

**UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE**

Miroljub D. Dačić

**IMUNSKI ODGOVOR KOKA NOSILJA U
ODGOJU NAKON PRIMENE
REKOMBINANTNE VEKTORSKE I ŽIVIH
MODIFIKOVANIH VAKCINA PROTIV
INFEKTIVNE BURZALNE BOLESTI**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018.

**UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE**

Miroljub D. Dačić

**IMUNSKI ODGOVOR KOKA NOSILJA U
ODGOJU NAKON PRIMENE
REKOMBINANTNE VEKTORSKE I ŽIVIH
MODIFIKOVANIH VAKCINA PROTIV
INFEKTIVNE BURZALNE BOLESTI**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**

Miroljub D. Dačić

**IMMUNE RESPONSE OF BREEDING
LAYERS AFTER APPLICATION OF
RECOMBINANT VECTOR AND
MODIFIED LIVE VACCINES AGAINST
INFECTIOUS BURSAL DISEASE**

PhD thesis

Belgrade, 2018.

MENTOR

**prof. dr Radmila Resanović, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine,
Beograd, Katedra za bolesti kopitara, mesojeda, živine i divljači**

ČLANOVI KOMISIJE

- 1. prof. dr Miroslav Valčić, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine,
Univerzitet u Beogradu, Katedra za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela**
- 2. dr Maja Velhner, naučni savetnik, Naučni institut za veterinarstvo „Novi
Sad“**
- 3. prof.dr Milorad Mirilović, vanredni profesor, Fakultet veterinarske
medicine, Univerzitet u Beogradu, Katedra za ekonomiku i statistiku**

SAŽETAK

Infektivna burzalna bolest (engl. infectious bursal diseases-IBD) predstavlja jedno od najznačajnijih oboljenja živine izazvano virusom iz familije *Birnaviridae*, rod *Avibirnavirus*. Bolest izaziva visoku stopu morbiditeta i mortaliteta, smanjenje produktivnosti i dovodi do imunosupresije.

Kontrola bolesti se sprovodi primenom biosigurnosnih mera, poštovanjem tehnoloških normativa i imunizacijom živine.

Vakcine protiv IBD su kategorizovane kao klasične (blage, intermedijalne i „vruće“), imunski kompleks vakcine i vektor vakcine. U Srbiji se još uvek u rutinskoj praksi ne primenjuju vakcine na bazi „imunskog kompleksa“ i rekombinantne vektorske vakcine.

U ovom radu su ispitivani i poređeni efekti primene klasične vakcine i rekombinantne vektorske vakcine protiv IBD, kroz analizu humoralnog i celularnog imunskog odgovora, praćenjem nivoa, ujednačenosti i brzine stvaranja imunskog odgovora, pregleda burzi Fabrici, merenjem B/B indeksa i zaštite koju vakcine pružaju nakon veštačke (challenge) infekcije virusom infektivne burzalne bolesti.

Rezultati ispitivanja pokazuju da u grupi pilića vakcinisanih rekombinantnom vektorskom vHVT13 vakcinom, nakon veštačke infekcije vvIBD nije bilo obolelih ni uginulih pilića. Kod grupa pilića vakcinisanih živim atenuiranim vakcinama („intermedijarna“; „intermedijarna plus“) konstantovani su klinički simptomi bolesti i uginuća. Takođe, praćenjem indeksa burze (B:BR i B:BI) utvrđena je statistički značajna razlika u korist grupe vakcinisane vHVT13 vakcinom. Serološki monitoring sproveden je simultano sa dva ELISA kit kompleta: unapređenim ELISA IBD plus test i klasičnim ELISA IBD kitom. Klasičnim ELISA testovima nije moguće sprovoditi monitoring posle vakcinacije vektor vakcinom jer oni ne detektuju u dovoljnoj meri anti VP2 antitela. Utvrđen je znatno viši titar antitela meren unapređenim IBD plus testom u grupi vakcinisanoj vektor vakcinom (ne manje od 5000) u odnosu na grupe pilića vakcinisane živim atenuiranim vakcinama protiv IBD.

Rezultati pregleda burzi, monitoring krvi i veštačka infekcija pokazuju da su vektor vakcine bezbedne, efikasne i ne izazivaju imunosupresiju prilikom primene u kontroli IBD virusa. Rekombinantna vHVT13 vakcina u našem ogledu indukovala je brzu serokonverziju i bolju imunogenost u poređenju sa klasičnim živim vakcinama.

Rezultati protočne citometrije periferne cirkulacije pilića, pokazuju da nema smanjenja nivoa imunoglobulina IgY nakon vakcinacija niti nakon veštačke infekcije i da nema statističke razlike u nivoima IgY klase između grupa pilića.

Protočnom citometrijom meren je $CD4^+/CD8^+$ T limfocitni odnos koji predstavlja meru imunokompetencije. Posle vakcinacija živim atenuiranim vakcinama $CD4^+ / CD8^+$ se smanjuje, a nakon veštačke infekcije taj odnos je smanjen kod svih grupa pilića.

Ključne reči: Infektivna burzalna bolest, rekombinantne vektor vakcine, veštačka infekcija, ELISA, VP2, burza Fabricii, protočna citometrija, IgY

Naučna oblast: Patologija i terapija životinja

Uža naučna oblast: Bolesti živine

UDK broj: 619:616.98:635.5

ABSTRACT

Infectious bursal disease (IBD) is one of the most significant viral diseases in poultry production caused by *Avibirnavirus*, *Birnaviridae*. Disease is characterized by high morbidity and mortality rate, as well as low productivity and marked immunosuppression.

Disease control is carried out by application of biosecurity measures, following of technical procedures and active immunization of chicken.

IBD vaccines are categorized as classical (mild, intermediate and intermediate-plus), immunocomplex vaccines and recombinant vector vaccines. Routine practice in Serbia includes application of classic vaccines, while immunocomplex and recombinant vaccines are not in significant use.

Objective of this experiment was to compare effects of classic and recombinant vaccines against IBD by analyzing level, homogeneity and development agility of humoral and cellular immune response, inspection of bursa, calculation of body/bursa index (B/B index) and protection after challenge test.

Obtained results showed no disease or mortality in the group of chickens vaccinated with vHVT13 after challenge with vvIBD virus. Disease symptoms and death occurred in control groups vaccinated with live attenuated vaccines (intermediary, intermediary plus). Statistically significant difference in B.BR and B.BI index was noticed in group vaccinated with vHVT13 when compared to control group. Serological testing was conducted with two distinct ELISA kits: classic ELISA IBD kit and ELISA IBD plus kit. Classic ELISA kit can not be used for monitoring of flocks vaccinated with recombinant vector vaccine because it does not detect antiVP2 antibodies in significant measure. ELISA IBD plus kit detected significantly higher titer in experimental group (not less than 5000) compared to groups vaccinated with classic vaccines.

Results of flow cytometry of peripheral blood show no decrease in IgY level neither after vaccination nor after artificial infection. There is no statistical difference in IgY level among experimental groups.

Flow cytometry was used to determine CD4⁺/CD8⁺ T lymphocyte ratio in order to establish immunocompetence of the immunized chickens. After vaccination with live vaccines CD4⁺/CD8⁺ ration was decreasing and after artificial infection this ration is continuing to decrease in all experimental groups.

Results of bursa inspection, blood monitoring and challenge test showed that recombinant vector vaccines are safe, efficient and do not develop immunosuppression when applied in IBD virus control. Recombinant vHVT13 vaccine applied in this investigation induced abrupt seroconversion and better immunogenicity compared to classic vaccines.

Key words: Infectious bursal disease (IBD), recombinant vector vaccines, challenge test, ELISA, VP2, bursa Fabricii, flow cytometry, IgY

Scientific field: Animal pathology and therapy

Specific scientific field: Poultry diseases

UDK number: 619:616.98:635.5

SKRAĆENICE I STRANI TERMINI

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1 Definicija bolesti	3
2.2 Istorijski podaci	3
2.3 Ekonomski značaj IBD-a	4
2.4 Virus infektivne burzalne bolesti	6
2.4.1 Klasifikacija i molekularna struktura	6
2.4.2 Serotipovi virusa infektivne burzalne bolesti	8
2.4.3 Kultivisanje u živim ćelijama in vitro	8
2.5 Epizootiologija infektivne burzalne bolesti	9
2.6 Imunopatogeneza	11
2.7 Klinička slika i oblici bolesti	17
2.8 Patomorfološke promene	18
2.9 Dijagnostika infektivne burzalne bolesti	20
2.10 Kontrola i prevencija	24
2.10.1 Žive atenuirane vakcine	24
2.10.2 Inaktivisane vakcine	25
2.10.3 Imuno-kompleks vakcine	26
2.10.4 Rekombinantne vektorske vakcine	28
2.11 Imunski sistem ptica	32
3. CILJ I ZADATAK ISTRAŽIVANJA	36
4. MATERIJAL I METODE RADA	37
4.1 Materijal	37
4.1.1 Pilići - eksperimentalne jedinke	37
4.1.2 Soj virusa IBD-a za veštačku infekciju	37
4.1.3 Vakcine	37
4.1.4 Dijagnostički kit kompleti i obojena monoklonska i poliklonska antitela	37
4.1.5 Dizajn eksperimenta	38
4.2 Metode	40
4.2.1 Imunoenzimska metoda - ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)	40
4.2.2 Inhibicija hemaglutinacije–Hi test (Haemaagglutination inhibition test)	41
4.2.3 Identifikacija izolata virusa koji je korišćen za veštačku infekciju	41
4.2.4 Merenje telesne mase	42
4.2.5 Merenje mase burze Fabricii	42
4.2.6 Određivanje vrednosti odnosa „masa burze/telesna masa“ (B/BR vrednost)	42

4.2.7	Određivanje vrednosti indeksa „masa burze / telesna masa“ (B/BI vrednost)	42
4.2.8	Protočna citometrija	43
4.2.9	Statistička analiza podataka	47
5.	REZULTATI	49
5.1	Veštačka infekcija, klinička slika i patomorfološki nalaz	49
5.2	Vrednosti odnosa „masa burze/telesna masa“ (B/BR) i vrednosti indeksa „masa burze/telesna masa“ (B/BI)	50
5.3	ELISA titrovi specifičnih antitela protiv IBDV-a, „klasičan“ i „unapređeni“ ELISA test	58
5.4	Prikaz serokonverzije na osnovu titra antitela protiv atipične kuge živine (ND) Hi testom i infektivnog bronhitisa (IB) ELISA testom	62
5.5	Rezultati pregleda limfocita iz periferne cirkulacije pilića dobijeni primenom protočne citometrije	65
5.5.1	Protočna citometrija imunoglobulina IgY (H+L) u perifernoj cirkulaciji pilića	65
5.5.2	Rezultati procentualne zastupljenosti i odnosa CD4 ⁺ / CD8 ⁺ T limfocita u perifernoj cirkulaciji pilića protočnom citometrijom	67
6.	DISKUSIJA	70
7.	ZAKLJUČAK	92
8.	LITERATURA	94
BIOGRAFIJA AUTORA		

SKRAĆENICE I STRANI TERMINI

PCR- Polymerase chain reaction – reakcija lančane polimerizacije

RFLP- Restriction fragment length polymorphism – polimorfizam dužine restriktivnih fragmenata

MDA- Maternally derived antibodies, maternalna antitela

MD- Marek Disease, marekova bolest živine

IB- Infektivni Bronhitis

ND- New Casle, atipična kuga živine

HVT- Herpesvirus of turkey, ćureći herpes virus

vHVT13 - turkey herpesvirus vector vaccine, rekombinantna vektorska HVT+IBD vakcina

rHVT- Recombinant herpesvirus of turkey, rekombinantni ćureći herpes virus

ELISA- Imunoenzimski test (Enzyme-linked immunosorbent assay)

AGP- Agar gel precipitacija

SN test- Serum neutralizacioni test

B/BR - Bursal body weight ratio, odnos „masa burze / telesna masa“

B/BI - Bursal body weight index, indeks „masa burze / telesna masa“

mAb- Monoclonal antibodies, monoklonska antitela

1. UVOD

Gamboro bolest (GB) ili Infektivna burzalna bolest (engl. Infectious Bursal Disease-IBD) od njenog otkrića, šezdesetih godina prošlog veka, do danas predstavlja jedno od najznačajnijih oboljenja živine koje je rasprostranjeno u celom svetu. IBD izaziva virus iz familije *Birnaviridae*, rod *Avibirnavirus*. Ovaj virus je odgovoran za nastanak veoma kontagiozne bolesti mladih pilića svih provenijenci i proizvodnih kategorija. Bolest nanosi velike gubitke jer dovodi do veoma visoke stope morbiditeta i mortaliteta, smanjene produktivnosti i veoma izražene imunosupresije, usled destrukcije nezrelih B limfocita u burzi Fabricii.

Kontrola bolesti se sprovodi primenom svih biosigurnosnih mera, poštovanjem tehnoloških normativa i pre svega pravilnom i pravovremenom imunizacijom živine.

Za imunizaciju živine se koriste brojne vakcine: vakcine prve generacije, klasične „žive“ vakcine (blage, intermedijalne i „vruće“), vakcine druge generacije – imuno-kompleks vakcine i vakcine treće generacije HCVT vektor vakcine. Vektor vakcina predstavlja herpes virus ćuraka u čiji je genom ubačen gen iz virusa Gamboro bolesti (soj Faragher 52/70) koji kodira sintezu strukturnog, VP2 proteina. Nakon vakcinacije rekombinantnom vakcinom virus se razmnožava u ćelijama domaćina bez interferencije sa maternalnim antitelima na Gamboro bolest.

Epizotološko područje Republike Srbije je u najvećem procentu opterećeno virusom IBD, zbog čega se javljaju veoma veliki direktni i indirektni gubici u živinarskoj proizvodnji. U Srbiji se još uvek ne primenjuje imunoprofilaksa živine vakcinama na bazi „imunskog kompleksa“ i rekombinantnim vektorskim vakcinama, dok se u svetu i regionu ove vakcine sve češće primenjuju. Kako Srbija uvozi piliće roditeljskih jata, teške tako i lake linije iz različitih zemalja (Mađarska, Bugarska, Češka, Nemačka, Holandija i dr.), koje sprovode imunoprofilaksu vakcinama na bazi „imunskog kompleksa“ i rekombinantnim vektorskim vakcinama, sve češće se srećemo sa situacijom da je potrebno sprovesti karantin roditeljskih jata i/ili jednodnevnih pilića nosilja iz uvoza kojima je aplikovana rekombinantna vakcina HVT-IBD „*in ovo*“ ili subkutano (s.c.), već u inkubatorskoj stanici. Kod ovih pilića je potrebno sprovoditi serološki monitoring na drugačiji način nego kod pilića koji su vakcinisani „klasičnim živim vakcinama“. Da bi se kontrolisao titar maternalnih antitela, a samim tim i aktivni imunski odgovor kod pilića koji su na ovaj način

vakcinisani, neophodna je primena posebnih Enzyme-linked immunosorbent assay ELISA kit kompleta koji u većoj meri detektuju anti VP2 antitela.

Kako je infektivna burzalna bolest veliki problem u savremenom živinarstvu i kako permanentno prisustvo ove bolesti nanosi velike ekonomske štete živinarskoj industriji, neophodno je pratiti razvoj novih vakcina i razvijati nove pristupe imunoprofilaksi protiv IBD.

Predmet istraživanja obuhvata mogućnost primene rekombinantne vakcine protiv IBD, dobijene genetskim inženjeringom, koja sadrži živi vHVT013-69 rekombinovani virus GB, u cilju prevazilaženja „imunskog jaza“ koji se javlja kod primene klasičnih vakcina. Potrebno je ispitati postoje li eventualne prednosti i/ili ograničenja pri primeni novih rekombinantnih vektorskih vakcina koje nisu nikada primenjivane na epizootološkom području Republike Srbije, u odnosu na široko rasprostranjenu primenu komercijalnih, živih modifikovanih vakcina. Poređenje efekata primene klasičnih živih modifikovanih vakcina i rekombinantne vektorske vakcine protiv IBD vršiće se kroz analizu imunskog odgovora, praćenjem titra antitela, nivoa IgY B, CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita, ujednačenosti i brzine stvaranja humoralnog i celularnog imunskog odgovora nakon vakcinacije i zaštite koju ove vakcine pružaju nakon veštačke infekcije virusom infektivne burzalne bolesti i praćenjem burza/bodi indeksa.

2. PREGLED LITERATURE

2.1 Definicija bolesti

Infektivna burzalna bolest je oboljenje koje uzrokuje virus iz familije *Birnaviridae*. Virus uzrokuje akutno, veoma kontagiozno oboljenje mladih pilića, koje je praćeno veoma izraženom imunosupresijom. Osnovni target organ predstavlja burza Fabrici, gde sazrevaju B limfociti i gde dolazi do njihove diferencijacije (Lukert and Saif, 2003). S obzirom na visok procenat mortaliteta i izraženu imunosupresiju koja čini piliće podložnim različitim sekundarnim infekcijama, kao i smanjenju imunskog odgovora na vakcinacije protiv drugih bolesti živine, prateće ekonomske štete koje ova bolest nanosi živinarskoj industriji u celom svetu su veoma velike (Weiss et Kaufer-Weiss, 1994; Schat, 1994; Van den Berg, 2000; Juul-Madsen et al., 2002).

2.2 Istorijski podaci

Infektivna burzalna bolest je prepoznata kao specifični entitet od strane Cosgrove (1962) pod nazivom avijarna nefroza, zbog pratećeg oštećenja bubrega tokom infekcije. Winterfield et al. (1972) su izolovali uzročnika na embrioniranim jajima i dali mu naziv „infektivni burzalni agent“ i identifikovali ga kao uzročnika ove bolesti. Naziv Infektivna burzalna bolest, usled patognomoničnih posledica na burzi Fabricii uvodi Hitchner (Lukert and Saif, 2003). Imunosupresivna priroda navedenog virusa prvi put je opisana od strane Allana (Allan et al., 1972).

IBD je dobila naziv i Gamboro bolest jer su se prvi slučajevi obolelih pilića pojavili u blizini mesta Gumboro, na poluostrvu Delaware, u Sjedinjenim Amerčkim Državama, 1957.godine. Osamdesetih godina prošlog veka je opisano postojanje i drugog serotipa virusa IBD (McFerran et al., 1980). Nakon toga dolazi do otkrića varijantnog soja serotipa 1 virusa u SAD-u, kao i veoma virulentnog soja virusa IBD u Africi, Aziji i Južnoj Americi (Lukert and Saif, 2003).

Kasnih osamdesetih godina prošlog veka usledilo je iznenadno pojavljivanje visoko patogenog soja virusa infektivne burzalne bolesti u celom svetu koji predstavlja značajan istorijski događaj. Prve pojave su zabeležene u Evropi (Chettle et al., 1989). Ovaj soj virusa u celom svetu uzrokuje značajne ekonomske štete. Antigena priroda tog soja nije kompletno raščišćena, ali su prepoznati virusi Serotipa 1. 1975. godine su

dijagnostikovani i potvrđeni prvi slučajevi infektivne burzalne bolesti u Jugoslaviji, a definitivna potvrda prisustva zaraze na našem prostoru izvršena je izolacijom virusa iz Fabricijusove burze leševa pilića jednog brojlerskog jata u Vojvodini (Velhner et al., 1976.). U periodu od 1978. do 1980. godine, Kozić i saradnici su ispitujući krvne serume živine sa uže teritorije Srbije često nalazili specifična precipitujuća antitela, ali bez ispoljavanja kliničkih znakova bolesti (citirano iz Velhner et al., 1980).

Van den Berg et Muelemans (1991) konstatuju da je bolest opisana i rasprostranjena širom sveta, što joj daje ogroman kako sociološki, tako i ekonomski značaj, imajući naročito u vidu veličinu ekonomskih šteta koje ona nanosi živinarstvu. Autori dalje naglašavaju, da ni sve mere koje se koriste u borbi protiv ove bolesti, nisu precizno definisane, pa samim tim nema ni standardnog plana i programa za njenu eradikaciju. Takođe ekspanzija međunarodne trgovine u svim oblastima, pa i živinarstvu, pojačava opasnost od pojave i šteta od ove bolesti.

Gumboro bolest živine u toku 1995. godine postaje internacionalni problem, s obzirom da je 95% zemalja, koje učestvuju i saraduju u prikupljanju podataka za OIE, prijavilo pojavu ove bolesti na svojoj teritoriji (Etteradossi, 1995; Van den Berg, 2000).

2.3 Ekonomski značaj IBD-a

Ekonomske gubitke možemo podeliti na direktne koji se očituju visokim mortalitetom, pre svega pilića starijih od tri nedelje i indirektne, koji nastaju kao posledica imunosupresije pilića u ranom periodu razvoja pilića. Indirektni gubici su rezultat sekundarnih virusnih, bakterijskih ili parazitarne infekcije (zbog smanjenog opšteg imunskog odgovora) (Lukert and Saif, 2003). Virus GB nema uticaja na ljude i nema zato značaj za javno zdravlje (Lukert and Saif, 2003).

Ducatelle et al. (1995) ubrajaju u indirektne troškove i gubitke koji se mogu javiti kao rezultat slabijeg prirasta i odbacivanja trupova na liniji klanja, zbog vidljivih znakova hemoragija ili izrazite kaheksije (škartovi).

McIlroy et al., (1989) sproveli su istraživanja u Severnoj Irskoj na velikom broju brojlerskih jata obolelih od GB i kvantifikovali ekonomske efekte koji prate subkliničke infekcije Gumboro bolesti u brojlerskoj proizvodnji. Njihov zaključak je da su kod oko 60% brojlerskih jata pronađene lezije na burzi Fabricii uprkos izostanku kliničke manifestacije GB. Farme sa jatima slobodnim od Gumboro bolesti imale su za

10% veći neto prihod na 1000 ptica u poređenju sa inficiranim jatima. Prosečna konverzija hrane i telesna masa bile su bolje u jatima slobodnim od Gumboro bolesti. Međutim, nisu zabeležene značajne razlike u procentu mortaliteta, što je naravno zavisilo pre svega od serotipa virusa i uzrasta pilića. Gubitak je uglavnom bio posledica smanjenja prosečne telesne mase i povećanog utroška hrane zbog loše konverzije.

