ugruška.

Uzorci slezene uzeti su nakon žrtvovanja životinja. Do analize uzorci su bili pohranjeni pri -70°C.

Također, iz uzoraka krvi uzimanih u tjednim razmacima izdvojili smo serume za IHA probu i do analize ih pohranili u zamrzivač na -20°C.

4.4. Laboratorijske hematološke probe

4.4.1. Određivanje hematoloških pokazatelja

Ukupan broj leukocita, trombocita i eritrocita u uzorcima heparinizirane pune krvi pilića odredili smo brojanjem pod mikroskopom na hemocitometru (Neubauerova improved komorica, Hirschmann Laborgeraete GmbH, Njemačka) i izračunali prema ranije opisanom postupku (MITIN,1981.).

Diferencijalnu bijelu krvnu sliku odredili smo mikroskopiranjem krvnih razmaza obojenih metodom po Papenheimu, primjenom May Grünwald i Giemsa otopina (SVETINA, 1988.).

4.5. Određivanje humoralne imunosti

4.5.1. Određivanje titra antihemaglutinacijskih protutijela u serumu

Serološkom probom inhibicije hemaglutinacije (IHA) odredili smo prvotno titar materalnih antihemaglutinacijskih protutijela u serumima pilića, te procijenili rizik interferencije s virusima korištenim za imunizaciju pilića. Također, smo u serumima izdvojenim iz uzoraka krvi uzetih neposredno prije te sedam i 14 dana nakon imunizacije IHA probom odredili titar protutijela, a time i humoralni odziv pilića na primijenjene viruse.

Probu smo radili standardnim beta-postupkom (ALLAN i GOUGH, 1974.; ALEXANDAR, 1998.; ANONYMUS, 2012.), na mikrotitracijskim pločama od 96 jažica s U dnom, kako je propisano od službenih tijela (ANONYMUS, 1992.; ANONYMUS, 2007.; ANONYMUS, 2012.), uz razliku da smo kao antigen koristili VNB cjepni soj VG/GA (Avinew, Merial, Francuska.).

4.6. Određivanje stanične imunosti

4.6.1. Određivanje ukupnog broja pilećih leukocita i pojedinih subpopulacija protočnom citometrijom

Postupak izdvajanja leukocita i protočne citometrije odradili smo u suradnji s mentorom dr. sc. Krešom Bendeljom i Mladenom Jergovićem sa Zavoda za staničnu imunost, te pritom koristili njihovu opremu u Imunološkom zavodu u Zagrebu.

4.6.1.1. Izdvajanje leukocita iz heparinizirane pune krvi pilića

Leukociti su izdvojeni iz pune heparinizirane krvi pilića modificiranim postupkom gradijenta gustoće fikolom, kako su opisali DALGAARD i sur. (2010.). U tu svrhu smo koristili fikol (Histopaque®-1077, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Njemačka), uz dodatak 3% dekstrana T-500 (GE Healthcare Bio-Science, Uppsala, Švedska) kao modifikacije (JERGOVIĆ i sur., neobjavljeni podatci).

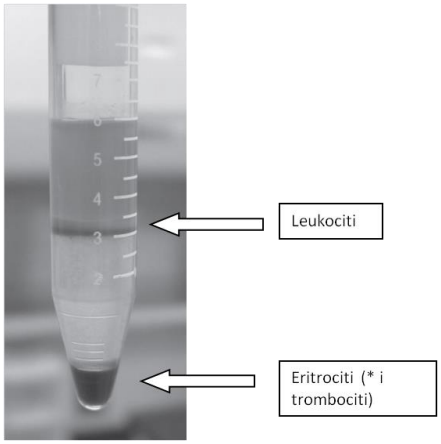
Postupak izdvajanja pilećih leukocita iz heparinizirane pune krvi:

1) U polistirensku epruvetu obujma 15 ml, s čepom na navoj i V dnom dodali smo 1 ml pune heparinizirane krvi pilića i pomiješali u omjeru 1:1 s apirogenim fosfatnim puferom (PBS; Imunološki Zavod, Zagreb, Hrvatska). Dobivenoj otopini dodali smo 0,8 ml 3% dekstrana i centrifugirali pri 50x*g* tijekom 8 minuta na temperaturi 18-25°C. Time smo iz uzoraka uklonili eritrocite i trombocite, koji su u ptica stanice s jezgrom.

2) Sterilnom Pasteurovom pipetom pokupili smo supernatant plazme sa suspendiranim leukocitima, bez dodirivanja donjeg sloja eritrocita i trombocita, te naslojili na jednaki volumen fikola u novoj epruveti. Zatim smo centrifugirali pri 900 x *g* tijekom 30 minuta na temperaturi 18-25°C, kako bi se izdvojili leukociti. Leukociti se nalaze u mliječnom prstenu i u supernatantu iznad prstena (Slika 4.).

3) Sterilnom Pasteurovom pipetom smo pokupili prsten leukocita i sloja supernatanta iznad prstena, premjestili u novu epruvetu s čepom na navoj i isprali s 10 ml medija (Imunološki Zavod, Hrvatska; sastav: RPMI 1640 s 2mM L-glutamina, 10% fetalni teleći serum (FBS), 100 i.j. penicilina, 100 μg streptomicina), centrifugiranjem pri 600x*g* tijekom 5 minuta.

4) Odbacili smo supernatant. Talog stanica ponovo smo otopili u 1 ml medija, homogenizirali uzorak vrtložnikom i odredili broj stanica brojanjem pod mikroskopom u Neubauerovoj komorici.



Slika 4. Izdvajanje leukocita postupkom gradijenta gustoće pomoću naslojavanja na fikol i centrifugiranja (preuzeto i prilagođeno iz: KAPCZYNSKI, 2008.).

4.6.1.2. Obilježavanje stanica monoklonskim protutijelima i određivanje subppopulacija leukocita protočnom citometrijom (imunofenotipizacija)

Nakon brojanja u Neubauerovoj komorici, koncentraciju stanica za određivanje frekvencija subpopulacija leukocita i T-limfocita (tj. imunofenotipizaciju) smo prilagodili na 250 000 stanica/ml u dvije zasebne epruvete od 4 ml (L- i T- epruvete). Stanice smo obilježili mišjim monoklonskim protutijelima (mPt) za pileće leukocitne površinske antigene tj. biljege (SouthernBiotech, Birmingham, SAD), konjugiranim s fluorescentnim bojama (Tablica 8.). Za obilježavanje neobilježenog mišjeg monoklonskog protutijela za pileći γδ TCR koristili smo sekundarna protutijela za mišja IgG protutijela iz kita za obilježavanje Zenon® Mouse IgG Labeling Kits (Molecular Probe, Eugene, SAD). Sekundarna protutijela bila su konjugirana s fluorescentnom bojom Alexa Fluor 647 (vrijednosti za ekscitaciju i najveću emisiju molekula Alexa Fluor 647 iznose 650, odnosno 668nm i istovjetne su alofikocijaninu, APC). Za višebojno obilježavanje leukocita smo primijenili slijedeća dva panela mPt: *Leukocitni panel:* CD45-APC, Makrofagi/monociti-R-PE, Bu-1-FITC i CD3-SPRD, te *T-limfocitni panel:* CD3-SPRD, CD8-FITC, CD4-R-PE i γδTCR-Alexa Fluor 647. Najmanju količinu monoklonskih protutijela koju treba dodati smo prethodno odredili titracijom.

Tablica 8. Monoklonska protutijela korištena za višebojnu protočnu citometriju.

Leukocitni antigen (CD) tj. biljeg	Klon	Konjugat fluorescentne boje (fluorokrom)*	Izotip	Populacije stanica koje nose biljeg
CD45	LT-40	APC	mišji IgM_{κ}	svi leukociti
Mo/Mf	KUL-01	R-PE	mišji $IgG1_{\kappa}$	makrofagi i monociti
Bu-1	AV 20	FITC	mišji $IgG1_{\kappa}$	B-limfociti, stanice burze
CD3	CT-3	SPRD	mišji $gG1_{\kappa}$	T limfociti
CD4	CT-4	R-PE	mišji $gG1_{\kappa}$	T pomoćnički limfociti
CD8α	EP-72	FITC	mišji $IgG2b_{\kappa}$	T citotoksični limfociti
γδ TCR	TCR 1	UNLB**(APC)	mišji $gG1_{\kappa}$	T limfociti s γδ staničnim receptorom

*APC= Alofikocijanin; FITC= fluorescein izotiocijanat; R-PE= R-fikoeritrin; SPRD = SpectralRedTM je tandem konjugat R-fikoeritrina i cijana 5.5 (R-phycoerythrin and CyanineTM 5.5).

** UNLB= neobilježeno primarno mPt naknadno obilježeno sekundarnim protutijelima iz Zenon kita (vidi objašnjenje u tekstu).
Leukocitni panel: CD45-Bu-1-CD3-Mo/Mf; T-limfocitni panel: CD3-CD4-CD8-TCR γδ

Nakon obilježavanja, uzorci stanica su fiksirani dodatkom pufera za fiksaciju i propuštanje (Imunološki Zavod, Zagreb, Hrvatska; sastav: 2% formaldehid u Dulbeccovom fosfatnom puferu (DPBS)). Frekvencija pojedinih subpopulacija leukocita i T-limfocita određena je propuštanjem najmanje 20 000 obilježenih stanica na protočnom

citometru LSRII (Becton Dickinson, Mountain View, SAD). Dobiveni rezultati su analizirani pomoću računalnog programa FlowJo© (verzija 7.6.5., Tree Star Inc., Ashland, SAD).

Postupak obilježavanja izdvojenih leukocita:

1) Volumen suspenzije leukocita u mediju koji odgovara količini 250.000 stanica u mililitru dodali smo u dvije sterilne polistirenske epruvete od 4 ml s polukružnim dnom, po jednu za svaki panel obilježavanja (L i T). Stanice smo obilježili prema panelu određenim monoklonskim protutijelima za površinsko obilježavanje leukocita i inkubirali u mraku pri sobnoj temperaturi tijekom 15 minuta.

2) Leukocite smo isprali u 3 ml pufera za obilježavanje (Imunološki Zavod, Zagreb, Hrvatska; sastav: 1% FBS, 0,1% natrij-azida (NaN_3) u DPBS) centrifugiranjem pri 600x*g* tijekom 5 minuta i tako uklonili slobodna monoklonska protutijela.

2a) nakon prvog ispiranja u svaku T epruvetu dodali smo po 3μl Zenon-konjugiranih-Alexa Fluor 647 protutijela za pileći γδ TCR i inkubirali 30 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon toga isprali smo u 3 ml pufera za obilježavanje centrifugiranjem pri 600xg tijekom 5 minuta.

3) Odbacili smo supernatant i sadržaj promiješali vrtložnikom.

4) Stanice smo raspršili u 250 μl pufera za fiksaciju i propuštanje te sastav ujednačili vrtložnikom.

5) Stanice smo propustili na citometru odmah nakon fiksacije ili pohranili na 4°C do naknadnog propuštanja.

4.6.2. Određivanje ispoljavanja gena za IFN-α i IFN-γ, te prisutnosti virusa u uzorcima slezene i pune krvi pilića

4.6.2.1. Izdvajanje ukupne RNK iz uzoraka

Ukupna RNK izdvojena je iz uzoraka slezene i heparinizirane pune krvi metodom ekstrakcije kiselim gvanidin-tiocijanat-fenol-kloroformom (skraćeno: metoda kisele fenolne ekstrakcije; CHOMCZYNSKI i SACHHI, 2006.), primjenom TRI® Reagent Solution (Applied Biosystems, Ambion, SAD), prema naputku proizvođača. TRI®Reagent Solution je cjeloviti reagens pripremljen za izdvajanje ukupne RNK ili simultano izdvajanje RNK, DNK i proteina iz raznovrsnog biološkog materijala (prvenstveno stanica i tkiva ljudskog, biljnog, životinjskog, ali i materijala bakterijskog, gljivičnog ili

virusnog podrijetla). Reagens je monofazna otopina fenola i gvanidin-tiocijanata koji koče aktivnost RNaze i stoga je pogodan za izdvajanje ukupne RNK. Napomena i preporuka proizvođača: Niti jednom postojećom metodom izdvajanja RNK ne izdvaja se RNK u potpunosti slobodna od kontaminacije s DNK na razini detekcije RT – PCR reakcijom. Stoga se preporuča prije RT-PCR reakcije ukloniti ostatke DNK iz uzorka tretiranjem DNazom.

Postupak izdvajanja ukupne RNK:

1) Homogenizacija tkiva i krvi, uz istovremenu inaktivaciju RNaza pomoću otopine gvanidin-tiocijanata. Uzorke slezene mase 50-150 mg usitnili smo pomoću sterilnog skalpela i premjestili u mili-epruvetu (volumen 2 ml). Dodali smo 1 ml TRI® Reagent Solution otopine i inkubirali 10 minuta na sobnoj temperaturi. (Od izolacije RNK iz konzerviranih uzoraka heparinizirane krvi odustali smo zbog vezanja heparina za RNK i inhibicije polimeraza u RT-qPCR reakciji. Pokušaj razdvajanja RNK i heparina precipitacijom s litij kloridom nije uspio.)
2) Odvajanje faza i deproteinizacija uzorka pomoću organskih otapala (fenol iz TRI Reagenta i kloroform). Nakon inkubacije, u homogenizirano tkivo dodali smo 0,2 ml kloroforma (Kloroform, Kemika, Zagreb, Hrvatska), žustro promućkali i inkubirali 10 minuta na sobnoj temperaturi. Faze smo odvojili centrifugiranjem s 12 000 x *g* tijekom 15 minuta pri temperaturi 4 °C. Pri tom se homogenat razdvaja u vodenu, međufazu i organsku fazu. RNK se nalazi isključivo u vodenoj fazi, DNK u međufazi te proteini u organskoj fazi.
3) Precipitacija RNA iz vodene faze izopropanolom. Nakon razdvajanja faza, pipetom smo pokupili vodenu fazu i prebacili u novu epruvetu. Dodali smo 0,5 ml izopropanola (2-propanol, Kemika, Zagreb, Hrvatska), promiješali vrtložnikom na maloj brzini i inkubirali 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, centrifugirali smo sadržaj na 12 000 x *g* tijekom 8 minuta pri temperaturi 8-25°C.
4) Ispiranje pelete RNK etanolom. U potpunosti smo uklonili supernatant. Precipitat RNK u ovoj fazi može biti vidljiv na dnu i postranoj stjenki epruvete kao gelu nalik pelet. Dodali smo 1 ml 75% etanola (DEPC-vodom razrijeđeni Etanol 96% pro analysis, Gram-mol, Zagreb, Hrvatska) i vrtložnikom promiješali, te ostavili preko noći na -20°C. Slijedećeg jutra, ponovili smo miješanje vrtložnikom i centrifugirali na 7500 x *g* tijekom 7 minuta pri temperaturi 4-25°C.

6) Ponovno otapanje i pohrana izdvojene RNK. Potpuno smo uklonili etilni alkohol i RNK pelet osušili na zraku 5-10 minuta, poštujući preporuku proizvođača da se pelet ne osuši u potpunosti. Pelet RNK otopili smo u 50 µl vode slobodne od RNaze, DNaze i tretirane dietilpirokarbonatom (DEPC-om) (Life technologies, Paisley, Škotska). Uzroke smo inkubirali 10 minuta pri 58°C, te do analize pohranili pri – 80 °C.

7) Koncentraciju i čistoću izdvojene ukupne RNK odredili smo analizom na spektrofotometru BioDrop µLITE (BioDrop, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo). Čistoću izdvojene RNK odredili smo pomoću omjera absorbancija valnih duljina 260/280 nm, a preporučene vrijednosti proizvođača reagensa su u rasponu 1,8-2,2.

4.6.2.2. Određivanje relativne količine IFN-α i IFN-γ, te odsječka virusne RNK lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (RT-qPCR)

Broj kopija glasničke RNK (gRNK) za IFN-α i IFN-γ u ukupnoj RNK izdvojenoj iz tkiva slezene odredili smo metodom reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *RealTime RT–PCR*; RT-qPCR). Za analizu pripremili smo master-mješavinu prema naputku proizvođača od reagensa sadržanih u kitu TaqMan® RNA-to-C_T™ 1-Step (Applied Biosystems, SAD), uz dodatak početnica i TaqMan probi (Tablica 9.) specifičnih za pileći IFN-α, IFN-γ i za "domaćinski" gen β-aktin (engl. "house keeping" gene) i odsječak M gena VNB-a te označenih različitim fluorescentnim bojama (Sigma-Aldrich, Njemačka). Master-miješavini dodali smo 2 µl uzorka ukupne RNK u ukupno 10 µl reakcijske smjese.

Tablica 9. Specifične početnice i TaqMan probe.

Oznaka	Slijed oligonukleotida (5'→ 3')	Referenca
qNDV-F (M+4100)	5'-AGTGATGTGCTCGGACCTTC-3'	**PEDERSEN, J.C., 2005. NVSL SOP-AV-1505**
qNDV-R (M+4169)	5'-CCTGAGGAGAGGCATTTGCTA-3'	
qNDV-P (M-4220)	5'- HEX- TTCTCTAGCAGTGGGACAGCCTGC -BHQ 1 -3'	
qChIFN α F	5'- GGACATGGCTCCCACACTAC -3'	**JENKINS i sur., 2009.**
qChIFN α R	5'-TCCAGGATGGTGTCGTTGAAG-3'	
qChIFN α P	5'- FAM - CAGCGCGTCTTGCTC- BHQ 1 – 3'	
qChIFN γ F	5´-GTGAAGAAGGTGAAAGATATCATGGA-3',	**KAISER i sur., 2000.**
qChIFN γ R	5´-GCTTTGCGCTGGATTCTCA-3'	
qChIFN γ P	5´ FAM-TGGCCAAGCTCCCGATGAACGA- BHQ 1- 3'	
qCh Ba - F	5'- ACCACAGCCGAGAGAGAAAT - 3'	**Izradio doc.dr.sc. Z.GOTTSTEIN.**
qCh Ba - R	5'- GACCTGACCATCAGGGAGTT - 3'	
qCh Ba - P	5'- FAM-CGTCGCACTGGATTTCGAGCA - BHQ 1 - 3'	

Određivanje relativne količine svakog pojedinog uzorka rađeno je u uređaju Mx3005P® (Stratagene, SAD) u duplikatu. Ct vrijednosti dobivene u RT-qPCR reakciji koristili smo za izračunavanje relativne promijene ispoljavanja gRNK IFN-α i IFN-γ kod LS i ZG pokusnih skupina u odnosu na kontrolnu K skupinu koja je služila kao kalibrator.

Reakcija je normalizirana prema ispoljavanju gRNK pilećeg β-aktina, prema formulama:

ΔCt = Ct IFN-α – Ct β-aktina; ΔCt = Ct IFN-γ – Ct β-aktina

Nakon toga, rezultati su normalizirani u odnosu na kalibrator (kontrolnu skupinu) prema formuli:

ΔΔCt = ΔCt pokusne skupine (ZG/LS) – ΔCt kalibratora (K)

Pomoću dobivene vrijednosti ΔΔCt izračunali smo relativnu promjenu ispoljavanja pokusnih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu tj. kalibrator prema formuli:

Relativna promjena = $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Dobiveni broj označava koliko puta je ispoljavanje ispitujuće gRNK veće ili manje u odnosu na kontrolnu skupinu.

Apsolutni broj kopija odsječka genomske RNK cjepnog virusa (bilo La Sota ili soja ZG1999HDS) u 2,5 μl ukupne RNK odredili smo RT-qPCR reakcijom na uređaju Mx3005P® (Stratagene, SAD) koristeći pripadajući računalni program MxPro (Stratagene, SAD) i kit TaqMan® RNA-to-C_T™ 1-Step (Applied Biosystems, SAD) prema uputama proizvođača, kao i specifične početnice i TaqMan probu za M gen VNB (Tablica 9). Količinu smo odredili usporedbom sa standardnom krivuljom prethodno izrađenom od pet desetorostrukih razrjeđenja virusne RNK poznate koncentracije analiziranih u tri ponavljanja koje su standardizirane primjenom kita TaqMan®DNA-Template Reagens kit (Applied-Biosystems, SAD) prema uputama proizvođača. Za bolju preciznost dobivenih rezultata, učinkovitost standarda treba biti preko 100%.

4.7. Statistička obrada podataka

Prikupljene podatke analizirali smo računalnim programom STATISTICA 12 (StatSoft Inc., SAD, 2013.). Osnovna obrada podataka temeljila se na metodama deskriptivne statistike. Normalnost raspodijele podataka provjerena je Kolmogorov-Smirnovim testom. Obzirom na normalnost raspodijele rezultata, razlike između pokusnih i kontrolne skupine analizirane su primjenom metoda jednosmjerne ANOVA ili Kruskal-Wallis.

5. REZULTATI

5.1. Podudarnost i razlike primijenjenih sojeva VNB

Nakon sravnjivanja nukleotidnih slijedova u varijabilnom dijelu F gena (374bp) istražena je podudarnost primijenjenih sojeva VNB, ZG1998HDS i cjepnog soja La Sota, međusobno i sa izolatima cjepnog virusa, uspoređivanjem nukleotidnih slijedova, kao i izvedenih slijedova aminokiselina. Rezultati su prikazani u tablici 10., a uključuju matrice podudarnosti slijeda nukleotida i izvedenih slijedova aminokiselina soja ZG1999HDS s ostalim slijedovima, te broj nukleotida i aminokiselina koji su različiti između uspoređivanih slijedova. Obzirom da se u sekvenci cjepnog soja La Sota pojavljuje dvostruki „peak" koji ukazuje na mješovitu populaciju, nađeno je da se ZG1999HDS soj u uspoređenoj regiji razlikuje za 15, odnosno 16 nukleotida (4,1%) od cjepnog soja, a u izvedenom slijedu aminokiselina razlikuju se za 3, odnosno 4 ak (3,3%). Izolati cjepnog soja (SAVIĆ, 2003.) razlikuju se od soja ZG1999HDS za17nt (4,6%), odnosno 4 ak (3,3%).