McIlroy et al., (1992) su nastavili sa istraživanjima da bi se utvrdilo da li vakcinacija brojlera protiv GB, u starosti od 20 dana, živom, atenuiranom vakcinom ima uticaj na produktivnost. Utvrđeno je da su neto prihod, prosečna telesna masa i mortalitet značajno poboljšani.

Pojava hipervirulentnih sojeva virusa GB širom sveta je uticala na dalje uvećanje ekonomskih šteta od ove bolesti. Kada je reč o stepenu mortaliteta za različite provenijence postoje različiti podaci u zavisnosti od autora što možda govori o svojevrsnoj iregularnosti mortaliteta kod Gumboro bolesti živine.

Posle epidemije u Istočnoj Engleskoj Chettle et al. (1989) su izveli zaključke predpostavljajući da su slučajevi prijavljeni u veterinarskim istraživačkim centrima predstavljali veoma teške oblike Gumboro bolesti, da su gubici iznosili približno 50 jata kroz godinu dana (polovina brojlerskih slučajeva, polovina kod pilića u odgoju) sa stepenom mortaliteta koji se kretao minimalno 10%, 15% kao srednja vrednost, do maksimalnih 30%.

Sharma (1999) u projektu pod nazivom "Potencijalna vakcina za smrtonosni virus" navodi da Minesota proizvodi preko 60 miliona brojlera i kokica za proizvodnju konzumnih jaja u vrednosti 245 miliona dolara godišnje i da ne postoji konkretan i jednostavan obrazac za suzbijanje virusa GB. Njihovi proizvođači proračunali su da gube nekoliko miliona dolara godišnje zbog virusa GB i bolesti koje on izaziva. Proizvođači i u drugim delovima SAD a i u inostranstvu gube na stotine miliona dolara godišnje zbog virusa Gumboro bolesti. Ovi gubici dolaze kako zbog gubitaka na tržištu (zbog uginulih pilića) tako i zbog visokih dodatnih troškova vakcinacija metodama trenutno dostupnim. Procenjuje se da se 40 biliona doza vakcine proda godišnje u celom svetu. Autor dalje navodi da je prioritetni cilj razvijanje vakcine koja će smanjiti imunosupresiju izazvanu bolešću, kao i pojavljivanje same bolesti (incidenca). Autor na kraju kaže da je njihov glavni cilj redukcija gubitaka izazvanih Gumboro virusom za 50%.

Proučavajući razvoj rekombinantnih vakcina protiv Gumboro bolesti kod pilića Vakharia (2003) navodi, da Gumboro bolest izaziva supresiju imunskog sistema i prouzrokuje gubitke veće od 150 miliona dolara u svetu godišnje. Autor dalje navodi da se aplikacijom jedne doza rekombinovane subjedinične vakcine kod pilića postiže kompletna aktivna i pasivna zaštita protiv različitih tipova virusa Gumboro bolesti.

Goddard et al. (1994) navode da je kod brojlerskih jata često nivo mortaliteta iznosio od 20 do 30 %, dok Stuart (1989) navodi da se kod brojlerskih jata najčešće mortalitet kreće oko 15%, a da je kod pilića za uzgoj roditelja ili nosilja mortalitet generalno uzevši visok i da ima podataka da se kreće do 70%.

Veći broj autora govori o uzrastu živine prilikom pojavljivanja bolesti kao i o nekim predisponirajućim faktorima za pojavu GB kao i o tzv. konkurentskim bolestima a uglavnom se odnosi na odgoj kokica nosilja za proizvodnju konzumnih jaja: Pojavljivanje bolesti najčešće se dešavalo (32-76%) u starosti pilića od 2 do 12 nedelje života. Neočekivano visoki gubici zbog Gumboro bolesti su bili zapaženi kod pilića u starosti od 17 nedelja (Philip et Moitra, 1993).

Indirektni gubici nastaju kao posledica delovanja virusa Gumboro bolesti na imunski sistem, što rezultira pojavom imunosupresije i povećanom osetljivošću na mnoge druge patogene, pa i neke saprofite. U indirektnu gubitke treba uračunati i zaostajanje u rastu, odbacivanje "škart" trupova na liniji klanja (meso koje ima krvave mrlje se odbacuje), loš imunski odgovor na sprovedenu imunoprofilaksu protiv drugih patogena i povećanu upotrebu hemoterapeutika u borbi protiv sekundarnih infekcija. Troškove proizvodnje povećava i duži tov usled poštovanja karence pri upotrebi antibiotika za lečenje sekundarnih bakterijskih infekcija. (De Wit, 2001).

2.4 Virus infektivne burzalne bolesti

2.4.1 Klasifikacija i molekulska struktura

Virus Gumboro bolesti je sitan i bez omotača (peplosa). Kapsid je oblika ikosaedra sa 32 kapsomere, dijametra oko 60 nm, pripada porodici Birnaviridae, rod Avibirnavirus (Kibenge et al., 1988; Leong et al., 2000). Nasledni materijal virusa čini dvostruki lanac (ds) RNK (Müller et al., 1979) sa dva segmenta: A i B. Otporan je u spoljnoj sredini i rezistentan na relativno visoke temperature. Relativna jednostavnost Gumboro virusa mogla bi biti razlog za njegovo delovanje na ćelije koje se aktivno dele, kao što su nezrele limfoidne ćelije.

Hudson et al. (1986); Miler et Nitschke (1987); Kibenge et al. (1997) i Maw et al. (2006) utvrdili su strukturu i organizaciju virusnog genoma koja se sastoji se iz dva segmenta. Manji segment B ds RNK, dužine 2800 baznih parova (bp) kodira VP1 strukturni protein u kapsidu, dok veći segment A ds RNK, dužine 3200 bp kodira sintezu strukturnih proteina VP2, VP3, VP4 kao i VP5 nestrukturnog proteina.

Snyder et al. (1988); Caston et al. (2001) objašnjavaju poseban značaj koji imaju strukturni proteini VP2 i VP3. Proteini VP2 i VP3 formiraju kapsid virusa, VP2 su spoljašnji a VP3 unutrašnji proteini kapsida.

VP2 je identifikovan kao glavni antigen za produkciju zaštitnih antitela domaćina, konformacijski zavisnih imuno-dominantnih epitopa koji se nalaze u hiper varijabilnom regionu VP2 i koji indukuju sintezu neutralizacionih antitela protiv IBDV (Fahey et al., 1989; Islam et al., 2001b; Maw et al., 2006, Ashraf et al., 2007). Epitopi koji indukuju neutralizaciju i proizvodnju zaštitnih specifičnih antitela su locirani na VP2 proteinu virusa, a to saznanje omogućilo je proizvodnju nekoliko grupa monoklonskih, specifičnih antitela protiv virusnog proteina VP2.

Antigeni deo VP2 (epitopi) odgovoran za indukciju neutralizujućih antitela je unutar malog regiona, nazvanog varijabilni domen VP2, i veoma je zavistan od konformacije VP2 proteina (Schnitzler et al., 1993). Ovaj deo je takođe odgovoran za serotipsku specifičnost. Grupno specifični epitopi, odgovorni za indukciju antitela, koja mogu unakrsno reagovati sa oba serotipa virusa (ne sintetišu se virus neutralizaciona antitela) nalaze se na VP3 proteinu (Oppling et al., 1991).

Nagarajan et Kibenge (1997b) navode da svaka modifikacija ovih struktura može uticati na virusnu reprodukciju, specifičnost za domaćina i virulencu soja.

Određivanje nukleotidne sekvence virusa i sekvence aminokiselina na kapsidu virusa koja je od nje kodirana, daje informaciju na molekularnom nivou o antigenosti i patogenosti virusa infektivne burzalne bolesti. Ispitivanjem nukleotidne i aminokiselinske sekvence varijabilne regije VP2 proteina, reverznom transkripcijom – polimeraza lančanom reakcijom (RT-PCR) omogućava molekularnu dijagnostiku IBDv i identifikaciju sojeva virusa (Maw et al, 2006.). Takođe ranijim ispitivanjima nukleotidne sekvence koja kodira varijabilni region VP2, utvrđeno je da se vrlo virulentni virusi infektivne burzalne bolesti izolovani u Evropi, Aziji i Africi mogu svrstati u istu grupu i da su oni antigenski i genetski slični jedni drugima (Eterradossi et al., 1999).

2.4.2 Serotipovi virusa infektivne burzalne bolesti

Postoje dva serotipa virusa infektivne burzalne bolesti, označeni kao 1 i 2. Virusi oba serotipa prirodno inficiraju piliće i ćurke, ali se bolest javlja samo kod pilića i samo virusi serotipa 1 su patogeni. Virus serotipa 2 se uglavnom izoluje kod ćuraka i nije patogen za piliće niti stvara zaštitu kod pilića protiv sojeva virusa serotipa 1 (Saif, 1998; Van den Berg, 2000).

Virusi serotipa 1 po svojoj virulentnosti i antigenosti, mogu da se podele na blage, srednje (intermedijarni) i vruće (intermedijarni plus, hot) vakcinalne sojeve (vaccine serotip 1), klasično virulentne (cvIBDV), vrlo virulentne (vvIBDV) i varijantne viruse (Van den Berg, 2000; Müller et al., 2003). Antigeno varijantni sojevi virusa su otkriveni i cirkulišu u SAD-u i Australiji (Snyder et al., 1988; Sapats et Ignjatovic, 2000).

2.4.3 Kultivisanje u živim ćelijama in vitro

Izolacija i kultivisanje virusa infektivne burzalne bolesti laboratorijskim metodama se najlakše izvodi na embrioniranim jajima bez specifičnih patogena (specific pathogen free – SPF) pilića, ćuraka ili pataka od 9. do 11. dana starosti. Inokulacija se vrši na horio-alantoisnu membranu ili u žumancetnu kesu. Posle nekoliko pasaža na kokošijim embrionima sojevi virusa Gumboro bolesti mogu se kultivisati i na kulturama tkiva pilećih fibroblasta. Adaptacijom virusa na kulturu tkiva, izvršena je i njegova atenuacija (Lange et al., 1987). Veliki broj pasaža u kulturi tkiva, dovodi do formiranja malih plakova virusa koji su visoko atenuisani (Müller et al., 1986). Ovako dobijeni virus veoma dugo je korišćen kao živa atenuirana vakcina. Divlji tipovi virusa infektivne burzalne bolesti, naročito „vrlo virulentni” sojevi virusa infektivne burzalne bolesti (vvIBDV), normalno se ne umnožavaju u kulturi tkiva. Ranija *in vivo* istraživanja pokazala su da vvIBDV koji je bio prilagođen na kulturu embrionalnih ćelija pileta, korišćenjem ciljane mutageneze i reverzne transkripcije, samo delimično biva oslabljen za SPF (Van Loon et al., 2002) i komercijalne piliće (Raue et al., 2004). Povratak i oživljavanje virulencije ovako oslabljenog virusa ograničava njegovu primenu u vakcinaciji (Raue et al., 2004).

2.5 Epizootiologija infektivne burzalne bolesti

Nema saznanja o vertikalnom prenošenju infektivne burzalne bolesti (putem jaja). Serološka evidencija (seropozitivnost) kod prirodne infekcije je bila utvrđivana kod pilića, ćuraka, pataka, morki i nojeva. Međutim o klinički manifestnoj bolesti je izveštavano samo kod pilića, mada su mikroskopske lezije nađene i kod drugih ptica. Bolest kod pilića izaziva samo serotip 1, ali pilići su osetljivi (prijemčivi) i na infekciju serotipom 2 virusa infektivne burzalne bolesti. Ćurke su takođe prijemčive sa oba serotipa virusa, ali bolest kod njih nije zabeležena (Saif, 1998).

Neutralizaciona ili precipitaciona specifična antitela, utvrđena kod različitih vrsta divljih pataka i gusaka, ali i kod vrane i pingvina, ukazuju da su i divlje ptice mogući rezervoari i vektori virusa infektivne burzalne bolesti (Gardner et al., 1997). Ogawa et al., 1998).

Okoye et al. (1990) su objavili serološke rezultate dobijene AGP testom, koji pokazuju prisustvo specifičnih antigena (precipitinogena) virusa infektivne burzalne bolesti, i u unutrašnjim organima pacova, koji su vodili poreklo sa živinarskih farmi zaraženih virusom IBD.

Živina je najosetljivija na infekciju virusom IBD između 3. i 6. nedelje starosti, što i odgovara periodu kada se burza Fabrici veoma razvija. Ako do infekcije dođe u ovom uzrastu dolazi do akutne forme GB koja je praćena: Depresijom, nakostrešenošću, iscrpljenošću i pojavom vodenastog i beličastog prolića. Ako do infekcije dođe pre treće nedelje starosti bolest najčešće protiče u subkliničkom toku (Faragher et al., 1974; Saif, 1998).

Za sada je potvrđeno i naučno priznato samo horizontalno prenošenje i širenje virusa infektivne burzalne bolesti, i to tako da se prijemčive jedinke inficiraju najčešće peroralnim, a ređe respiratornim putem. Vindevogel et al. (1976) utvrdili su da inficirani pilići izlučuju virus preko fecesa veoma rano (već 48 časova posle nastanka infekcije) i mogu izlučivati virus 1-14 dana nakon infekcije, ali ne duže od 16 dana.

Mogućnost perzistiranja infekcije kod pilića u fazi rekonvalescencije, nije još potpuno istražena. Bolest se prenosi kontaktom između zaraženog i prijemčivog jata direktno sa izlučevinama (feces, mokraćna, iscedak iz nosa i kljuna), ili indirektnim kontaktom (preko kontaminiranih vektora, hrane, vode, samih životinja ili preko odeće radnika, odnosno farmskim osobljem. Howie et Thorsen (1981) sugerišu da i pojedini insekti mogu biti značajni vektori, poput nekih vrsta komaraca (*Aedes vexans*).

McAllister et al. (1995) su utvrdili da virus infektivne burzalne bolesti može da preživi i do 8 nedelja u larvama kukuruznog brašnara (*Alphitobius diaperinus*) u zaostaloj hrani iz živinarskog objekta kontaminiranog virusom. Nije utvrđeno da li larve virus prenose mehanički ili biološki (razvoj virusa u larvama). Ekstremna otpornost virusa GB na raznovrsne uticaje spoljne sredine, olakšava mogućnost indirektnog prenošenja virusa.

Širenju virusa infektivne burzalne bolesti, naročito u međunarodnoj trgovini žvinskim mesom i prerađevinama, doprinose i osobine virusa, da može u potpunosti da sačuva infektivnost na različitim temperaturama, kako niskim tako i visokim. Cho et Edgar (1972) navode da na niskim temperaturama (-20°C) infektivnost virusa traje i do tri godine.

Visok stepen rezistencije virusa infektivne burzalne bolesti na fizičke i hemijske agense omogućava njegovo dugo održavanje u spoljašnjoj sredini i u kontaminiranim farmama živine.

Benton et al. (1967) utvrdili su da IBDV podnosi vrlo niske vrednosti pH, ali je osetljiv na natrijum hidroksid i kad je PH preko 12 on biva potpuno inaktivisan. Virus GB je prilično otporan na: etar, hloroform, kvaternerna amonijumova jedinjenja, fenol i njegove derivate. Jedinjenja joda i formalin su se pokazali kao efikasni dezinficijensi.

Oksidaciona sredstva su takođe efikasna protiv izazivača ove bolesti, a Neighbor et al. (1994) su utvrdili da je rastvor vodonik peroksida u koncentraciji od 10%, raspršen u obliku fine magle, vrlo efikasan protiv IBDV-a.

Do 1987. godine infektivna burzalna bolest nije predstavljala veći problem u svetu jer se nije ispoljavala u klinički manifestnom obliku i držana je veoma uspešno pod kontrolom zahvaljujući vakcinaciji. Mortalitet je bio niži od 5%, a indirektni gubici su nastajali kao posledica imunosupresije. Ali, od 1987. primećuje se slabiji učinak vakcina u raznim delovima sveta. U SAD pojava novih sojeva virusa GB dovodi do blagog porasta mortaliteta, ali u Evropi i Aziji mortalitet je dostizao i do 70% kod nosilja i do 30% kod brojlera. Klinički manifestni oblik postaje dominantna forma oboljenja uz dodatne gubitke zbog specifičnih uginuća. Na osnovu antigenih i molekularnih karakteristika ovih novih sojeva istraživači su definisali novu epidemiološku situaciju (Van den Berg, 2000).

Promenu kliničke slike IBD-a zabeležili su istih godina dijagnostičari sa područja Delaware (SAD). Snyder et al. (1988) su upotrebom tehnike monoklonskih

antitela dokazali promjenljivost epitopa i nastanak varijantnog tipa 1 virusa iz klasičnog soja. U SAD novi sojevi se karakterišu izraženom genskom varijacijom (Snyder et al., 1992) ali blagim porastom mortaliteta, dok u Evropi i Aziji sojevi još uvek pripadaju klasičnom serotipu 1, ali se javlja značajan porast patogenosti.

Novi, virulentni sojevi su prvi put opisani u Evropi krajem osamdesetih godina prošlog veka (Chettle et al., 1989), a zatim u Japanu ranih 90-ih (Nunoya et al., 1992) odakle su se brzo raširili po svetu. Van den Berg et al. (1991) opisuju pojavu visoko patogenog soja tipa 1 IBDV (vvIBDV) u Holandiji i Belgiji, 1987.godine. Kliničko stanje koje su izazivali sojevi vvIBDV, označeno je kao vrlo virulentna infektivna burzalna bolest (vvIBD).

Filogenetske analize segmenta A vvIBD virusa pokazuju da se virioni skupljaju u grozdove i da su veoma slični klasičnim sojevima virusa poput 52/70 (Brown et al., 1994; Van den Berg et al., 1997). Oni su potvrdili da se spontano povećanje virulencije odigralo bez bitnijih promena u antigenskoj strukturi virusa.

2.6 Imunopatogeneza

Patogeneza se može definisati kao način na koji virus dovodi do oštećenja tkiva domaćina izazivajući nastanak bolesti, imunosupresiju i/ili smrt. Suština patološkog procesa posle infekcije virusom infektivne burzalne bolesti jeste zapaljenje, a zatim nekroza limfatičnog tkiva prvenstveno burze Fabrici (Velhner et al., 1980).

Virus pokazuje tropizam prema burza Fabricii (BF) u kojoj se proizvode B limfociti. Okoye et Uzoukwu (1990) su proučavajući patogenezu infektivne burzalne bolesti embrionalno burzektomisanih pilića, došli do zaključka da BF nije neophodna za nastanak infekcije, ali je neophodna u patogenezi bolesti za ispoljavanje kliničkih znakova. Burzektomija može sprečiti nastanak bolesti kod pilića inficiranih virulentnim sojem (Hiraga et al., 1994). Masivna replikacija virusa u ćelijama burze dovodi do njihove destrukcije, a posledična diseminacija virusa do bolesti i smrti.

Prema istraživanjima Hirai et Calnek (1979) infekcijom su najmasovnije zahvaćeni B limfociti, ali su veoma često inficirane i ćelije makrofagno-monocitnog sistema koje mogu doprineti diseminaciji virusa (Burkhardt et Müller, 1987). Visoke koncentracije virusnog antigena dokazane su u BF, dok je samo u tragovima virus otkriven u timusu i slezini (Lasher et Shane, 1994). Prva replikacija virusa posle per os infekcije odvija se u makrofagima i limfoidnim ćelijama digestivnog trakta već za 4

sata posle unosa virusa. Zatim ubrzo, BF biva inficirana, i za manje od 16 sati posle infekcije nastaje masivna replikacija virusa u ćelijama burze Fabricii, vodeći ka produženoj viremiji koja dovodi do oštećenja i drugih organa (Hiraga et al., 1994). Umnožavanje virusa u B limfocitima *in vivo* uzrokuje atrofiju burze obično 4 dana nakon infekcije (Lasher et Shane, 1994).

Apoptoza je proces u toku koga, kao odgovor na specifične stimulse, ćelije izumiru na kontrolisan, programiran način. Mnoge visoko diferentovane ćelije mogu podleći apoptozi, ali su zreli B limfociti i T limfociti naročito prijemčivi. Apoptozu obično indukuju fiziološki stimulusi, ali i neki patološki, poput virusne infekcije, mogu da posluže kao okidač (Jungmann et al., 2001). Broj ćelija u apoptozi je u srazmeri sa intenzitetom replikacije virusa. Ova ispitivanja pokazuju da pored nekroze, i apoptoza dovodi do deplecije ćelija u inficiranoj burzi Fabrici. Brojne studije kao i brojni autori, (Vasconcelos et Lam, 1994; Tanimura et Sharma, 1998) pokazuju da je imunosupresija koju izaziva virus infektivne burzalne bolesti bar delimično uzrokovana apoptozom.

Fernandez-Arias et al. (1997); Yao et al. (1998) smatraju da su VP2 i VP5 proteini induktori apoptoze, ali su potrebna dodatna istraživanja da se njihova uloga precizno utvrdi.

Kod ptica koje prežive akutnu fazu bolesti, umnožavanje virusa se smanjuje, i lobulusi burze koji su ostali bez ćelija mogu ponovo da se repopulišu B-ćelijama (Müller et al., 2003).

Replikacija virusa u burzi Fabrici stvara velike lezije (nekroze), depleciju limfoidnih folikula, tako da virus oštećuje pre svega humoralni imunski sistem ptica. Predilekciono mesto za virus infektivne burzalne bolesti su B ćelije. Limfocitne ćelije pilića na svojim površinama poseduju specifične proteinske receptore. B ćelije između ostalih poseduju IgM i Bu-1b receptore. Imunoglobulini M klase (IgM) su osnovna antitela koje produkuju B ćelije. To su primarna antitela koja se stvaraju kao odgovor na početku ekspozicije antigena. Korišćenjem konjugovanih monoklonskih antitela (eng. mAb) tzv. markera, koji se vezuju za odgovarajuće receptore limfocita, može da se utvrdi broj i procenat limfocita. Posle bojenja jednoćelijskih suspenzija sa monoklonskim antitelima, intenzitet bojenja se može kvantifikovati protočnom citometrijom. T limfociti pileta produkuju takođe različita anti-pileća antitela. Istim metodama bojenja korišćenjem različitih monoklonskih antitela (markera) mogu da se broje T limfociti ili određuje njihov odnos i struktura (imunofenotipizacija). Tako se monoklonskim CD4 antitelima (CD4mAb) detektuju T helper limfociti, CD8

antitelima T citotoksični i supresorski limfociti, CD45 antitelima ukupne T limfocitne ćelije krvi (Bridle et al., 2006; Fair et al., 2008).

Analizama broja limfocita, metodom protočne citometrije (eng. flow cytometry), dobijenih iz krvi, slezine i burze pilića neinficiranih i inficiranih virusom infektivne burzalne bolesti, dokazan je pad procenta limfocita sa površinskim IgM markerima (B limfociti) u slezini i burzi inficiranih pilića. Korišćenjem CD4 i CD8 markera za analizu iz periferne krvi i slezine nisu ustanovljene značajne razlike u broju i odnosu T limfocita pre infekcije i posle infekcije pilića virusom infektivne burzalne bolesti (Rodenberg et al., 1994). Ovi rezultati sugerišu postojanje humoralne imunodepresije nastale kao posledica prisustva virusa IBD, dok analizom broja i proporcije T helper i T citotoksičnih i supresorskih limfocita nije uočena celularna imunodepresija.

Imunofenotipizacijom populacije limfocita iz periferne krvi pilića odgajanih u sistemu slobodnog gajenja (eng. free-range), ustanovljeno je da su CD3⁺ monoklonska antitela reagovala sa 12-24% limfoidnih ćelija krvi, CD4⁺ ekspresija je bila u procentu od 4-31% a CD8⁺ od 1-10%. U kombinacijama su korišćena sledeća anti-pileća antitela za protočnu citometriju: CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ i CD45⁺ koja pokazuju ukupne limfoidne ćelije (Fair et al., 2008). Ovaj rad pokazuje izvodljivost korišćenja protočne citometrije za merenje periferne krvi pilića, korišćenjem anti-pilećih antitela za limfocitne subpopulacije, ali ne za sve vrsta ptica, ne za npr. Common Raven (*Corvus corax*) ili Black-billed Magpie (*Pica pica*) (i još drugih vrsta ptica). Jer je prirodna varijabilnost imunoloških funkcija još više izražena kod ptica.

Analizu stanja B i T ćelija i njihov odnos u burzi Fabrici, kada su pilići bili izloženi patogenom soju virusa IBD, sprovodili su brojni autori. Kod infekcije patogenim sojem IBD dolazi do rapidnog uništenja B burzalnih ćelija i do infiltracije T ćelija u burzu Fabrici. Sedam dana nakon infekcije, protočnom citometrijom ćelijske suspenzije burzalnog tkiva utvrđeno da je 65% predstavljalo T ćelije a svega 7% B ćelije. Kod SPF pilića T ćelije predstavljaju manje od 5% svih ćelija BF a nakon 7 dana od infekcije i kasnije 65% burzalnih ćelija su T ćelije. Suprotno posle sedam dana od infekcije IBD virusom, nivo B ćelija burze koji je obično 35% svih burzalnih ćelija opada do 7% (Kim et al., 2000).

Većina burzalnih T ćelija izazvanih IBDV infekcijom su sa TCR2⁺ receptorima, nešto manje TCR1⁺ (Tanimura et Sharma, 1997). Kim et al. (2000) su ispitali burzalne T ćelije izazvane IBDV infekcijom uz korišćenje CD3⁺, CD4⁺,

CD8⁺ i CD25⁺ mouse anti-chicken monoklonskih antitela. Interesantno je uporediti odnos dve značajne podgrupe T ćelija, CD4⁺ i CD8⁺, nakon infekcije virusom infektivne burzalne bolesti i nakon priliva aktiviranih T ćelija u BF. Merenje je vršeno i u perifernoj cirkulaciji pilića.

Maksimalan nivo CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita se dostiže 7. dana nakon infekcije. Treba naglasiti da se oni nalaze u podjednakim odnosima tokom prvih 7 dana, da bi kasnije CD8⁺ T ćelije postale dominantne. Ovaj mehanizam se verovatno odvija posredstvom citokina i njihovih citotoksičnih efekata (cit. Resanović, 2015).

Nakon 7 dana infekcije i kasnije oko 2. nedelje, relativan broj burzalnih CD4⁺ T ćelija opada na 10% od ukupnih burzalnih ćelija a nasuprot tome raste broj CD8⁺ T (T citotoksični limfocit) ćelija iznad 20% (Kim et al., 2000).

Rezultati ukazuju da bi burzalne T ćelije mogle imati značajnu ulogu u virusnom klirensu i oporavku burze Fabrici posle infekcije. Intraburzalne T ćelije ograničavaju replikaciju virusa u ranoj fazi bolesti, ali u isto vreme dovode do oštećenja i produženog vremena oporavka BF, jer imaju negativan uticaj na repopulaciju B folikula. (Rautenschlein et al., 2002a, 2002b; Rautenschlein et Haase, 2005).

Imunofenotipizacijom limfocitnih subpopulacija u perifernoj krvi živine Bridle et al. (2006) su ustanovili procentualnu zastupljenost pozitivnih CD4 i CD8 T ćelija. Na osnovu zastupljenosti utvrđivali su važan CD4⁺/CD8⁺ T limfocitni odnos (Eng. Helper/Suppressor ratio -H/S ratio). Utvrdili su da je odnos CD4⁺/CD8⁺ T limfocita u perifernoj krvi laboratorijski uzgajanih pilića bio od 2,93 do 3,25. Taj odnos kod komercijalno uzgajanih pilića, intenzivno vakcinisanih i starijih je manji i kreće se od 1,3 do 1,9. Nasuprot smanjivanju odnosa T helper/T citotoksičnih ćelija u krvi, relativne proporcije ukupnih CD3, CD4, CD8, CD45 limfocita su veće kod komercijalno uzgajanih pilića u odnosu na laboratorijski uzgajane (Bridle et al., 2006 ;Fair et al., 2008). Nešto manje proporcije su zabeležene u studiji Fair et al. (2008) u zavisnosti najverovatnije od starosti živine u ogledu. I drugi autori su radili cirkulišuće limfocite kod mladih nosilja do godinu dana starosti. Nivo cirkulišućih T ćelija pilića opada sa starošću (Cheng et al., 2001; Berndt et al., 2006).

Manji odnos CD4⁺/CD8⁺ T limfocita kod komercijalno uzgajanih pilića se objašnjava pre svega genetskom selekcijom na proizvodne osobine, faktorima sredine u komercijalnom odgoju i intenzivnom imunizacijom. Smanjenje odnosa CD4⁺/CD8⁺

T limfocita u perifernoj krvi, odnosno povećanje CD8⁺ T ćelija karakteriše se kao smanjenje imunokompetencije kod komercijalno uzgajanih pilića (Bridle et al., 2006).

Stewart et Nicholson (2000) ukazuju da za takve analize kada se koriste obeležena monoklonska antitela (mAb), poželjno je koristiti ih od istog proizvođača, iz razloga što različite kompanije koje proizvode monoklonska antitela, mogu da ih proizvedu imunizacijom sa različitim epitopa. Dešava se da korišćenjem istih monoklonskih antitela (CD3⁺ npr.) od drugog proizvođača dobijemo različit procenat utvrđenih limfocita.

Uzročnik infektivne burzalne bolesti je imunosupresivan virus, koji prvenstveno inficira IgM B ćelije u burzi Fabrici. Posle veštačke infekcije nevakcinisanih pilića virusom IBD, populacija B limfocita se značajno smanjila između 7. i 21. dana nakon infekcije, u poređenju sa nevakcinisanim i neinficiranim pilićima i u poređenju sa vakcinisanim, pa veštački inficiranim (Petkov et al., 2009). Dve subpopulacije B ćelija su merene na osnovu ekspresije IgM i Bu-1b površinskih markera. Isti autori navode da i pored smanjenja populacija B ćelija u burzi Fabrici posle izlaganja pilića virusom IBD, ne dolazi do smanjenja nivoa ukupnih serumskih imunoglobulina (IgA, IgG i IgM), niti utiče na IgG i IgA B ćelija u slezini.

Hirai et al. (1981) i Petkov et al. (2009) ukazuju da smanjenje subpopulacije B limfocita u BF, nije smanjilo ukupne nivoe imunoglobulina. Autori takođe nisu uočili pad imunoglobulina IgG (IgY) ćelija krvi.

Rezultati istraživanja o ulozi ćelijskog imunskog odgovora i značaju virus specifičnih antitela (Rautenschlein et al., 2002b; Rautenschlein et Haase, 2005) pokazuju da samo antitela nisu dovoljna da zaštite živinu od infekcije IBD virusom, i da je uloga T-limfocita ključna za izgradnju zaštitnog imunskog odgovora.

Virus se replikuje i u ćelijama monocitno-makrofagne loze koje imaju veoma značajnu ulogu u diseminaciji virusa po organizmu. Makrofagi koji su permanentno inficirani serotipom 1 virusa, imaju specifičnu ulogu u ovom procesu dovodeći do burnog procesa lučenja citokina kao što su tumor TNF (tumor necrosis factor), IL6 (interleukin 6) i faktora transformacije rasta (TGF-β) (Lam, 1998). Takođe treba uzeti u obzir ulogu posrednika TH ćelija u patogenezi (Vervelde et Davison, 1997).

Infekcija virusom GB rezultira nastankom imunosupresije. Imunosupresivni efekti su najizraženiji ukoliko do infekcije živine dođe u starosti od 2-3 nedelje. Imunosupresija se klinički manifestuje na različite načine. Svakako proizvodne osobine datog jata su znatno smanjene. Imunosupresivna jata su izložena sekundarnim

infekcijama. Titar antitela kao odgovor na izvršenu vakcinaciju je nizak i raste procenat loših trupova na liniji klanja. Imunosupresija prati i kliničku i subkliničku formu GB (Resanović, 2015).

Pilići stari do 14 dana koji prežive infekciju virusom GB su imunosupresivni uprkos repopulaciji B limfocita u burzi i humoralni imunitet im ostaje oštećen tokom celog života a pilići stariji od 24 dana koji prežive infekciju virusom GB imaju prolaznu depresiju sistemske produkcije antitela. Čelijski imunski odgovor i funkcija heterofila i makrofaga je privremeno oslabljena (Ragland et al., 2002).

Destrukcija nezrelih oblika B limfocita u burzi Fabrici, predstavlja osnov za pojavu imunosupresije, koja poprima mnogo teži oblik kada su u pitanju mlađe nego starije jedinke (Faragher et al., 1974).

Smatra se da destruktivna Ig produkovanja B ćelija predstavlja verovatno glavni mehanizam nastanka imunosupresije humoralnog imunskog odgovora (Hoerr, 2010).

Da Silva Martins et al. (1992) su utvrdili da je za ranu imunosupresiju pilića odgovorna destruktivna limfocita iz čijih plazma ćelija nastaju imunoglobulini M klase (IgM). Autori su koristili hromatografiju na gelu da bi razdvojili klase imunoglobulina iz krvi petonedeljnih SPF pilića, prethodno inficiranih patogenim 50/72 sojem IBDv-a.

Sharma et al. (1989, 1993, 1994, 2000) su kao najteže i najduže posledice imunosupresivnih efekata virusa infektivne burzalne bolesti ustanovili kod slučajeva kada su jednodnevni pilići bili inficirani virusom. U terenskim uslovima, to je retkost, a pilići se obično inficiraju tek u uzrastu od 2 do 3 nedelje, i to u momentu kada nivo specifičnih maternalnih antitela protiv virusa IBD-a opadne ispod zaštitnog nivoa.

Giambrone et al. (1977) proučavali su posledice koje nastaju usled imunosupresivnog efekta bolesti, a koje se javljaju kao slabiji imuni odgovor pilića, na ostale sprovedene vakcinacije koje su od velike važnosti naročito za intenzivnu živinarsku proizvodnju.

Podaci o uticaju virusa GB na celularni imunitet i specifične T ćelije su kontroverzni. Kompromitovani mogu biti T limfociti u slezini i u perifenoj cirkulaciji. Smatra se da virus GB modulira funkciju T ćelija, ali se tačan mehanizam modulacije još uvek ne zna.

OIE (2000) je kao najbolji metod, za određivanje stepena imunosupresije, prihvatio metod merenja postignutog nivoa humoralne zaštite (titar vakcinalnih antitela) protiv virusa atipične kuge živine, nakon prethodnog zaražavanja pilića virusom infektivne burzalne bolesti.

2.7 Klinička slika i oblici bolesti

Posle kratke inkubacije, koja iznosi 2 do 4 dana, u akutnim slučajevima ptice leže iscrpljene, nakostrešene i zaprljane vodenastim i beličastim prolivom. Jedan od prvih simptoma, nakon inkubacije, je depresija obolelih ptica.

Uginuća se masovnije javljaju najčešće trećeg dana od početka ispoljavanja kliničkih simptoma. Mortalitet se u naredna 4 dana, svakodnevno progresivno povećava. Posle pika mortaliteta, dolazi do naglog pada dnevnog uginuća. Živina se u sledećih 5 do 7 dana potpuno oporavlja.

Mortalitet može i izostati, ali obično se kreće do 20-30% (pri infekciji klasično virulentnim sojevima virusa), pa sve do 90 i 100 % (pri infekciji vrlo virulentnim sojevima virusa) (Van den Berg et al., 1991).

Imunosupresija je zapažena kod pilića sa niskim titrom maternalnih antitela, koji su bili izloženi virusu infektivne burzalne bolesti u prvih 10 dana života. Kao posledica toga, dolazi do ispoljavanja širokog spektra sekundarnih oboljenja kako kod brojlera tako i kod pilića nosilja .

Brojne infekcije, naročito respiratornog sistema, pratioci su imunosupresije (Faragher et al., 1974). Kliničko ispoljavanje infektivne burzalne bolesti zabeleženo je najranije kod 12 dana starih pilića (Audi et al., 1972), što su pilići mlađi, to je tok bolesti akutniji, a procenat obolelih veći. Težina bolesti zavisi od imunskog statusa jedinki, virulencije i serotipa virusa IBD-a kao i kompletnog menadžmenta farme. Bolest se ispoljava kroz tri glavna klinička oblika:

Klasičan oblik, opisan je još 1962. godine i uzrokuju ga klasični virulentni sojevi virusa infektivne burzalne bolesti (cv IBDV). Krajem sedamdesetih godina prošlog veka bolest je proticala uglavnom bez kliničkih simptoma, a mogla se dokazati nalazom antitela na IBD kao i histološkim promenama na burzi Fabrici. Faragher (1972) daje objašnjenje da je imunski odgovor kod asimptomatskog oblika relativno nizak i da bolest najčešće ima subklinički tok, a do infekcije dolazi posle pada titra maternalnih antitela, ispod zaštitnog nivoa.

Imunosupresivni oblik, Snyder (1990) i Snyder et al. (1988,1992) su prvi opisali u SAD. Njega izazivaju slabo patogeni virusi infektivne burzalne bolesti, kao i njegovi varijantni sojevi. Varijantni sojevi virusa su delimično rezistentni na neutralizaciju specifičnim antitelima protiv tzv. "klasičnih" sojeva virusa IBD-a.

Akutni oblik, opisan je u Evropi krajem osamdestih godina prošlog veka, a izazivaju ga “vrlo virulentni” sojevi virusa infektivne burzalne bolesti (vvIBDV). Neki od izolata vvIBDV-a izazvali su mortalitet od 90% do 100% kod pilića Leghorn provenijencije (Chettle et al., 1989; Van den Berg et al., 1991). Isti autori ga opisuju kao oboljenje sa akutnom, progresivnom kliničkom slikom, koje često u zahvaćenim jatima izaziva veoma visok procenat smrtnosti.

2.8 Patomorfološke promene

McFerran (1993) opisuje patomorfološke promene koje se primećuju uglavnom na samoj burzi Fabrici. Hiperemija, hipertrofija i edem burze Fabrici redovan je nalaz kod živine koja je uginula za vreme akutne faze bolesti. Kod najtežih slučajeva bolesti, na burzi se mogu uočiti i petehijalna krvarenja. Od petog dana infekcije, veličina burze Fabrici se smanjuje, da bi oko osmog dana u velikoj meri atrofirala. Veličina atrofirane burze nakon petog dana infekcije iznosi tek 1/3 od uobičajene veličine, za taj uzrast živine.

Na muskulaturi grudi i nogu izražena su markantna tačkasta krvavljenja koja mogu biti i u obliku ehimoza. Još uvek nije u potpunosti poznat mehanizam nastanka krvavljenja kod IBD (Resanović, 2015). Neki autori poput Skeeles et al. (1980) smatraju da su krvavljenja posledica poremećaja u koagulaciji obolele živine.

Prvi opisi patomorfoloških promena nastalih kao posledica GB u SAD, govore o značajnim promenama na bubrezima. Bubrezi su hipertrofirani i blede sive boje kao posledica poremećene resorpcije i nakupljanja kristala urata u tubulima (Cosgrove, 1962).

Promene se uočavaju i na jetri. Jetra je često uvećana sa nekrotičnim žarištima duž ivice lobusa. Žarišta u ređim slučajevima mogu biti rasuta po ostalim područjima jetre (Cosgrove, 1962; Cho et Edgar, 1972).

Lukert et Saif (1997) opisuju promene na burzi Fabrici kod nekih varijantnih sojeva virusa infektivne burzalne bolesti poreklom iz SAD-a. Ovi sojevi virusa izazivaju brzu atrofiju burze Fabrici, za razliku od ostalih sojeva virusa, kod kojih atrofija burze ima uobičajeni redosled promena u toku zapaljenskog procesa.

Hiraga et al. (1994), Inoue et al. (1994) su utvrdili da se karakteristične makroskopske promene na burzi Fabrici u akutnom toku bolesti, koje su uzrokovane

vrlo virulentnim sojevima virusa IBD, mogu naći i na drugim limfatičnim organima (timus, slezina, cecalne tonzile, Pajerove ploče, Harderova žlezda i kostna srž).

Henry et al. (1980) su napravili poseban model za utvrđivanje stepena makroskopskih promena na zahvaćenim organima. Prema njima u zavisnosti od stepena promena, one se ocenjuju na skali od 1 do 5. Sa najvišim stepenom B limfociti bivaju skoro potpuno uništeni a teški oblik panleukopenije nastaje kao posledica toga.

Sharma et al. (1989) stepen oštećenja burzalnog limfoidnog tkiva ocenjuju od 0 do 4 (burza scor) na osnovu stepena nekroze limfnih folikula i/ili limfocitne deplecije. Najmanje promene od 0 su ako je do 5% burzalnih folikula pogođeno (limfocitna deplecija i cistične formacije). 1 je od 5-25%, 2 od 25-50%, 3 od 50-75% i burza scor od 4 je kad je više od 75% burzalnih folikula oštećeno.

Za procenu oštećenja burze se takođe koristi i odnos mase burze prema masi tela i izražava se takozvanim „burza/telesna masa“ odnosom (eng. Bursa body weight ratio, B/BR) (Sharma et al., 1989). Indeks burze (eng. Bursa body weight index, B/BI) (Lucio et Hitchner, 1979) se dobija kada se odnos „burza/telesna masa“ podeli sa prosečnim odnosom „burza/telesna masa nezaraženih pilića (kontrolne grupe). Vrednost indeksa burza/masa tela ispod 0,7 po Lucio i Hitchner formuli, ukazuje na atrofiju ovog organa.

Virus se može dokazati u limfocitima burze 6 sati nakon infekcije. Nekroza limfocita u pars lymphoreticularis burze uočava se već jedan dan nakon infekcije, i ona je udružena sa infiltracijom polimorfonuklearima. Inflamatorne promene, subserozni edem i hiperemija burzalnih lobulusa (folikula), dovode do povećanja burze. Posle trećeg dana dolazi do smanjivanja burzalnih lobulusa i oni se pretvaraju u nekrotična područja okružena polimorfonuklearima. Od četvrtog dana infekcije akutna inflamatorna faza infekcije se stišava. Nekroza i fagocitoza ćelijskih elemenata za posledicu imaju „pretvaranje“ burzalnih lobulusa u ciste, oko kojih se nalazi fibroplastično tkivo nastalo od vezivnotkivne strome burze Fabricii (Okoye et Uzoukwu, 1990).

Konvencionalni soj virusa infektivne burzalne bolesti izaziva akutno zapaljenje burze sa edemom, limfoidnom deplecijom i atrofijom organa, dok infekcija sa varijantnim sojem A ne dovodi do akutnog zapaljenja, ali je nekroza limfoidnih ćelija takođe uočljiva tri dana posle infekcije (Sharma et al., 1989). Jedinke inficirane

varijantnim Delaware sojem A virusa imaju još i veća oštećenja burze (Lasher et Shane, 1994).