Tablica 10. Podudarnost i razlike nukleotidnog slijeda varijabilnog dijela F gena (var F gen) i izvedenog slijeda aminokiselina odabranih sojeva VNB (opis u tekstu).

gt	var F gen, 374 bp	matrica podudarnosti nt sekvenci	broj različitih nt	matrica podudarnosti ak sekvenci	broj različitih ak
2	APMV-1/chicken/HR-Croatia/ZG1999HDS/1999	ID*	ID	ID	ID
2	PESTIKAL, LaSota SPF (Savić, 3/2014, K.br.5034092)	95,9%	15 (16 (Y))	96,7%	4 (3+X)
2	(KC844235) NDV La Sota C5	96,2%	14	97,5%	3
2	(AF077761) NDV strain LaSota	96,2%	14	97,5%	3
2	(JN863120) NDV isolate LaSota	96,2%	14	97,5%	3
2	(JF950510) NDV strain LaSota	95,9%	15	97,5%	3
2	(AY845400) NDV strain LaSota	96,2%	14	97,5%	3
2	(NC002617) NDV B1	95,9%	15	95,9%	5
2	(Savić, 2003.) NDV HR-711/99	95,4%	17	96,7%	4
2	(Savić, 2003.) NDV HR-1374/00	95,4%	17	96,7%	4

* ID= identično, istovjetno; nt= nukleotida; ak= aminokiselina

Sojeve primijenjene u istraživanju usporedili smo dodatno i u čitavoj dužini dostupnih nukleotidnih slijedova (964 bp), te u početnom dijelu F gena (541bp). Nađena je razlika u 23 nt (4,3%) u početnom dijelu F gena (541 bp), te u 35 nt (3,7%) usporedbom cijele dužine dobivene sekvence cjepnog soja La Sota (964 bp) i soja ZG1999HDS.

5.2. Klinička kontrola zdravstvenog stanja životinja u pokusu

Zdravstveno stanje pilića u pokusu praćeno je inspekcijom prilikom svakodnevnih zahvata na životinjama, hranidbe i čišćenja, te prema potrebi i drugim metodama kliničke pretrage. Za čitavog istraživanja nisu uočene reakcije na primijenjene viruse u obliku promjena u kliničkoj slici, niti je došlo do uginuća pilića u pokusu.

5.3. Humoralna imunost

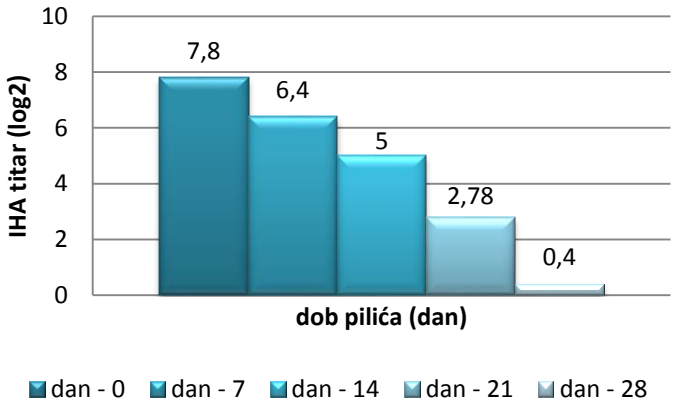
Primjenom beta postupka serološke IHA probe utvrđen je titar specifičnih protutijela za VNB u serumu pilića, kako bi se odredila kinetika iščezavanja materalnih protutijela te započeo pokus nakon što su nestala. Nakon primijene virusa IHA proba je primijenjena u svrhu dokaza titra aktivno stečenih specifičnih protutijela na VNB kao rezultat imunosnog odgovora na primijenjene virusne pripravke.

5.3.1. Titar materalnih protutijela specifičnih za VNB u serumu pilića prije početka pokusa

Rezultati IHA probe na razini specifičnih materalnih protutijela za VNB u serumima pilića po tjednima prije početka pokusa pokazuju da titar protutijela iz tjedna u tjedan postupno opada (Slika 5.), te na dan početka pokusa, u dobi pilića 28 dana, ima gotovo zanemarivu razinu od 0,4 ± 0,7 (Tablica 11.).

Tablica 11. Dinamika iščezavanja materalnih protutijela (srednja vrijednost±SD) specifičnih za VNB praćena IHA probom (log 2) u pilećim serumima u tjednim razmacima prije početka pokusa.

Materalna protutijela	**Vrijeme uzorkovanja (dani prije početka pokusa)**				
	0	**7**	**14**	**21**	**28**
Srednja vrijednost ± SD	7,80 ± 1,03	6,40 ± 0,97	5,00 ± 0,67	2,78 ± 1,48	0,40 ± ,70



Slika 5. Titar materalnih protutijela (srednja vrijednost±SD) specifičnih za VNB u serumu pilića po tjednima prije početka pokusa.

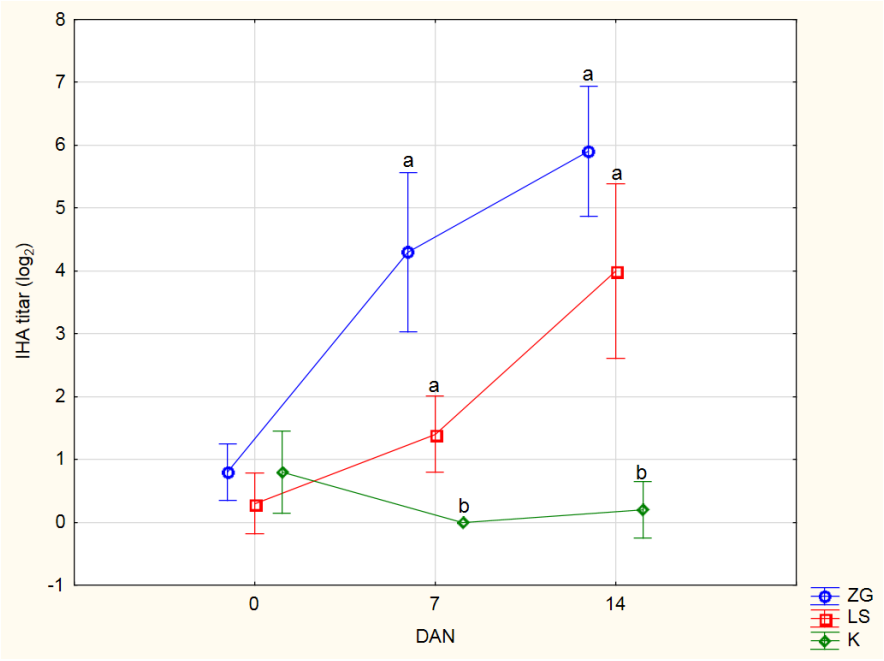
5.3.2.Titar protutijela specifičnih za VNB u pilećim serumima nakon imunizacije

Rezultati IHA probe prikazani su u tablici 12. i slikom 6., a pokazuju da su primijenjeni virusni pripravci potaknuli tvorbu specifičnih protutijela u pilića obje skupine. Statistički značajan porast titra protutijela zabilježen je u obje skupine imuniziranih pilića u usporedbi s kontrolnom skupinom sedmog (ZG p=0,000005, LS p=0,044) i 14. (ZG p=0,000022, LS p=0,0085) dana istraživanja. Za čitavog istraživanja titar protutijela specifičnih za VNB bio je veći u skupine ZG u odnosi na LS skupinu (Slika 6.).

Tablica 12. Vrijednosti titra protutijela specifičnih za VNB u pilećim serumima u tjednim intervalima nakon imunizacije pilića u dobi 28 dana (srednja vrijednost±SD). *

Skupina	Vrijeme uzorkovanja (dani)		
	0	7	**14**
ZG	0,80 ± 0,63	4,30 ± 1,77 **a**	5,90 ± 1,45**a**
LS	0,30 ± 0,67	1,40 ± 0,84 **a**	4,00 ± 1,94**a**
K	0,80 ± 0,91	0,00 ± 0,00 **b**	0,20 ± 0,63**b**

* Statistički značajne razlike između skupina po danima označene su različitim malim slovima abecede (a, b, c…).



*Statistički značajne razlike (p<0,05) između skupina po danima označene su različitim malim slovima abecede (a, b, c…).

Slika 6. Titar protutijela specifičnih za VNB (srednja vrijednost±SD) u serumu pilića po danima nakon početka pokusa.

5.4.Ukupna i diferencijalna krvna slika

Rezultati za broj eritrocita, trombocita i ukupnih leukocita te relativni udio heterofila, limfocita, monocita, eozinofila i bazofila prikazani su tablicom 13., te slikama od 7. do 14..

Tablica 13. Ukupan broj krvnih stanica i relativni udio pojedinih leukocita (srednja vrijednost±SD) u uzorcima pileće krvi.*

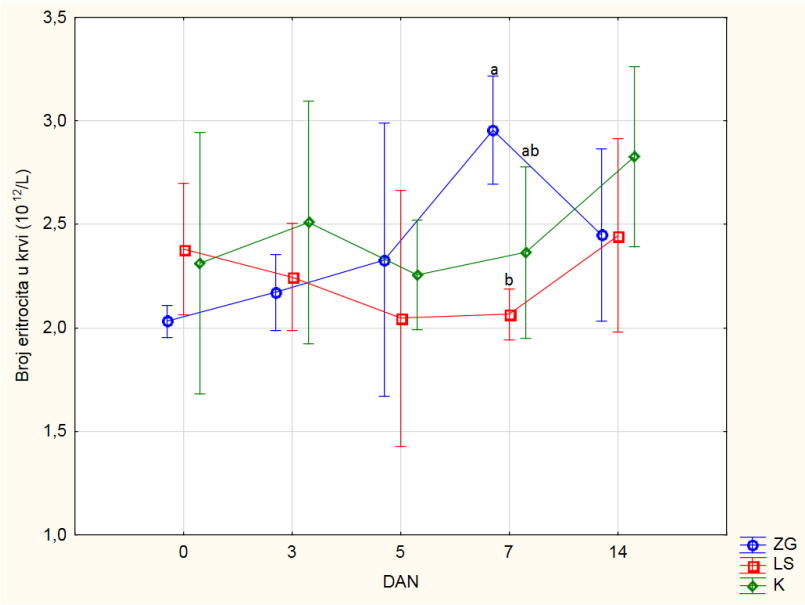
dpi **	SKUPINA	ERITROCITI x 10^{12}/L	TROMBOCITI x 10^{9}/L	UKUPNI LEUKOCITI x 10^{9}/L	HETEROFILI %	LIMFOCITI %	MONOCITI %	EOZINOFILI %	BAZOFILI %
0	ZG	2,42 ± 0,15	45,44 ± 16,19	41,95 ± 11,08	29,00±5,42	58,43±6,85	4,29±2,21	2,71±2,21	5,57±2,15
0	LS	2,40 ± 0,32	27,08 ± 11,28	33,75 ± 6,96	34,57±8,30	52,57±8,02	5,14±2,73	2,00±2,24	5,71±2,43
0	K	2,46 ± 0,43	43,92 ± 17,74	40,46 ± 10,83	34,71±3,82	54,57±5,44	3,29±2,75	2,00±1,41	5,43±2,07
3	ZG	2,39 ± 0,19	52,39 ± 31,26 a**b**	46,07 ± 10,39	35,14±7,56**a**	53,86±11,13	4,14±1,46	3,00±2,94	3,86±3,80**b**
3	LS	2,38 ± 0,33	64,97 ± 36,22**a**	40,56 ± 6,24	34,29±4,61**a**	51,71±3,77	4,29±1,38	3,14±2,67	6,57±2,94**a**
3	K	2,65 ± 0,52	38,52 ± 21,14**b**	45,81 ± 13,46	27,29±7,41**b**	59,43±12,45	3,43±1,90	3,29±1,98	6,57±2,99**a**
5	ZG	2,54 ± 0,55	71,63 ± 31,59**a**	48,67 ± 15,71	31,86±7,27**ab**	58,29±7,85**ab**	2,29±2,14	1,29±1,50	6,29±1,89
5	LS	2,28 ± 0,50	57,55 ± 25,81**ab**	40,73 ± 4,99	38,29±10,16**a**	51,57±9,50**b**	3,29±2,43	1,29±0,76	5,57±1,27
5	K	2,33 ± 0,28	34,20 ± 25,29**b**	38,63 ± 6,96	25,00±5,45**b**	65,57±3,95**a**	3,00±2,58	1,29±1,11	5,14±2,12
7	ZG	3,05 ± 0,34**a**	67,27 ± 26,10	46,91 ± 12,80**ab**	25,57±6,85	59,71±9,18	4,86±3,58	3,14±1,77	6,71±1,50**a**
7	LS	2,42 ± 0,33**ab**	49,52 ± 9,94	39,65 ± 8,78 **b**	27,00±5,13	62,71±4,89	2,14±0,90	2,29±1,38	5,86±2,91**ab**
7	K	2,52 ± 0,41**b**	64,68 ± 26,78	53,15 ± 15,06 **a**	28,29±6,58	60,29±6,05	3,57±1,72	3,71±2,56	4,14±2,12**b**
14	ZG	2,77 ± 0,36	55,44 ± 23,50	51,82 ± 10,23	24,57±5,47**a**	62,86±4,18**b**	5,00±1,91**a**	1,71±1,11	5,86±0,90
14	LS	2,64 ± 0,34	66,11 ± 27,34	53,75 ± 13,02	28,86±6,07**a**	64,71±5,38**b**	1,29±1,80**ab**	1,57±1,27	3,57±1,90
14	K	2,90 ± 0,39	67,68 ± 26,10	57,79 ± 15,68	17,57±4,47**b**	73,14±3,58**a**	3,43±2,76**b**	1,86±1,57	4,00±1,63

*Statistički značajne razlike ($p<0,05$) između skupina po danima označene su različitim malim slovima abecede (a, b, c); **dpi= dani poslije imunizacije

5.4.1. Eritrociti

Rezultati analize ukupnog broja eritrocita u krvi pokazuju da se ona kreće u fiziološkom rasponu tijekom čitavog pokusa (Tablica 13.). Broj eritrocita u krvi pilića ZG skupine raste do sedmog dana pokusa nakon čega pada do četrnaestog dana. Broj eritrocita u krvi pilića LS skupne pada do petog dana, ostaje na gotovo istoj razini do sedmog dana, zatim raste do 14. dana. Broj eritrocita u krvi kontolne skupine (K) raste u odnosu na početne vrijednosti do trećeg dana, potom pada do petog dana te se ponovo povećava do kraja pokusa četrnaestog dana kada je i najveći u odnosu na sve skupine.

Trećeg dana nakon imunizacije broj eritrocita u imuniziranih pilića je manji od kontrolne skupine, te unatoč padu broja u skupine LS i porastu u skupine ZG, broj eritrocita je veći u LS skupini. Petog dana broj eritrocita je najveći u ZG skupini, a najmanji u LS skupini, dok vrijednost broja eritrocita kontrolne skupine pada u odnosu na prethodnu i nalazi se između vrijednosti imuniziranih skupina. U odnosu na prethodne vrijednosti, broj eritrocita ZG skupine naglo raste sedmog dana, najveće su i statistički značajno veće vrijednosti (p=0,0017) u usporedbi sa skupinom LS, te veće od kontrolne skupine. LS skupina sedmog dana dosegnula je najniže vrijednosti tijekom pokusa, ali i u odnosu na ostale skupine. Do kraja pokusa, četrnaestog dana broj eritrocita pada u skupini ZG, dok naglo raste u kontrolne i LS skupine. Najviši je u konrolnoj skupini, dok je LS skupina gotovo dosegnula vrijednosti ZG skupine.



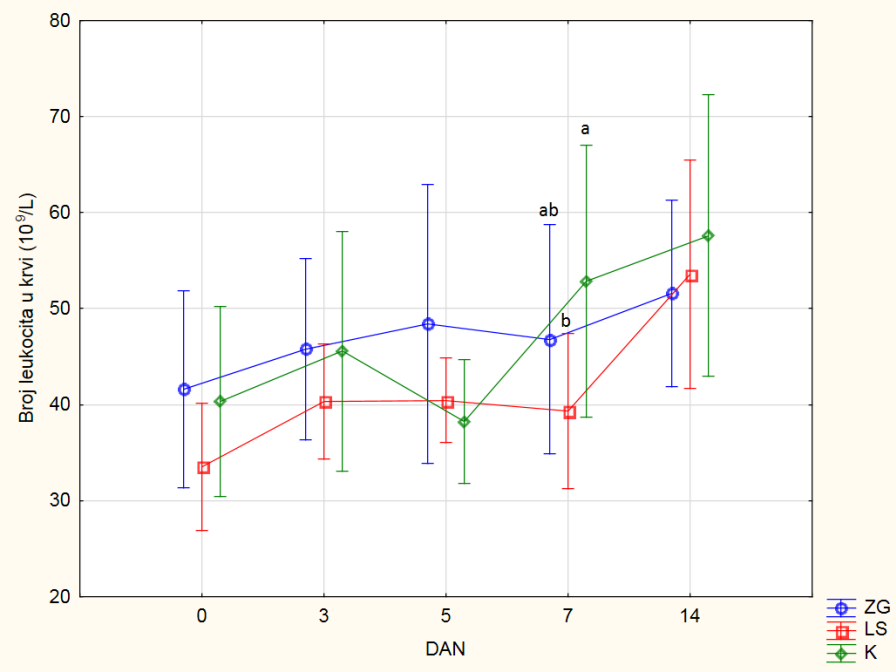
*Statistički značajne razlike (p<0,05) između skupina po danima označene su različitim malim slovima abecede (a, b, c).

Slika 7. Ukupan broj eritrocita (srednja vrijednost±SD) u krvi pilića po danima tijekom pokusa.*

5.4.2. Leukociti

Rezultati ukupnog broja leukocita u krvi pilića prikazani su u tablici 13. i slikom 8.. Analizom rezultata od početka pokusa uočava se povišen broj u odnosu na fiziološke vrijednosti u svih skupina s tendencijom daljnjeg porasta u svih skupina do kraja pokusa, kada je najviši. Ukupan broj leukocita u krvi pilića ZG skupine povećava se do petog dana i najviši je od svih skupina, zatim sedmog dana pada gotovo do vrijednosti trećeg dana, te ponovno raste do kraja pokusa. Kod LS skupine broj leukocita raste do trećeg dana, ostaje gotovo na istoj razini do petog dana, blago pada na najniže vrijednosti do sedmog dana, te naglo raste do 14. dana. Broj leukocita u krvi pilića kontrolne skupine raste do trećeg dana, zatim pada do petog, zatim naglo raste do sedmog dana, a porast se nastavlja do kraja pokusa.

Trećeg dana nakon imunizacije broj leukocita je veći u ZG skupine, a niži u LS skupine u odnosu na kontrolnu, ali i dalje povišen u svih. Petog dana i dalje raste u ZG skupine i najviši je, u LS skupine ostaje na istoj razini, a u kontrolnoj pada. Sedmog dana broj leukocita u kontrolne skupine je veći nego u imuniziranih skupina, sa statističkom značajnošću (p=0,028) u odnosu na LS skupinu. Broj leukocita 14. dan najveći je ponovo u kontrolne skupine, ali bez statistički značajnih razlika u odnosu na ostale skupine, te nešto veći u LS nego u ZG skupine.



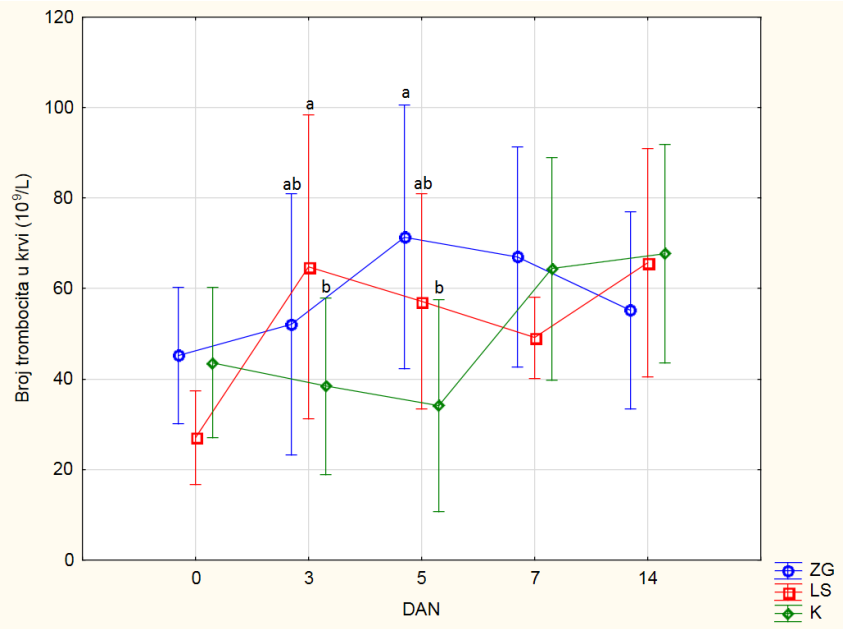
* Statistički značajne razlike (p<0,05) između skupina po danima označene su različitim malim slovima abecede (a, b, c).

Slika 8. Ukupan broj leukocita (srednja vrijednost±SD) u krvi pilića po danima tijekom pokusa.*

5.4.3. Trombociti

Broj trombocita u krvi pilića prikazan je u tablici 14. i slikom 9.. Analizom rezultata uočava se porast broja trombocita u krvi kod pokusne skupine ZG do 5. dana, a kod skupine LS do 3. dana pokusa kada su značajno veći od kontrolne skupine K, dok kod kontrolne skupine taj broj blago pada do 5. dana. Potom, do kraja pokusa broj trombocita postupno raste kod kontrolne skupine, a pada kod pokusnih skupina te do kraja pokusa nema značajnih razlika između njih. Broj trombocita u krvi pilića pokusne skupine ZG raste do petog dana, a zatim do kraja pokusa pada. Broj trombocita u pilića LS skupine naglo raste do trećeg dana, zatim postupno pada do sedmog dana i opet raste do 14. dana. Kod pilića kontrolne skupine broj trombocita pada do petog dana, naglo raste do sedmog dana, potom raste do 14. dana.

Trećeg dana nakon imunizacije broj trombocita u odnosu na početne vrijednosti povećao se u imuniziranih pilića, a smanjio u kontrolne skupine. Broj trombocita naglo raste u pilića LS skupine i značajno je veći ($p=0,049$) od kontrole te veći u odnosu na ZG skupinu. Do petog dana broj trombocita u ZG skupine i dalje raste i značajno je veći ($p=0,006$) od kontrolne skupine, dok u LS skupine i kontrole pada, ali je u LS skupine i dalje viši nego u kontrole. Iako se smanjio, broj trombocita u krvi pilića ZG skupine sedmog dana i dalje je veći nego u kontrolne i LS skupine, a u LS je ispod razine kontrolne skupine. Do kraja pokusa, broj trombocita u ZG skupini i dalje pada i najniži je dok u LS i K skupina bilježi porast. Iako je taj porast u LS skupine nagli, ne dostiže vrijednost kontrolne skupine.



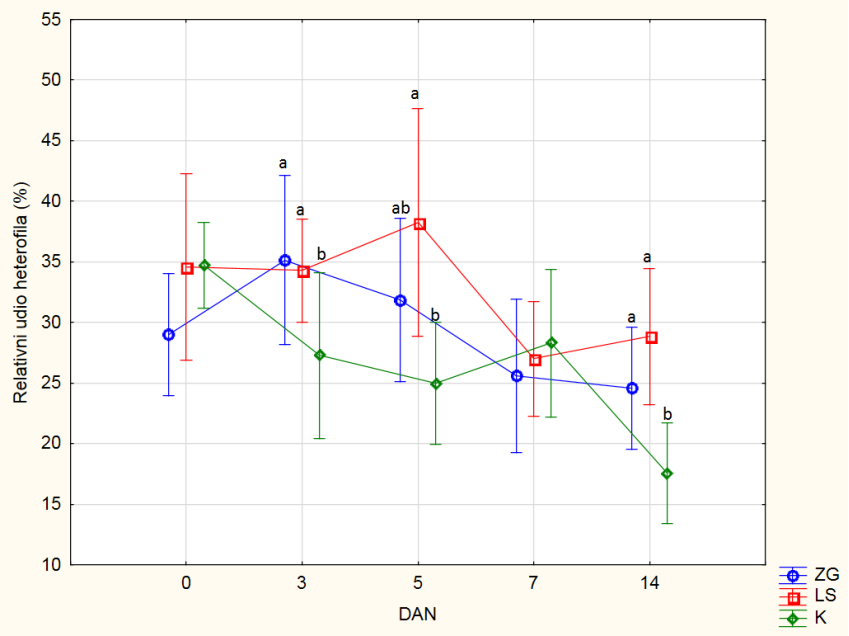
*Statistički značajne razlike ($p<0,05$) između skupina po danima označene su različitim malim slovima abecede (a, b, c).

Slika 9.Ukupan broj trombocita (srednja vrijednost±SD) u krvi pilića po danima tijekom pokusa.*

5.4.4. Heterofilni granulociti

Rezultati relativnog udjela heterofila u ukupnom broju leukocita prikazani su tablicom 14. i slikom 10.. Analizom rezultata uočava se tendencija smanjivanja prema kraju pokusa. Kod pokusne skupine ZG uočava se nagli porast relativnog udjela heterofila do trećeg dana pokusa, zatim postupno pada do sedmog dana pa ponovo raste do kraja pokusa 14. dana. Kod LS skupine gotovo ostaje na razini početnih vrijednosti do trećeg dana, zatim raste do petog dana pa ponovo pada do sedmog i povećava se do zadnjeg dana pokusa. Kod kontrole njihov udio izrazito pada do trećeg dana pokusa, nastavlja padati do petog dana, potom naglo raste do sedmog dana pokusa pa opet naglo pada do 14. dana.

Trećeg dana zastupljenost heterofila je statistički značajno veća kod imuniziranih pilića nego u kontrole (ZG p=0,026, LS p=0,047), a najveća je u pilića ZG skupine. I peti dan njihov udio je veći u imuniziranih skupina u odnosu na kontrolnu, ali je u LS skupine statistički značajno veći (p=0,00025) u odnosu na kontrolu te veći nego u ZG skupine. Sedmi dan rezultati su obrnuti, najveća je zastupljenost u kontrolne skupine u odnosu na obje pokusne, a najmanja je u ZG skupine. Do kraja pokusa njihova zastupljenost u pokusnih skupina je statistički značajno veća u obje pokusne skupine (ZG p=0,047, LS p=0,0017) u odnosu na kontrolnu kod koje bilježi izraziti pad.



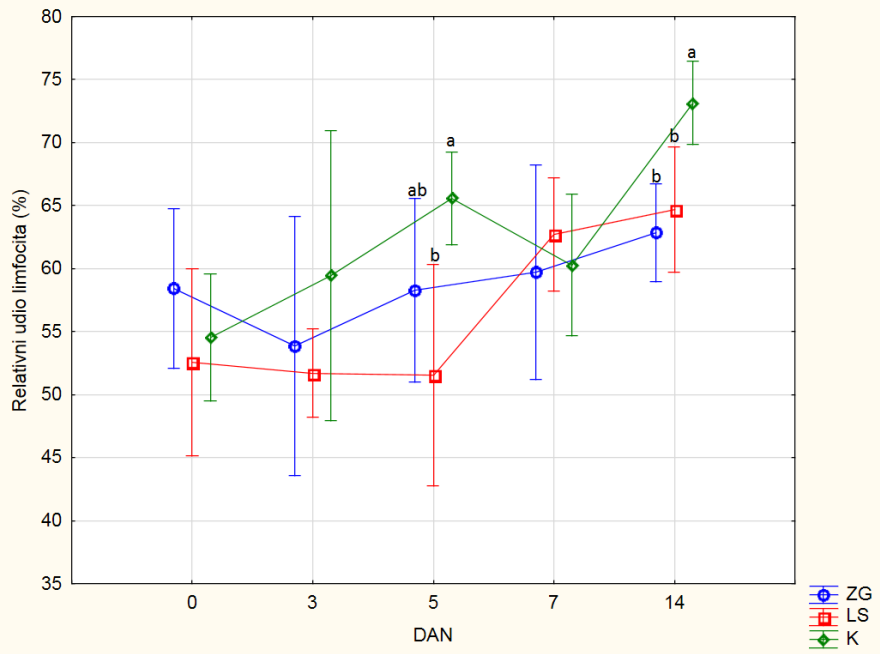
*Statistički značajne razlike (p<0,05) između skupina po danima označene su različitim malim slovima abecede (a, b, c).

Slika 10. Zastupljenost heterofila (srednja vrijednost±SD) u populaciji leukocita u krvi pilića po danima tijekom pokusa.*

5.4.5. Limfociti

Relativni udio (%) limfocita prikazujemo u tablici 14. i slikom 11. Analizom rezultata uočava se tendencija porasta zastupljenosti limfocita u diferencijalnoj krvnoj slici (DKS) svih skupina sve do kraja pokusa. Zastupljenost limfocita bilježi pad u ZG skupine do trećeg dana pokusa, potom raste do kraja pokusa. Kod LS skupine udio limfocita blago pada do petog dana pokusa, zatim naglo raste do sedmog dana i nastavlja blagi porast do kraja pokusa. Kod kontrolne skupine broj limfocita naglo raste do petog dana, bilježi nagli pad do sedmog dana, te ponovno raste do kraja pokusa.

Zastupljenost limfocita u odnosu na početne vrijednosti bilježi pad u obje pokusne skupine do trećeg dana, niža je nego u kontrolne, a najniža u LS skupine. Petog dana također je udio limfocita niži u imuniziranih skupina u odnosu na kontrolnu, a kod LS skupine je najniži i statistički značajno niži (p=0,00057) od kontrole. Sedmi dan pokusa udio limfocita u DKS-u najviši je kod LS skupine u odnosu na kontrolnu i ZG skupinu kod posljednje od kojih je najniži. Na kraju pokusa 14. dan udio limfocita je najviši u kontrolnoj skupini i značajno viši (ZG p=0,01, LS p=0,034) nego u obje pokusne skupine.



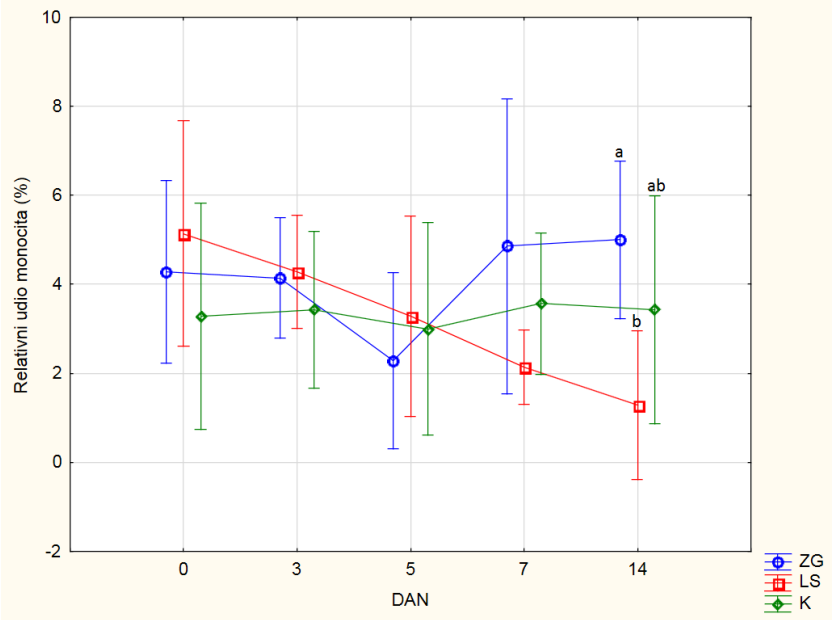
*Statistički značajne razlike (p<0,05) između skupina po danima označene su različitim malim slovima abecede (a, b, c).

Slika 11. Zastupljenost limfocita (srednja vrijednost±SD) u populaciji leukocita u krvi pilića po danima tijekom pokusa.*

5.4.6. Monociti

Rezultati analize zastupljenosti monocita u krvi prikazani su u tablici 14. i na slici 12.. Analizom rezultata uočava se tendencija pada njihovog udjela postupno od početka do kraja pokusa u pilića LS skupine, te u središnjem dijelu pokusa (petog dana) u kontrolne i ZG skupine, s time da je pad naglašeniji i nagli u ZG skupine. Relativni udio monocita u krvi pilića ZG skupine gotovo je nepromijenjen do trećeg dana pokusa, zatim pada do petog dana, naglo raste do sedmog dana i blago raste do kraja pokusa. Zastupljenost monocita u DKS-u skupine LS konstantno pada od početka do kraja pokusa. Kod kontrolne skupine njihov udio gotovo je na istoj razini od početka do kraja pokusa uz neznatan pad petog dana pokusa.

Treći dan pokusa udio monocita je veći u obje pokusne skupine u odnosu na kontrolu, a najveći je u LS skupine. Peti dan, unatoč daljenjem smanjenju udjela monocita u LS skupine, i dalje je njihov udio najveći u LS skupini, ali i najniži u ZG skupini. Sedmi dan udio monocita je najveći u ZG skupini, a najniži u LS skupini. Na kraju istraživanja 14. dana zastupljenost monocita je najveća kod ZG skupine, i to značajno veća ($p=0,02$) u odnosu na pokusnu skupinu LS, ali bez značajnih razlika u odnosu na kontrolnu skupinu koja se po vrijednostima nalazi između njih.



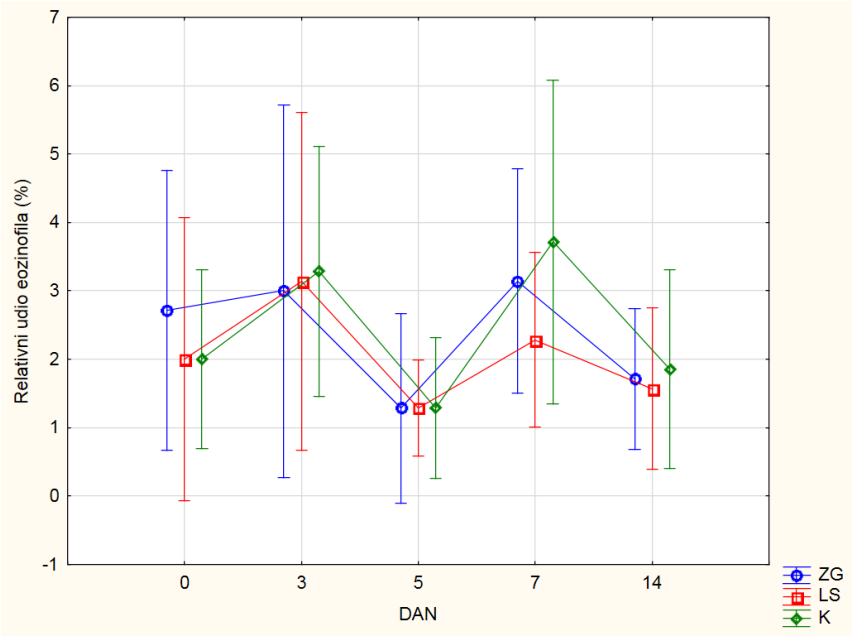
*Statistički značajne razlike ($p<0,05$) između skupina po danima označene su različitim malim slovima abecede (a, b, c).

Slika 12. Zastupljenost monocita (srednja vrijednost±SD) u populaciji leukocita u krvi pilića po danima tijekom pokusa.*

5.4.7. Eozinofilni i bazofilni granulociti

Zastupljenost eozinofila i bazofila u krvi je mala i tijekom čitavog istraživanja vrijednosti su unutar fizioloških granica u svih skupina, a rezultati su prikazani u tablici 14. te slikom 13. za eozinofile i slikom 14. za bazofile.

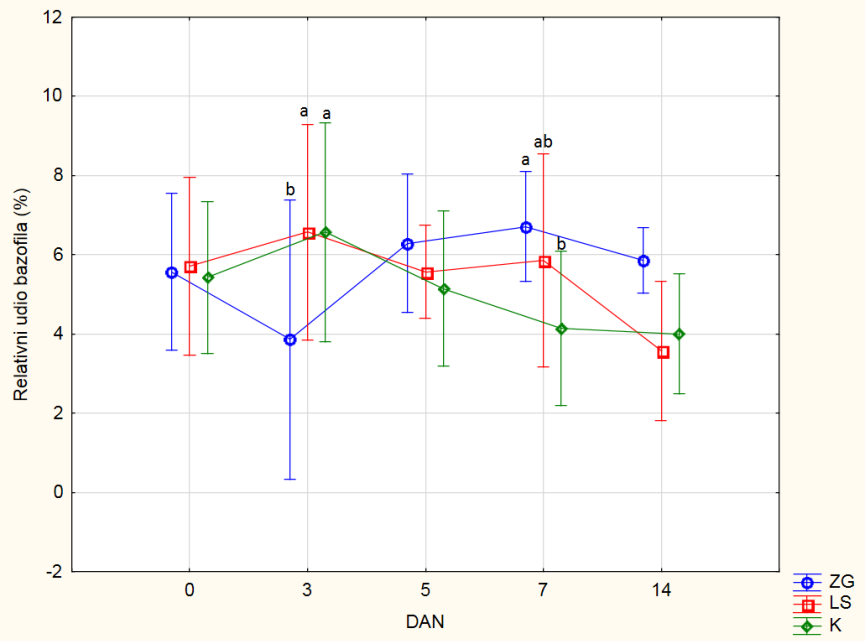
Udio eozinofila u svih skupina pokazuje istu tendenciju, ali bez statistički značajnih razlika među njima: raste do trećeg dana, pada do petog zatim ponovo raste do sedmog dana i pada do kraja pokusa. Treći dan udio eozinofila je niži u skupina imuniziranih pilića u odnosu na kontrolu, a najniži je u ZG skupine. Peti dan vrijednosti svih skupina su najniže tijekom pokusa i međusobno gotovo jednake. Sedmi dan zastupljenost eozinofila je ponovo najviša u kontrolne skupine te je viša u ZG nego u LS skupini. Unatoč padu vrijednosti do 14. dana, odnos udjela eozinofila među skupinama je isti kao i sedmi dan.



*Statistički značajne razlike ($p<0,05$) između skupina po danima označene su različitim malim slovima abecede (a, b, c).

Slika 13. Zastupljenost eozinofila (srednja vrijednost±SD) u populaciji leukocita u krvi pilića po danima tijekom pokusa.*

Udio bazofila do trećeg dana pada u ZG skupine, najniži je i značajno je niži nego u LS i kontrolne skupine (LS p=0,03, K p=0,03) u kojih je porastao i približno je istih vrijednosti. Peti dan njihov udio je viši u imuniziranih pilića u odnosu na kontrolnu, te u ZG skupine u odnosu na LS skupinu. Sedmi dan odnos udjela bazofila u populaciji leukocita je ista kaoi peti dan, ali statistički značajno veći u ZG skupini u odnosu na kontrolu. Na kraju pokusa zastupljenost bazofila je najveća u ZG skupini, te veća u kontrolnoj nego li u LS skupini.



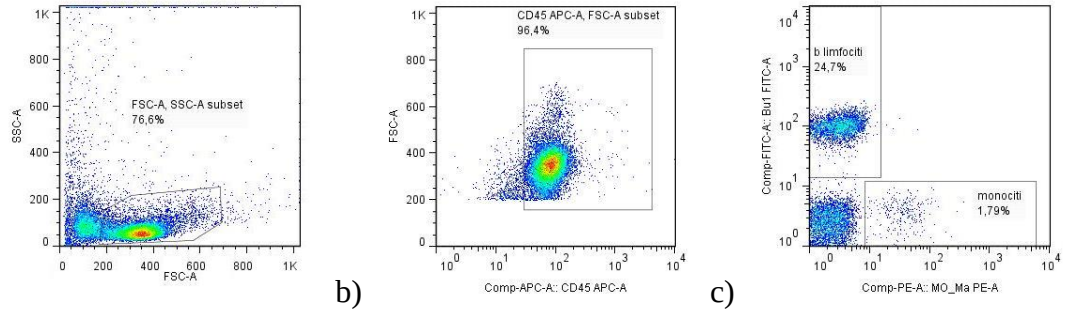
*Statistički značajne razlike (p<0,05) između skupina po danima označene su različitim malim slovima abecede (a, b, c).

Slika 14. Zastupljenost bazofila (srednja vrijednost±SD) u populaciji leukocita u krvi pilića po danima tijekom pokusa.*

5.5. Imunofenotipizacija

Rezultati imunofenotipizacije krvi pilića protočnom citometrijom prikazani su tablicama 14. i 15., te slikama 15. do 24..

5.5.1. Zastupljenost pojedinih subpopulacija leukocita u krvi pilića



a) b) c)

Slika 15. Postavljanje elektronskih okvira za mjerenje subpopulacija leukocita. **a)** elektronski okvir postavljen je oko populacija leukocita definiranih na temelju veličine (FCS) i zrnatosti (SSC) stanica **b)** Leukociti su dalje ograđeni na temelju ispoljavanja biljega CD45 **c)** subpopulacije B limfocita i monocita su izdvojene na dvoparametrijskom dijagramu fluorescencije biljega Bu1 i Mo/Mf.

Kvantitativne odnose subpopulacija leukocita (monocita, B-i T-limfocita) u perifernoj krvi pilića prikazali smo kao relativni udio tj. zastupljenost (%) tih populacija u populaciji leukocita ($CD45^+$ stanice = 100%), nakon oduzimanja pozadinskog bojenja i autoflorescencije samih stanica. U tu svrhu koristili smo obilježavanje stanica monoklonskim protutijelima (mPt) za pileće leukocitne površinske biljege konjugirane s fluorokromima koje smo odabrali za leukocitni panel. Slika 15. prikazuje zadane okvire za određivanje monocita, T- i B- limfocita.

Na temelju veličine stanica (FSC) i zrnatosti (SSC) izdvojili smo stanice koje odgovaraju leukocitima i potvrdili pomoću očitavanja fluorescencije istovjetne florokromu koje je konjugirano na mPT. U nastavku smo iz tog okvira odabrali $CD45^+$ stanice i dalje diferencirali u istom okviru, na temelju očitovanja fluorescencije za njihove specifične biljege: Bu-1 za B-limfocite, Mo/Mf za monocite i CD3 za T-limfocite (nije prikazano).

Tablica 14. Leukocitni panel – relativni udio (%) subpopulacija leukocita (srednja vrijednost±SD) u krvi pilića po danima tijekom pokusa.*

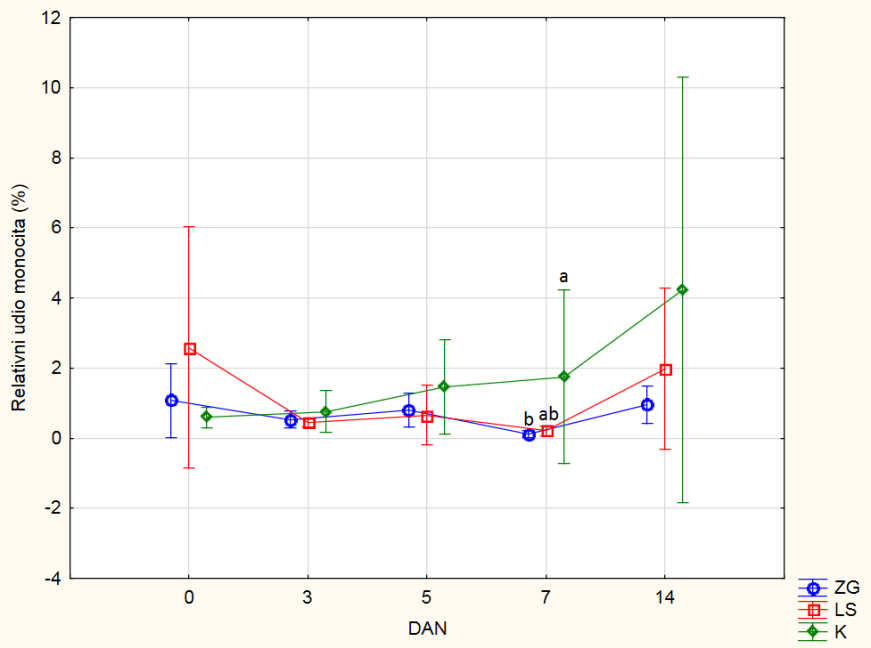
Subpopulacija leukocita	Skupina	Uzorkovanje (dpi)				
		0	**3**	**5**	**7**	**14**
MONOCITI	ZG	1,08±0,86	0,53±0,20	0,81±0,31	0,12±0,08	0,96±0,43**b**
	LS	2,59±2,78	0,44±0,09	0,66±0,69	0,21±0,12	1,98±1,84**ab**
$CD45^+Mo/Mf^+$	K	0,59±0,23	0,76±0,48	1,46±1,09	1,752±1,99	4,23±4,89**a**
B LIMFOCITI	ZG	25,54±3,58	34,66±6,93**a**	23,00±7,86	26,82±6,33	31,70±9,98
	LS	19,76±5,68	34,94±6,06**a**	29,70±6,54	28,92±6,74	27,02±4,91
$CD45^+Bu\text{-}1^+$	K	22,78±2,94	24,08±3,94**b**	28,74±3,96	29,52±2,57	24,74±6,23
T LIMFOCITI	ZG	60,40±6,84**b**	59,90±10,88**b**	73,75±6,61**a**	70,00±6,99	60,32±10,59
	LS	65,82±8,25**ab**	62,78±6,62**b**	64,92±7,38**ab**	69,24±7,17	62,82±5,12
$CD45^+CD3^+$	K	68,96±3,19**a**	72,06±3,84**a**	58,70±0,87**b**	63,84±1,82	62,56±6,43

* Statistički značajne razlike između skupina po danima označene su različitim malim slovima abecede (a, b, c…);
**dpi= dani poslije imunizacije

5.5.1.1. Monociti

Rezultate relativnog udjela monocita ($CD45^{+}Mo/Mf^{+}$) u krvi prikazali smo tablicom 14. i slikom 16.. Vrijednosti su se tijekom pokusa kretale u fiziološkim granicama, ali bile su više u kontrolnoj u usporedbi s pokusnim skupinama. Kod ZG skupine udio monocita blago pada do trećeg dana, raste do petog dana, zatim ponovo pada do sedmog dana i naglo raste do kraja pokusa. Kod LS skupine udio monocita naglo pada do trećeg dana pokusa, zatim blago raste do petog, ponovo pada do sedmog dana te naglo raste do kraja pokusa. Kontrolna skupina bilježi konstantan rast udjela monocita unutar fizioloških granica tijekom čitavog pokusa.