2.9 Dijagnostika infektivne burzalne bolesti

Dijagnoza akutnog oblika infektivne burzalne bolesti postavlja se kliničkim i patomorfološkim ispitivanjima. Klinički pregled se bazira na praćenju razvoja kliničke slike, koja se karakteristično menja u toku bolesti (utvrđivanje “pika” mortaliteta), i praćenju vrste i stepena izraženosti ostalih kliničkih simptoma. Patomorfološkim ispitivanjem i utvrđivanjem tipičnih promena na burzi Fabrici, može se sa velikim stepenom sigurnosti postaviti i konačna dijagnoza. Po kliničkim znacima, bolest se najčešće mora diferencirati u odnosu na: kokcidiozu, atipičnu kugu živine, virusnu anemiju pilića, mikotoksikoze i nefropatogeni oblik infektivnog bronhitisa. U svim ovim slučajevima, prisustvo promena na burzi Fabrici, potvrđuje definitivnu dijagnozu IBD-a. Takođe kod subkliničkih infekcija, atrofija burze Fabricii može dovesti do zamene sa drugim bolestima, a najčešće sa Marekovom bolešću i infektivnom anemijom pilića (Van den Berg et al., 2000). Lukert et Saif (1997), kod takvih slučajeva predlažu dodatno histološko ispitivanje burze Fabricii.

Serološka dijagnostika je od malog značaja zato što serološki testovi ne mogu razlikovati specifična antitela protiv virusa infektivne burzalne bolesti, u odnosu na njihovo poreklo, odnosno da li je njihovo stvaranje izazvano dejstvom patogenog (poljskog) virusa ili vakcinalnog virusa (Block et al., 2007; Bublot et al., 2007).

Međutim Kouwenhoven et Van Den Bos (1994) podvlače značaj kvantitativnog određivanja titra specifičnih antitela protiv IBDV za imunoprofilaksu kod mladih pilića, jer se na osnovu tih rezultata, određuje optimalno vreme vakcinacije. Takođe se primenom seroloških testova kod odgoja koka nosilja, može verifikovati uspešnost sprovedenih mera vakcinacije (Lucio, 1987; Meulemans et al., 1987).

Serološki testovi koji se najčešće koriste su agar gel precipitacija (AGP) (Lucio, 1987; Hira et al., 1972), Imunoenzimski – ELISA test (Enzyme-linked immunosorbent assay) (Marquardt et al., 1980) i serum neutralizacioni (SN) na kulturi tkiva pilećih fibroblasta (Weisman et Hitchner, 1978)

Agar gel precipitacija (AGP) je najjednostavnija, ali i najmanje senzitivna metoda. Rezultati se dobijaju posle vremenskog perioda od 48-72 časa.

Serum neutralizacija (SN) duže traje, inkubacija je najmanje pet dana i zahteva odgovarajuću opremu i sredstva. Senzitivnija je od AGP testa. Weisman et Hitchner (1978) su ustanovili da SN test ima najbolju korelaciju sa direktnim stepenom zaštite jedinke, proverenom na biološkom ogledu.

Imunoenzimski (ELISA) test je u poređenju sa AGP i SN testom, jednostavniji, jeftiniji i najbrži. ELISA test se karakteriše visokim stepenom senzitivnosti i specifičnosti, a pojavu varijacija u dobijenim rezultatima prilikom ispitivanja istih seruma, Roney et Freund (1988) objašnjavaju korišćenjem različitih sojeva virusa IBD, kao antigena, u dijagnostičkim kompletima (kitovima) različitih proizvođača.

Sharma et al. (1994), Jackwood et al. (1999) su utvrdili da ELISA dijagnostički kitovi koji koriste VP2 rekombinantni protein virusa kao antigen, ostvaruju znatno bolju korelaciju u odnosu na stepen zaštite jedinki, dobijen ispitivanjem u biološkom ogledu, od onih ELISA kitova koji su pripremljeni od standardnih antigena.

Viši nivo detekcije i bolja korelacija sa VN testom se objašnjava prirodom antigena koji se koristi za detekciju antitela. Klasični IBD ELISA test koristi antigen klasičnog porekla odgajen i oslabljen na kulturi tkiva a IBD Plus ELISA test koristi izvorni burzalni virus (iz inficirane BF umnožen, prečišćen virus). Opisano je da, IBD virus prilagođavanjem za rast na kulturi tkiva menja antigenost. Na primer monoklonska antitela (Mab) 21 prepoznaju sve vv sojeve IBD ali se ne vezuju za virusni antigen adaptiran za kulturu tkiva. Neutrališuća Mab 8 detektuju konformacijske epitope IBD virusa i prepoznaje samo virus uzgojen na BF (prirodni, izvorni burzalni virus) ali ne i virus uzgojen na ćelijskoj kulturi (Vakharia et al., 2000; Le Gros, 2009).

Metodom AGP se pored ispitivanja specifičnih antitela iz seruma mogu ispitivati i suspenzije tkiva zaraženih organa (najčešće burze Fabrici) pomoću specifičnih antiseruma ili monoklonskih antitela, tako da u tom slučaju, pojava precipitinskih linija, pokazuje prisustvo virusnih antigena u pomenutom ispitivanom materijalu (Snyder et al., 1992).

Imunoenzimskom (AC-ELISA) metodom se takođe može otkriti i dokazati antigen serotipa 1 IBDV-a, u burzalnim homogenatima. AC-ELISA je zasnovana na mikrotitar pločama prekrivenim IBDV-specifičnim antitelima. Korišćenje specifičnih monoklonskih antitela u detekciji virusnog antigena omogućava se znatno preciznija karakterizacija prisutnog virusnog antigena, odnosno identifikacija sojeva virusa. Na taj način su Snyder et al. (1998) korišćenjem različitih grupa specifičnih monoklonskih

antitela omogućili precizniju identifikaciju varijantnih virusa infektivne burzalne bolesti u SAD-u, a Eterradossi et al. (1999), precizniju identifikaciju veoma virulentnih virusa infektivne burzalne bolesti.

Virus infektivne burzalne bolesti, se može detektovati direktnom i indirektnom imunofluorescencijom (Meulemans et al., 1977) ili metodom bojenja imunoperoksidazom (Cho et al., 1987), direktno u samim folikulima tkiva burze Fabrici poreklom od inficiranih pilića.

Izolacija virusa Infektivne burzalne bolesti laboratorijskim metodama se najlakše izvodi na embrioniranim SPF jajima od 9. do 11. dana starosti. Inokulacija se vrši na horio-alantoisnu membranu ili u žumancetnu kesu. Posle nekoliko pasaža na kokošijim embrionima sojevi virusa GB mogu se kultivisati i na kulturama tkiva pilećih fibroblasta.

Molekularne metode omogućavaju bržu identifikaciju virusa u odnosu na izolaciju IBDV-a. Najviše upotrebljavana molekularna metoda za detekciju genoma IBDV-a je reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) (Lin et al., 1993). Uz upotrebu specifičnih prajmera RT-PCR se može koristiti za dokazivanje virusne RNK u burzi Fabrici (Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals, 2008), kostnoj srži, slezini i timusu (Kabell et al., 2005 a).

RT-PCR se bazira na umnožavanju određenog dela gena. Izvodi se u tri koraka: ekstrakcija nukleinske kiseline iz ispitivanog uzorka, reverzna transkripcija (RT) određenog dela RNK u DNK kopiju (cDNK) i amplifikacija (umnožavanje) rezultujuće cDNK PCR-om. Druga dva koraka RT-PCR-a zahtevaju izbor odgovarajućih prajmera, kratkih oligonukleotidnih sekvenci komplementarnih specifičnim nukleotidnim sekvencama na RNK i cDNK. U zavisnosti od mesta vezivanja prajmera za RNK nukleotidnu sekvencu, biće umnožena različita područja ciljnog gena (genoma virusa u slučaju IBDV-a) (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2008).

Polimerase chain reaction (PCR) je treći korak. Može se izvoditi klasičnim RT-PCR ili kvantitativnim. Wu et al. (2007) su objavili protokole za amplifikaciju i molekularno tipiziranje IBDV-a.

Parovi prajmera U3/L3 i +290/-861, koji su se pokazali korisnim u amplifikaciji srednje trećine VP2 gena serotipa 1 IBDV-a (U3/L3 par prajmera) (Eterradossi et al., 1999) i regiona na 5` kraju segmenta B genoma IBDV-a (+290/-861 par prajmera) (Le Nouen et al., 2006), mogu se navesti kao primeri. Oba segmenta su

se pokazala kao pogodna za molekularno-epizootiološke studije. Par prajmera U3/L3 stvara produkt koji većim delom predstavlja kopiju dela genoma IBDV-a koji u sebi obuhvata i deo koji kodira hiper- varijabilnu regiju VP2 proteina (Le Nouen et.al., 2005).

Determinacija sojeva IBDV-a, serotipa 1 ima značaja u epizootiologiji i imunologiji. Sojevi virusa mogu se determinisati na više načina: testiranje njihove patogenosti na SPF pilićima; unakrsnim virus neutralizacionim (VN) testom ili testom sa monoklonskim antitelima; determinacijom nukleotidne sekvence virusnog genoma ili ispitivanjem broja i veličine restrikcionih fragmenata dobijenih digestijom takvih RT-PCR produkata uz pomoć restrikcionih endonukleaza (Restriction fragment length polymorphism-RFLP).

Dokazano je da aminokiseline u varijabilnom domenu VP2 proteina (mali region-domen između 206 i 350 aminokiseline) predstavljaju osnov za antigenske varijacije, ali se ne može definisati tačno mesto vezano za patogenost. Potraga za markerima virulencije još uvek traje. Proučavanjem VP2 gena mnogobrojnih virusnih sojeva i selekcijom mutanata dokazano je da ovaj domen predstavlja molekularnu osnovu antigenih varijacija (Oppling et al.,1991; Schnitzler et al.,1993; Van den Berg et al.,1997).

Iako je molekularna osnova antigenih varijacija bolje shvaćena još uvek nije pronađen pouzdan genski marker virulentnosti virusa IBDV-a. Istraživanja upućuju da nalaz aminokiseline izoleucin na pozicijama 242, 256 i 294 (Rudd et al.,2002, citat iz Velhner et al., 2010), kao i aminokiselina alanin na poziciji 222 i serin na poziciji 299 (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2008), hipervarijabilne regije VP2, ukazuju na visoku virulentnost virusa.

Mundt (1999) navodi da zamena aminokiseline, alanin treoninom, na poziciji 284 hipervarijabilne regije VP2, dovodi do atenuacije i prilagođavanja virusa na umnožavanje u kulturi tkiva .

Kusk-a et al. (2005) su razvili metodu (upotrebom PCR-a i multipleks (MPX) PCR-a) kojom su uspešno detektovali i diferentovali pet različitih sojeva IBDV-a serotipa 1: danski vvIBDV (DK01), referentni cvIBDV (F52/70), vakcinalne intermedijalne (D78 i Bursine-2), i vakcinalni intermedijalni plus soj (228E).

2.10 Kontrola i prevencija

Preventivne mere protiv pojave infektivne burzalne bolesti podrazumevaju poštorene mere higijene i mere imunoprofilakse. Isključivo imunoprofilaksa ne može da spreči pojavu bolesti, ako sve glavne sanitarne mere nisu preduzete. Ove mere obuhvataju poštovanje principa prilikom useljavanja pilića „sve unutra-sve napolje“, obavezno mehaničko čišćenje, sanitarno pranje i dezinfekcija, dezinsekcija i odmor farme. Takođe pre čišćenja, odmah po pražnjenju farme glodari moraju biti eliminisani. Silosi za hranu moraju biti kompletno ispražnjeni i očišćeni (Maris, 1986).

Uprkos strogim merama opšte profilakse, vakcinacija kao mera specifične profilakse je neizbežna u područjima sa povećanim rizikom od infekcije, i obavezna u zaštiti pilića prvih nekoliko nedelja posle izleganja (Müller et al., 2003). Molekularne studije i različiti pristupi vakcinaciji značajno su doprineli boljem razumevanju biologije IBD virusa i unapredjenju strategije kontrole bolesti (Müller et al., 2012).

Thiry et al. (1994) su sve vakcine protiv infektivne burzalne bolesti svrstali u dva osnovna tipa i to: atenuirane žive vakcine i uljne inaktivisane vakcine.

Ekonomski gubici koji nastaju kao posledica kliničkih i subkliničkih oblika bolesti opravdavaju istraživanja i korišćenje novih vakcina. Žive vakcine stvaraju dugotrajan i solidan imunitet, ali imaju rezidualno patogeno delovanje na burzu Fabrici i postoji rizik povratka virulencije. Inaktivisane vakcine su uspešno korišćene do pojave visoko virulentnih sojeva, a kasnije nisu bile dovoljne da se potomstvo zaštiti preko maternalnih antitela. Postala je neophodna vakcinacija živim vakcinama. Ali, maternalna antitela su postala problem u pravljenju šeme vakcinacije, pa je neophodan serološki monitoring da se odredi pravo vreme (nizak titar maternalnih antitela) za vakcinaciju (Van den Berg et Meulemans, 1991).

2.10.1 Žive atenuirane vakcine

Atenuiranim živim vakcinama se imitira prirodna infekcija kod domaćina, one služe za masovnu aplikaciju i indukuju stvaranje i humoralne i celularne zaštite.

Žive vakcine mogu da imaju i neželjene efekte. Smits (1977), je ispitivajući efekat deset komercijalnih vakcina GB na eksperimentalnim pilićima, našao da sve one manje ili više oštećuju tkivo BF, manje kod pilića sa maternalnim antitelima, jače kod onih bez antitela. Do sličnih rezultata su došli i drugi autori (Thornton et Pattison,

1975; Meza, 1984), ukazujući na patogeno dejstvo vakcina protiv infektivne burzalne bolesti na BF, i na njihov potencijalni imunosupresivni efekat.

Atenuirane žive vakcine sadrže klasične ili varijantne viruse i komercijalno su dostupne a klasifikovane su prema stepenu atenuacije na „blage - slabe“, „intermedijarne“ (srednje), „intermedijarne plus“ i „vruće“ (hot) (Saif, 1998; Van den Berg, 2000; Müller et al., 2003).

One su pripremljene od sojeva virusa Gumboro bolesti, koji su atenuirani serijskim pasażama na pilećim embrionima. Blage i srednje žive vakcine su bezbednije jer izazivaju manja oštećenja na BF, nego vruće vakcine, ali su manje efikasne u prisustvu maternalnih antitela (MDA) i protiv vv IBDV. Nasuprot tome, manje atenuisane vakcine (intermedijarne plus i vruće), mogu prevazići više nivoe MDA, uspešnije su u prisustvu maternalnih antitela, ali izazivaju veća oštećenja BF što dovodi do posledične imunosupresije. Ovi sojevi vakcina se ne preporučuju za piliće mlađe od 10 dana starosti (Prandini et al., 2008).

Merenje titra maternalnih antitela protiv virusa infektivne burzalne bolesti kod jednodnevnih ili nekoliko dana starih pilića omogućava da se odredi vreme potpune osetljivosti pilića na infekciju divljim, ali i vakcinalnim virusom. De Witt (1999) i Lucio et Hitchner (1979) dodaju i značaj za usklađivanjem i ostalih vakcinacija u kompletnom programu zaštite živine. Pored toga uspeh tako obavljene vakcinacije, zavisi i od sprovedenih higijenskih mera i dezinfekcije kao i pravilnog izbora vakcinalnog soja virusa. S obzirom na varijabilnost pojedinačnih titrova, čak i procena optimalnog vremena vakcinacije definitivno neće potpuno rešiti problem sa upotrebom atenuiranih živih vakcina.

2.10.2 Inaktivisane vakcine

Pokazalo se međutim da vakcinacija roditelja živim atenuisanim vakcinama protiv infektivne burzalne bolesti stvara neujednačen imunitet koji se u nedovoljnoj meri prenosi na potomstvo (Wyeth et Cullen, 1978; Wyeth, 1980). To je dovelo do sledeće faze u razvoju imunoprofilakse protiv GB – primene inaktivisanih vakcina suspendovanih na uljnom nosaču.

Inaktivisane vakcine su antigeni koji se ne replikuju za razliku od živih, i primenjuju se isključivo individualno, subkutano ili intramuskularno, najčešće u starosti koka od 16 do 18 nedelja.

Inaktivisane vakcine se koriste za stvaranje imunskog odgovora koji je praćen visokim, ujednačenim i perzistentnim titrima specifičnih antitela protiv infektivne burzalne bolesti, kod koka (odgoj koka roditelja teških i lakih hibrida) pre pronošnja. Wyeth et Cullen (1978,1979), naglašavaju da vakcinaciji inaktivisanom vakcinom treba da prethodi vakcinacija živim atenuiranim vakcinama ili da su koke bile prirodno inficirane IBD virusom.

Da bi se indukovala visoka produkcija maternalnih antitela u toku celog perioda nošenja jaja, nosilje se sukcesivno vakcinišu živim, atenuiranim vakcinama da bi se imunski sistem „pripremio“ za inaktivisane, u uljnom nosaču emulgovane, vakcine (buster efekat). Inaktivisane vakcine se aplikuju pre perioda pronošnja, da bi se pojačao imunski odgovor, i obezbedio siguran prenos maternalnih antitela na potomstvo (Müller et al., 2003).

Box (1989) i Wyeth et al. (1992) izveštavaju da pilići koji potiču od roditeljskih jata, vakcinisanih na ovaj način, održavaju zaštitni nivo maternalnih antitela do oko 30. dana starosti. Van den Berg et al. (1991) smatraju da su pilići vakcinisani inaktivisanom vakcinom protiv infektivne burzalne bolesti zaštićeni i od sojeva virusa koji izazivaju imunosupresiju. Međutim pilići nisu zaštićeni od novih, visoko virulentnih sojeva virusa IBD, koji mogu da izazovu visok procenat mortaliteta u kasnijim fazama odgoja.

Odluka o korišćenju inaktivisanih vakcina pre svega će zavisiti od epizootiološke situacije. Prisustvo visoko patogenih sojeva virusa Gumboro bolesti zahteva vakcinaciju brojlera živim vakcinama, i to sa tačno određenim karakteristikama. Tamo gde nema rizika od infekcije veoma virulentnim sojevima virusa Gumboro bolesti, zaštita roditeljskih jata, inaktivisanom vakcinom pred samo pronošnje je dovoljna za zaštitu njihovog potomstva, od rane pojave bolesti.

2.10.3 Imuno-kompleks vakcine

„Imuno-kompleks“ je relativno novi koncept vakcina protiv GB. Ovim vrstama vakcine se izbegava pojava interferencije sa maternalnim antitelima i moguća je njena primena u prisustvu visokih nivoa maternalnih antitela (MDA). Imunski kompleks vakcine su dizajnirane da premoste (by-pass) neutralizacionu aktivnost MDA (Jeurissen et al., 1998; Ivan et al., 2005).

Vakcine „imuno-kompleks“ predstavljaju mešavinu specifičnih antitela protiv IBD, dobijenih iz seruma hiperimunizovanih pilića i živih virusa IBD, liofilizovane i u

zamrznutoj formi. Ovaj kompleks sadrži optimalnu količinu virusa i antitela pod uslovima koji nisu pogodni da antitela neutrališu vakcinalni virus. Imuno-kompleks vakcine se proizvode u *in vitro* uslovima (Whitfill et al., 1995; Haddad et al., 1997). Vakcina se može aplikovati subkutanom injekcijom jednodnevnim pilićima ili 18 dana starim pilećim embrionima (*in ovo* vakcinacija) u inkubatoru. U inkubatorima *in ovo* aplikacija je robotizovana i vrlo precizna. Brojlerski pilići izleženi iz ovakvih jaja su zaštićeni tokom celog perioda tova. Posle primene ovih vakcina nije potrebna revakcinacija protiv infektivne burzalne bolesti, nije potrebno određivanje nivoa maternalnih antitela pre vakcinacije, jer je ova vakcina efikasna i u prisustvu maternalnih antitela protiv GB. Vakcinalni virus iz kompleksa postaje aktivan i replikuje se kod svake jedinke u skladu sa padom maternalnih antitela pilića. Nema rizika (ne uzimanje vakcine, visok i neujednačen MDA) povezanog sa aplikacijom vakcine kroz vodu za piće kao kod drugih živih atenuiranih vakcina IBD (Haddad et al., 1997).

Mehanizam kojim ova vakcina dovodi do stvaranja imunskog odgovora se zasniva na neprepoznavanju vakcinalnog virusa od strane imunskog sistema pilića, odnosno na taj način ga antitela iz kompleksa štite od neutralizacije maternalnim antitelima (MDA). Imune komplekse fagocituju folikularno-dendritične ćelije slezine u kojima vakcinalni virus „miruje“ dok titar maternalnih antitela ne opadne do nivoa kada više ne pruža adekvatnu zaštitu protiv GB (Jeurissen et al., 1998). Kada nivo maternalnih antitela opadne ispod zaštitnog nivoa vakcinalni virus se oslobađa iz slezine, dolazi do BF, replikuje se i dolazi do stvaranja aktivnog imunskog odgovora.

Pored niza prednosti imunski kompleks vakcine, kao i atenuirane žive vakcine protiv infektivne burzalne bolesti mogu imati i mane, kao što je prolazna destrukcija burzalnih folikula i zaostali imunosupresivni efekat (Corley et Giambrone, 2002; Rautenschlein et Haase, 2005). Kod pilića bez prisustva MDA imuno-kompleks vakcine takođe mogu da imaju zaostali imunosupresivni efekat (Corley et Giambrone, 2002).

Pregled seruma pilića na IBDV antitela prvog dana može da posluži kao osnova da se probno proceni visina titra na koji imuno-kompleks IBD vakcina probija maternalni imunitet. To probno vreme proboja je moguće vreme kada replikujući se intermedijarni virus vakcine, koji se oslobađa iz kompleksa, može da izazove prolaznu, zadržanu imunosupresiju (Rautenschlein et al., 2011). Njihov ogled je pokazao da su rezultati vakcinacija protiv ND sprovedene u periodu od 12. do 15.

dana posle izvođenja pilića značajno slabiji kod grupe pilića vakcinisanih imuski kompleks vakcinom protiv IBD u odnosu na grupu pilića sa vektorskom vHVT vakcinom i kontrolnom grupom. Rautenschlein et al. (2011), su takođe utvrdili da je želatinizacija BF detektovana kod 6-30% pilića vakcinisanih sa imuski kompleks vakcinom između 15. i 28. dana posle inkubiranja. Da vakcinacija grupe pilića sa rHVT ne utiče na B/BR odnos dok su imuskim kompleksom inokulisane ptice pokazale značajno smanjenje težine burze sa početkom od 21. dana posle inkubiranja i da su patohistološke lezije uočene samo kod imuski kompleks grupe pilića od 12. dana posle inkubacije.