Udio monocita u imuniziranih skupina pada do trećeg dana i niži je nego u kontrolne skupine, dok među pokusnim skupinama gotovo nema razlike. Peti dan nešto je viši u ZG nego u LS skupine, ali i dalje najveći u kontrolne skupine. Sedmi dan udio pada kod imuniziranih skupina, dok kod kontrolne dalje raste i statistički značajno veći ($p=0,011$) je u odnosu na skupinu ZG, ali ne i LS (Slika 16.). Do 14. dana taj broj još dodatno raste kod svih skupina, kod kontrolne K je opet najveći, ali bez značajnih razlika, te veći u LS u odnosu na ZG skupinu.



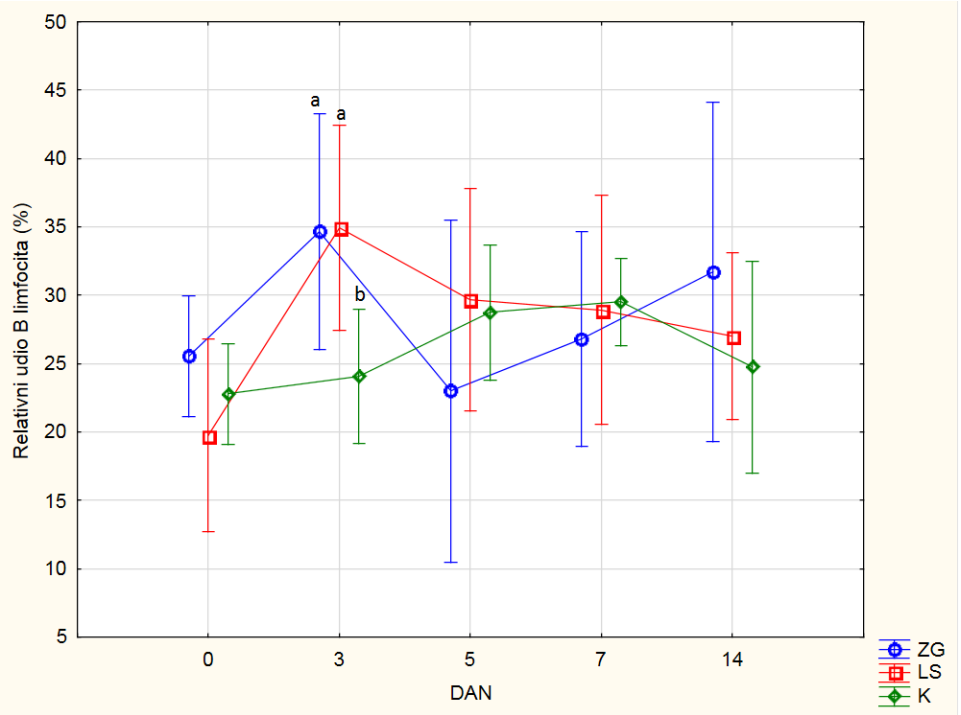
*Statistički značajne razlike ($p<0,05$) između skupina po danima označene su različitim malim slovima abecede (a, b, c).

Slika 16. Relativni udio (%) monocita (srednja vrijednost±SD) u krvi pilića po danima tijekom pokusa.*

5.5.1.2. B- limfociti

Relativni udio B limfocita ($CD45^+$ $Bu\text{-}1^+$) prikazali smo tablicom 14. i slikom 17. Zastupljenost B-limfocita u krvi pilića ZG skupine raste do trećeg dana, pada do petog dana i zatim ponovo raste do kraja pokusa. Kod LS skupine njihov udio raste do trećeg dana, zatim pada do petog, gotovo je na istoj razini do sedmoog dana i ponovo pada do kraja pokusa. Udio B-limfocita u krvi pilića K skupine raste postupno do sedmog dana, a zatim pada do kraja pokusa.

Kod obje imunizirane skupine udio B-limfocita naglo raste do 3. dana pokusa te je značajno veći (ZG p=0,006, LS p=0,005) u odnosu na kontrolnu skupinu, a među njima gotovo se ne razlikuje. Nakon trećeg dana taj broj kod pokusnih skupina opada, naročito kod skupine ZG, kada je najmanji, dok je kod LS skupine veći nego u K. Sedmog dana zastupljenost kod imuniziranih skupina je niža nego u kontrolne i veća u LS nego u ZG skupine. Na kraju pokusa 14. dana najveća je u ZG skupine, manja u LS i najmanja u K, ali bez značajnih razlika.



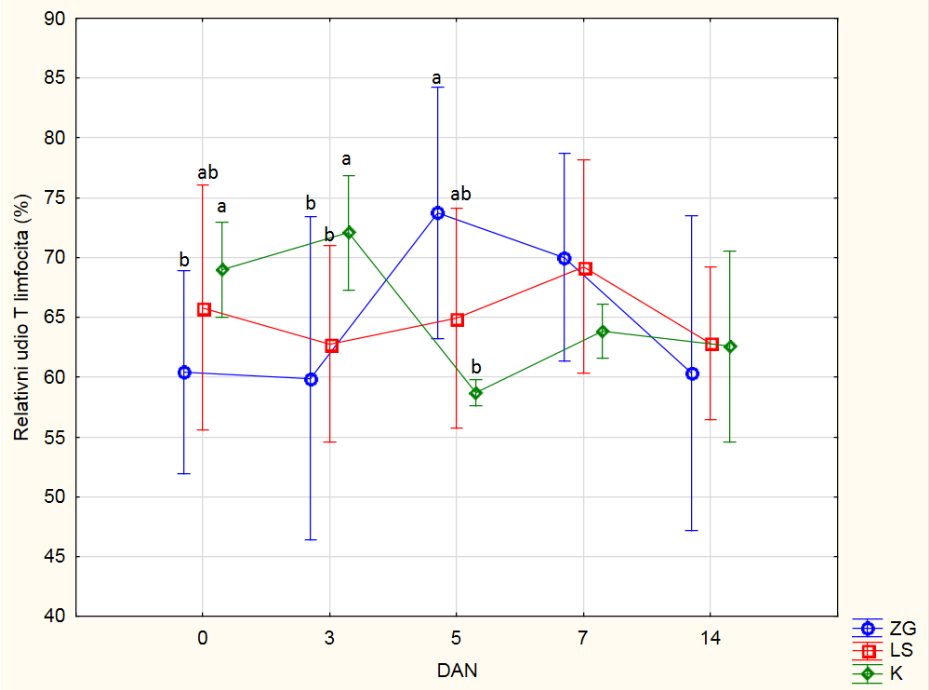
*Statistički značajne razlike (p<0,05) između skupina po danima označene su različitim malim slovima abecede (a, b, c).

Slika 17. Relativni udio (%) B limfocita (srednja vrijednost±SD) u krvi pilića po danima tijekom pokusa. *

5.5.1.3. T-limfociti

Relativni udio T limfocita ($CD45^+CD3^+$) prikazan je u tablici 14. i slici 18.. Vrijednosti kod ZG skupine blago padaju do trećeg dana, zatim naglo rastu do petog dana, padaju do sedmog dana te dalje naglo do kraja pokusa. Kod LS skupine udio T-limfocita pada do trećeg dana, postupno raste do sedmog dana i opet pada do kraja pokusa. Kod kontrolne skupine njihov udio raste do trećeg dana, naglo pada do petog dana, ponovo raste do sedmog dana i blago pada do 14. dana.

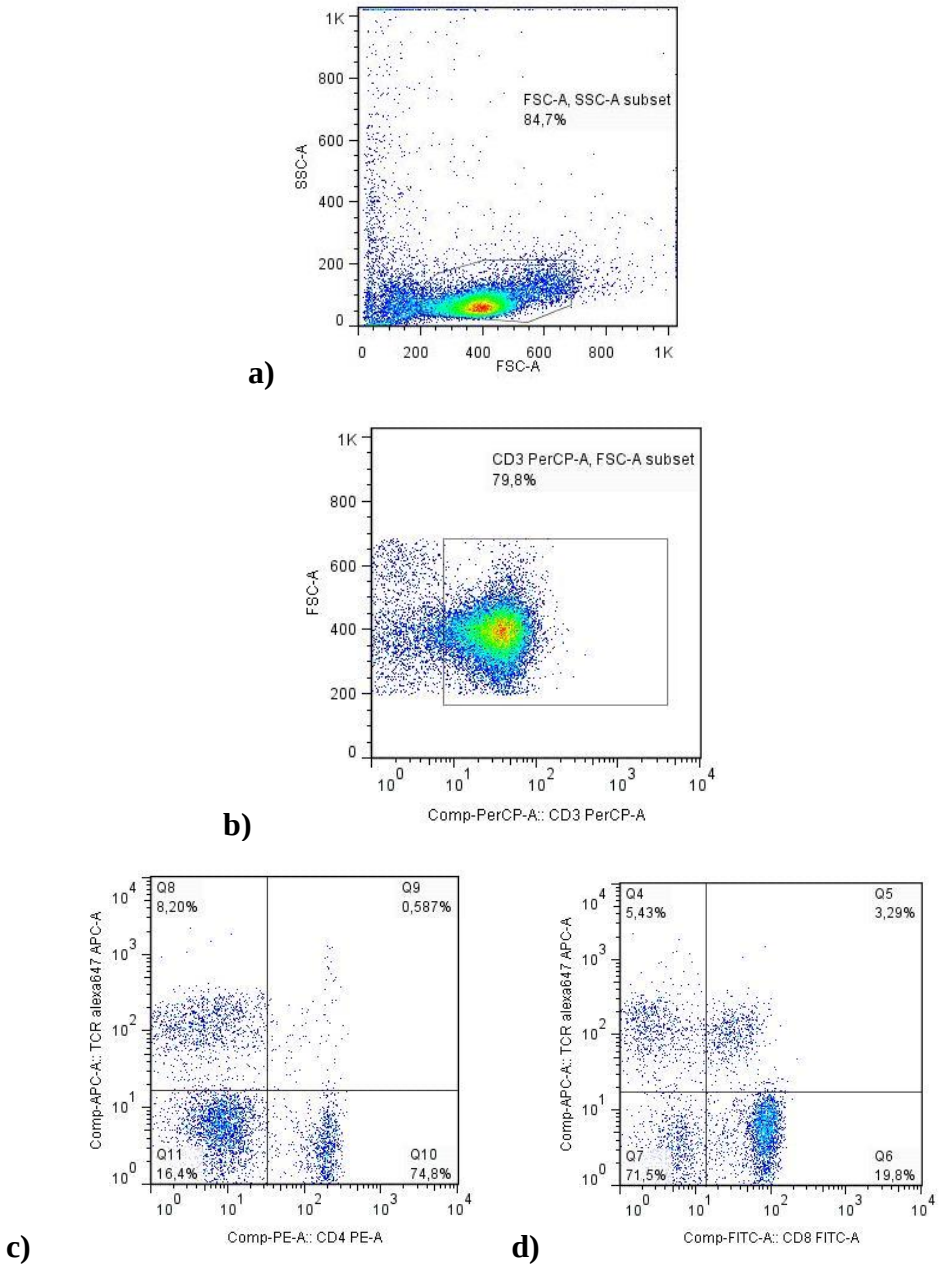
Na samom početku pokusa značajno je veći (p=0,05) udio T-limfocita kod K skupine u odnosu na pokusnu ZG, ali ne i LS skupinu, i veći je kod LS skupine nego u ZG. Trećeg dana pokusa kontrolna skupina K značajno je veći (ZG p=0,006, LS p=0,034) u odnosu na obje pokusne skupine, a udio T-limfocita najniži je u ZG skupine i niži u odnosu na LS skupinu. Petog dana istraživanja relativni udio T limfocita kod kontrolne skupine naglo opada, a kod pokusne ZG naglo raste te se međusobno značajno razlikuju (p=0,001) dok se pokusna skupina LS nalazi između navedenih vrijednosti i značajno se ne razlikuje od istih. Do kraja pokusa taj broj postupno opada kod skupine ZG i LS, a blago raste kod kontrolne skupine. Sedmog dana veći je u ZG nego u LS skupine, odnosno na kraju pokusa najniži u ZG, dok je zastupljenost viša i međusobno gotovo ista u LS i K skupina.



*Statistički značajne razlike (p<0,05) između skupina po danima označene su različitim malim slovima abecede (a, b, c).

Slika 18. Relativni udio (%) T limfocita (srednja vrijednost±SD) u krvi pilića po danima tijekom pokusa.*

5.5.2. Relativna zastupljenost pojedinih subpopulacija T-limfocita u krvi pilića



Slika 19. Postavljanje elektronskih okvira za mjerenje subpopulacija T- limfocita. **a)** elektronski okvir postavljen je oko populacije leukocita definiranih na temelju veličine (FCS) i zrnatosti (SSC) stanica **b)** T-limfociti su izdvojeni na temelju ispoljavanja biljega CD3 **c i d)** daljnja analiza usmjerena je na subpopulaciju γδ TCR^+ limfocita i određivanje frekvencija c) pomoćničkih ($CD4^+$) i d) citotoksičnih ($CD8^+$) T-limfocita koji imaju taj TCR i koji nemaju taj TCR.

Kvantitativne odnose subpopulacija T-limfocita (γδTCR+ T-limfocita i αβ TCR+ T-limfocita, te pomoćničkih ($CD4^+$) i citotoksičnih ($CD8^+$) T-limfocita) u perifernoj krvi pilića prikazali smo kao relativnu zastupljenost (%) tih populacija u populaciji T-limfocita ($CD3^+$stanice = 100%), nakon oduzimanja pozadinskog bojanja i autoflorescencije samih stanica. U tu svrhu koristili smo obilježavanje stanica mPt za

pileće leukocitne površinske biljege od interesa konjugirane s fluorokromima koje smo odabrali za T-limfocitni panel (Slika 19.).

Na temelju veličine stanica (FSC) i zrnatosti (SSC) izdvojili smo leukocite (Slika 19.a) i iz njih izdvojili populaciju T-limfocita pomoću očitavanja fluorescencije istovjetne florokromu koje je konjugirano na mPT za pileći CD3 antigen. U nastavku smo iz dobivenog novog okvira (slika 19.b) ogradili $CD3^+$ stanice i dalje diferencirali u dva okvira (Slika 19. c i d), na temeju očitovanja fluorescencije za njihove specifične biljege: TCR1 za γδTCR subpopulaciju T-limfocita, CD4 za pomoćničke (Th-) i CD8 za citotoksične (Tc-) T-limfocite. Relativni udio subpopulacije αβ TCR^+ T-limfocita odredili smo kao $CD3^+TCR1^-$ populaciju u okviru b na slici 19..

Tablica 15. T-limfocitni panel – relativni udio (%) pojedinih subpopulacija T-limfocita (srednja vrijednost±SD) u krvi pilića po danima tijekom pokusa.*

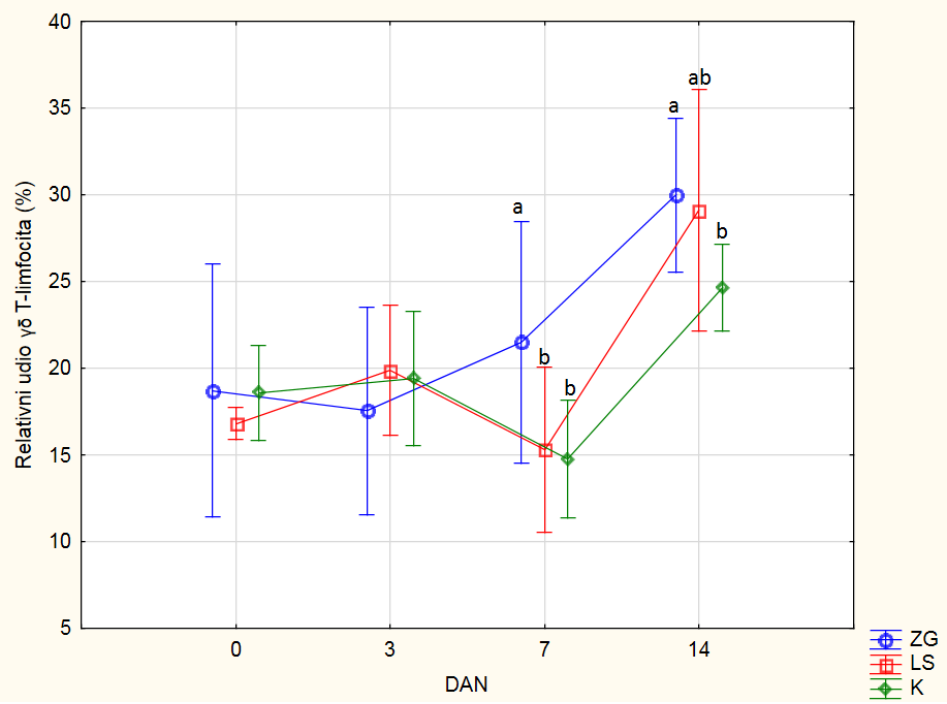
Subpopulacija T-limfocita	**Skupina**	**Uzorkovanje (dpi**)**				
		0	**3**	**5**	**7**	**14**
T LIMFOCITI	ZG	60,40±6,84**b**	59,90±10,88**b**	73,75±6,61**a**	70,00±6,99	60,32±10,59
$CD45^+$ $CD3^+$	LS	65,82±8,25**ab**	62,78±6,62**b**	64,92±7,38**ab**	69,24±7,17	62,82±5,12
Leukocitni panel	K	68,96±3,19**a**	72,06±3,84**a**	58,70±0,87**b**	63,84±1,82	62,56±6,43
γδ T-limfociti	ZG	18,72±5,89	17,54±4,82	N/A	21,48±5,61**a**	29,98±3,59**a**
	LS	16,82±0,76	19,90±3,03	N/A	15,31±3,85**b**	29,10±5,61**ab**
$CD3^+TCR1^+$	K	18,56±2,20	19,42±3,12	N/A	14,76±2,74**b**	24,64±2,03**b**
αβ T-limfociti	ZG	81,28±5,89	82,66±4,78	N/A	78,52±5,61**b**	70,02±3,59**b**
	LS	83,18±0,76	80,10±3,03	N/A	84,69±3,85**a**	70,90±5,61**ab**
$CD3^+TCR\ 1^-$	K	81,44±2,20	80,58±3,12	N/A	85,22±2,73**a**	75,36±2,03**a**
γδ Th-limfociti	ZG	0,52±0,49	0,63±0,24**a**	N/A	0,86±0,07**b**	2,10±0,54**a**
	LS	0,40±0,29	0,39±0,13**ab**	N/A	1,22±0,45**ab**	1,20±0,54**ab**
$CD3^+TCR1^+CD4^+$	K	0,44±0,22	0,21±0,14**b**	N/A	1,68±0,11**a**	0,65±0,41**b**
	ZG	20,06±0,74	14,54±3,14	N/A	15,30±4,57	19,36±4,17
γδ Tc-limfociti $CD3^+TCR1^+CD8^+$	LS	22,04±3,78	18,82±6,18	N/A	18,74±5,58	20,82±10,98
	K	21,50±5,80	14,82±4,09	N/A	14,60±3,61	14,16±5,12
αβ Th-limfociti	ZG	76,02±2,60	81,20±3,57	N/A	78,24±10,13	64,90±5,07**b**
	LS	75,72±5,50	80,48±1,67	N/A	77,76±3,71	72,24±5,51**ab**
$CD3^+TCR1^-CD4^+$	K	80,72±4,54	80,74±4,83	N/A	77,90±3,73	76,40±9,57**a**
	ZG	21,18±1,83	16,30±3,49	N/A	15,40±4,01	30,38±5,75**a**
αβ Tc-limfociti $CD3^+TCR1^-CD8^+$	LS	21,68±5,37	16,40±1,84	N/A	18,70±3,42	24,68±4,38**ab**
	K	16,12±5,06	16,66±4,50	N/A	17,26±3,19	19,88±7,81**b**

*Statistički značajne razlike ($p<0,05$) između skupina po danima označene su različitim malim slovima abecede (a, b, c); ** dpi= dani poslije imunizacije

5.5.2.1. γδ T - limfociti

Relativni udio γδ T - limfocita (TCR 1^+) prikazali smo tablicom 15. i slikom 20.. Analiza rezultata pokazala je da njihova zastupljenost u populaciji T-limfocita u svih skupina ima tendenciju značajnog porasta u drugom tjednu pokusa. Zastupljenost γδ T - limfocita kod pokusne skupine ZG blago pada do trećeg dana, zatim raste do sedmog dana, taj porast je naglašen u razdoblju od sedmog do 14. dana. Kod LS skupine njihova zastupljenost raste do trećeg dana, pada do sedmog, zatim naglo raste do kraja pokusa. Relativni udio γδ T – limfocita bilježi blagi rast do trećeg dana, pada do sedmog dana pa naglo raste do 14. dana.

Relativni udio populacije γδ T - limfocita trećeg dana najveća je u skupine LS, najniža u ZG skupine, a vrijednosti K skupine su između ovih krajnjih vrijednosti. Sedmog dana udio γδ T - limfocita veći je u obje imunizirane skupine u odnosu na kontrolu te značajno veći kod ZG u odnosu na skupinu LS (p=0,016) i K (p=0,009) kod kojih taj broj pada ispod početnih vrijednosti. Do 14. dana zastupljenost intenzivno raste u svih skupina, veća je u obje pokusne skupine u usporedbi s kontrolom, ali se značajno razlikuje samo kod skupine ZG (p=0,036) u odnosu na kontrolnu skupinu K (Slika 20.) i nešto je veća nego u LS skupine.



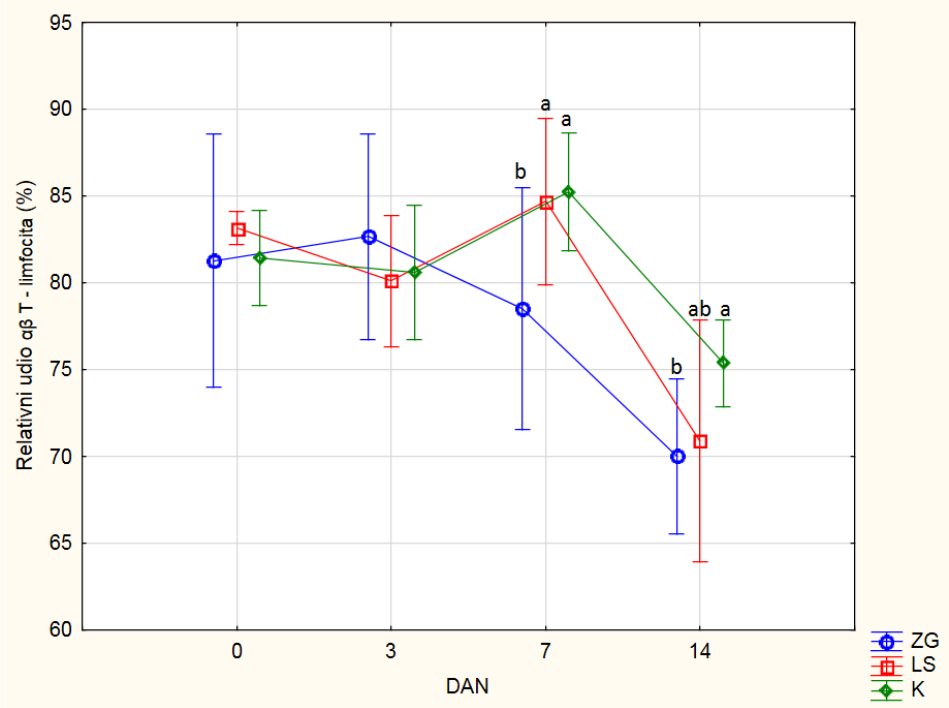
*Statistički značajne razlike (p<0,05) između skupina po danima označene su različitim malim slovima abecede (a, b, c).