2.10.4 Rekombinantne vektorske vakcine

Rekombinantne vakcine protiv IBDV sadrže rekombinantne vakcinalne viruse, kod kojih je izražen VP2 protein virusa infektivne burzalne bolesti. Ovakve vakcine imaju niz prednosti u odnosu na dosadašnju klasičnu proizvodnju vakcina. Najvažnije prednosti su: nepostojanje patogenosti, senzitivnosti na maternalna antitela i rizika od povratne virulencije. Mogućnost njihovog korišćenja kod *in ovo* vakcinacije, uz jednostavno razlikovanje inficiranih od vakcinisanih životinja (putem diva strategije) ih čini još atraktivnijim za upotrebu u industrijskom živinarstvu (Hein, 2011). Još u fazi eksperimentalnih ispitivanja ovih vakcina Bayliss et al. (1991), Heine et Boyle (1993) smatrali su da će u budućnosti primat preuzeti DNA rekombinovane vakcine.

Tokom poslednje decenije i po, na tržištima različitih zemalja pojavilo se više različitih rekombinantnih virusnih vektor vakcina za živinu koje su korišćene za imunizaciju protiv različitih bolesti. Prva generacija ovih vakcina je bila na bazi Fowl pox (FP) virusa koji se koristio kao vektor za rekombinantne vakcine protiv avijarne influence (rFP/H5); atipične kuge živine (rFP/ND) i infektivnog laringotraheitisa (rFP/ILT). Nakon toga se pojavila druga, nova generacija virusnih vektorskih vakcina, zasnovana na ćurećem herpes virusu (HVT) kao bazi (rHVT/ND, ILT, AI i IBDV). Ove nove vektor vakcine (naročito rHVT) su jasno pokazale da su efikasne u zaštiti, da omogućavaju maksimalno ispoljavanje performansi kod vakcinisanih jata, a samim tim obezbeđuju i veću ekonomsku dobit u živinarskoj industriji, u poređenju sa živim „klasičnim“ vakcinama (Hein, 2011).

Prva generacija rekombinantnih virusnih vektor vakcina koja se zasnivala na (FP) vektora rFP/ILT, aplikovana je od 8-10 nedelje starosti živine. Pokazala je poboljšanje u kontrolisanju ILT u poređenju sa primenom klasičnim živim vakcinama

protiv ILT-a. Međutim (Melson et Jensen, 2011) navode nedostatke (FP) vektora vakcine kao što je: Prilično kratko trajanje zaštite kod ptica, za razliku od zaštite dobijene sa HVT vektorskim vakcinama (prirodne perzistencije, žive duže). Uz to maternalna antitela F.Pox virusa ometala su (interferencija) početak stvaranja imuniteta kod pilića vakcinisanih u ranoj dobi. A to se dešavalo kod ptica prethodno vakcinisanih ili zaraženih pox virusom.

Drugo pitanje koje je zabrinjavalo je bezbednost primene (FP) vektorskih vakcina „*in ovo*“ primenjivanih. Većina FP virus vektorskih vakcina su u međuvremenu zamenjene mnogo boljim HVT vektorskim vakcinama. (Rosenberger J.K. and S.C. Rosenberger, 2006).

Neka pitanja i dileme, kao što su: aplikacija, pojava imunskog odgovora, zaštita protiv Marekove bolesti (MD) kada je reč o ovim vakcinama, moraju se ozbiljno razmatrati, posebno zato što su u terenskim uslovima uočeni neki nedostaci. Većina ovih problema može da se lako spreče i otklone, da bi se izbegle sve vrste ovih grešaka (Hein et al., 2008).

vHVT vektorske vakcine kao i HVT vakcine se primenjuju subkutano prvog dana života ili „*in-ovo*“ u inkubatoru. vHVT vektor (slično kao HVT vakcina) se ne širi ni kod jedne nevakcinisane jedinke, vakcinisane sa greškom ili propustom i takve jedinke neće biti zaštićene protiv Marekove bolesti niti protiv IBD. Kod vHVT vektorskih vakcina nema živih virusa protiv IBD, ugrađen je samo VP2 protein (imunodominantni peptid) virusa kao antigen. Virus se ne umnožava i ne izlučuje iz vakcinisanih pilića u prvim danima nakon vakcinacije te nema horizontalnog širenja (superinfekcije upotrebljenim virusom), kao što je slučaj kod živih atenuiranih vakcina. Neophodno je da svako pile dobije pojedinačnu dozu vakcine. Čak i veoma mali broj propusta i grešaka u vakcinaciji, u endemskim oblastima može imati negativan efekat i odraziće se na efikasnost vakcinacije. (Hein et al., 2008; Williams et Hopkins, 2011).

Darteil et al. (1995) su sprovedi eksperimentalnu infekciju IBD virusom posle vakcinacije pilića sa dve vrste rekombinantnih ćurećih herpes virusnih vakcina (eng. Recombinant herpesvirus of turkey-vHVT). vHVT 001 i vHVT 002 i jednom klasičnom HVT vakcinom, aplikovanom parenteralno. Pilići su veštački inficirani 21. dana posle vakcinacije okularno sa infektivnom dozom IBDV 52/70 sojem. Rezultati eksperimentalne su pokazali da ekspresija VP2 proteina u HVT rekombinantnom virusu (vHVT 002) izaziva stvaranje anti VP2 neutrališuća antitela kod pilića, koja pouzdano štite sve vakcinisane piliće od uginuća (100% zaštita) i protiv oštećenja BF.

Dok je sa vHVT 001 rekombinantnom virusnom linijom vakcine postignuta parcijalna protiv IBDV.

Pored veštačke infekcije protiv IBD, vršili su veštačku infekciju i protiv Marekove bolesti (soj RB1B). Sedam dana nakon vakcinacije, veštačka infekcija sa virulentnim sojem Marekove bolesti pokazala je slab zaštitni nivo vHVT001 i vHVT002 koji je iznosio 6% i 10% redom navođenja. Dok su pilići vakcinisani jednom dozom parenteralno aplikovane HVT imali zaštitu 84%. Taj rezultat pokazuje da je zaštita sa oba rekombinantna virusa vrlo smanjena protiv Marekove bolesti čak i ako je u tehnologiji izrade vektor vakcine isečen ne esencijalni gen HVT koji ne utiče na replikaciju vektora u ćelijama pilećih fibroblasta. Takođe je protiv IBDV postignuta parcijalna zaštita sa vHVT001.

Pokazalo se da vektorska vHVT vakcina kao biotehnoški proizvod uspostavlja nivo zaštite protiv MDV a da može biti ugrožena u slučajevima infekcije virulentnim sojevima Marekove bolesti roditeljskih jata i njihovog izlaganja u ranom uzrastu. Istovremena upotreba vHVT vektorske vakcine sa vakcinalnim serotipom 1 MDv - CVI 988 (Rispensoj) ili serotipom 2 MDv – SB1 daje dobar i isti nivo zaštite u poređenju sa parenteralnom aplikacijom klasičnih vakcina protiv Marekove bolesti HVT i CVI 988 ili HVT i SB1 (Hein, 2009; Hein, 2011).

Istovremena vakcinacija ili kombinovanje različitih HVT vektorskih vakcina (vHVT/IBD; vHVT/ND; vHVT/ILT) stvoriće određene smetnje koje će se izražavati odlaganjem početka stvaranja aktivnog imunskog odgovora, jedne od kombinovanih, vHVT vektorskih vakcina. Kombinacija vHVT vektorske vakcine sa konvencionalnom HVT vakcinom će imati ozbiljan negativni efekat i uticaj na efikasnost vHVT vakcine (Slacum et al., 2009).

Kompletna zaštita jata (> 90%), posle primene rekombinantnih vektor vakcina u odnosu na sve izražene antigene u vHVT13 vektor vakcini se ne postiže pre tri do četiri nedelje starosti pilića. Uzevši u obzir prethodnu činjenicu i pored veće efikasnosti novije generacije vektorskih vakcina, prema Le Gros-u (Le Gros, 2009), visok i uniforman titar maternalnih antitela na IBDV pilića koji potiču od dobro vakcinisanih roditelja, će smanjiti rizik pojave bolesti do postizanja potpune zaštite pilića vakcinisanih sa vHVT/IBD vektorskim vakcinama.

Kada je reč o bezbednosti korišćenja, dobro je poznato da su vektorske vakcine na bazi HVT vektora bezbedne i da veoma slabo stupaju u interakciju sa maternalnim antitelima, te su baš zbog tih svojih osobina i izabrane da budu vektor za

virus infektivne burzalne bolesti. (Darteil et al., 1995; Pitcovski et al., 2003). Isti autori su dokazali da aplikacija trostruke doze vHVT vakcine (rVP2 antigen) kod ptica nije izazvala uginuće, niti simptome neke bolesti i da nije ometala sintezu antitela nakon vakcinacije protiv atipične kuge živine ili infektivnog bronhitisa klasičnim živim vakcinama u daljem toku odgoja.

Upotreba novih, rekombinantnih vektorskih vakcina zahteva kompleksniji pristup u tumačenju rezultata visine titra antitela nakon primene ELISA testa. Za mnoge konvencionalne žive i inaktivisane vakcine poznate su ELISA smernice za tumačenje rezultata, međutim za nove generacije rekombinantnih virusnih vektor vakcina, potrebna su nova praktična uputstva za pomoć u interpretaciji rezultata ELISA testova (Prandini et al., 2008, Bart van Leerdam et al., 2013). Isti autori navode rezultate titra antitela nakon primene klasičnog ELISA testa i nakon primene unapređenog, ELISA IBD plus testa i na osnovu tih rezultata izvode zaključak da klasični IBD ELISA kompleti, koji su obloženi čitavim IBD antigenom, nisu u stanju da u dovoljnoj meri detektuju visinu titra VP2 antitela sintetisanih nakon vakcinacije rekombinantnim vHVT vakcinama. Amino kiseline koje su uključene za adaptaciju IBD virusa, virulenciju i ćelijski tropizam, reverznom genetikom mapirane su u VP2 hipervarijabilnoj regiji (označenoj i kao P region) (Boot et al., 2000; Brandt et al., 2001; Letzel et al., 2007). S obzirom da se adaptacijom na kulturi tkiva može promeniti antigenost VP2 proteina, novi ELISA, ProFlok Plus IBD Ab test je razvijen tako što su ELISA ploče obložene prirodnim IBD virusnim antigenom poreklom (prečišćeni ekstrakt) iz inficirane BF (Le Gros et al., 2009). Ovaj poboljšani test je osetljiviji od klasičnog testa i u visokoj korelaciji sa virus neutralizacionim (VN) testom (Jackwood et al., 1999).

Kombinovana upotreba (korišćenje) oba ELISA testa omogućava diferencijaciju između pilića vakcinisanih rekombinantnim HVT+IBD vakcinama i prirodno inficiranih pilića infektivnom burzalnom bolešću ili vakcinisanih IBD živim, komercijalnim vakcinama.

Bublot et al. (2007) potvrđuju mogućnost nastanka ranijeg imunskog odgovora korišćenjem vektor vakcine protiv infektivne burzalne bolesti, jer na aktivnost i efikasnost ćurećeg herpes virusa (HVT) kao vektora nakon aplikacije vakcine, ne utiče prisustvo visokih nivoa maternalnih antitela, te se zato rekombinantna vektorska vakcina vHVT13 može aplikovati „*in ovo*“ 18. dana embrioniranja (Roh et al., 2016), ili subkutano jednodnevnim pilićima, čime se prevazilazi pitanje pravovremenosti

vakcinacije kod živih modifikovanih vakcina. Priroda povezanosti ciklusa ćurećeg herpes virusa u ćelijama domaćina i način replikacije ćurećeg herpes virusa verovatno doprinose sposobnosti ove vakcine da „prevaziđu“ maternalna antitela.

Goutebroze et al., (2003) i Bublot et al., (2007) takođe navode da VP2 sintetisana antitela izazvana vektor vHVT13 vakcinom su zaštitna, što je prethodno opisano i potvrđeno eksperimentima sa vakcinisanim pilićima na kojima su vršene veštačke infekcije.

Ogledi u Sloveniji sprovedeni na brojlerskim jatima u visoko rizičnim, za infekciju IBD oblastima, koja su vakcinisana protiv infektivne burzalne bolesti intermedijalnim, intermedijalnim plus (p/o) i ćurećim herpes virusom vHVT13 vektor vakcinom (subkutano, jednodnevnim brojlerima), imali su za cilj da ocene efikasnost različitih komercijalnih vakcina koje su im dostupne. Serološki rezultati su pokazali da iako je potvrđeno prisustvo sva tri vakcinalna soja virusa u limfnim organima, nije bilo značajnog imunskog odgovora na vakcinaciju u jatima brojlera vakcinisanih inermedijalnim i intermedijalnim plus vakcinama. Značajno povećanje titra specifičnih antitela koje je otkriveno samo kod jata brojlera vakcinisanih vektor vHVT13 vakcinom pokazuje sposobnost vakcine da indukuje imunski odgovor kod živine sa visokim nivoom maternalnih antitela (Zorman Rojs et al., 2011).

2.11 Imunski sistem pilića

Iako su se ptice i sisari razdvojili još pre više od 200 miliona godina, oni dele brojne imunološke karakteristike. Imunski sistem ptica funkcioniše slično kao i imunski sistem sisara, ali određene razlike postoje u anatomskom smislu. Postoji mnogo razlika u rasporedu i strukturi limfatičnog tkiva između sisara i ptica. Jedna od glavnih razlika je nepostojanje limfnih čvorova, onakvih kakve srećemo kod sisara (Toivanen Auli et Toivanen P., 1987a,b). Ptice poseduju i Harderovu žlezdu kao posebno okulonazalno limfno tkivo. Najvažnija razlika između limfatičnog tkiva ptica i sisara je da ptice imaju specifični limfatični organ, burzu Fabrici, gde se razvijaju i diferentuju B- limfociti (Romanoff, 1960).

Kod pilića kao i kod svih ptica, postoje primarni i sekundarni limfoidni organi. U primarne limfoidne organe ubrajaju se timus i burza Fabricii, a u sekundarne slezina, kosna srž i nakupine limfoidnog tkiva po različitim organima: u okviru respiratornog (eng. BALT- Bronchial associated limph tissue), digestivnog (eng. GALT-

Gastrointestinal associated lymph tissue), limfatičnog tkiva pridruženog konjuktivi (eng CALT- conjunctival associated lymph tissue), genitalnog sistema, kože, Harderova žlezda).

Uloga primarnih limfatičnih organa je da uspostave imunsku zrelost organizma, a posle toga započinje proces njihove involucije (Kaiser et Balic, 2014).

Timus je primarni limfoidni organ koji je kod ptica smešten u vratnom delu između trećeg vratnog i prvog torakalnog pršljena. Sastoji se od dva niza sa po sedam režnjeva. Svaki režanj je obavijen vezivnotkivnom kapsulom koja u vidu septi prodire u parenhim režnjeva i deli ih na režnjiće koji se sastoje od središnjeg dela medule i spoljašnjeg dela korteksa. Septe imaju bogatu ćelijsku strukturu (fibroblasti, plazma ćelije, limfociti) i putem njih arterije, vene, kapilare i limfni sudovi ulaze u parenhim (Davison et al., 2008). Osnovnu građu timusnih režnjića čine epitelne retikularne ćelije i limfociti različitog stepena zrelosti (Naglić et Hajsig, 1993). Prema meduli preovlađuju sve zreliji limfociti, od kojih mnogi imaju apoptotske promene tako da većina timusnih limfocita, umire u samom timusu, a vrlo mali broj (2 do 5%) napušta timus (Ciriaco et al., 2003). U korteksu se nalazi vrlo gusta subpopulacija T limfocita (CD3, CD4, CD8). Timociti tokom svoje migracije od korteksa do medule sazrevaju, zatim migriraju i putem krvi naseljavaju područje drugih, timus zavisnih organa (Watanabe et al., 2005). U timusu se nalazi 5-20% B limfocita, zavisno od starosti pilića. B limfociti se nalaze isključivo u meduli.

Burza Fabrici (Fabricijusova burza, bursa Fabricii, BF) je najvažniji limfatični organ imunskog sistema ptica, neophodan za uspostavljanje normalne imunske reaktivnosti, zbog važne uloge koju ima u proizvodnji antitela. Ima oblik šuplje vrećice i smeštena je dorzalno od kloake sa kojom je povezana uskim kanalićem. Burza Fabrici je najrazvijenija kod pilića u starosti od četiri do 12 nedelja. Nakon toga počinje da atrofira da bi sasvim atrofirala u doba sticanja polne zrelosti (Ciriaco et al., 2003).

Unutrašnjost BF se sastoji od longitudinalnih nabora sluznice (plicae) koji su prekriveni pločastim epitelom i kojih kod živine ima 16-18. Epitelne ćelije u vidu izdanaka (sekundarni nabori) u niže smeštenoj lamini propriji u kojoj se nalaze limfne ćelije, stvaraju folikule burze (lobulusi burze) (Rukavina, 2002). Folikuli su ovalnog oblika, obavijeni su fibrovaskularnom stromom i predstavljaju strukturnu i funkcionalnu burzalnu jedinicu u kojoj se razlikuju korteks i medula. Svaki folikul ima svoju nezavisnu prokrvljenost. Korteks folikula obiluje gusto zbijenim limfocitima,

plazma ćelijama i makrofagima, dok medula pretežno sadrži limfoblaste i limfocite (Davison et al., 2008). U kori su gusto zbijeni limfociti za koje se pretpostavlja da podležu procesu proliferacije, dok se u meduli nalaze limfociti u kasnijoj fazi sazrevanja (Boyd et Ward, 1984). Veza burzalnih folikula (BL) sa epitelom nabora omogućava prenošenje antigena iz lumena burze prema meduli. Antigen dospeo na ovaj način do medule izaziva klonsku proliferaciju (Pinck et al., 1985). To ukazuje da burza može imati ulogu u imunskom odgovoru kao sekundarni limfatički organ.

U dorzalnom delu nabora sluznice smeštene su difuzne površine T limfocita, koji čine 5% limfocitne populacije u burzi (Khan et Hashimoto, 1996).

Nalaz plazma ćelija i T limfocita u BF pokazuje da ovaj organ ima višestruku ulogu u imunskom sistemu i da nije samo mesto dozrevanja B limfocita (Naglić et Hajsig, 1993).

Kod pilića kojima je hirurški uklonjena burza, nestaju plazma ćelije i naglo slabi sposobnost stvaranja antitela, ali se znatnije ne smanjuje broj limfocita u perifernom krvotoku. Pilići postaju osetljiviji prema infekciji salmonelama i drugim bakterijama. Iz ovog se može zaključiti da je BF važna za sticanje humoralne imunoreaktivnosti na antigene. U BF se razvijaju B limfociti koji naseljavaju periferni limfatični sistem i u njemu, u dodiru sa odgovarajućim antigenom, stvaraju antitela (Glick et al., 1956).

Imunokompetentne ćelije koje nastaju u primarnim, sele se u sekundarne imunske organe (Toivanen Auli et Toivanen P., 1987a).

Slezina ptica se nalazi na prelazu žlezdanog u mišićni želudac, okruglog do jajolikog je oblika. Najveći je limfatični organ uključen u krvotok i najveći skup limfnog tkiva u organizmu. Zbog obilja fagocitnih ćelija i brzog reagovanja na prisustvo i pojavu antigena koji cirkulišu u krvi, slezina je izuzetno važan organ odbrane organizma. Vezivnotkivna kapsula koja obavija organ, deli parenhim na mnogobrojne trabekule. Tkivo slezine podeljeno je na crvenu i belu pulpu (Rukavina, 2002). Krvotok slezine je prilagođen njenoj funkciji, tzv. „filtracije krvi“. Arterija *lienalis* se grana na *arteriae trabeculares*, a od njih nastaju u belo pulpi *arteriae centrales* koje su okružene pretežno T limfocitima, dok se B limfociti nalaze u limfatičnim čvorićima na periferiji bele pulpe (Sharma, 1997). Crvena pulpa se sastoji od sinusoida ispunjenih krvlju i razasutih limfnih i nelimfnih ćelija, dok se bela pulpa sastoji od gusto zbijenih limfnih i nelimfnih ćelija. Makrofagi crvene pulpe su značajni i imaju važnu ulogu u nespecifičnoj odbrani organizma (Gumati et al., 2003).

Limfatično tkivo pridruženo digestivnom sistemu - GALT je neinkapsulirano i smešteno u zidu digestivnog trakta. Jedan deo tog tkiva koji je dobro organizovan su npr. cecalne tonzile i Payerove ploče, a drugi deo su limfatične ćelije difuzno razmeštene u zidu u digestivnog trakta (Toivanen Auli et Toivanen P., 1987a).

Cekalne tonzile se nalaze na proksimalnim krajevima cekuma (po jedna na svakom cekumu). Payerove ploče se nalaze na završnom delu creva. Mekelov divertikulum se nalazi na spoju duodenuma i jejunuma i predstavlja ostatak nekadašnje veze žumancetne kesice i creva, koja po izleganju pileta i resorpciji žumanceta biva ispunjena T i B limfocitima.

Harderova žlezda se sastoji pretežno od B limfocita, i smeštena je u medijalnom uglu očne šupljine. Za razliku od Harderove žlezde u kojoj nema specijalizovanog limfatičnog epitela, limfatično tkivo pridruženo konjunktivi -CALT je prekriven pločastim epitelom sa intraepitelnim leukocitima. Početna apsorpcija i obrada antigena odvija se u CALT-u, što kasnije dovodi do stvaranja plazma ćelija u Harderovoj žlezdi. Vakcinacijom na površini oka stvara se zaštitni imunski odgovor (Rukavina, 2002).

Limfatično tkivo povezano s bronhima -BALT, nalazi se neposredno ispod epitela bronha. Sva limfatična tkiva povezana s mukozom imaju identičnu građu, a struktura BALT-a takođe zavisi od starosti pilića i opterećenja antigenima.

Ptice poseduju imunoglobuline klasa IgM, IgA i IgG, s tim što se kod ptica klasa IgG označava kao IgY zbog izvesnih razlika u odnosu na istu klasu kod sisara, ali su im funkcije identične.

3. CILJ I ZADATAK ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je da se ispita stepen zaštite rekombinantne vakcine vHVT013-69 protiv Gamboro bolesti kod koka nosilja u odgoju praćenjem humoralnog i celularnog imunskog odgovora i burza bodi indeksa i da se na osnovu tih rezultata dođe do odgovora da li je na području gde je u velikom procentu na terenu prisutan „divlji“ Gamboro virus moguće primeniti ovaj tip rekombinovane vakcine u cilju imunoprofilakse.

Radi ostvarivanja zadatih ciljeva istraživanja definisani su sledeći zadaci:

1. Vađenje krvi jednodnevnim pilićima radi utvrđivanja maternalnog titra antitela na IBD
2. Vakcinacija jednodnevnih pilića koka nosilja rekombinantnom vektor vHVT13 vakcinom u inkubatorskoj stanici
3. Vakcinacija pilića klasičnim, živim vakcinama protiv infektivne burzalne bolesti (intermedijalna i intremedijalna plus), atipične kuge živine i infektivnog bronhitisa, na osnovu predviđenog programa vakcinacije tokom odgoja koka nosilja
4. Merenje titra antitela ELISA testom (ProFLOK i ProFLOK plus) i Hi testom.
5. Veštačka infekcija pilića virusom infektivne burzalne bolesti vv sojem IBD virusa – CH/99
6. Kliničko praćenje zdravstvenog stanja pilića nakon veštačke infekcije
7. Patoanatomske ispitivanje
8. Određivanje vrednosti odnosa „masa burze/telesna masa“ (B/BR) i indeksa „masa burze/telesna masa“ (B/BI indeks) nakon žrtvovanja pilića, 7 dana nakon vakcinacije, 11 dana nakon veštačke infekcije i 70. dana starosti pilića.
9. Ispitivanje periferne krvi koka nosilja u odgoju na cirkulišuće IgY B i T limfocite metodom protočne citometrije (Flow cytometry), koristeći poliklonska Anti-Chicken IgY (FITC konjugat) i monoklonska CD4⁺ i CD8⁺ (FITC konjugat, RPE konjugat).

4. MATERIJAL I METODE RADA

4.1 Materijal

4.1.1 Pilići - eksperimentalne jedinke

Eksperiment je izveden na 400 jednodnevnih pilića, oba pola, lake linije, Lohmann brown provenijence. Smešteni su u odvojene, izolovane prostorije, pripremljene za prijem jednodnevnih pilića. Prostorije su grejane, ventilirane i osvetljavane prema tehničkim normativima za navedeni hibrid. Tokom čitavog toka eksperimenta, pilići su pojeni i hranjeni *ad libitum*. Hranjeni su komercijalnim smešama za ishranu date kategorije pilića.

4.1.2 Soj virusa IBD-a za veštačku infekciju

Za veštačku infekciju je korišćen vrlo virulentan soj virusa infektivne burzalne bolesti (vvIBDV) izolovan sa našeg područja - CH/99 (izolat koji potiče sa farme pilića u Vojvodini, 1999. godine) (pristupni kod u bazi gena: KF439863; GenBank access number: KF439863).

4.1.3 Vakcine

Protiv GB su korišćene tri vakcine: komercijalna vektorska vakcina vHVT13, proizvođač, Merial, a Sanofi Company i dve klasične žive atenuirane vakcine, intermedijalna Nobilis Gumboro „D78“ i intermedijalna plus, Nobilis Gumboro „228E“, obe proizvedene od strane MSD Animal Health. U ogledu je vršena i imunizacija pilića protiv drugih virusnih bolesti i za te vakcinacije su korišćene sledeće vakcine: Cryomarex Rispens+HVT i Rispens CVI 988 Strain, vakcine protiv Marekove bolesti (Merial, a Sanofi Company), žive atenuirane vakcine protiv Infektivnog bronhitisa (IB) i New casle bolesti (ND): Nobilis IB Ma5+Clone30, Nobilis ND Clone 30 (MSD Animal Health) i IB Bioral H120 i Avinew (Merial,SAD). Upotreba svih vakcina je prema instrukcijama proizvođača.

4.1.4 Dijagnostički kit kompleti i obojena monoklonska i poliklonska antitela

Za detektovanje serumskih ELISA antitela na virus infektivne burzalne bolesti (IBDV) upotrebljeni su komercijalni kitovi „ProFLOK“ (klasičan IBD test) i „ProFLOK“ plus („unapređen, poboljšan“ IBD plus test) proizvođača „Synbiotics Corporation“, SAD. Oba kompleta su indirektni ELISA i prepoznaju antitela od

oba soja IBDV, klasičnog i varijantnog. Principi rada oba testa su slični. Specifična IBDV antitela u serumu koji se testira formiraju antigen antitelo kompleks sa IBDV antigenom vezanim za ploču. Antigen-antitelo kompleks se detektuje obeleženim peroksidaza konjugatom (anti-pileći IgG (H+L)). Razlika između ova dva testa je u prirodi IBDV antigena obloženog na pločama. ProFlok IBD test koristi antigen izveden iz klasičnog soja, gajen i oslabljen na kulturi tkiva. ProFlok Plus IBD test koristi prirodni (izvorni) burzalni antigen izveden od klasičnog soja. ProFlok Plus IBDV test omogućava precizniju detekciju IBDV zaštitnih VP2 antitela. Ovaj poboljšani test je osetljiviji od klasičnog testa i u visokoj je korelaciji sa testom VN (Le Gros, 2009). Prag pozitivnosti za klasičan test je postavljen na jedinici titra od 554 a za unapređeni test 1002. Za detektovanje antitela na infektivni bronhitis virus (IBV) korišćen je IB Virus Antibody Test Kit (IDEXX Laboratories, SAD).

Za detekciju CD4⁺ T limfocita korišćena su CD4⁺ monoklonska antitela konjugovana sa fluorescein isothiocyanatom-FITC (Thermo Scientific, SAD, kat. br. MA5-16468), a za detekciju CD8⁺ korišćena su monoklonka antitela konjugovana sa RPE (crveni fiko eritrin; Thermo Scientific, SAD). Takođe, korišćena su CD4⁺ monoklonksa antitela obeležena sa RPE (Thermo Scientific, kat. br. MA5-16469) i anti-zečji IgY (H+L) (Thermo Scientific, SAD, kat. br. 31501). obeležen sa FITC. Rabbit (Isotype) anti-Chicken IgY(H+L) sekundarna poliklonska antitela obojena fluorescein isothiocyanatom (FITC.)

4.1.5 Dizajn eksperimenta

Jednodnevni komercijalni pilići lake linije (Lohmann provenijence) su podeljeni u pet grupa po 80 pilića i odgajani su do 70. dana starosti.

➤ Procedura izvođenja vakcinacije

U inkubatorskoj stanici, prvog dana života, odmah nakon izleganja svih 400 pilića je vakcinisano protiv infektivnog bronhitisa (Bioral H120) i atipične kuge živine (Avinew), sprej metodom. Pilići grupe G1 su vakcinisani protiv Gamboro bolesti, subkutano, vektorskom, vHVT13 vakcinom, dok je grupa G2 vakcinisana istom vakcinom samo intramuskularno. Sve grupe su takođe vakcinisane protiv Marekove bolesti, intramuskularno. Grupe G1 i G2 su vakcinisane Rispens CVI 988 Strain vakcinom (Merial), a grupe G3, G4 i G5 Criomarex Rispens + HVT vakcinom (Merial).

U toku oglada 14. dana uzrasta pilića kod svih grupa, ponovljena je imunizacija protiv infektivnog bronhitisa i atipične kuge živine, dvovalentnom vakcinom, Nobilis

IB Ma5+Clone 30, aerosolom. Imunizacija živim atenuiranim vakcinama protiv Gamboro bolesti grupa G3 i G4, izvršena je u optimalnom vremenu na osnovu visine utvrđenog titra maternalnih antitela jednodnevnih pilića, da bi se izbegla interferenca sa maternalnim antitelima. Grupa G3, je vakcinisana 28. dana peroralno, putem vode za piće, intermedijarnom (im) Nobilis Gumboro „D78“ vakcinom, a nakon 7 dana revakcinisana istim sojem. Grupa G4 vakcinisana je 26. dana, intermedijarnom plus (im plus) Nobilis Gumboro „228E“, peroralno, putem vode za piće, a nakon 7 dana obavljena je revakcinacija, intermedijarnom Nobilis Gumboro „D78“ vakcinom. Grupa G5 u toku oglada nije vakcinisana samo protiv IBD, a vakcinacije protiv IB, ND i Marekove bolesti u toj grupi su takođe obavljene.

Imunizacija živim atenuiranim vakcinama protiv infektivnog bronhitisa Nobilis IB 4-91 i atipične kuge živine Nobilis ND Clone 30 vakcinama, je ponovljena 42. dana oglada pilića. Obe vakcine su aplikovne aerosol metodom.

➤ **Uzorkovanje krvi za određivanje titra antitela**

1.,14., 21., 28., 35., 48., 59 i 70. dana su uzimani uzorci krvi (po 10 uzoraka) iz svake eksperimentalne grupe, venepunkcijom venae brachialis i izdvajan je krvni serum. Nakon izdvajanja krvnog seruma ispitivano je prisustvo i visina titra antitela na Gamboro bolest, ELISA metodom primenom, dva kompleta kitova, Synbiotics IBD i IBD plus. Na kraju eksperimenta HI testom i ELISA testom urađen je titar specifičnih antitela na ND i IB iz istih uzoraka krvi pilića, radi upoređenja serokonverzije na IB i ND kod različito vakcinisanih grupa pilića protiv infektivne burzalne bolesti.

➤ **Uzorkovanje krvi za protočnu citometriju**

Uzorci pune krvi za protočnu citometriju uzimani su iz krilne vene (*punkcijom v. Brachialis*) pomoću heparinske igle i šprica obloženog sa EDTA antikoagulansom (BD Vacutainer[®], Plymouth, Velika Britanija, 102 IJ litijum heparina). Uzorci su čuvani i transportovani do laboratorije na ledenim ulošcima horizontalno postavljeni u frižider torbu i bili su stiroporom odvojeni od direktnog kontakta sa ledom. Transport do laboratorije i analize su započete u naredna 2 sata od uzimanja uzoraka.

Tokom eksperimenta uzorkovana je puna periferna krv pilića u tri navrata: 28. dana oglada (pre obavljene vakcinacije živim atenuiranim vakcinama protiv IBD), 48. dana oglada (20 dana nakon vakcinacije živim atenuiranim vakcinama protiv IBD) i 59. dana oglada (11 dana nakon veštačke infekcije) Uzorkovana je puna krv od šest jedinki iz svake grupe pilića. Posle izdvajanja limfocita iz pune krvi limfo prep reagensom (FicolL-Hypaque, Sigma-Aldrich,SAD) i bojenja sa obeleženim

monoklonskim i poliklonskim antitelima izvršeno je brojanje i utvrđen T limfocitni odnos $CD4^+$ i $CD8^+$ pozitivnih ćelija krvi u sva tri termina uzorkovanja krvi. Procentualna zastupljenost imunoglobulina IgY klase (IgY B ćelije iz periferne krvi), protočnom citometrijom, utvrđivana je u dva termina 48.dana ogleada (20 dana nakon vakcinacije živim atenuiranim vakcinama) i 59. dana ogleada (11 dana nakon veštačke infekcije) mereno je u dva termina ogleada

Test veštačke infekcije je urađen 48. dana, na po 10 jedinki iz svake grupe, s tim što su iz grupe G5 (nije vakcinisana protiv GB), izdvojene 20 jedinke, od kojih su formirane dve podgrupe sa po 10 pilića G5/A i G5/B, gde je veštačka infekcija urađena na pilićima podgrupe G5/A. Svim pilićima, izdvojenim iz svih eksperimentalnih grupa (osim grupe G5/B nevakcinisani, neinficirani, izdvojeni na posebnoj lokaciji), dato je po 50 μ l pripremljenog inokuluma intraokularno i intranazalno (ukupno 100 μ l inokuluma).

Pilići iz podgrupe G5/A, 59. dana ogleada (11 dana nakon veštačke infekcije) korišćeni su za merenje mase burze i određivanje B/BR odnosa, uzorkovanje krvi za pregled limfocita protočnom citometrijom i samo u tom terminu su sa oznakom G5/A. Sva uzorkovanja i pregledi u ostalim terminima ogleada su vršeni na grupama pilića koje su označene od G1 do G5.

Prilikom uzorkovanja krvi, 14., 21., 35., 59. (11 dana nakon veštačke infekcije) i 70. dana, žrtvovano je po šest pilića u cilju patomorfološkog ispitivanja. Pre žrtvovanja izvršeno je merenje telesne mase pilića, a nakon žrtvovanja, ekstrakcija i merenje mase burze Fabrici, radi utvrđivanja vrednosti B/BR odnosa i B/BI indeksa BF.

4.2 Metode

4.2.1 Imunoenzimska metoda – ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Za praćenje visine titara antitela protiv IBD i IB u uzorcima krvnih seruma pilića, korišćena je ELISA metoda. Priprema uzoraka i sama procedura izvođenja testa obavljani su prema priloženom uputstvu proizvođača.

Očitavanje optičkih gustina uzoraka izvršeno je čitačem „Labsystems - Multiskan, MCC/340“, uz pomoć kompjuterskog programa „MyLab v. 1.0“. Prevođenje dobijenih optičkih gustina u ELISA vrednosti antitela (ELISA titre)

izvršeno je prema uputstvu proizvođača ELISA kita programom „xChek“ (Idexx Laboratories, SAD).

3.2.2 Inhibicija hemaglutinacije – Hi test (Haemaagglutination inhibition test)

Serumi su ispitivani na prisustvo specifičnih antitela ND koji inhibiraju hemaglutinaciju, HI testom, koristeći ND virusni antigen (Deventer, Holland). U prvi niz ploče sipa se po 25µl PBS i ispitujući serum. Zatim se pravi serija dvostrukih razblaženja seuma i PBS-a i na kraju se dodaje 25 µl virusa, jačine 4 hemaglutinacione jedinice. Zatim sledi inkubiranje na sobnoj temperaturi 45-60 minuta. U svim bazenčićima se dodaje po 25 µl ispranih pilećih eritrocita. HI titar se određuje kao recipročna vrednost najviše razređenog seruma koji vrši inhibiciju hemaglutinacije. Pozitivan i negativan antiserum takođe proizvodi Deventer, Holandija.

4.2.3 Identifikacija izolata virusa koji je korišćen za veštačku infekciju

Za veštačku infekciju je korišćen vrlo virulentan soj virusa infektivne burzalne bolesti (vvIBDV) izolovan sa našeg područja - CH/99 (izolat koji potiče sa farme pilića u Vojvodini, 1999. godine) (pristupni kod u bazi gena: KF439863; GenBank accession number: KF439863). Identifikaciju i registraciju u banci gena, izolata virusa koji je korišćen za veštačku infekciju, izvršili su Dobrosavljević et al. (2014). Visoka genetska i antigenska sličnost između većine evropskih, azijskih i afričkih vvIBDV sojeva (Eterradossi et al., 1999; Kusk et al., 2005) omogućila je autorima da deo HVR VP2 gena izolata divljeg soja virusa, amplifikuju prajmerima koje su Kusk et al. (2005) upotrebili za amplifikaciju soja DK01. Dobijeni proizvod RT-PCR-a su sekvencionirali i uporedili sa sličnim genskim sekvencama u BLAST bazi (Basic Local Alignment Search Tool). Rezultati su pokazali da se dobijena nukleotidna sekvenca dela HVR VP2 gena našeg izolata divljeg soja virusa u potpunosti poklapa sa dva vrlo virulentna soja: AL13 (pristupni kod u banci gena AY907001) i AL10 (pristupni kod u banci gena AY907000). Poklapanje nukleotidne sekvence divljeg soja virusa CH/99 sa referentnim evropskim vvIBDV sojem, UK661 (pristupni kod u banci gena AJ878898) iznosila je 99,07% (citat iz Dobrosavljević et al., 2014).

4.2.4 Merenje telesne mase

Telesna masa pilića merena je na digitalnoj, tehničkoj vagi tačnosti 0,1g. Iz svake grupe izdvojeno je po 6 jedinki za određivanje telesne i mase Fabricijusovih burzi.

4.2.5 Merenje mase Fabricijusove burze

Nakon merenja telesne mase, pilići su žrtvovani prema ranije pomenutoj direktivi. Izdvajane su Fabricijusove burze i merene na digitalnoj tehničkoj vagi, preciznosti 0,1g.

4.2.6 Određivanje vrednosti odnosa „masa burze / telesna masa“ (B/BR vrednosti)

$$B/BR = \frac{\text{Masa BF}}{\text{Telesna masa pileta}}$$

Izračunavanje B/BR vrednosti (tzv. relativni indeks burze) rađeno je prema Sharma et al. (1989). Posle računanja individualnih B/BR odnosa pilića, za svaku grupu u navedenim terminima određivan je prosečni odnos mase BF/ Telesna masa pileta (Mean Bursal body weight ratio, Sharma et al.,1989). Masa BF merena u gramima (gm) / Telesna masa pilića (gm) x 1000.

Na osnovu vrednosti odnosa „masa burze / telesna masa“ (B/BR vrednosti) određivan je stepen oštećenja Fabricijusove burze (BF) nakon vakcinacije (poređenje sa različitim vakcinama i načinima aplikacije) i veštačke infekcije IBD virusom.

4.2.7 Određivanje vrednosti indeksa „masa burze / telesna masa“ (B/BI vrednosti)

Na osnovu vrednosti indeksa „masa burze / telesna masa“ (B/BI vrednosti) takođe je određivan stepen oštećenja Fabricijusove burze (BF) nakon vakcinacije (poređenje sa različitim vakcinama i načinima aplikacije) i veštačke infekcije IBD virusom, tj. stepen atrofije ovog organa. Korišćena je formula koju su dali Lucio et Hitchner (1979):

$$B/BI = \frac{\text{Masa BF / telesna masa pileta}}{\text{Prosečna masa BF grupe „K.G5“ / prosečna telesna masa grupe „K.G5“}}$$

Smatra se da je atrofija nastupila kada je index manji od 0,7.

4.2.8 Protočna citometrija

➤ Izolacije limfocita:

Postupak sa uzorcima: Uzorci pune nekoagulisane krvi su homogenizovani i pipetom je odliveno po 1ml u polistirenske epruvete zapremine 5ml (12 x 75 mm, U oblik dna, BD Science, Bedford, MA, SAD). Odliveni poduzorak krvi razređen je sa 1 ml PBS rastvora, kome je dodat 1% bovini serum albumin. Ovako razređena krv je zatim pažljivo pipetirana u polistirenske epruvete zapremine 5ml u kome se nalazilo 1,5 ml limfo prep reagensa (Ficoll-Hypaque) sa težnjom da se krv zadrži na njegovoj površini (u trenutku mešanja) usled manje specifične težine.

Uzorci krvi su zatim centrifugirani (centrifuga Eppendorf 4564, Nemačka; 800 g) tokom 30 minuta a zatim je sloj ćelija iznad Fikolija koji zadržava limfocite, trombocite i krvnu plazmu i ostatke fikoli paqua pažljivo odliven pipetom sa nastavkom u polistirenske epruvete zapremine 5ml.

Zahvaćeni supernatant je resuspendovan sa 4 ml PBS a zatim centrifugiran na 800 g tokom 7 minuta radi uklanjanja trombocita i ostatka Ficolli paqua. Sediment je izuzet i ponovo resuspendovan sa 4 ml PBS i centrifugiranje na 400g tokom 7 minuta.

Pročišćen supernatant je izdvojen u polistirenske epruvete zapremine 5ml (oko 1ml).

CD4⁺ monoklonska antitela konjugovana sa FITC i RPE razređena su sa 1 ml PBS i u reakciji je korišćeno 10 µl, dok je anti-zečji IgY nakon suspenzije sa 1 ml PBS-a dodavan u količini od 1 µl. (visoka koncentracija antitela i uputstvo proizvođača da se razredi 1:50-200; dok su CD4⁺ i CD8⁺ antitela razređena 1:1,5). Inkubacija uzorka sa antitelima u mraku vršena je tokom 20 minuta nakon čega je izvršeno ponovno centrifugiranje radi ispiranja viška fluorescentnog konjugata i nevezanih antitela (400g tokom 7 minuta).

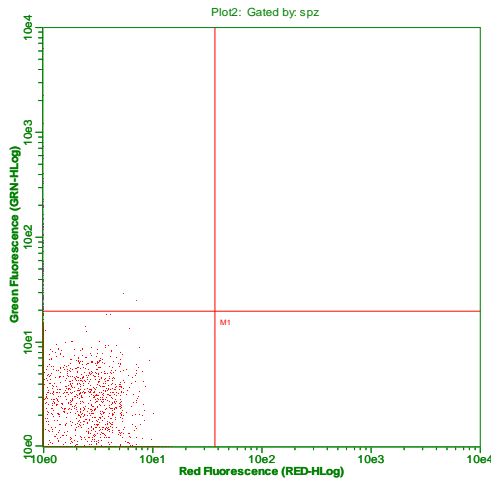
Sediment je prenet u 1,5 eppendorf epruvete i resuspendovan sa 1 ml PBS uz homogenizaciju na vorteksu.