Slika 20. Relativni udio (%) γδ T - limfocita (srednja vrijednost ±SD) u krvi pilića po danima tijekom pokusa.*

5.5.2.2. αβ T-limfociti

Rezultati relativnog udjela αβ T-limfocita ($TCR1^-$, αβ 1- i αβ 2-TCR), prikazani su tablicom 15. i slikom 21., a suprotni su onima TCR 1^+ populacije na prethodnoj stranici. Relativni udio oba αβ T-limfocita u ZG skupine raste do trećeg dana, zatim pada do sedmog dana i nastavlja naglo padati do kraja pokusa. Kod LS skupine njihov udio pada do trećeg dana, zatim raste do sedmog dana pa opet naglo pada do 14. dana. Zastupljenost u kontrole je gotovo na istoj razini do trećeg dana, potom raste do sedmog dana i pada do kraja pokusa.

Relativni udio αβ T-limfocita trećeg dana nakon imunizacije najveći je u ZG skupine, a najniži u LS skupine, dok je nešto viši u kontrolne. Njihov udio naglo pada u ZG do sedmog dana istraživanja te dolazi do značajnih razlika između ZG skupine i ostalih skupina(LS p=0,016, K p=0,009), raste u LS i K, a naviši je u K skupine. Do kraja istraživanja njihov udio se smanjuje u svih skupina, najniži je u ZG skupine i značajno niži (p=0,036) nego u kontrolne skupine K.



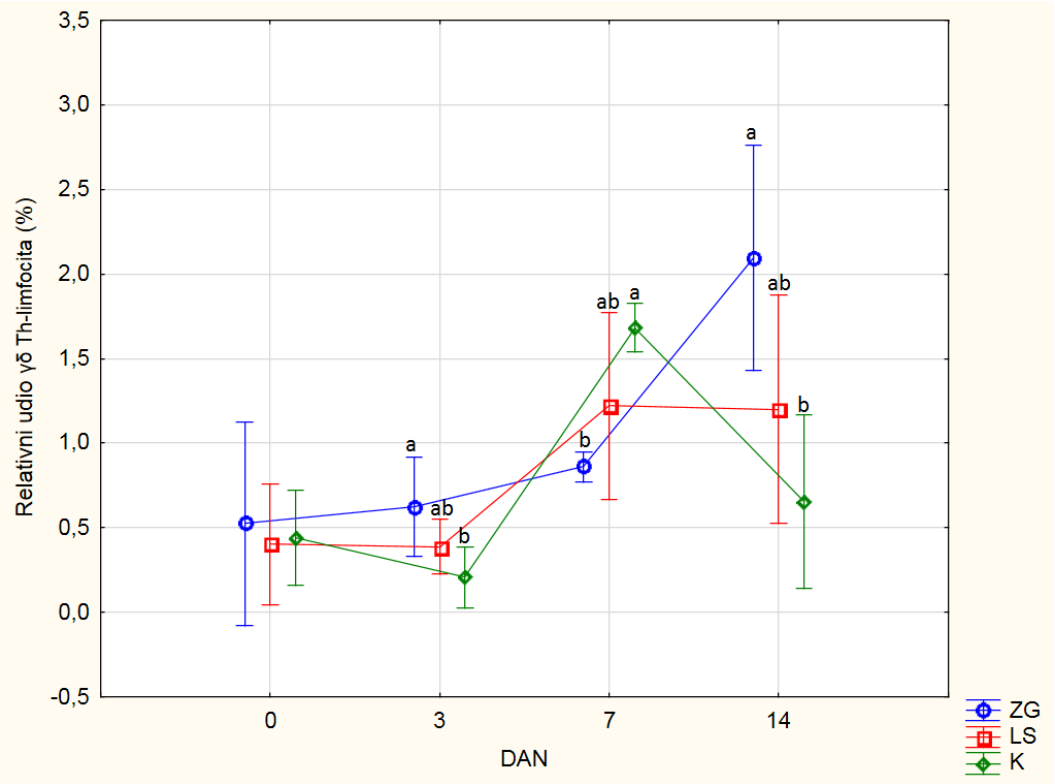
*Statistički značajne razlike (p<0,05) između skupina po danima označene su različitim malim slovima abecede (a, b, c).

Slika 21. Relativni udio (%) αβ T-limfocita (srednja vrijednost±SD) u krvi pilića po danima tijekom pokusa.*

5.5.2.3. γδ Th-limfociti

Relativni udio γδ pomoćničkih Th-limfocita ($CD3^+TCR1^+CD4^+$) prikazan je u tablici 15. i slikom 22. Kod ZG skupine raste tijekom čitavog istraživanja. Kod LS skupine njihova zastupljenost se gotovo ne mijenja do trećeg dana, raste do sedmog dana, i ostaje na istoj razini do kraja pokusa. Kod kontrolone skupine njihov udio pada do trećeg dana, zatim naglo raste do sedmog i opet pada do kraja pokusa.

Trećeg dana pokusa relativni udio γδ pomoćničkih Th-limfocita veći je u imuniziranih skupina nego u kontrolne, najveći je kod pokusne skupine ZG te se značajno razlikuje od kontrolne skupine K (p=0,008), dok se skupina LS značajno ne razlikuje od navedenih skupina. Potom dolazi do naglog porasta postotnog udjela kod kontrolne skupine te je njihova razina značajno veća od pokusne ZG skupine (p= 0,02), ali ne i od LS skupine. Do 14. dana taj udio kod kontrolne skupine naglo opada, a kod ZG skupine nastavlja rasti te se značajno razliku (p=0,007), dok u odnosu na LS skupinu, koja je na istoj razini, nema značajnih razlika.



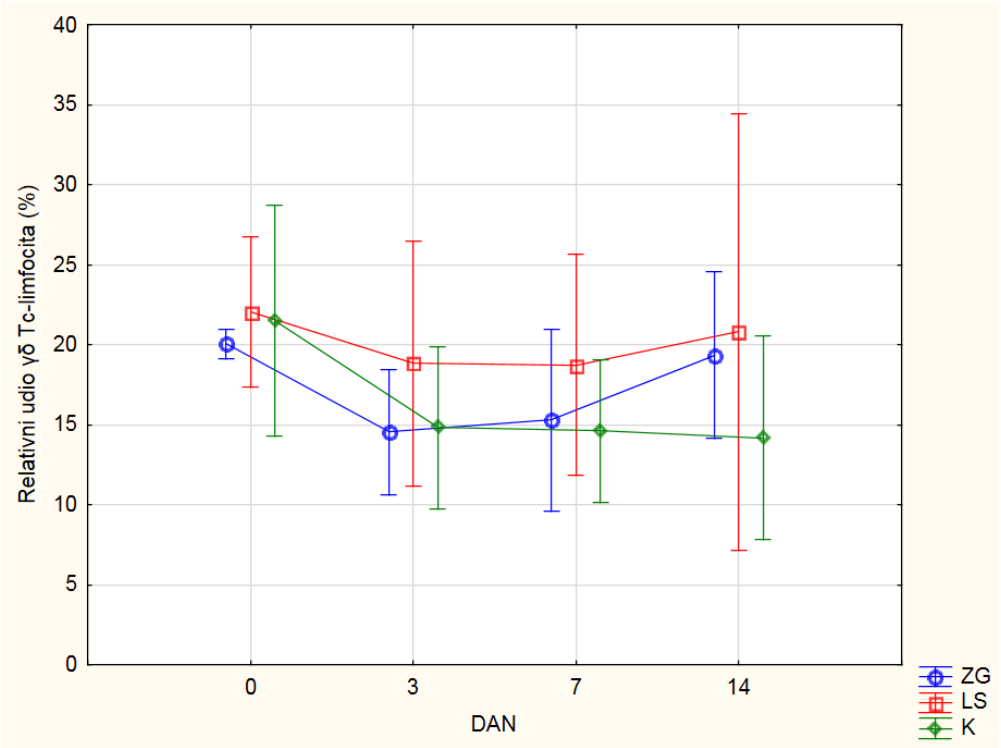
*Statistički značajne razlike (p<0,05) između skupina po danima označene su različitim malim slovima abecede (a, b, c).

Slika 22. Relativni udio (%) γδ Th-limfocita (srednja vrijednost±SD) u krvi pilića po danima tijekom pokusa.*

5.5.2.4. γδ Tc-limfociti

Postotni udio γδ citotoksičnih Tc-limfocita ($CD3^+TCR1^+$ $CD8^+$) prikazali smo u tablici 15. i slici 23., ne mijenja se značajno tijekom istraživanja te nema značajnih razlika između skupina. Kod ZG skupine pada do trećeg dana, zatim postupno raste do kraja pokusa. Kod LS skupine njihov udio blago pada, ostaje na istoj razini do sedmog dana i ponovo raste do kraja istraživanja. Kod kontrole njihov udio naglo pada do trećeg dana, ostaje gotovo nepromijenjen do sedmog dana i blago pada do kraja pokusa.

Tijekom čitavog istraživanja udio γδ Tc-limfocita najveći je u LS skupine. Trećeg dana najniži je u ZG skupine, ali tek nešto niži od kontrolne. Sedmog dana je veći u obje imunizirane skupine, ali je razlika gotovo neznatna između ZG i K skupina. Na kraju pokusa je i dalje veći u pokusnih skupina, ali se razlika između ZG i K povećala. a LS je još uvijek veća nego u ZG skupine.



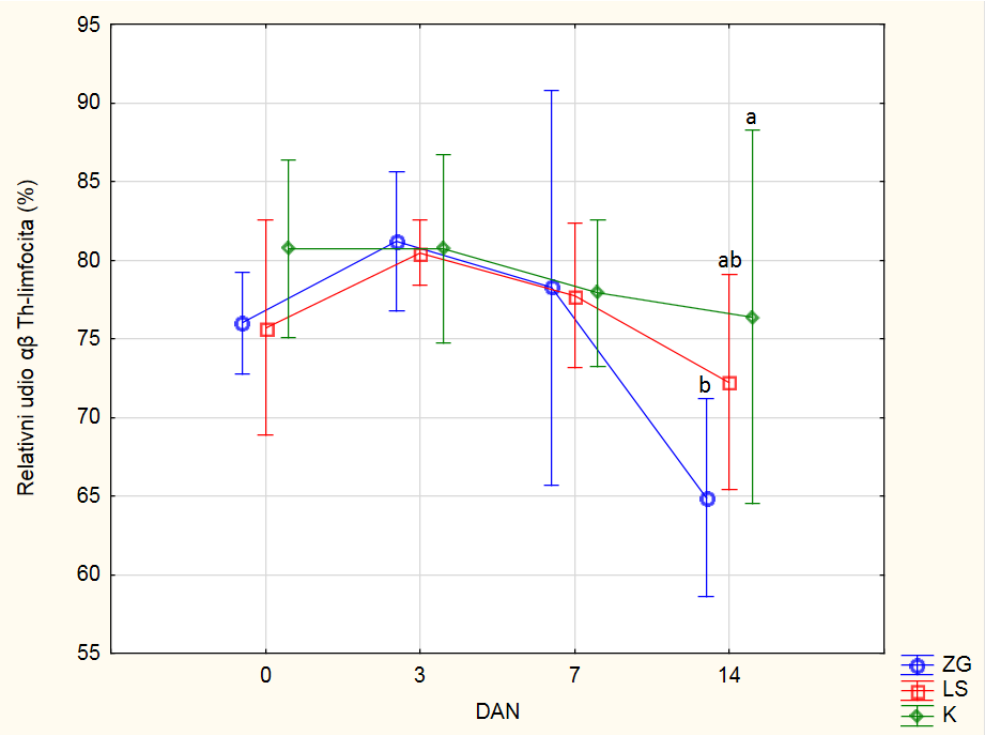
*Statistički značajne razlike ($p<0,05$) između skupina po danima označene su različitim malim slovima abecede (a, b, c).

Slika 23. Relativni udio (%) γδ Tc-limfocita (srednja vrijednost±SD) u krvi pilića po danima tijekom pokusa. *

5.5.2.5. αβ Th-limfociti

Relativni udio αβ Th-limfocita ($CD3^+TCR1^-CD4^+$) zabilježeni su u tablici 15. i prikazani na slici 24.. Njihova zstupljenost u ZG skupine raste do trećeg dana, pada do sedmog dana i nastavlja naglo padati do kraja istraživanja. Njihova zastupljenost kod LS skupine raste do trećeg dana, potom pada dokraja istraživanja. Kod kontrole njihov udio je na istoj razini do trećeg dana, a zatim pada do kraja pokusa.

Trećeg dana pokusa udio αβ Th-limfocita raste u imuniziranih, veći je u ZG, a manji u LS skupine u odnosu na K skupinu te LS u odnosu na ZG skupinu. Do sedmog dana istraživanja pada u svih skupina, najniži je u LS skupine dok je u ZG i K skupine gotovo na istoj razini. Na kraju pokusa taj broj naglo opada kod ZG skupine i značajno je manji od kontrolne skupine K (p=0,002), dok je kod LS skupine niži od K, ali viši od ZG skupine.



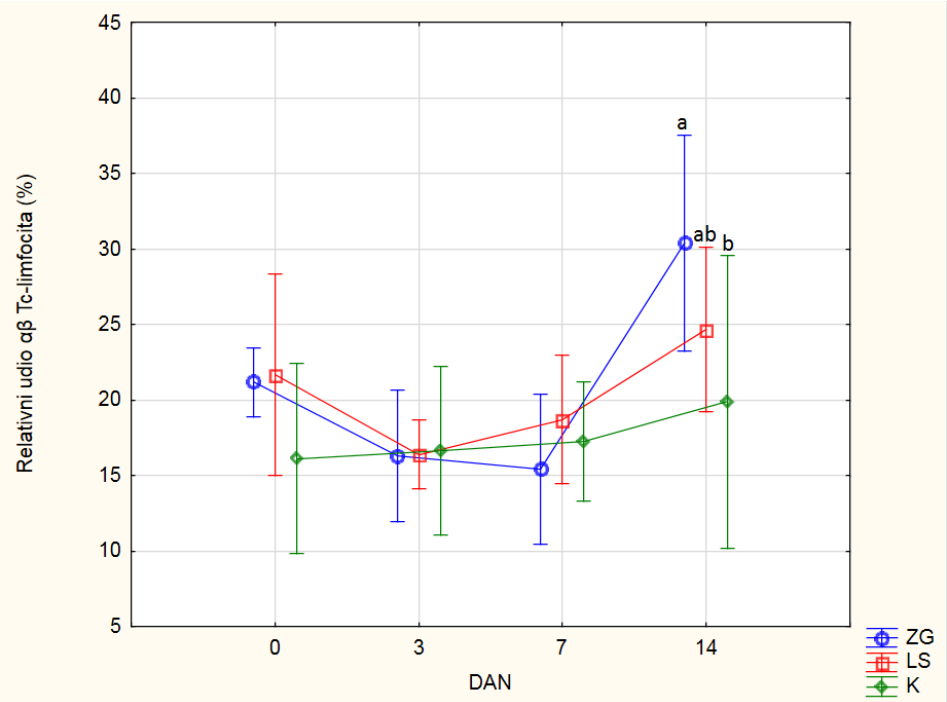
*Statistički značajne razlike (p<0,05) između skupina po danima označene su različitim malim slovima abecede (a, b, c).

Slika 24. Relativni udio (%) αβ Th-limfocita (srednja vrijednost±SD) u krvi pilića po danima tijekom pokusa.*

5.5.2.6. αβ Tc-limfociti

Relativni udio αβ Tc-limfocita ($CD3^+TCR1^-CD8^+$) prikazali smo u tablici 15. i slikom 25.. Kod ZG skupine njihov udio pada do sedmog dana, a zatim naglo raste do kraja pokusa. Kod LS skupine njihov udio pada do trećeg dana, a zatim postupno raste do kraja pokusa. Kod kontrolne skupine relativni udio raste od početka do kraja pokusa.

Trećeg dana relativni udio αβ TCR Tc-limfocita pada u imuniziranih skupina i gotovo je na istoj razini među svim skupinama. Sedmog dana najveći je u LS skupine, najmanji u ZG skupine, a kod kontrolne je na istoj razini i vrijednostima između pokusnih skupina. Do kraja pokusa njihov udio kod pokusne skupine ZG naglo raste i značajno je veći od kontrolne skupine K (p=0,0006), a kod skupine LS je veći nego u K, ali manji nego u ZG skupine.



*Statistički značajne razlike (p<0,05) između skupina po danima označene su različitim malim slovima abecede (a, b, c).

Slika 25. Relativni udio (%) αβ Tc-limfocita (srednja vrijednost±SD) u krvi pilića po danima tijekom pokusa.*

5.6. Ispoljavanje gena za IFN-α i IFN-γ

Rezultati relativne promjene ispoljavanja gRNK za IFN-α i IFN-γ u uzorcima slezene pilića prikazani su tablicom 15. i slikama 26. i 27..

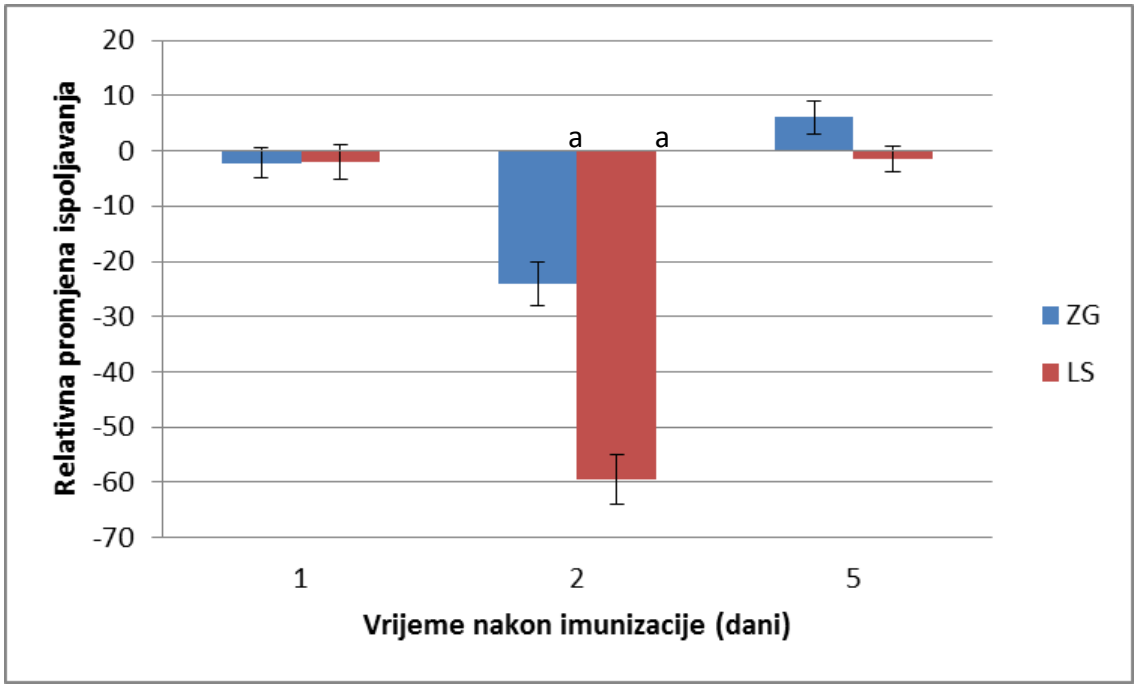
Tablica 16. Relativna promjena ispoljavanja gRNK za IFN-α i IFN-γ kod skupina ZG i LS (srednja vrijednost±SE) normaliziranih u odnosu na kontrolnu (kalibrator) skupinu s razinom ispoljavanja 0.*

gRNK	SKUPINA	Vrijeme nakon imunizacije (dpi**)							
		0,25	**0,5**	**1**	**2**	**3**	**5**	**7**	**14**
IFN- α	**ZG**	N/A***	N/A	-2,23±2,73	-24,1±3,88**a**	N/A	6,03±2,96	N/A	N/A
	LS	N/A	N/A	-2,01±3,17	-59,5±4,43**a**	N/A	-1,54±2,33	N/A	N/A
	K	N/A	N/A	0	0**b**	N/A	0	N/A	N/A
IFN-γ	**ZG**	-3,55±3,23	-1,45±1,70	1,54±3,16	11,71±5,83	-1,66±2,36	2,71±2,75	-1,46±2,43	-1,36±3,43
	LS	-2,70±3,31	-1,59±2,02	1,47±3,49	6,52±6,02	-1,27±1,92	-1,91±2,46	-1,15±2,86	1,34±6,58
	K	0	0	0	0	0	0	0	0

*Statistički značajne razlike između skupina po danima označene su različitim malim slovima abecede (a,b,c); **dpi= dani poslije imunizacije; ***N/A= nema relevantnih podataka

5.6.1. Relativna promjena ispoljavanja gena IFN-α

Za relativnu promjenu ispoljavanja gRNK IFN-α u slezeni dobiveni su relevantni podaci za 1, 2 i 5 dana nakon početka pokusa (Tablica 16. i Slika 26). Tijekom pokusa utvrđeno je manje ispoljavanje gRNK IFN-α u pokusnih skupina nego u kontrolne, ali nešto veće kod ZG skupine. Drugog dana utvrđeno je značajno manje ispoljavanje gRNK IFN-α kod obje pokusne skupine (ZG p=0,031, LS p=0,011) u odnosu na kontrolnu (kalibrator), ali jače kod LS skupine nego kod ZG skupine. Petog dana zabilježeno je jače ispoljavanje gRNK IFN-α u pokusnih skupina u odnosu na kontrolu i jače u ZG nego u LS skupine.

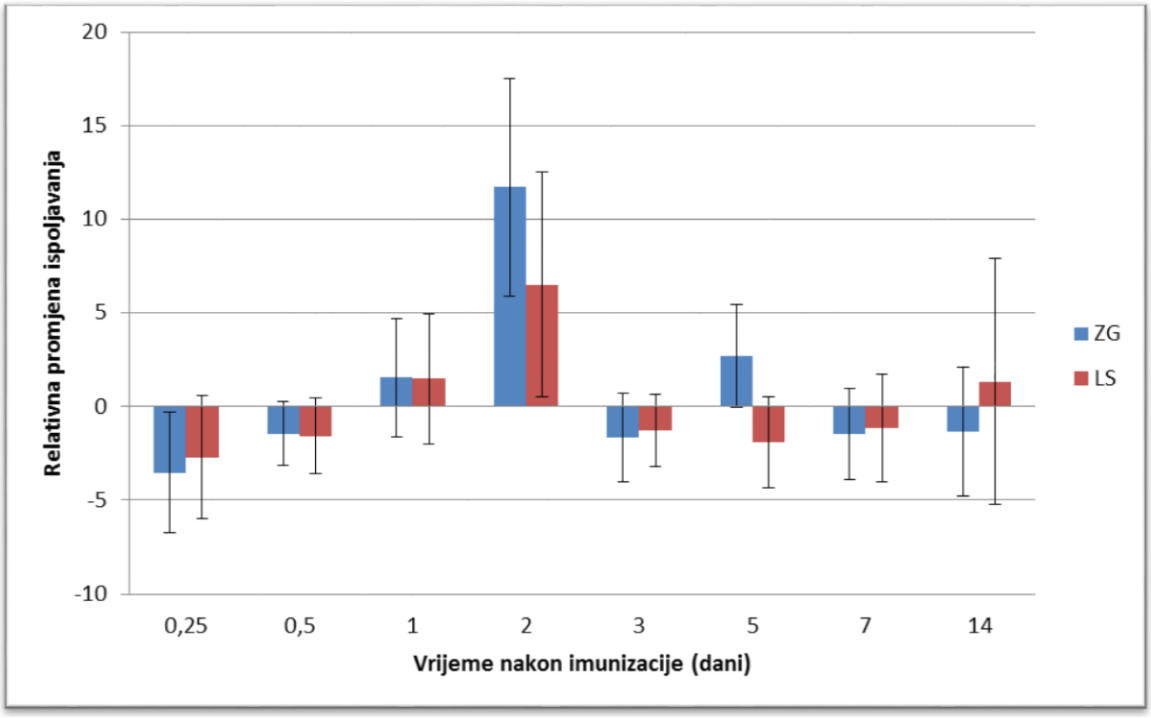


*Statistički značajne razlike između skupina po danima označene su različitim malim slovima abecede (a,b,c).

Slika 26. Relativna promjena ispoljavanja gRNK IFN-α (srednja vrijednost±SD) kod skupine ZG i LS u odnosu na kontrolnu skupinu čija je razina ispoljavanja 0.*

5.6.2. Relativna promjena ispoljavanja gena IFN- γ

Razina ispoljavanja gRNK IFN-γ je niža u pokusnih skupina nego u kontrolne u prvih šest sati nakon imunizacije, a najniža u ZG skupine. Razina ispoljavanja raste i već prvog dana je veća nego u kontrolne, a kod pokusnih skupina se ne razlikuje. Drugog dana je najveća za trajanja pokusa i to gotovo dvostruko u ZG skupine u odnosu na LS skupinu. Trećeg dana je ponovo manja nego u kontrolne skupine, a petog dana raste u ZG skupine i veća je nego u kontrole, dok je u LS skupine niža od kontrole. Sedmog dana je niža u obje pokusne skupine i gotovo bez razlike između njih, a na kraju pokusa ostaje na istoj razini u ZG skupine, dok u LS skupine raste i viša je nego u kontrolne skupine.



* Statistički značajne razlike između skupina po danima označene su različitim malim slovima abecede (a,b,c).

Slika 27. Relativna promjena ispoljavanja gRNK IFN-g (srednja vrijednost±SD) kod skupine ZG i LS u odnosu na kontrolnu skupinu (0).*

5.7. Količina VNB

Primjenom RT-qPCR u uzorcima ukupne RNK slezene nije utvrđeno umnažanje odsječka virusnih RNK, a time nije potvrđeno postojanje genoma VNB, odnosno samog virusa u slezenama pilića obje pokusne skupine, stoga rezultate posebno ne prikazujemo.

6. RASPRAVA

Newcastleska bolest trajna je prijetnja peradarskoj proizvodnji sa značajnim gospodarskim posljedicama. Zdrava perad bitan je preduvjet uspješne proizvodnje. Stoga, se perad nastoji zaštititi od bolesti i uginuća primjenom nespecifičnih mjera i specifičnom imunoprofilaksom. U tu svrhu primjenjuju se cjepiva u svih dobnih kategorija peradi. Ovisno o tipu proizvodnje, cjepiva se primjenjuju jednokratno ili višekratno u cilju trajne zaštite ptica. Cijepljenjem roditelja nastaje aktivna imunost, a stvorena protutijela se prenose na potomstvo pružajući adekvatnu zaštitu u prvim tjednima života, te iščezavaju do trećeg-četvrtog tjedna (SHARMA i RAUTENSCHLEIN, 2013.). Postojanje pasivne imunosti omogućava interferenciju materalnih protutijela u serumu pilića s primijenjenim cjepivom (RAUW i sur. 2009.). Kako bi se to izbjeglo, živa cjepiva se pilićima primjenjuju putem sluznica probavnog i dišnog sustava, potičući prvenstveno humoralnu imunost prvotno lokalno, s posrednim sustavnim djelovanjem (SASIPREEYAJAN i sur., 2012.).

Muški pilići komercijalnog hibrida nesilica korišteni su u našem istraživanju. Očekivano, pilići su bili zaštićeni materalnim protutijelima specifičnim za VNB na što ukazuje zaštitni titar protutijela prvog dana (Tablica 11. i Slika 5.). Kako bismo istražili učinak zaraze sojem ZG1999HDS virusa NB na imunosni odgovor imunološki naivne peradi i okarakterizirali slijed događaja pri prvoj pojavi, čekali smo da iščeznu prisutna materalna protutijela. Iščezavanje materalnih protutijela pratili smo u tjednim razmacima u uzorcima seruma iz krvi pilića prije početka pokusa. Materalna protutijela specifična za VNB u komercijalnih nesilica iščezavaju do 5 tjedna i dobrim dijelom sprječavaju razvoj sustavne imunosti, ali ne i lokalne (RAUW i sur., 2009.) No, u našem slučaju materalna protutijela su se u potpunosti izlučila do dobi pilića od 28. dana te smo tada pilićima pokusnih skupina primijenili okulonazalno pripravke soja ZG1999HDS ili cjepni soj La Sota, imitirajući tako prirodni put zaraze, a kontrolnoj skupini sterilni fosfatni pufer (PBS).

Imunogenost soja ZG1999HDS već je prije dokazana (BIĐIN i MAZIJA, 2009.), a mi smo je ovim istraživanjem potvrdili. Soj ZG1999HDS je jače potaknuo tvorbu specifičnih protutijela u usporedbi sa cjepnim sojem La Sota, što se u našem slučaju očitovalo višim titrom protutijela specifičnih za VNB sedmog i 14. dana nakon imunizacije, a značajno višim u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 12. i Slika 6.). Poznato je da živa cjepiva od La Sota soja, primijenjena putem dišnog sustava u jednodnevne peradi, mogu uzrokovati oštećenje epitela u dušniku i nestanak trepetljika, te

tako stvoriti predispoziciju za nastanak sekundarnih bakterijskih infekcija kojima se očituje tzv. cjepna reakcija (AL-GARIB i sur., 2003.). Međutim, za trajanja pokusa nismo zabilježili cjepnih reakcija što bi se očitovale kliničkim znakovima ili uginućem pilića niti u jedne skupine imuniziranih pilića. To bi se moglo pripisati i dobi kada smo piliće imunizirali, a kada je imunosni sustav u potpunosti dozrio. Također, takav nalaz upućuje da je značajnom uginuću tovnih pilića prilikom izolacije istraživanog soja (MAZIJA i sur., 2011.) vjerojatno pogodovalo postojanje drugih infekcija i/ili nepovoljni uvjeti okoliša i držanja. Naime, standardnim testovima *in vivo* (MDT, ICPI, IVPI) nađeno je da je soj ZG1999HDS lentogen, što je potvrđeno analizom izvedenog slijeda aminokiselina na mjestu cijepanja F0 proteina.

Danas je poznato da imunost, potaknuta bilo prirodnom zarazom bilo cijepljenjem, nastaje kroz proces usklađivanja i međudjelovanja različitih tipova imunosnih stanica i odgovora. S obzirom na to, stanična i humoralna imunost ovisne su o komponentama urođene imunosti i međusobno. Imajući to u vidu, odlučili smo istražiti stanični odgovor na primjenu terenskog soja ZG1999HDS i time nadopuniti njegovu karakterizaciju u svrhu mogućnosti primijene za proizvodnju cjepiva za perad.

Patološki procesi u organizmu, uzrokovani biološkim ili organskim agensima, očituju se specifičnim promjenama u biokemijskom sastavu i broju stanica u krvi. Iz tog razloga pratili smo hematološke pokazatelje u uzorku pune krvi i odredili broj ukupnih leukocita, trombocita i eritrocita, te diferencijalnu bijelu krvnu sliku. Dobivene vrijednosti većinom pokazuju kolebanja unutar fizioloških granica (NAGLIĆ i HAJSIG, 1993.). Pri tom valja imati na umu da referentne vrijednosti hematoloških pokazatelja za kokoš kao vrstu u stvarnosti pokazuju genetski, dobno i spolno uvjetovane razlike (ABDI-HACHESOO i sur., 2011.) a također na njihovu vrijednost utječu i uvjeti okoliša (sezonska kolebanja) (ALBOKHADAIN, 2012.). U dostupnoj literaturi nismo našli podataka koji bi se odnosili na muške piliće lakog hibrida u dobi četiri do šest tjedana. Većina istraživanja odnosi se na tovne piliće različite dobi (ERF, 1998.; CIGLAR GROZDANIĆ, 2005.; BALENOVIĆ, 2008.; GOTTSTEIN, 2008.) ili pilenke lakih hibrida koje su bile starije od životinja u našem pokusu (BALENOVIĆ i sur., 2007.) ili pripradale autohtonim pasminama (ABDI-HACHESOO i sur., 2011.). S obzirom na prije navedene čimbenike koji utječu na broj i udio pojedinih stanica u krvi teško je usporediti dobivene rezultate s tim podacima. Stoga uspoređujemo dobivene rezultate pokusnih

skupina u odnosu na vrijednosti kontrolne skupine i vrijednosti iz NAGLIĆ i HAJSIG (1993.; Tablica 6.).

Ukupan broj eritrocita (Tablica 13., Slika 7.) u svih skupina je u fiziološkim granicama (2,5-4,0 x 10^{12} /L), uz nalaz značajno većeg broja u ZG skupine u odnosu na kontrolnu sedmog dana. Ovakav nalaz može biti rezultat mogućeg utjecaja niza citokina na pojačanu hematopoetsku aktivnost i otpuštanje stanica u krvotok tijekom imunosne reakcije. Poznato je da citokini svojim indirektnim utjecajem mogu djelovati i na druge stanice, izuzev izravno na imunosne, i na taj način potaknuti njihovo umnažanje i otpuštanje u cirkulaciju (WIGLEY i KAISER, 2003.).

Ukupan broj leukocita bio je viši od referentnih vrijednosti (20-30x10^9/L) u svih skupina od početka do kraja istraživanja (Tablica 13., Slika 8.). S obzirom da su životinje držane u istim uvjetima te je povećanje ukupnog broja leukocita uzrokovano istim čimbenikom u svih životinja, to se razlike među skupinama vjerojatno mogu pripisati primijenjenim virusima.

Ukupan broj trombocita u pokusnih skupina raste do trećeg u LS, a u ZG do petog dana pokusa, te je bio značajno veći u ZG skupine u odnosu na kontrolnu trećeg i petog dana pokusa, a veći u ZG nego u LS petog i sedmog dana (Tablica 13., Slika 9.). Trombociti ptica su stanice s jezgrom i pored hemostatske uloge posjeduju značajnu sposobnost fagocitoze, čak dvostruko učinkovitiju nego drugi cirkulirajući fagociti, heterofili i monociti (RIES i sur., 1984.). Razlog većeg broja možemo tražiti u pojačanoj aktivaciji imunološkog sustava zbog umnažanja živog virus u organizmu kojim se podražuju stanice na fagocitozu. Trombociti mogu poslužiti i u predočavanju antigena izvršnim T-limfocitima nakon fagocitoze i aktiviranju antivirusnih odgovora putem receptora nalik tolu (ST PAUL i sur., 2012.).

Udio heterofila kod pokusnih skupina raste u ZG skupine do trećeg dana, a u LS do petog dana, dok kod kontrolne skupine stalno pada i treći dan je je značajno niži nego u pokusnih skupina, a od LS skupine i peti dan (Tablica 13., Slika 10.). Osim treći dan, kada je njihov udio veći, do kraja pokusa njihov udio je manji u ZG nego u LS skupine. Utvrđene vrijednosti na početku pokusa bile su blago povišene u odnosu na referentne vrijednosti (20-30%), u pokusnih skupina rastu do petog dana, a nakon toga se vraćaju u fiziološke okvire. Heterofili su ekvivalent neutrofilima u sisavaca (SWAGGERTY i sur. 2006.; SHARMA i RAUTENSCHLEIN, 2013.), te imaju značajnu ulogu u aktivaciji

upalnog odgovora i moduliranju stečenog imunosnog odgovora. Uz porast ukupnog broja trombocita, nagli značajan porast udjela heterofila od trećeg do petog dana kod pilića LS skupine moguće ukazuje na upalni proces u organizmu uslijed oštećenja tkiva umnažanjem virusa, značajnu fagocitnu aktivnost u organizmu, a time i aktivaciju mehanizama urođene imunosti, ali koji se nije očitovalo klinički vidljivim znakovima.

Stanična imunost prema LAMBRECHT i sur. (2004.) ima ključnu ulogu za zaštitu od NB-a, što je dokazano zaštitom burzektomiranih pilića, dok prema REYNOLDS i MARAQA (2000.a) sam stanični odgovor nije dostatan za zaštitu od virulentnog virusa NB.

Zahvaljujući molekularnim metodama stanični imuni odziv na VNB više nije nedokučiv. Stanični odziv moguće je okarakterizirati pomoću protočne citometrije određivanjem frekvencije izvršnih stanica u krvi, timusu i slezeni, te drugim limfatičnim organima, ili pak pomoću *in vitro* prisjetnog odgovora izdvojenih perifernih leukocita na podražaj mitogenom ili specifičnim virusnim antigenom (DALGAARD i sur., 2010.). U tom smislu funkcionalna sposobnost T- limfocita određuje se protočnom citometrijom na temelju proliferacije i/ili unutarstanične proizvodnje specifičnih citokina (npr. IFN γ ili IL-6) nakon stimulacije ili pomoću RT-qPCR reakcije na temelju ispoljavanja gRNK za citokine (KAISER i sur., 2000; LAMBRECHT i sur., 2004.; DALGAARD i sur., 2010.).

Imunofenotipizacija stanica pune krvi peradi daje dobar uvid u proliferaciju imunosnih stanica kao odgovor na cijepljenje, i danas se, zahvaljujući sve većem broju dostupnih monoklonskih protutijela, sve češće koristi (BALENOVIĆ i sur., 2007.; KAISER i STÄHELI, 2014.) iako iz ekonomskih razloga većinom u istraživačke svrhe i kod razvoja cjepiva.

Porast relativnog udjela B-limfocita ($CD45^{+}Bu\text{-}1^{+}$) u populaciji mononuklearnih stanica izdvojenih iz pune krvi pilića obje pokusne skupine je naglašen do trećeg dana, kada je značajno viši u odnosu na konrolnu skupinu (Tablica 14., Slika 17.). Takav nalaz upućuje na pojačanu aktivaciju B-limfocita, ali i posredno, aktivaciju staničnog imunosnog odgovora (GOTTSTEIN, 2008.; TIZARD, 2013.) budući da su i B limfociti sposobni predočiti antigen.

Relativni udio pomoćničkih T-limfocita prati porast B-limfocita u istom razdoblju (do trećeg dana) u obje pokusne skupine i značajno je veći u ZG nego u kontrolne skupine (Tablica 15., Slika 22.). To se može objasniti aktivnom ulogom pomoćničkih T-limfocita

u pokretanju odgovarajućeg imunosnog odgovora (DEGEN i sur., 2005.a; KAISER, 2010.). Upravo sinergijom pomoćničkih T- i B- limfocita aktivira se Th1 tip imunosnog odgovora koja se odvija pod kontrolom $CD4^+$ T pomoćničkih limfocita, potičući staničnu imunosnu reakciju čiji odziv slijedi nakon nekoliko dana praćen povećanjem citotoksičnih $CD8^+$ T limfocitima (TIZARD, 2013.).

Slezena ima važnu ulogu u imunosnom, posebice staničnom, odgovoru na različite patogene (DALGAARD i sur., 2010.; SHARMA i RAUTENSCHLEIN, 2013.). Funkcionalna sposobnost staničnog imunosnog odziva može se procijeniti *in vitro* stimulacijom izdvojenih splenocita i određivanjem količine proizvedenih citokina, naročito IFN γ, ili ispoljavanja gRNK pomoću RT-q PCR (RUE i sur., 2011.). Mi smo se odlučili za kvantifikaciju ispoljavanja gRNK jer postoji pozitivna korelacija između ispoljavanja gRNK i proizvodnje biološki aktivnog IFN γ (KAPCZYNSKI i KOGUT, 2008.).

U pretraženim uzorcima slezene nismo našli genomsku RNK virusa NB što je u suglasju s tvrdnjom KAPCZYNSKI i sur. (2013.) da se lentogeni sojevi ne nalaze u slezeni već se umnažaju lokalno na mjestu ulaska (RAUW i sur., 2009.) zbog čega znatno slabije potiču imunosni odgovor nego velogeni (KAPCZYNSKI i sur., 2013.). Međutim, relativnom kvantifikacijom u odnosu na gRNK β aktina i kontrolnu skupinu kao kalibratora, nađen je porast ispoljavanja gena za IFN γ (Tablica 16., Slika 27.) u obje pokusne skupine koji je najveći 2. dana u odnosu na kontrolu, a zatim se u obje pokusne skupine više ili manje zadržava u razini kao kod kontrolne skupine sve do kraja pokusa. Ovakav nalaz slabije stimulacije IFN γ u suglasju je s prethodnim istraživanjima koja ukazuju na njegovu slabiju stimulaciju djelovanjem lentogenih sojeva VNB-a (RUE i sur., 2011.; KAPCZYNSKI i sur., 2013.).

Za razliku od IFN γ, ispoljavanje gRNKA za IFN-α je bilo slabije izraženo, a 2. dana i značajno manje u obje pokusne u odnosu na kontrolnu skupinu. Obzirom da se rezultati odnose na uzorke slezene i upućuju na sustavnu imunost, ne možemo znati kakav je bio lokalni odgovor u dišnom sustavu na mjestu infekcije i umnažanja ovih lentogenih sojeva, a za očekivati je da bi tamo proizvodnja IFN- α bila značajnija. Nadalje, takav nalaz mogao bi se pripisati djelovanju V proteina koji je poznat po uplitanju u provođenje signala za sintezu IFN u jezgru stanice (HORVATH, 2004.). Stoga, bi bilo preporučljivo utvrditi da li i u kojoj količini soj ZG1999HDS sintetizira V protein posttranslacijskim

preuređivanjem P gena u odnosu na cjepni soj La Sota i ispitati učinak V proteina na splenocite.

Obzirom na dobivene rezultate može se zaključiti da primijena oba soja VNB ima poticajni učinak na stanični imunosni odgovor, koji je bio izražen jačom proliferacijom B- i T-pomoćničkih limfocita i ispoljavanjem IFN-γ u ZG u odnosu na LS skupinu. I na kraju, smatramo da bi se spoznaje o staničnoj imunosti i imunogenosti soja ZG1999HDS koje su proizašle iz ovog istraživanja trebale nadopuniti imunofenotipizacijom stanica slezene, analizom funkcionalne sposobnosti stanica izdvojenih iz slezene i krvi specifičnom stimulacijom inaktiviranim VNB-a, određivanjem NO i citokina u supernatantu, te citokina unutarstanično protočnom citometrijom. Nadalje, smatramo potrebnim odrediti ekspresiju IFN- γ u krvi, zajedno s dokazom genoma VNB-a. Za potvrdu učinkovitosti trebalo bi provesti izazivačku infekciju virulentnim sojem VNB-a čime bi došli do vrijednih spoznaja o zaštitnom učinku stvorene imunosti u pilića.

7. ZAKLJUČCI

1. Usporednom analizom slijeda nukleotida varijabilnog dijela F gena i izvedenog slijeda aminokiselina utvrđeno je da se soj ZG1999HDS razlikuje od La Sota soja VNB.

2. Nakon okulonazalne primjene soj ZG1999HDS jače potiče tvorbu protutijela od cjepnog soja La Sota što se očituje većim titrom protutijela specifičnih za VNB sedmog i 14. dana, a istodobno oba soja značajno jače potiču tvorbu protutijela u odnosu na kontrolnu skupinu.

3. Tijekom pokusa nije zabilježena pojava klinički vidljivih znakova NB niti uginuća koja bi se pripisala djelovanju primijenjenih virusa.

4. Kod obje pokusne skupine broj pretraženih krvnih stanica, izuzev povišenih leukocita u svih skupina tijekom čitavog razdoblja, u uzorcima periferne krvi kreće se u fiziološkim granicama za čitavog pokusa, pri čemu gotovo nema statistički značajnih razlika između pokusnih skupina.

5. Povećan relativni udio pomoćničkih ($CD4^+$) T limfocita nađen u uzorcima periferne krvi pokusnih skupina trećeg dana ukazuje na aktivaciju imunosnog odgovora kod primjene oba soja VNB.

6. Značajno veći porast relativnog udjela B-limfocita trećeg dana u obje pokusne skupine u odnosu na kontrolnu skupinu upućuje na njihovu aktivaciju, i posredno na aktivaciju staničnog imunosnog odgovora, jače izraženog primijenom ZG1999HDS soja.

7. Porast udjela heterofila uz povećan broj trombocita u obje pokusne skupine ukazuje na aktivaciju mehanizama urođene imunosti do trećeg dana, a daljnji rast u skupine cijepljene La Sota sojem do petog dana moguće znači nazočnost upale u organizmu koja se nije klinički očitovala.

8. Genom primijenjenih virusa nije pronađen u pretraženim uzorcima slezene što je u suglasju s njihovom pripadnošću lentogenom patotipu.

9. Sojevi ZG1999HDS i La Sota, potiču sintezu interferona γ, što se očitovalo većim ispoljavanjem gena u obliku gRNK drugog dana nakon primjene, ali ne značajno u odnosu na kontrolnu skupinu.

10. S obzirom na poticajni učinak terenskog soja ZG1999HDS na humoralni i stanični imunosni odgovor u pilića opravdano je ovaj pripravak upotrijebiti za daljnje istraživanje i mogući razvoj cjepiva za domaću perad.