➤ Protočna citometrija izvođenje i prikaz histograma

Ćelije su analizirane na uređaju za protočnu citometriju Guava Easy Cyte (Guava Technologies, Hayward, California, SAD) sa 488nm argonskim laserom. U svim uzorcima je analizirano najmanje 10.000 čestica.

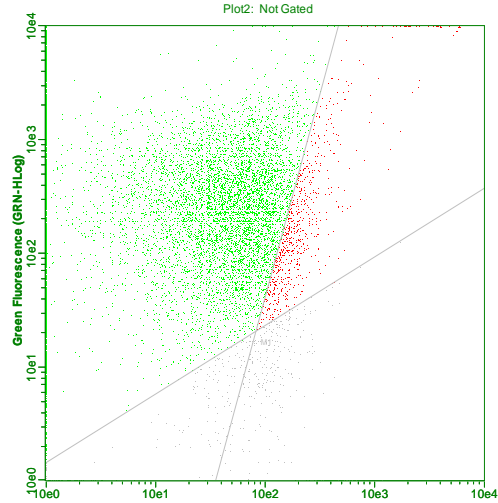
1. Prikaz protočne citometrije nakon vakcinacije (28. dana ogleda). Prvo merenje IgY, primer iz grupe G1; a) negativna kontrola; b) grupni tačkasti dijagram; c) očitavanje vrednosti; d) preračunavanje procentualne vrednosti-odnosa za IgY/CD4; e i f) razdvojen histogram prema fluorescenciji; g) grupni uporedni histogram.

(a)



Kontrola kod odnosa IgY:CD4
Negativna kontrola (bez dodatka antitela markiranih fluorescentnim bojama)

(b)



(Dot plot) Primer uzorka krvi iz grupe G1
posle vakcinacije. Prva citometrija za IgY.

(c)

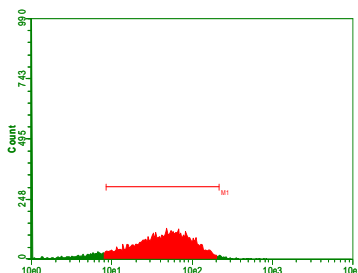
	Count	%Total	%Gated
LL	4214	21.07%	...
LR	0	0.00%	...
UL	15088	75.44%	...
UR	698	3.49%	...
All Events	20000	100.00%	...



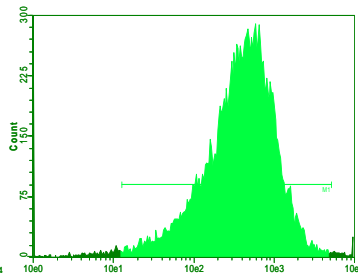
(d)

IgY	75.44	95.58	IgY/CD4
CD4	3.49	4.42	21.62

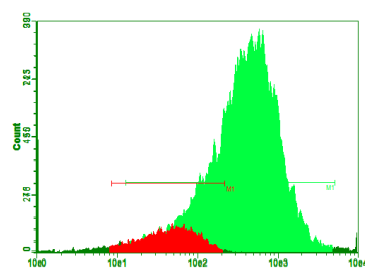
(e)



(f)

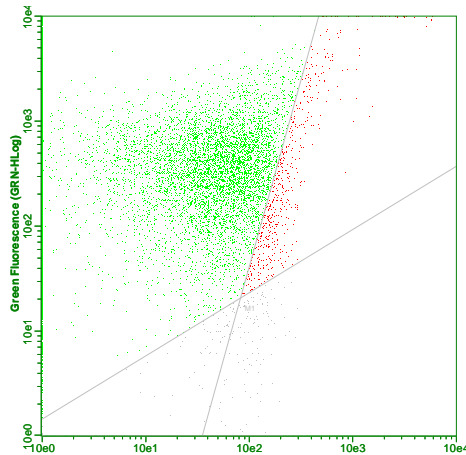


(g)



2. Prikaz protočne citometrije nakon veštačke infekcije. Druga citometrija za merenje IgY, primer iz grupe G4; a) grupni tačkasti dijagram; b) očitavanje vrednosti; c) preračunavanje procentualne vrednosti-odnosa za IgY/CD4.

(a)



(Dot plot, tačkasti dijagram) Primer uzorka krvi iz grupe G4 posle veštačke infekcije.

(b)

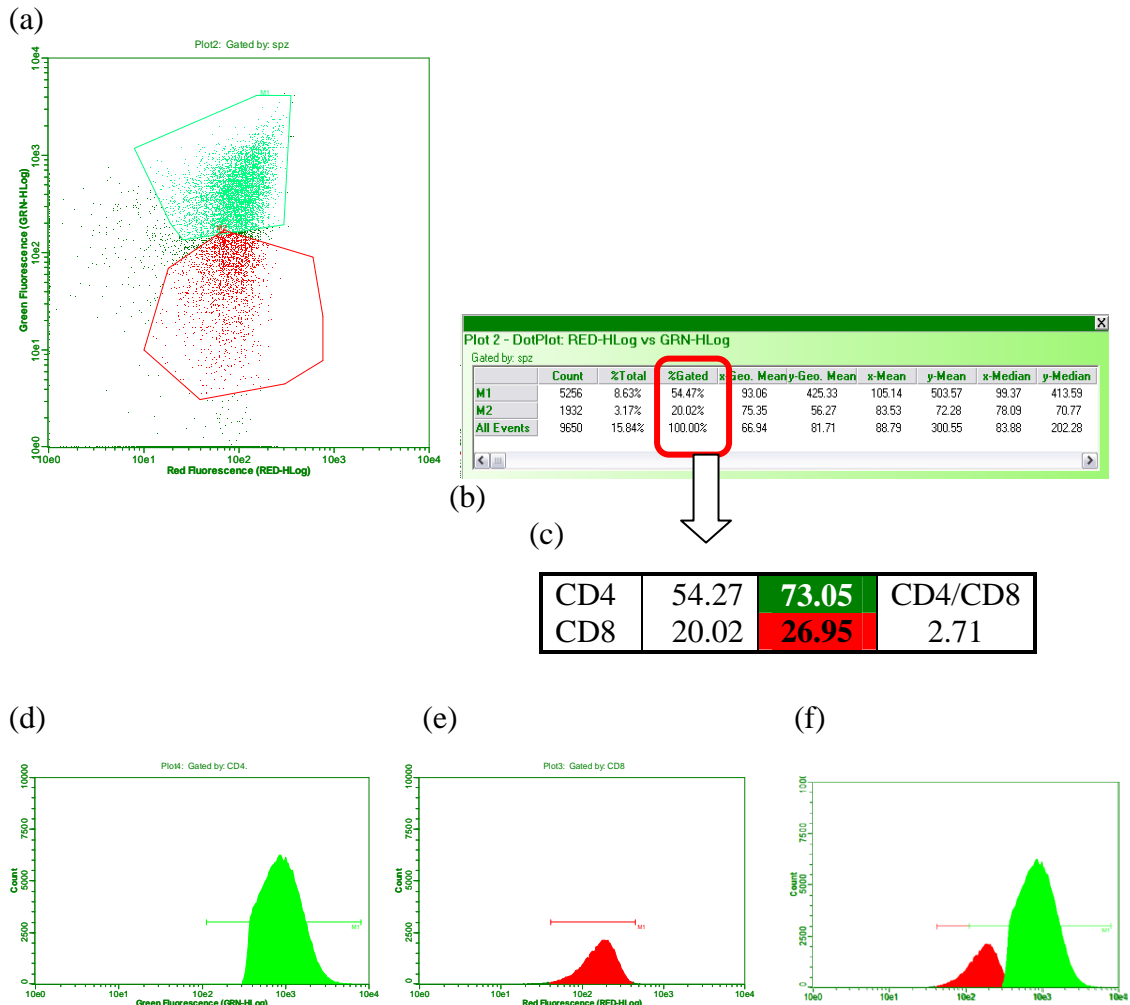
Not Gated			
	Count	%Total	%
LL	3025	15.13%	
LR	0	0.00%	
UL	16470	82.35%	
UR	505	2.53%	
All Events	20000	100.00%	

(c)

IgY	82.35	97.02	IgY/CD4
CD4	2.53	2.98	32.55

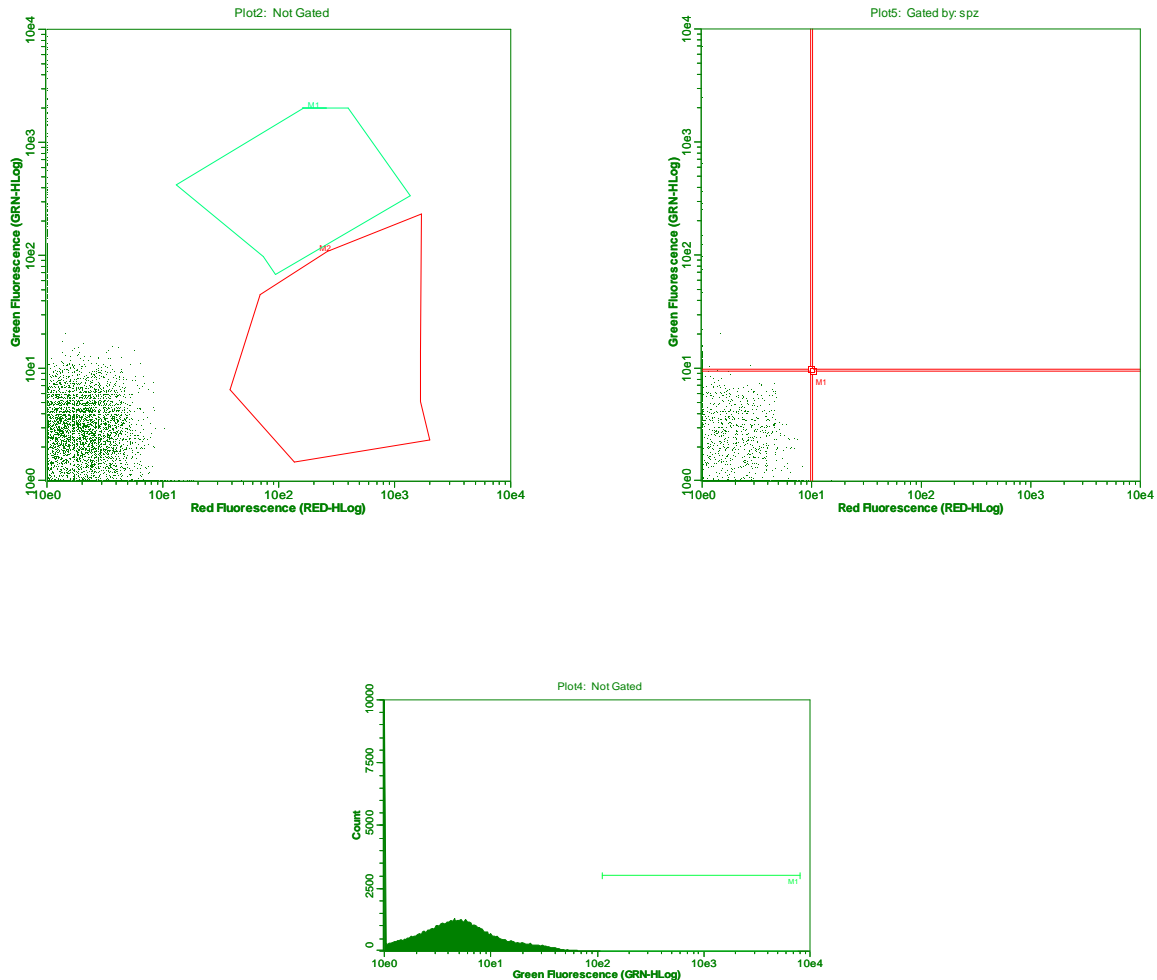
Zelena fluorescencija predstavlja detekciju IgY B limfocita, a crvena CD4⁺ T limfocite periferne cirkulacije (za detekciju IgY B ćelija korišćena Rabbit (Isotype) anti-Chicken IgY(H+L) sekundarna poliklonska antitela obojena fluorescein isothiocijanatom (FITC.) a za detekciju CD4⁺ T limfocita, korišćena su monoklonka antitela konjugovana sa RPE, crveni fikoeritrin).

3. Prikaz CD4⁺/CD8⁺ T ćelijski odnos. Prikaz prve protočne citometrije (28. dana uzrasta pilića) pre vakcinacije atenuiranim živim vakcinama. Prva grupa pilića G1 (vHVT13). Kod svih grupa prve citometruje CD4⁺/CD8⁺ ili Thelper/Supresor odnos visok: a) dvobojni-grupni tačkasti dijagram, b) očitavanje vrednosti, c) preračunavanje procentualne vrednosti-odnosa za CD4⁺/CD8⁺ (do 100%), d i e) razdvojen histogram prema fluorescenciji, f) dvobojni-grupni uporedni histogram.



Zelena fluorescencija predstavlja detekciju CD4⁺ T limfocita, a crvena CD8⁺ T limfocite periferne cirkulacije (za detekciju CD4⁺ T limfocita korišćena su CD4⁺ monoklonska antitela konjugovana sa fluorescein izothiocianatom-FITC, a za detekciju CD8⁺ T limfocita, korišćena su monoklonka antitela konjugovana sa RPE, crveni fikoeritrin).

Dot-plot (dijagram sa tačkama) i histogram *negativne kontrole* na protočnoj citometriji: neobeležena ćelija, bez dodatka antitela markiranih fluorescentnim bojama (izostanak crvene i zelene fluorescencije) u donjem levom uglu.



4.2.9 Statistička analiza podataka

U statističkoj analizi dobijenih rezultata izvedenog eksperimenta kao osnovne statističke metode korišćeni su deskriptivni statistički pokazatelji. Ovi pokazatelji su nam omogućili opisivanje dobijenih eksperimentalnih rezultata i njihovo tumačenje. Od deskriptivnih statističkih pokazatelja koristili smo: meru centralne tendncije, standardnu devijaciju, standardnu grešku aritmetičke sredine, interval varijacije i koeficijent varijacije. Dalja statistička analiza odvija se u zavisnosti da li su analizirani

podaci normalno distribuirani ili ne. Testiranje na normalnost izvedeno je pomoću Kolmogorov-Smirnov (Kolmogorov-Smirnov) testa. U slučaju normalne distribucije podataka za poređenje signifikantnih razlika između eksperimentalnih grupa koristili smo parametarsku analizu varijanse (One way analysis of variances). U slučaju kada distribucija podataka nije normalna upotreblavana je ne-parametarska Kruskal - Wallisova analiza varijanse (Kruskal Wallis Analysis of Variance on Ranks). U slučaju da postoje statistički signifikantne razlike između grupa, parovi grupa biće poređeni između sebe na osnovu parametarskog Tukievog testa, odnosno ne-parametarskog Dunn's Multiple Comparison testa. Signifikantnost razlika ustanovljavana je na nivoima značajnosti od 5 i 1 %. Svi dobijeni rezultati prikazani su tabelarno i grafički. Statistička analiza izvedenog eksperimenta urađena je u Statistical analysis of the results was elaborated using software GrapfPad Prism version 5.00 for Windows, GrapfPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com i MS Excel-u.

5. REZULTATI

5.1 Veštačka infekcija, klinička slika i patomorfološki nalaz

Parametri koji su praćeni da bi se procenio efekat vakcinacije i veštačke infekcije su: Prisustvo kliničkih znakova IBD, stopa mortaliteta i pato-anatomski nalaz.

Tabela 1. Klinički znaci IBD i stopa smrtnosti posle veštačke infekcije pilića nosilja

Grupa	Vakcine protiv IBD	Veštačka infekcija	Klinički znaci IBD	Stepen mortaliteta
G.1	vHVT13 s/c.	Da	0/10	0/10
G 2	vHVT13 i/m.	Da	0/10	0/10
G.3	„Intermedijarna“	Da	2/10	2/10
G.4	„Intermedijarna plus“	Da	2/10	2/10
G5/A	Nevakcinisana/ infic.	Da	10/10	5/10
G5/B	Nevakcinisana/ neinf.	Ne	0/10	0/10

Prisustvo kliničkih znakova i stopa mortaliteta posle veštačke infekcije u svim grupama pilića sumirani su u prethodnoj tabeli.

U grupi pilića nevakcinisanih pilića, a veštački inficiranih (G5/A), teške kliničke znake IBD kao što su depresija, nakostrešenost perja i vodenasti proliv, imale su sve kokice a pet od deset su uginule. U obe grupe pilića vakcinisane živim atenuiranim vakcinama, intermedijarnom i intermedijarnom plus vakcinom protiv IBD (G3 i G4) po dve od deset kokica su pokazale kliničke znake bolesti i uginule. U grupama pilića koje su vakcinisane rekombinantnom vektorskom vakcinom vHVT13 (G1 i G2) i u kontrolnoj grupi (G5/B), koja nije bila vakcinisana i inficirana, nije bilo kliničkih znakova bolesti niti je zabeleženo uginuće pilića.

Makroskopski nalaz (pato-anatomski nalaz) uginulih pilića posle veštačke infekcije je u skladu sa promenama koje se navode u literaturi za IBD. Edem burze Fabrici, povećani, bleđi kao kuvani bubrezi, krvarenja na muskulaturi grudi i nogu zabeleženi su samo kod uginulih pilića u grupama G3, G4 i G5/A (tabela1). Tokom obdukcije krvarenja na Fabricijusovim burzama i na sluzokoži proventrikulusa ustanovljena su samo kod dva od pet uginulih pilića u grupi G5/A (nevakcinisana/inficirana). Posle veštačke infekcije makroskopske promene nisu

zabeležene u grupama vakcinisanih sa vHVT13 (G1 i G2), i u grupi pilića koji nisu vakcinisani i inficirani (G5/B).

5.2 Vrednosti odnosa „masa burze/telesna masa (B/BR) i vrednosti indeksa „masa burze/telesna masa (B/BI)

Tabela 2. B/BR vrednosti 14. dana eksperimenta

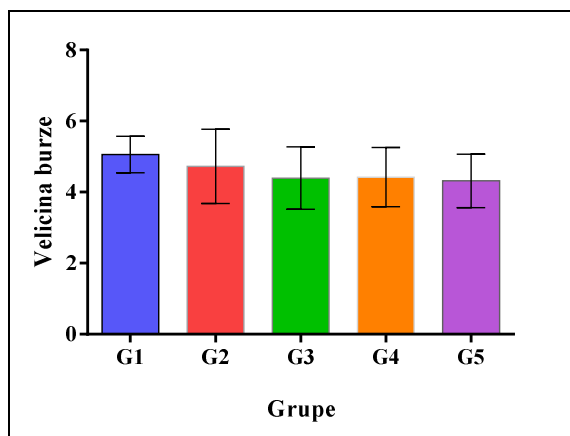
Grupa	Način vakcinacije i vrsta vakcine protiv infektivne burzalne bolesti	Prosečna masa burze Fabricii (g)	Prosečna B/BR vrednost
G1	vHVT13 s/c.	0,66	5,063
G2	vHVT13 i/m.	0,58	4,73
G3	Intermedijarna p/o	0,61	4,40
G4	Intermedijarna + p/o	0,57	4,43
G5*	Nevakcinisana	0,53	4,32

*Kontrolni nevakcinisani i neinficirani pilići držani su zajedno do momenta kada je vršena infekcija sa vvIBDV virusom, kojom prilikom su pilići podeljeni u dve podgrupe: G5/A (inficirana) i G5/B (nevakcinisana i neinficirana)

Tabela 3. Deskriptivne statističke B/BR vrednosti burzi 14. dana eksperimenta

	N	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
G1	6	5,06	0,51	0,2083	10,07	5,88	4,32
G2	6	4,73	1,04	0,4250	22,03	5,83	3,22
G3	6	4,40	0,88	0,3589	19,99	5,26	3,01
G4	6	4,43	0,83	0,3394	18,79	5,26	3,01
G5	6	4,32	0,75	0,3069	17,40	5,26	3,01

Analizirajući prosečne B/BR vrednosti burzi Fabricii 14 dana eksperimenta ustanovljeno je da je eksperimentalna grupa 1 (G1) imala najveće vrednosti ($5,06 \pm 0,51$), dok je najmanji indeks zabeležen kod G5 grupe ($4,32 \pm 0,75$). Nisu ustanovljene signifikantne razlike između prosečnih vrednosti eksperimentalnih grupa ($p > 0,05$). Najveće variranje, koje se nalazi u granicama homogenosti statističke serije, zabeleženo je kod G2 eksperimentalne grupe (22,03%).



Grafikon 1. Grafički prikaz prosečnih B/BR vrednosti 14. dana eksperimenta

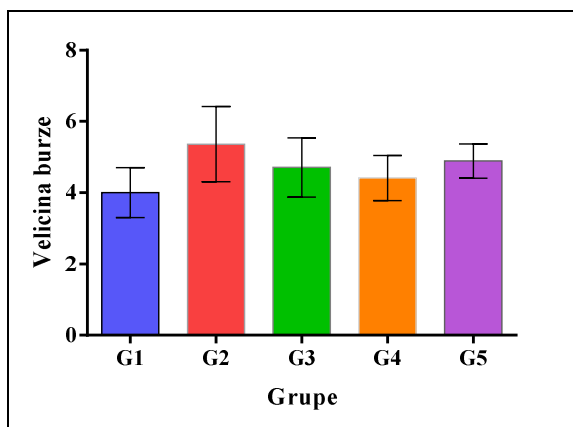
Tabela 4. B/BR vrednosti 21. dana eksperimenta

	Način vakcinacije i vrsta vakcine protiv infektivne burzalne bolesti	Prosečna masa burze Fabricii (g)	Prosečna B/BR vrednost
G1	vHVT13 s/c.	0,78	4,003
G2	vHVT13 i/m.	1,1	5,36
G3	Intermedijarna p/o	0,89	4,70
G4	Intermedijarna + p/o	0,85	4,42
G5	Nevakcinisana	1,0	4,89

Tabela 5. Deskriptivne statističke B/BR vrednosti burzi 21. dana eksperimenta

	n	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
G1	6	4,00	0,70	0,3516	17,56	4,90	3,23
G2	6	5,37	1,06	0,5289	19,72	6,31	4,030
G3	6	4,71	0,83	0,4169	17,71	5,70	3,78
G4	6	4,42	0,64	0,3183	14,42	5,11	3,85
G5	6	4,89	0,48	0,2409	9,85	5,43	4,26

Analizom prosečnih B/BR vrednosti burzi Fabricii 21 dana nisu ustanovljene signifikantne razlike između prosečnih vrednosti eksperimentalnih grupa ($p > 0,05$). Najveće variranje, koje se nalazi u granicama homogenosti statističke serije, zabeleženo je kod G2 eksperimentalne grupe (19,72%).