8. POPIS LITERATURE

1. ABDEL-MONEIM, A. S., A. A. EL-SAWAH, M. A. KANDIL (2006): Characterization of variant strain of Newcastle disease virus in Egypt. BS. Vet. Med. J. 16, 12-17.
2. ABDI-HACHESOO, B., A. TALEBI, S. ASRI-REZAEI (2011): Comparative study on blood profiles of indigenous and Ross-308 broiler breeders. Glob. Vet. 7, 238–241.
3. AHMED, K., V. K. SAXENA, A. ARA, K. B. SINGH, N. R. SUNDARESAN, M. SAXENA, T. J. RASOOL (2007): Immune response to Newcastle disease virus in chicken lines divergently selected for cutaneous hypersensitivity. Int. J. Immunogenet. 34, 445–455.
4. ALBOKHADAIM, I. (2012): Hematological and some biochemical values of indigenous chickens in Al-Ahsa, Saudi Arabia during summer season. Asian J. Poult. Sci. 6, 138–145.
5. ALDOUS, E. W., C. M. FULLER, J. K. MYNN, D. J. ALEXANDER (2004): A molecular epidemiological investigation of isolates of the variant avian paramyxovirus type 1 virus (PPMV-1) responsible for the 1978 to present panzootic in pigeons. Avian Pathol. 33, 258–269.
6. ALDOUS, E. W., D. J. ALEXANDER (2001): Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). Avian Pathol. 30, 117–128.
7. ALDOUS, E. W., J. K. MYNN, J. BANKS, D. J. ALEXANDER (2003): A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. Avian Pathol. 32, 239–256.
8. ALEXANDER, D. J. (1998): Newcastle Disease Virus and other Avian Paramyxoviruses. *In:* Laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. (Swayne, D. E., J. R. Glisson, M. W. Jackwood, J. E Pearson, W. M. Reed, Eds.). 4th ed., American Association of Avian Pathologists Inc., Kennet Square, pp. 156-163.
9. ALEXANDER, D. J. (2001): Gordon Memorial Lecture. Newcastle disease. Brit. Poult. Sci. 42, 5–22.
10. ALEXANDER, D. J. (2009): Ecology and epidemiology of Newcastle disease. *In*: Avian influenza and Newcastle disease – a field and laboratory manual. (Alexander, D. J., I. Capua, Eds.). Springer-Verlag Italia, Milano, pp. 19–26.

11. ALEXANDER, D. J., D. A. SENNE (2008): Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. *In*: Diseases of Poultry. (Saif, Y. M., Editor-in-chief). 12th ed., Blackwell, Ames, pp. 75–100.
12. ALEXANDER, D. J., G. PARSONS (1986): Pathogenicity for chickens of avian paramyxovirus type 1 isolates obtained from pigeons in Great Britain during 1983-85. Avian Pathol. 15, 487–493.
13. ALEXANDER, D. J., J. G. BELL, R. G. ALDERS (2004): FAO Technology Review: Newcastle disease. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
14. ALEXANDER, D. J., W. H. ALLAN (1974): Newcastle disease virus pathotypes. Avian Pathol. 3, 269–278.
15. ALEXANDER, D. J., R. J. MANVELL, J. P. LOWINGS, K. M. FROST, M. S. COLLINS, P. H.RUSSELL, J. E. SMITH (1997): Antigenic diversity and similarities detected in avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates using monoclonal antibodies. Avian Pathol. 26, 399 – 418.
16. AL-GARIB, S. O., A. L. J. GIELKENS, E. GRUYS, G. KOCH (2003): Review of Newcastle disease virus with particular references to immunity and vaccination. World Poultry Sci. J. 59, 185-200.
17. ALLAN, W. H., R. E. GOUGH (1974): A standard haemagglutination inhibition test for Newcastle disease. 1. A comparison of macro and micro methods. Vet. Rec. 95, 120-123.
18. ANONYMUS (1992): Council directive 92/66/EEC introducing Community measures for the control of Newcastle Disease. The Council of the European Communities. Official Journal L. 260, pp. 1-20.
19. ANONYMUS (1993): Commission Decision of 8 February 1993 laying down the criteria for vaccines to be used against Newcastle disease in the context of routine vaccination programmes. Decision 93/152/EEC. Official Journal of the European Communities L 59, 35 i dopuna Decision 2010/633/EC. Official Journal of the European Union, L 279, 33.
20. ANONYMUS (2007): Pravilnik o mjerama kontrole newcastleske bolesti. Narodne novine 9/2007.
21. ANONYMUS (2012): Newcastle disease. Chapter 2.3.14. *In*: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Office International des Epizooties (OIE), Paris, pp. 576–589. (zadnji pristup 30. svibnja 2014.:

http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/
Health_standards/tahm/2.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf).

22. ANONYMUS, (2013): Naredba o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2014. Narodne novine 160/2013.
23. ARIAANS, M. P., P. M. van de HAAR, J. W. LOWENTHAL, W. van EDEN, E. J. HENSEN, L. VERVELDE (2008): ELISPOT and intracellular cytokine staining: novel assays for quantifying T cell responses in the chicken. Dev. Comp. Immunol. 32, 1398–1404.
24. BALENOVIĆ, M., M. POPOVIĆ, V. SAVIĆ, D. KEZIĆ, K. VLAHOVIĆ, A. DOVČ, G. BEZROK, I. POPOVIĆ, I. VALPOTIĆ (2007): Kvantitativna imunofenotipizacija T-limfocita periferne krvi kokoši nesilica. Prax. Vet. 55, 33–39.
25. BALENOVIĆ, M. (2008): Kinetika tvorbe IFN-γ, IL-2 i T limfocita u tovnih pilića imuniziranih živim i inaktiviranim cjepivom protiv newcastleske bolesti. Disertacija. Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
26. BALENOVIĆ, M., V. SAVIĆ, A. EKERT KABALIN, L. JURINOVIĆ, W. L. RAGLAND. (2011): Abundance of IFN alfa and IFN gamma gene transcripts and absence of IL-2 transcripts in blood of chickens vaccinated with live or inactivated NDV. Acta Vet. Hung. 59, 141-148.
27. BALLAGI-PORDÁNY, A., E. WEHMANN, J. HERCZEG, S. BELÁK, B. LOMNICZI (1996): Identification and grouping of Newcastle disease virus strains by restriction site analysis of a region from the F gene. Arch. Virol. 141, 243- 261.
28. BEARD, C. W., R. P. HANSON (1984): Newcastle disease. *In*: Diseases of Poultry. (Hofstad, M. S., H. J. Barnes, B. W. Calnek, W. M. Reid, H.W. Yoder, Eds.). 8th ed., Iowa State University Press, Ames, pp. 452–470.
29. BIĐIN, M., H. MAZIJA (2009): Imunogenost terenskog soja virusa newcastleske bolesti NB Zg-2000 primijenjenog SPF pilićima. (Immunogenicity of the field strain NDV Zg-2000 administered to the SPF chickens). Zbornik Peradarski dani 2009. Hrvatska, Poreč, 25.-28. ožujka 2009. (Mirta Balenović, urednica). Centar za peradarstvo, Zagreb, 241-245.
30. CATTOLI G., A. FUSARO, I. MONNE, S. MOLIA, A. le MENACH, B. MAREGEYA, A. NCHARE, I. BANGANA, A. G. MAINA, J. N. KOFFI, H. THIAM, O. E. BEZEID, A. SALVIATO, R. NISI, C. TERREGINO, I. CAPUA

(2010): Emergence of a new genetic lineage of Newcastle disease virus in West and Central Africa – implications for diagnosis and control. Vet. Microbiol. 142, 168–176.

31. CATTOLI, G., C. de BATTISTI, S. MARCIANO, S. ORMELLI, I. MONNE, C. TERREGINO, I. CAPUA (2009): False-negative results of a validated real-time PCR protocol for diagnosis of Newcastle disease due to genetic variability of the matrix gene. J. Clin. Microbiol. 47, 3791–3792.
32. CATTOLI, G., L. SUSTA, C. TERREGINO, C. BROWN (2011): Newcastle disease: a review of field recognition and current methods of laboratory detection. J. Vet. Diagn. Invest. 23, 637–656.
33. CHOI, K.-S., E.-K. LEE, W.-J. JEON, J.-H. KWON (2010): Antigenic and immunogenic investigation of the virulence motif of the Newcastle disease virus fusion protein. J. Vet. Sci. 11, 205 - 211.
34. CHOMCZYNSKI, P., N. SACCHI (2006): The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. Nat. Protoc. 1, 581–585.
35. CIGLAR GROZDANIĆ, I. (2005): Imunoreaktivnost pilića na inaktivirani virus newcastleske bolesti primijenjen metodom zamagljivanja. Disertacija. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
36. COLLINS, M., J. BASHIRUDDIN, D. J. ALEXANDER (1993): Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity. Arch. Virol. 363–370.
37. COLLINS, M. S., S. FRANKLIN, I. STRONG, G. MEULEMANS, D. J. ALEXANDER (1998): Antigenic and phylogenetic studies on a variant Newcastle disease virus using anti-fusion protein monoclonal antibodies and partial sequencing of the fusion protein gene. Avian Pathol. 27, 90–96.
38. COLLINS, M., I. STRONG, D. J. ALEXANDER (1994): Evaluation of the molecular basis of pathogenicity of the variant Newcastle disease viruses termed "pigeon PMV-1 viruses". Arch. Virol. 134, 403–411.
39. COLLINS, M., I. STRONG, D. J. ALEXANDER (1996): Pathogenicity and phylogenetic evaluation of the variant Newcastle disease viruses termed "pigeon PMV-1 viruses" based on the nucleotide sequence of the fusion. Arch. Virol. 141, 635–647.

40. COURTNEY, S. C., D. GOMEZ, L. SUSTA, N. HINES, J. C. PEDERSEN, P. J. MILLER, C. L. AFONSO (2012): Complete genome sequencing of a novel Newcastle disease virus isolate circulating in layer chickens in the Dominican Republic. J. Virol. 86, 9550.
41. CZEGLÉDI, A., D. UJVÁRI, E. SOMOGYI, E. WEHMANN, O. WERNER, B. LOMNICZI (2006): Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. Virus Res. 120, 36–48.
42. DALGAARD, T. S., L. R. NORUP, A. R. PEDERSEN, K. J. HANDBERG, P. H. JØRGENSEN, H. R. JUUL-MADSEN (2010): Flow cytometric assessment of chicken T cell-mediated immune responses after Newcastle disease virus vaccination and challenge. Vaccine 28, 4506–4514.
43. DE LEEUW, O. S., B. P. H. PEETERS (1999): Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. J. Gen. Virol. 80, 131–136.
44. DE LEEUW, O. S., G. KOCH, L. HARTOG, N. RAVENSHORST, B. P. H. PEETERS (2005): Virulence of Newcastle disease virus is determined by the cleavage site of the fusion protein and by both the stem region and globular head of the haemagglutinin-neuraminidase protein. J. Gen. Virol. 86, 1759–1769.
45. DEGEN, W. G. J., N. van DAAL, N. L. ROTHWELL, P. KAISER, V. E. J. C. SCHIJNS (2005a): Th1/Th2 polarization by viral and helminth infection in birds. Vet. Microbiol. 105, 163–167.
46. DEGEN, W. G. J., H. I. van ZUILEKOM, N. C. SCHOLTES, N. VAN DAAL, V. E. J. C. SCHIJNS (2005b): Potentiation of humoral immune response s to vaccine antigens by recombinant chicken IL-18 (rChIL-18). Vaccine 23, 4212–4218.
47. DIEL, D. G., L. H. DA SILVA, H. LIU, Z. WANG, P. J. MILLER, C. L. AFONSO (2012): Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes. Infect. Genet. Evol. 12, 1770–1779.
48. DING, Z., Y. CONG, S. CHANG, G. WANG, Z. WANG, Q. ZHANG, H. WU, Y. SUN (2010): Genetic analysis of avian paramyxovirus-1 (Newcastle disease virus) isolates obtained from swine populations in China related to commonly utilized commercial vaccine strains. Virus Genes 41, 369–376.

49. DORTMANS J. C., G. KOCH, P. J. ROTTIER, B. P. H. PEETERS (2009): Virulence of pigeon paramyxovirus type 1 does not always correlate with the cleavability of its fusion protein. J. Gen. Virol. 90, 2746–2750.
50. DORTMANS, J. C., P. J. ROTTIER, G. KOCH, B. P. H. PEETERS (2010): The viral replication complex is associated with virulence of Newcastle disease virus (NDV). J. Virol. 84, 10113–10120.
51. ERF, G. F. (2004): Cell-mediated immunity in poultry. Poult. Sci. 83, 580–590.
52. ERF, G. F., W. G. BOTTJE, T. K., BERSI (1998): CD4, CD8 and TCR defined T-cell subsets in thymus and spleen of 2- and 7-week old commercial broiler chickens. Vet. Immunol. Immunopathol. 62, 339–348.
53. FAIR, J. M., K. J. TAYLOR-MCCABE, Y. SHOU, B. L. MARRONE (2008): Immunophenotyping of chicken peripheral blood lymphocyte subpopulations: individual variability and repeatability. Vet. Immunol. Immunopathol. 125, 268–273.
54. GALLILI, G. E., D. BEN-NATHAN (1998): Newcastle disease vaccines. Biotechnol. Adv. 16, 343–366.
55. GERLACH, H. (1994): Defence mechanisms of the avian host. *In:* Avian medicine: Principles and application. (Ritchie, B. W., G. J. Harrison, L. R. Harrison, Eds.). Wingers Publishing Inc., Lake Forth, pp. 109-120.
56. GLICKMAN, R., R. SYDDALL, R. IORIO (1988): Quantitative basic residue requirements in the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein as a determinant of virulence for Newcastle disease virus. J. Virol. 62, 354–356.
57. GOEBEL, S. J., J. TAYLOR, B. C. BARR, T. E. KIEHN, H. R. CASTRO-MALASPINA, C. V. HEDVAT, K. A. RUSH-WILSON, C. D. KELLY, S. W. DAVIS, W. A. SAMSONOFF, K. R. HURST, M. J. BEHR, P. S. MASTERS (2007): Isolation of avian paramyxovirus 1 from a patient with a lethal case of pneumonia. J. Virol. 81, 12709–12714.
58. GOTOH, B., T. KOMATSU, K. TAKEUCHI, J. YOKOO (2002): Paramyxovirus strategies for evading the interferon response. Rev. Med. Virol. 12, 337–57.
59. GOTTSTEIN, Ž. (2008): Kinetika imunogeneze soja FC126 herpesvirusa purana unesenog u dišni sustav pilića postupkom nebulizacije. Disertacija. Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.

60. GOULD A. R., J. A. KATTENBELT, P. SELLECK, E. HANSSON, A. LA-PORTA, H. A. WESTBURY (2001): Virulent Newcastle disease in Australia: molecular epidemiological analysis of viruses isolated prior to and during the outbreaks of 1998-2000. Virus Res. 77, 51–60.
61. GROSS, W. B., H. S. SIEGEL (1983): Evaluation of the heterophol/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. Avian Dis. 27, 972-979.
62. HALL, T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41, 95-98.
63. HELLER, E., A. LEVY, R. VAIMAN, B. SCHWARTSBURD (1997): Chicken embryo fibroblasts produce two types of interferon upon stimulation with Newcastle disease virus. Vet. Immunol. Immunopathol. 57, 289–303.
64. HORVATH, C. M. (2004): Weapons of STAT destruction. Interferon evasion by paramyxovirus V protein. Eur. J. Biochem. 271, 4621 – 4628.
65. HUANG, Z., S. KRISHNAMURTHY, A. PANDA, S. K. SAMAL (2003): Newcastle disease virus V protein is associated with viral pathogenesis and functions as an alpha interferon antagonist. J. Virol. 77, 8676 – 8685.
66. HUPBAUER, A., E. TOPOLNIK (1944): Kuga peradi ustanovljena kod nas. Vet. Arhiv 14, 1 – 35.
67. JENKINS, K., J. W. LOWENTHAL, W. KIMPTON, A. G. D. BEAN (2009): The *in vitro* and *in ovo* responses of chickens to TLR9 subfamily ligands. Dev. Comp. Immunol. 33, 660–667.
68. JEURISSEN, S. H., A, G. BOONSTRA-BLOM,S. O. AL-GARIB, L. HARTOG, G. KOCH (2000): Defence mechanisms against viral infection in poultry: a review. Vet. Q. 22, 204–208.
69. KAISER, P. (2010): Advances in avian immunology – prospects for disease control: a review. Avian Pathol. 39, 309–324.
70. KAISER, P., L. ROTHWELL, E. E. GALYOV, P. BARROW, J. BURNSIDE, P. WIGLEY (2000): Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella typhimurium, Salmonella enteritidis* and *Salmonella gallinarum*. Microbiology 146, 3217–3226.
71. KAISER, P., P. STÄHELI (2014): Avian cytokines and chemokines. *In*: Avian immunology. (Schat, K. A., B. Kaspers i P. Kaiser, Eds.). 2nd ed., Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 189-204.

72. KALETA, E. F., D. J. ALEXANDER, P. H. RUSSELL (1985): The first isolation of the avian PMV-1 virus responsible for the current panzootic in pigeons ? Avian Pathol. 14, 553–557.
73. KALETA, E., C. BALDAUF (1988): Newcastle disease in free-living and pet birds. *In*: Newcastle disease. (Alexander, D. J., Ed.). Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 197–246.
74. KAPCZYNSKI, D. R. (2008): Evaluating the cell-mediated immune response of avian species to avian influenza viruses. Methods Mol. Biol. 436 (Clifton, N. J., Ed.), 113–126.
75. KAPCZYNSKI, D. R., C. L. AFONSO, P. J. MILLER (2013): Immune responses of poultry to Newcastle disease virus. Dev. Comp. Immunol. 41, 447–453.
76. KAPCZYNSKI, D. R., D. J. KING (2005): Protection of chickens against overt clinical disease and determination of viral shedding following vaccination with commercially available Newcastle disease virus vaccines upon challenge with highly virulent virus from the California 2002 exotic Newcastle disease outbreak. Vaccine 23, 3424– 3433.
77. KAPCZYNSKI, D. R., M. H. KOGUT (2008): Measurement of avian cytokines with real-time RT-PCR following infection with the avian influenza virus. Methods Mol. Biol. 436 (Clifton, N. J., Ed.), 127–134.
78. KIM, L. M., D. J. KING, P. E. CURRY, D. L. SUAREZ, D. E. SWAYNE, D. E. STALLKNECHT, R. D. SLEMONS, J. C. PEDERSEN, D. A. SENNE, K. WINKER, C. L. AFONSO (2007): Phylogenetic diversity among low virulence Newcastle disease viruses from waterfowl and shorebirds and comparison of genotype distributions to poultry-origin isolates. J. Virol. 81, 12641–12653.
79. KIM, S.-H., M. SUBBIAH, S. MADHURI, A. S. SAMUEL, P. L. COLLINS, S. K. SAMAL (2011): Roles of the fusion and hemagglutinin-neuraminidase proteins in replication, tropism, and pathogenicity of avian paramyxoviruses. J. Virol. 85, 8582-8596.
80. KOLAKOFSKY, D., L. ROUX, D. GARCIN, R. W. H. RUIGROK (2005): Paramyxovirus mRNA editing, the "rule of six" and error catastrophe: a hypothesis. J. Gen. Virol. 86, 1869–1877.
81. KUMAR, S., B. NAYAK, P. L. COLLINS, S. K. SAMAL (2011): Evaluation of the Newcastle disease virus F and HN proteins in protective immunity by using a

recombinant avian paramyxovirus type 3 vector in chickens. J. Virol. 85, 6521–6534.

82. LAMBRECHT, B., M. GONZE, G. MEULEMANS, T. P. van den BERG (2004): Assessment of the cell-mediated immune response in chickens by detection of chicken interferon-γ in response to mitogen and recall Newcastle disease viral antigen stimulation. Avian Pathol. 33, 343-350.
83. LIU, W.-Q., M.-X. TIAN, Y.-P. WANG, Y. ZHAO, N.-L. ZOU, F.-F. ZHAO, S.-J. CAO, X.-T. WEN, P. LIU , Y. HUANG (2012): The different expression of immune-related cytokine genes in response to velogenic and lentogenic Newcastle disease viruses infection in chicken peripheral blood. Mol. Biol. Rep. 39, 3611–3618.
84. LOKE, C. F., A. R. OMAR, A. R. RAHA, K. YUSOFF (2005): Improved protection from velogenic Newcastle disease virus challenge following multiple immunizations with plasmid DNA encoding for F and HN genes. Vet. Immunol. Immunopathol. 106, 259–267.
85. LOMNICZI, B., E. WEHMANN, J. HERCZEG, A. BALLAGI-PORDÁNY, E. F. KALETA, O. WERNER, G. MEULEMANS, P. H. JORGENSEN, P. MANTÉ, L. GIELKENS, I. CAPUA, J. DAMOSER (1998): Newcastle disease outbreaks in recent years in western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII). Arch. Virol. 143, 49–64.
86. LOWENTHAL, J. W., T. E. CONNICK, P. G. MCWATERS, J. J. YORK (1994): Development of T cell immune responsiveness in the chicken. Immunol. Cell Biol. 72, 115–122.
87. MAMINIAINA, O. F., P. GIL, F.-X. BRIAND, E. ALBINA, D. KEITA, H. R. ANDRIAMANIVO, V. CHEVALIER, R. LANCELOT, D. MARTINEZ, R. RAKOTONDRAVAO, J.-J. RAJAONARISON, M. KOKO, A. A. ANDRIANTSIMAHAVANDY, V. JESTIN, R. SERVAN de ALMEIDA (2010): Newcastle disease virus in Madagascar: identification of an original genotype possibly deriving from a died out ancestor of genotype IV. PLoS One 5, e13987.
88. MAXWELL, M. H., G. W. ROBERTSON (1998): The avian heterophil leukocyte: a review. World. Poultry Sci. J. 54, 155-178.
89. MAYO, M. A. (2002): A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. Arch. Virol. 147/148, 1655–1656.

90. MAZIJA, H. (1983): Njukaslska bolest peradi (atipična kuga peradi). Spectrum. Pliva, Zagreb, Hrvatska.
91. MAZIJA, H., S. ČAJAVEC, E. PRUKNER-RADOVČIĆ, N. ERGOTIĆ, I. CIGLAR GROZDANIĆ, Ž. GOTTSTEIN, A. KOKIĆ, W. L. RAGLAND (2009): Immunogenicity and safety of La Sota strain of Newcastle disease virus administered to newly hatched chicks by nebulization. Acta Vet. Brno 78, 137-144.
92. MAZIJA, H., Ž. GOTTSTEIN, S. IVANKOVIĆ, D. ČOVIĆ (2011): Lentogenic cytolitic strain of the Newcastle Disease Virus isolated in Croatia. *U:* IX simpozij. peradarski dani, s međunarodnim djelovanjem. Zbornik. Hrvatska, Šibenik, 11. – 14. svibnja 2011. (Balenović, M., urednica). Centar za peradarstvo, Zagreb, 48-58.
93. MEBATSION, T., S. VERSTEGEN, L. T. C. de VAAN, A. ROMER-OBERDORFER, C. SCHRIER (2001): A recombinant Newcastle Disease Virus with low-level V protein expression is immunogenic and lacks pathogenicity for chicken embryos. J. Virol. 75, 420–428.
94. MEULEMANS G., T. P. van den BERG, M. DECAESSTECKER, M. BOSCHMANS (2002): Evolution of pigeon Newcastle disease virus strains. Avian Pathol. 31, 515–519.
95. MEULEMANS G. (1988): Control by vaccination. *In:* Newcastle disease. (Alexander, D. J., Ed.). Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 318-332.
96. MILLER, P. J., C. L. AFONSO, J. EL ATTRACHE, K. M. DORSEY, S. C. COURTNEY, Z. GUO, D. R. KAPCZYNSKI (2013): Effects of Newcastle disease virus vaccine antibodies on the shedding and transmission of challenge viruses. Dev. Comp. Immunol. 41, 505–513.
97. MILLER, P. J., D. J. KING, C. L. AFONSO, D. L. SUAREZ (2007). Antigenic differences among Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after a virulent challenge. Vaccine 25, 7238–7246.
98. MILLER, P. J., E. L. DECANINI, C. L. AFONSO (2010): Newcastle disease: evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. Infect. Genet. Evol. 10, 26–35.
99. MILLER, P. J., G. KOCH (2013): Newcastle disease. *In*: Diseases of Poultry. (Swayne, D. E., editor-in-chief; J. R. Glisson, L. R. McDougald, L .K. Nolan, D.

L. Suarez, V. L. Nair, Eds.). 13th ed., Blackwell Publishing Ltd., Ames, pp. 89–130.

100. MILLER, P. J., L. M. KIM, H. S. IP, C. L. AFONSO (2009a): Evolutionary dynamics of Newcastle disease virus. Virology 391, 64–72.
101. MILLER, P., C. ESTEVEZ, Q. YU, D. SUAREZ, D. KING (2009b): Comparison of viral shedding following vaccination with inactivated and live Newcastle disease vaccines formulated with wild-type and recombinant viruses. Avian Dis. 53, 39– 49.
102. MITIN, V. (1981): Brojanje krvnih tjelešaca u peradi. *In*: Praktikum iz fiziologije. Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 77-82.
103. MOHAMED, M. H. A., S. KUMAR, A. PALDURAI, M. M. MEGAHED, I. A. GHANEM, M. A LEBDAH, S. K. SAMAL (2009): Complete genome sequence of a virulent Newcastle disease virus isolated from an outbreak in chickens in Egypt. Virus Genes 39, 234–237.
104. MOHAMMED, M. A, S. M. SOKKAR, H. H. TANTAWI (1978): Contagious paralysis of pigeons. Avian Pathol. 7, 637–643.
105. MUNIR, M., A. LINDE, S. ZOHARI, K. STÅHL, C. BAULE, K. HOLM, B. ENGSTRÖM, M. BERG (2010): Complete genome analysis of an Avian Paramyxovirus Type 1 strain isolated in 1994 from an asymptomatic Black-Headed Gull (*Larus ridibundus*) in Southern Sweden. Avian Dis. 54, 923–930.
106. NAGLIĆ, T., D. HAJSIG (1993): Veterinarska imunologija. Školska knjiga, Zagreb, Hrvatska.
107. NEDELJKOVIĆ, G. (2011): Genomic characterisation and phylogenetic analysis of a Newcastle disease virus isolate (ZG1999HDS) from an outbreak in 1999 in Croatia. Master's degree thesis. Uppsala University, Medical Faculty, Uppsala, Sweden.
108. PALDURAI, A., S. KUMAR, B. NAYAK, S. K. SAMAL (2010): Complete genome sequence of highly virulent neurotropic Newcastle disease virus strain Texas GB. Virus Genes 41, 67–72.
109. PANDA, A., Z. H. HUANG, S. ELANKUMARAN, D. D. ROCKERNANN, S. K. SAMAL (2004): Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virus. Microb. Pathogenesis 36, 1–10.
110. PEETERS, B. P. H., O. S. de LEEUW, G. KOCH, A. L. J. GIELKENS (1999): Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: Evidence that

cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. J. Virol. 73, 5001–5009.

111. PEETERS, B. P., O. S. DE LEEUW, I. VERSTEGEN, G. KOCH, A. L. GIELKENS (2001): Generation of a recombinant chimeric Newcastle disease virus vaccine that allows serological differentiation between vaccinated and infected animals. Vaccine 19, 1616–1627.
112. PEETERS, B. P., Y. K. GRUIJTHUIJSEN, O. S. DE LEEUW, A. L. GIELKENS (2000): Genome replication of Newcastle disease virus: involvement of the rule-of-six. Arch. Virol. 145, 1829–1845.
113. PEI, J., W. E. BRILES, E. W. COLLISSON (2003): Memory T cells protect chicks from acute infectious bronchitis virus infection. Virology 306, 376–384.
114. PEROZO, F., P. VILLEGAS, R. DOLZ, C. L. AFONSO, L. B. PURVIS (2008): The VG/GA strain of Newcastle disease virus: mucosal immunity, protection against lethal challenge and molecular analysis. Avian Pathol. 37, 237–245.
115. PFOHL, J. L., J. B. HESTER, V. W. DOELLING, R. S. GIRARDI, J. E. HUTCHINS, D. L. MURRAY, C. A. RICKS, R. M. POSTON (1997): Development of a highly quantitative, reproducible assay for determination of chicken T cell growth factor biological activity. Poult. Sci. 76, 1379–1386.
116. PIEPER, J., U. METHNER, A. BERNDT (2008): Heterogeneity of avian gd T cells. Vet. Immunol. Immunopathol. 124, 241–252.
117. POPOVIĆ, M., M. BALENOVIĆ, A. EKERT KABALIN, V. SAVIĆ, N. VIJTIUK, K. VLAHOVIĆ, I. VALPOTIĆ (2010): Evaluation of CD45+ cells kinetics in the blood of fattening chickens immunized with live or inactivated Newcastle disease vaccine. Vet. Arh. 80, 61 – 69.
118. QURESHI, M. A, C. L. HEGGEN, I. HUSSAIN (2000): Avian macrophage: effector functions in health and disease. Dev. Comp. Immunol. 24, 103–119.
119. RAUW, F., Y. GARDIN, V. PALYA, S. VAN BORM, M. GONZE, S. LEMAIRE, T. VAN DEN BERG, B. LAMBRECHT (2009): Humoral, cell-mediated and mucosal immunity induced by oculo-nasal vaccination of one-day-old SPF and conventional layer chicks with two different live Newcastle disease vaccines. Vaccine 27, 3631–3642.
120. RAUW, F., Y. GARDIN, V. PALYA, S. ANBARI, S. LEMAIRE, M. BOSCHMANS, T. VAN DEN BERG, B. LAMBRECHT (2010): Improved

vaccination against Newcastle disease by an in ovo recombinant HVT-ND combined with an adjuvanted live vaccine at day-old. Vaccine 28, 823–833.

121. REYNOLDS, D. L., A. D. MARAQA (2000a): Protective immunity against Newcastle disease: The role of cell-mediated immunity. Avian Dis. 44, 145-154.
122. REYNOLDS, D. L., A. D. MARAQA (2000b): Protective immunity against Newcastle disease: The role of antibodies specific to Newcastle disease virus polypeptides. Avian Dis. 44, 138–144.
123. RIES, S., I. KÄUFER, M. REINACHER, E. WEISS (1984): Immunological characterization of chicken thrombocytes. Cell Tissue Res. 263, 1-3.
124. ROTT, R., H. D. KLENK (1988): Molecular basis of infectivity and pathogenicity of Newcastle disease virus. *In*: Newcastle disease. (Alexander, D. J., Ed.). Kluwer Academic, Boston, pp. 98-112.
125. RUE, C. A., L. SUSTA, I. CORNAX, C. C. BROWN, D. R. KAPCZYNSKI, D. L. SUAREZ, D. J. KING, P. J. MILLER, C. L. AFONSO (2011): Virulent Newcastle disease virus elicits a strong innate immune response in chickens. J. Gen. Virol. 92, 931–939.
126. RUNJIĆ, I. (2006): Genomske značajke virusa soja Zg – 2000 newcastleske bolesti. pre-Bologna diplomski rad. Prirodoslovno matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
127. SASIPREEYAJAN, J. T. POHUANG, N. SIRIKOBKUL (2012): Efficacy of different vaccination programs against Newcastle Disease Virus challenge in broiler chickens. Thai. J. Vet. Med. 42, 431-437.
128. SAVIĆ, V. (2003): Genetic characterisation of Newcastle diseases virus strains isolated in Croatia and neighbouring countries. Disertacija. Prirodoslovno matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
129. SAWANT, P. M., P. C. VERMA, P. K. SUBUDHI, U. CHATURVEDI, M. SINGH, R. KUMAR, A. K. TIWARI (2011): Immunomodulation of bivalent Newcastle disease DNA vaccine induced immune response by co-delivery of chicken IFN-γ and IL-4 genes. Vet. Immunol. Immunopathol. 144, 36–44.
130. SENNE, D. A., D. J. KING, D. R. KAPCZYNSKI (2004): Control of Newcastle disease by vaccination**.** Dev. Biol. (Basel). 119, 165-170.
131. SHANMUGASUNDARAM, R., R. K. SELVARAJ (2012): CD4+CD25+ Regulatory T cell ontogeny and preferential migration to the cecal tonsils in chickens. PLoS One 7, e33970.

132. SHARMA, J. M., S. RAUTENSCHLEIN (2013): Host factors for disease resistance. *In:* Diseases of poultry. (Swayne, D. E., Editor-in-chief;, J. R. Glisson, L. R. McDougald, V. Nair, L. K. Nolan, D. Suarez, Eds). 13th ed., Blackwell Publishing Ltd., Ames, pp. 61-80.
133. SHENGQING, Y., N. KISHIDA, H. ITO, H. KIDA, K. OTSUKI, Y. KAWAOKA, T. ITO (2002): Generation of velogenic Newcastle disease viruses from a nonpathogenic waterfowl isolate by passaging in chickens. Virology 301, 206–211.
134. SNOECK, C. J., A. T. ADEYANJU, A. OWOADE, E. COUACY-HYMANN, B. R. ALKALI, U. OTTOSSON, C. P. MULLER (2013): Genetic diversity of newcastle disease virus in wild birds and pigeons in West Africa. Appl. Environ. Microbiol. 79, 7867–7874.
135. ST. PAUL, M., S. PAOLUCCI, N. BARJESTEH, R. D. WOOD, K. A. SCHAT, S. SHARIF (2012): Characterization of chicken thrombocyte response to toll-like receptor ligands. PloS One 7, e43381.
136. STEWARD, M., I. B. VIPOND, N. S. MILLAR, P. T. EMMERSON (1993): RNA editing in Newcastle disease virus. J. Gen. Virol. 74, 2539–2547.
137. STUPAR, M. (2012): Dokaz horizontalnog širenja soja ZG1999HDS virusa Newcastleske bolesti nakon intravenske primjene u pilića. Diplomski rad, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
138. SUSTA, L., I. CORNAX, D. G. DIEL, S. C. GARCIA, P. J. MILLER, X. LIU, S. HU, C. C. BROWN, C. L. AFONSO (2013): Expression of interferon gamma by a highly virulent strain of Newcastle disease virus decreases its pathogenicity in chickens. Microb. Pathog. 61-62, 73–83.
139. SVETINA, A. (1988): Bojanje krvnog razmaza otopinama May-Grünwald i Giemsa (metoda po Pappenheimu). *In*: Patologija krvi (priručnik za vježbe). Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, p.63.
140. SWAGGERTY, C. L., P. KAISER, L. ROTHWELL, I. Y. PEVZNER, M. H. KOGUT (2006): Heterophil cytokine mRNA profiles from genetically distinct lines of chickens with differential heterophil-mediated innate immune responses. Avian Pathol. 35, 102-108.
141. SWAYNE, D. E. (2011): Newcastle disease virus and other avian paramyxovirus type 1 viruses. *In*: Fenner's veterinary virology. (MacLachlan, N.

J., E. J. Dubovi, Eds.). 4th ed., Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 311–314.

142. TAKADA, A, H. KIDA (1996): Protective immune response of chickens against Newcastle disease, induced by the intranasal vaccination with inactivated virus. Vet. Microbiol. 50, 17–25.
143. TAYLOR, J., C. EDBAUER, A. REY-SENELONGE, J. F. BOUQUET, E. NORTON, S. GOEBEL, P. DESMETTRE, E. PAOLETTI (1990): Newcastle disease virus fusion protein expressed in a fowlpox virus recombinant confers protection in chickens. J. Virol. 64, 1441–1450.
144. TIZARD, I. R. (2013): Veterinary Immunology. 9th ed., Saunders, St. Louis, USA.
145. UJVARI, D. (2003): Phylogenetic analysis reveals extensive evolution of avian paramyxovirus type 1 strains of pigeons (*Columba livia*) and suggests multiple species transmission. Virus Res. 96, 63–73.
146. YACOUB, A., M. LEIJON, M. J. MCMENAMY, K. ULLMAN, J. MCKILLEN, G. ALLAN, S. BELÁK (2012): Development of a novel real-time PCR-based strategy for simple and rapid molecular pathotyping of Newcastle disease virus. Arch. Virol. 157, 833–844.
147. VAN BOVEN, M., A. BOUMA, T. H. FABRI, E. KATSMA, L. HARTOG, G. KOCH (2008): Herd immunity to Newcastle disease virus in poultry by vaccination. Avian Pathol. 37, 1–5.
148. WEHMANN, E., D. UJVÁRI, H. MAZIJA, M. VELHNER, I. CIGLAR GROZDANIC, V. SAVIC, G. JERMOLENKO, Z. CAC, E. PRUKNER-RADOVCIC, B. LOMNICZI (2003): Genetic analysis of Newcastle disease virus strains isolated in Bosnia-Herzegovina, Croatia, Slovenia and Yugoslavia, reveals the presence of only a single genotype, V, between 1979 and 2002. Vet. Microbiol. 94, 269-281.
149. WIGLEY, P., P. KAISER (2003): Avian cytokines in health and disease. Rev. Bras. Ciência Avícola 5, 1–14.
150. WISE, M. G., D. L. SUAREZ, B. S. SEAL, J. C. PEDERSEN,. D. A. SENNE, D. J. KING, D. R. KAPCZYNSKI, E. SPACKMAN (2004): Development of a Real-Time Reverse-Transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA in clinical samples. J. Clin. Microbiol. 42, 329–338.

151. YUSOFF, K., W. TAN (2001): Newcastle disease virus: macromolecules and opportunities. Avian Pathol. 30, 439–455.
152. ZEKARIAS, B., A. A. H. M. TER HUURNE, W. J. M. LANDMAN, J. M. J. REBEL, J. M. A. POL, E. GRUYS (2002): Immunological basis of differences in disease resistance in the chicken. Vet. Res. 33, 109–125.
153. ZANETTI, F., A. BERINSTEIN, A. PEREDA, O. TABOGA, E. CARRILLO (2005): Molecular characterization and phylogenetic analysis of Newcastle disease virus isolates from healthy wild birds. Avian Dis. 49, 546–550.
154. ZANETTI, F., A. BERINSTEIN, E. CARRILLO (2008): Effect of host selective pressure on Newcastle disease virus virulence. Microb. Pathog. 44, 135–140.
155. ZOHARI, S. (2010): Newcastle disease virus (NDV). Avian paramyxovirus type 1 (APMV-1). Lecture. Uppsala University, Uppsala, Sweden.

9. ŽIVOTOPIS

Gordana Nedeljković rođena je 13. prosinca 1977. u Zagrebu, od oca Franje i majke Ane. Osnovnu školu Bartola Kašića u Zagrebu završila je 1992. godine. Maturirala je u II. gimnaziji u Zagrebu 1996. godine. Iste godine upisala je Pravni fakultet u Zagrebu, ali je 1997. godine, nakon uspješno položenog prijemnog ispita, upisala redovni studij Veterinarskog fakulteta. Tijekom studija bila je aktivni član Udruge studenata veterinarske medicine "Equus" te sudjelovala na Smotrama fakulteta i Športskim prvenstvima Sveučilišta u Zagrebu i na Međunarodnim športskim igrama studenata biomedicinskih znanosti "Humanijada". Apsolvirala je 2003. godine, a diplomirala 2006. godine, obranivši diplomski rad pod naslovom: "Utjecaj stresa uzrokovanog lomom lakatne kosti u kokoši na imuni odziv prema newcastleskoj bolesti". Nakon diplome odradila je vježbenički staž i položila stručni ispit. Zaposlena je 1. listopada 2008. godine na mjesto znanstvenog novaka na projektu: "Imunoprofilaksa bolesti peradi i drugih ptica" (053-0531863-1858, voditelja prof. emeritusa Hrvoja Mazije, kojeg je naslijedio doc.dr.sc. Željko Gottstein) na Zavodu za bolesti peradi s klinikom Veterinarskog fakulteta u Zagrebu. Početkom 2009. godine upisala je doktorski studij iz veterinarskih znanosti. U razdoblju 2009-2011. godine polazila je Magistarski studij infektivne biologije Sveučilišta u Uppsali, Kraljevina Švedska, na kojem je magistrirala položivši zadane ispite i obranivši rad pod naslovom: "Genomic characterisation and phylogenetic analysis of a Newcastle disease virus isolate (ZG1999HDS) from an outbreak in 1999 in Croatia". Položivši sve ispite iz doktorskog studija, prijavila je i obranila temu doktorske disertacije pod vodstvom doc.dr.sc. Željka Gottsteina u veljači 2014. godine.

10. POPIS OBJAVLJENIH RADOVA AUTORA

Izvadak iz Hrvatske znanstvene bibliografije (CROSBI)
Gordana Nedeljković (310004)

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima
1. Radišić, Berislav; Matičić, Dražen; Lipar, Marija; Vnuk, Dražen; Gudan, Andrea; Brkljača Bottegaro, Nika; Stanin, Damir; Nedeljković, Gordana. **Diaphragmatic hernia in a mare**. // *Wiener Tierärztliche Monatsschrift (1914)*. **96** (2009) , 5/6; 122-126 (članak, znanstveni).

Znanstveni radovi u drugim časopisima
1. Radišić, Berislav; Capak, Darko; Matičić, Dražen; Harapin, Ivica; Kos, Josip; Babić, Tomislav; Nedeljković, Gordana. **Surgical treatment of a unilateral scrotal hernia in a ram**. // *Veterinarski arhiv*. **80** (2010) , 1; 145-154 (prikaz slučaja, znanstveni).

Sažeci u zbornicima skupova
1. Filipović, Natalija; Stojević, Zvonko; Gottstein, Željko; Pađen, Lana; Nedeljković, Gordana; Marinković, Iris; Vodopija, Barbara. **The influence of calcitriol on expression of TGFb-isoformes in tissues of chickens.** // *Book of Abstracts. The 5th International Congress "Veterinary Science and Profession"* / Horvatek Tomić, Danijela ; Severin, Krešimir ; Slavica, Alen (ur.). Zagreb : Faculty of veterinary medicine, University of Zagreb, 2013. 91 (poster,međunarodna recenzija,sažetak,znanstveni).

2. Gottstein, Željko*; Nedeljković, Gordana*; Ećimović, Karolina; Verić, Nebojša. *equally contributing first authors. **Relative expression of interferon-gamma in the spleen and the bone marrow of SPF chicken embryos after in ovo stimulation with La Sota strain of Newcastle disease virus.** // *2nd Meeting of Middle-European Societies for Immunology and Allergology - Abstract Book* / Polić, Bojan i sur. (ur.).Rijeka : Hrvatsko imunološko društvo, 2013. 86 (poster,međunarodna recenzija,sažetak,znanstveni).

3. Kos, Dragana; Jurišić, Ivana; Nedeljković, Gordana; Gottstein, Željko. **Application of LAMP method for detection and quantification of Newcastle disease virus.** // *Book of Abstracts* / Horvatek Tomić, Danijela ; Severin, Krešimir ; Slavica, Alen (ur.).Zagreb : Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, 2013. 57-57 (predavanje,međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

4. Nedeljković, Gordana; Jergović, Mladen; Cvetić, Željko; Bendelja, Krešo; Mazija, Hrvoje; Gottstein, Željko. **Assessment of cell mediated immunity to NDV strain ZG1999HDS applied to one-day old chickens by means of nebulisation or oculonasal instillation** // *MASIR 2013- Measuring Antigen-Specific Immune Responses- Appendum to the final programme book-additional poster abstracts* / Roederer, Mario; Gratama, Jan; Kern, Florian. (ur.). Noordeloos, Nizozemska : MASIR Foundation, 2013. 9 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

5. Nedeljković, Gordana*; Jergović*, Mladen; Cvetić, Željko; Bendelja, Krešo; Mazija, Hrvoje; Gottstein, Željko. *equally contributing first authors. **Induction of cell mediated immunity with NDV strain ZG1999HDS in nebulised newly hatched chickens.** // *2nd*

Meeting of Middle-European Societies for Immunology and Allergology - Abstract Book / Polić, Bojan i sur. (ur.). Rijeka : Hrvatsko imunološko društvo, 2013. 41 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

6. Marić, Milan; Gottstein, Željko; Nedeljković, Gordana; Mazija, Hrvoje. **Immunogenicity of inactivated vaccine of pigeon paramixovirus 1 in pigeons of different immune status.** // *Proceedings of the International Scientific Meeting of Anatomy and Physiology, Fundamentals of Medicine* / Šimpraga, Miljenko ; Mihelić, Damir ; Tkalčić, Suzana (ur.). Zagreb : Medicinska naklada, 2009. 188-188 (poster,sažetak,znanstveni).

Magistarski radovi
1. Nedeljković, Gordana. **Genomic characterisation and phylogenetic analysis of a Newcastle disease virus isolate (ZG1999HDS) from an outbreak in 1999 in Croatia.** / magistarski rad. Uppsala, Sweden : Medical faculty, Department of medical biochemistry and microbiology, 07.06. 2011., 33 str. Voditelj: Berg, Mikael.

Diplomski radovi
1. Nedeljković, Gordana. **Utjecaj stresa uzrokovanog lomom lakatne kosti u kokoši na imuni odziv prema newcastleskoj bolesti.** / diplomski rad. Zagreb : Veterinarski fakultet, 08.09. 2006., 65 str. Voditelj: Mazija, Hrvoje.

Druge vrste radova
1. Marić, Milan (mentori: Željko Gottstein, Gordana Nedeljković). **Imunogenost cjepiva od inaktiviranog paramiksovirusa 1 primijenjenog parenteralno golubovima različite imunosti.** 2009. (studentski rad).