Grafikon 2. Grafički prikaz prosečnih B/BR vrednosti 21. dana eksperimenta

Tabela 6. B/BR vrednosti 35. dana eksperimenta

	Način vakcinacije i vrsta vakcine protiv infektivne burzalne bolesti	Prosečna masa burze Fabricii (g)	Prosečna B/BR vrednost
G1	vHVT13 s/c.	2,3	5,36
G2	vHVT13 i/m.	2,4	6,15
G3	Intermedijarna p/o	1,5	3,10
G4	Intermedijarna + p/o	0,6	1,618
G5	Nevakcinisana	1,7	5,215

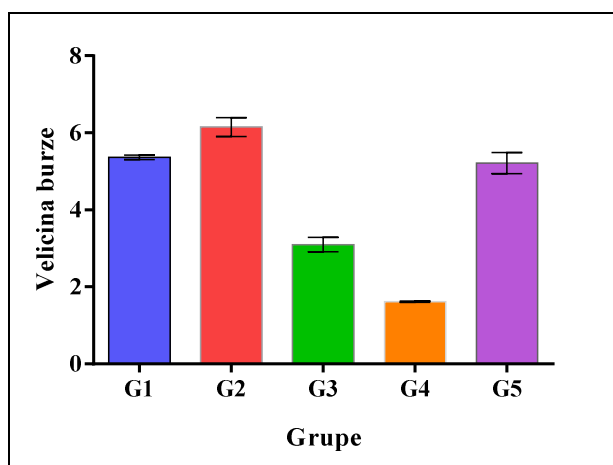
Tabela 7. Deskriptivne statističke B/BR vrednosti burzi 35. dana eksperimenta

	N	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
G1	6	5,37 ^{aeA}	0,06	0,0303	1,13	5,42	5,31
G2	6	6,15 ^{bfAB}	0,25	0,123	3,98	6,45	5,85
G3	6	3,10 ^{cefg}	0,19	0,0935	6,03	3,30	2,85
G4	6	1,62 ^{abcd}	0,02	0,0104	1,28	1,64	1,60
G5	6	5,22 ^{dgB}	0,27	0,1358	5,21	5,47	4,84

Statistička signifikantnost prikazana je istim slovima: a, b, c,d, e, f, g, $p < 0,01$; A, B, C, $p < 0,05$

Analizom prosečnih B/BR vrednosti burzi Fabricii 35. dana eksperimenta ustanovljeno je da je eksperimentalna grupa G4 imala najmanju vrednosti ($1,62 \pm 0,02$), što je statistički vrlo značajno manje od prosečne vrednosti svih eksperimentalnih grupa ($p < 0,01$). Eksperimentalna grupa G3 sa prosečnom vrednošću indeksa burze od $3,10 \pm 0,19$ statistički signifikantni je manja ($p < 0,01$) od indeksa za grupe G1, G2, i G5.

Nisu ustanovljene signifikantne razlike između prosečnih vrednosti eksperimentalnih grupa G1 i G5 ($p > 0,05$). Kod svih eksperimentalnih grupa ustanovljena su minimalna variranja.



Grafikon 3. Grafički prikaz prosečnih B/BR vrednosti 35. dana eksperimenta

Tabela 8. B/BR vrednosti 59. dana eksperimenta (11 dana posle veštačke infekcije)

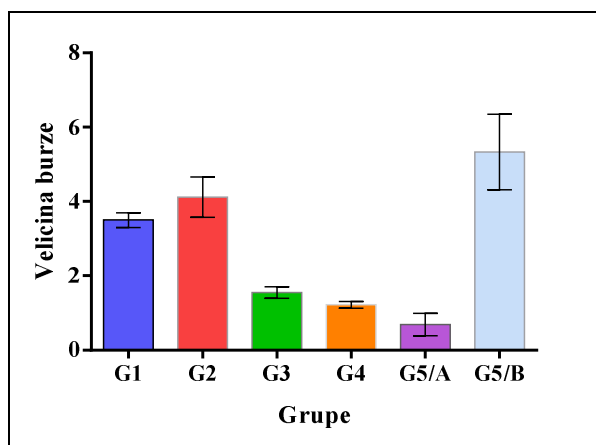
	Način vakcinacije i vrsta vakcine protiv infektivne burzalne bolesti	Prosečna masa burze Fabricii (g)	Prosečna B/BR vrednost
G1	vHVT13 s/c.	2,3	3,50
G2	vHVT13 i/m.	2,85	4,12
G3	Intermedijarna p/o	1,0	1,55
G4	Intermedijarna + p/o	0,75	1,22
G5/A	Nevakcinisana/inficirana	0,45	0,69
G5/B	Nevakcinisana/neinficirana	3,73	5,33

Tabela 9. Deskriptivne statističke B/BR vrednosti burzi 59. dana eksperimenta

	N	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
G1	6	3,50 ^{dhij}	0,20	0,0982	5,61	3,75	3,27
G2	6	4,12 ^{Aefg}	0,55	0,2714	13,17	4,59	3,65
G3	6	1,55 ^{ceh}	0,16	0,0780	10,05	1,75	1,37
G4	6	1,22 ^{bfi}	0,09	0,0460	7,54	1,35	1,15
G5/A	6	0,69 ^{agj}	0,30	0,1489	43,12	1,04	0,35
G5/B	6	5,33 ^{abcdA}	1,02	0,5094	19,11	6,74	4,36

Statistička signifikantnost prikazana je istim slovima: a, b, c,d, e, f, g, h, i, j, $p < 0,01$; A, $p < 0,05$

Analizom prosečnih vrednosti indeksa burzi Fabricii 59. dana eksperimenta ustanovljeno je da je eksperimentalna grupa G5/B imala najveću vrednost ($5,33 \pm 1,02$), što je statistički vrlo značajno veće od prosečne vrednosti svih eksperimentalnih grupa ($p < 0,01$) izuzev grupe G2 gde je ta razlika značajno veća ($p < 0,05$). Eksperimentalna grupa G2 sa prosečnom vrednošću indeksa burze od $4,12 \pm 0,55$ statistički signifikantno je veća ($p < 0,01$) od indeksa za grupe G3, G4, i G5/A a nije ustanovljena značajnost razlika sa grupom. G1 ($p > 0,05$). Eksperimentalna grupa G1 sa prosečnom vrednošću indeksa burze od $3,50 \pm 0,20$ statistički signifikantno je veća ($p < 0,01$) od indeksa za grupe G3, G4, i G5/A. Nisu ustanovljene signifikantne razlike između prosečnih vrednosti eksperimentalnih grupa G3 i G4, G5/A, kao i između G4 i G5/A ($p > 0,05$). Kod svih eksperimentalnih grupa nisu ustanovljena velika variranja podataka.



Grafikon 4. Grafički prikaz prosečnih B/BR vrednosti 59. dana eksperimenta

Tabela 10. B/BR vrednosti 70. dana eksperimenta

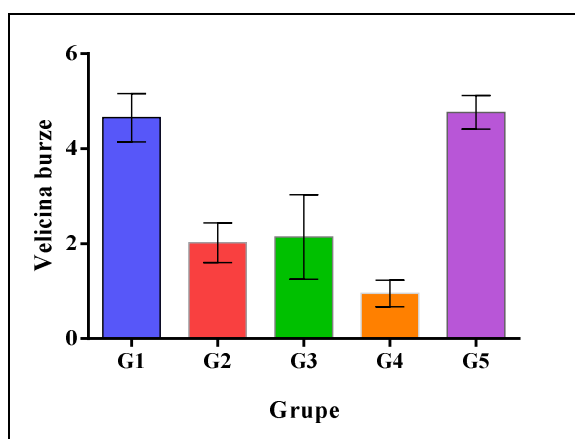
	Način vakcinacije i vrsta vakcine protiv infektivne burzalne bolesti	Prosečna masa burze Fabricii (g)	Prosečna B/BR vrednost
G1	vHVT13 s/c.	4,46	4,65
G2	vHVT13 i/m.	1,75	2,002
G3	Intermedijarna p/o	1,96	2,14
G4	Intermedijarna + p/o	0,7	0,95
G5	Nevakcinisana	4,33	4,76

Tabela 11. Deskriptivne statističke B/BR vrednosti burzi 70. dana eksperimenta

	N	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
G1	6	4,65 ^{ade}	0,51	0,2077	10,94	5,27	3,87
G2	6	2,02 ^{cd}	0,42	0,1699	20,61	2,40	1,64
G3	6	2,14 ^{ef}	2,17	0,8865	101,47	4,94	0,62
G4	6	0,95 ^{ab}	0,28	0,1141	29,28	1,19	0,60
G5	6	4,76 ^{bcf}	0,35	0,1443	7,42	5,19	4,41

Statistička signifikantnost prikazana je istim slovima: a, b, c, d, e, f, $p < 0,01$

Analizom prosečnih vrednosti indeksa burzi Fabricii 70 dana eksperimenta ustanovljeno je da je eksperimentalna grupa G5 imala najveće vrednosti ($4,76 \pm 0,35$) što je statistički vrlo značajno veće od prosečne vrednosti eksperimentalnih grupa G2, G3 i G4 ($p < 0,01$). Eksperimentalna grupa G1 sa prosečnom vrednošću indeksa burze od $4,65 \pm 0,51$ statistički signifikantno je veća ($p < 0,01$) od indeksa za grupe G2, G3, i G4. Između ostalih eksperimentalnih grupa nisu ustanovljene signifikantne razlike ($p > 0,05$). Najveće variranje, koje izlazi izvan granica homogenosti statističke serije, zabeleženo je kod G3 eksperimentalne grupe (101,47%).



Grafikon 5. Grafički prikaz prosečnih B/BR vrednosti 70. dana eksperimenta

Tabela 12. Sumirane vrednosti odnosa „masa burze / telesna masa (B/BR) i vrednosti indeksa „masa burze / telesna masa“ (B/BI)

Grupa	Vreme uzorkovanja BF, uzrast pilića u danima					
	14.	21.	35.	59.	70.	Prosečna vrednost
G1	5.036*	4.003*	5.36*	3.50*	4,65*	4,52*
	1.16**	0.82**	1.03**	0.66**	0,98**	
G2	4.73*	5.36*	6.15*	4.12*	2,02*	4,48*
	1.09**	1.09**	1.18**	0.77**	0,42**	
G3	4.40*	4.70*	3.10*	1.55*	2,14*	3,18*
	1.02**	0.96**	0.59**	0.29**	0,45**	
G4	4.43*	4.42*	1.618*	1.22*	0,95*	2,53*
	1.02**	0.90**	0.31**	0.23**	0,20**	
G5	4.32*	4.89*	5.215*	0.69* ^A	5.33* ^B	4,90*
				0,13** ^A		

* B/BR -Vrednosti odnosa „masa burze / telesna masa“

** B/BI - Vrednosti indeksa „masa burze / telesna masa“

^A – challenge test

^B – bez challenge testa

Veličina Fabricijusovih burzi, prosečna masa burzi i vrednsti odnosa „masa burze/ telesna masa“ (B/BR) po oglednim grupama, prikazane su u tabelama (tab. 2,4,6,8 i 10) za vreme uzorkovanja: 14.,21.,35., (7 dana posle vakcinacija živim atenuiranim vakcinama protiv IBD, za grupe G3 i G4), 59., (11 dana nakon veštačke infekcije pilića izdvojenih iz svih grupa) i 70. dana uzrasta pilića, na kraju oglada.

U tabeli 12. prikazane su prosečne vrednosti odnosa „masa burze/ telesna masa“ (B/BR) i vrednost indeksa „masa burze/ telesna masa“ (B/BI) po grupama pilića za sve termine merenja.

Utvrđene su značajne razlike između grupa 35. dana oglada (7 dana nakon vakcinacija atenuiranim živim vakcinama). Analizom prosečnih B/BR vrednosti burzi Fabricii ustanovljeno je da su grupe G3 i G4 (pilići vakcinisani živim atenuiranim vakcinama) imale značajno manje vrednosti ($p < 0,01$) od indeksa za grupe G1,G2, i G5. Nisu ustanovljene razlike između prosečnih vrednosti grupa G1 i G5 ($p > 0,05$).

Posle veštačke infekcije (59. dana oglada) utvrđena je statistički značajna razlika u grupama. Prosečne vrednosti B/BR i B/BI grupe pilića G1 i G2 (vHVT13)

značajno su veće od vrednosti grupa G3,G4 i G5/A. Međutim grupe pilića G1 i G2 (vHVT13) i G5/B (nevakcinisana neinficirana) se značajno razlikuju. Vrednosti B/BR i B/BI za G5/B grupu pilića su veće od dobijenih vrednosti u grupama G1 i G2. Rezultati merenja indeksa burze i težine tela pilića pokazuju da su pilići u grupama G1 i G2 (vakcinisane vHVT13) bili osetljivi na veštačku infekciju iako daleko manje nego druge grupe pilića (G3 i G4) vakcinisane živim atenuiranim vakcinama i grupe G5/A (nevakcinisana inficirana). Osetljivost grupa sa vHVT13 vakcinacijom, nakon veštačke infekcije je na granici atrofije i histoloških lezija burzi (0,66 i 0,77). Smatra se da je atrofija nastupila kada je (B/BI manji od 0,7 Lucio and Hitchner, 1979).

Nakon veštačke infekcije masa burzi i vrednosti B/BI dramatično se smanjuju u grupi nevakcinisanih a inficiranih pilića (G5/A) i u grupama pilića vakcinisanih živim atenuiranim vakcinama (G3 i G4), kod kojih je došlo do pojave atrofije burzi 0,29; 0,23; 0,13 za G3, G4 i G5/A respektivno.

Na kraju eksperimenta najbolje vrednosti B/BR su utvrđene u kontrolnoj grupi G5 ($4,76 \pm 0,35$) i u grupi G1 ($4,65 \pm 0,51$). Grupe G2,G3 i G4 su sa značajno manjim prosečnim B/BR vrednostima. Na osnovu dobijenih vredosti B/BR i B/BI u ogledu, subkutano aplikovana vHVT13 vakcina na pilićima nosiljama pokazala je da ne izaziva imunosupresiju i omogućava najbolji stepen zaštite.



Slika 1. Izgled BF i slezine nakon veštačke infekcije po eksperimentalnim grupama



Slika 2. Izgled BF i slezine nakon veštačke infekcije po eksperimentalnim grupama



Slika 3. Izgled BF i slezine nakon veštačke infekcije po eksperimentalnim grupama



Slika 4. Izgled BF i slezine na kraju ogleđa po eksperimentalnim grupama

5.3 ELISA titrovi specifičnih antitela protiv IBDV-a, „klasičan“ i „unapređeni“ ELISA test

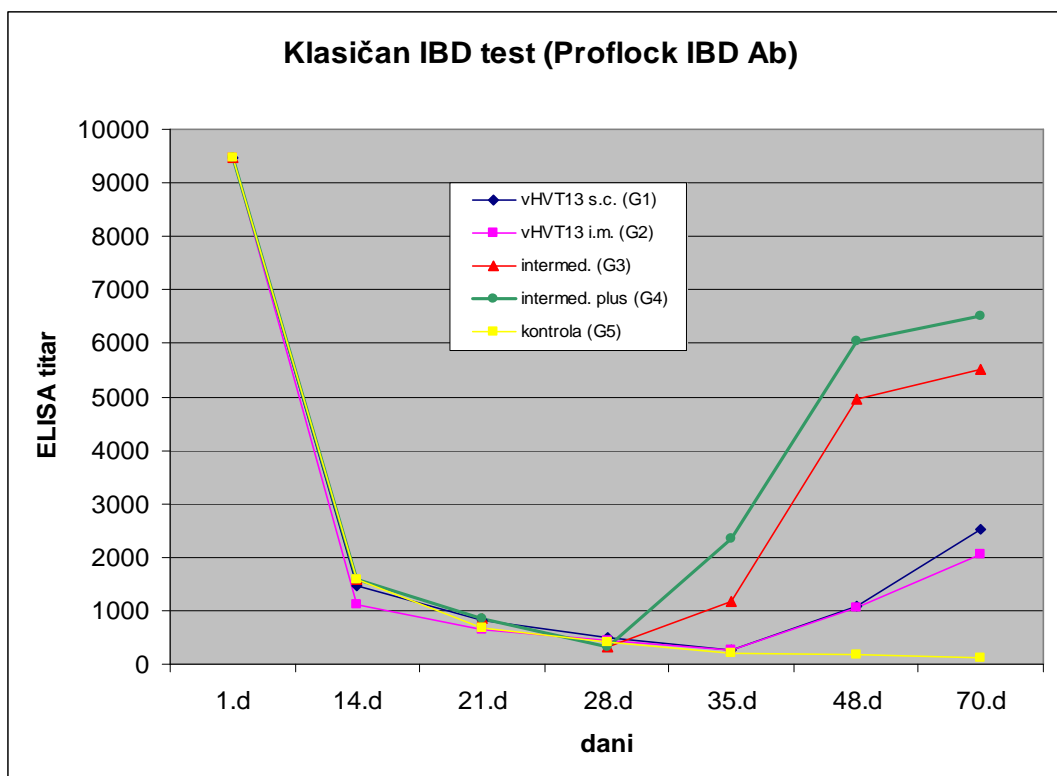
Tabela 13. Visina titra antitela na IBDV (klasičan ELISA IBD test)

Grupa	Visina titra antitela u zavisnosti od vremena uzorkovanja krvi							
	1.	14.	21.	28.	35.	48.	59.	70.
G1	9477	1475	825	498	254	1082	3247	2524
G2	9477	1113	659	430	275	1062	3513	2061
G3	9477	1570	843	317	1160	4968	8312	5515
G4	9477	1570	843	317	2352	6038	7087	6517
G5	9477	1570	675	419	219	170	8828	117

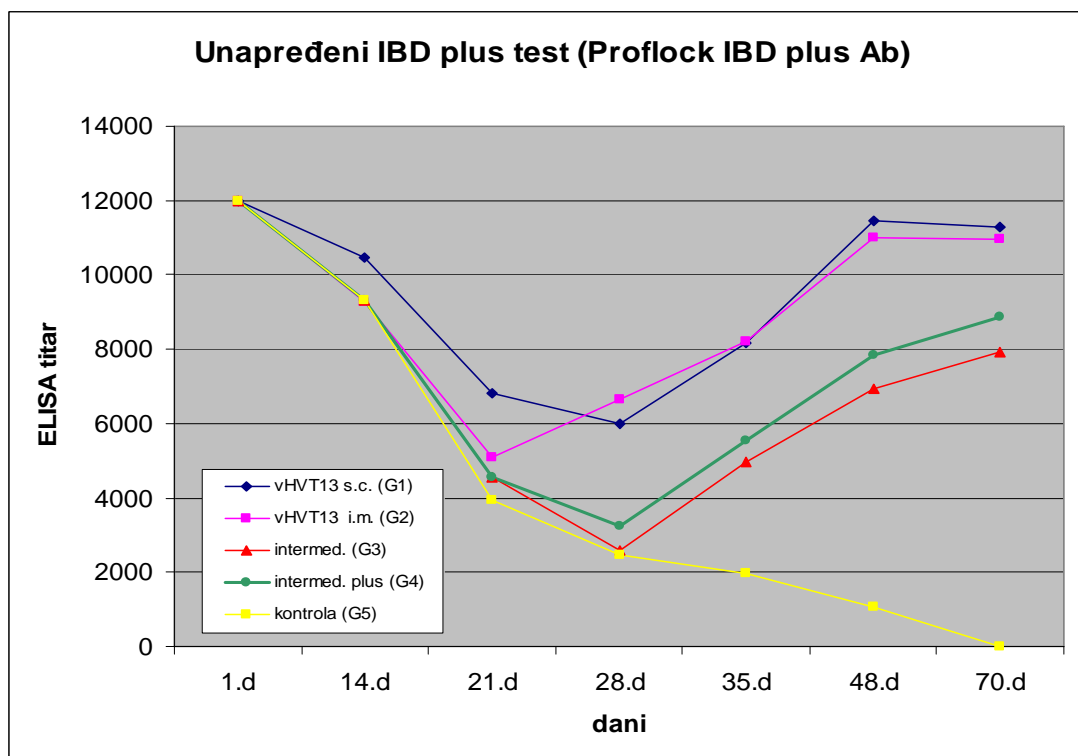
Tabela 14. Visina titra antitela na IBDV (unapređeni ELISA IBD plus test)

Grupa	Visina titra antitela u zavisnosti od vremena uzorkovanja krvi							
	1.	14.	21.	28.	35.	48.	70.	
G1	11763	10488	6831	6001	8154	11447	11283	
G2	11763	9273	5097	6647	8204	11009	10970	
G3	11763	9328	4551	2644	4951	6931	7931	
G4	11763	9328	4551	3247	5525	7850	8853	
G5	11763	9328	3956	2453	1976	1083	263	

* Napomena 59. dana ogleđa nije urađen pregled krvi IBD plus testom iz razloga carinske indolencije i nemogućnosti brze nabavke dijagnostikuma.



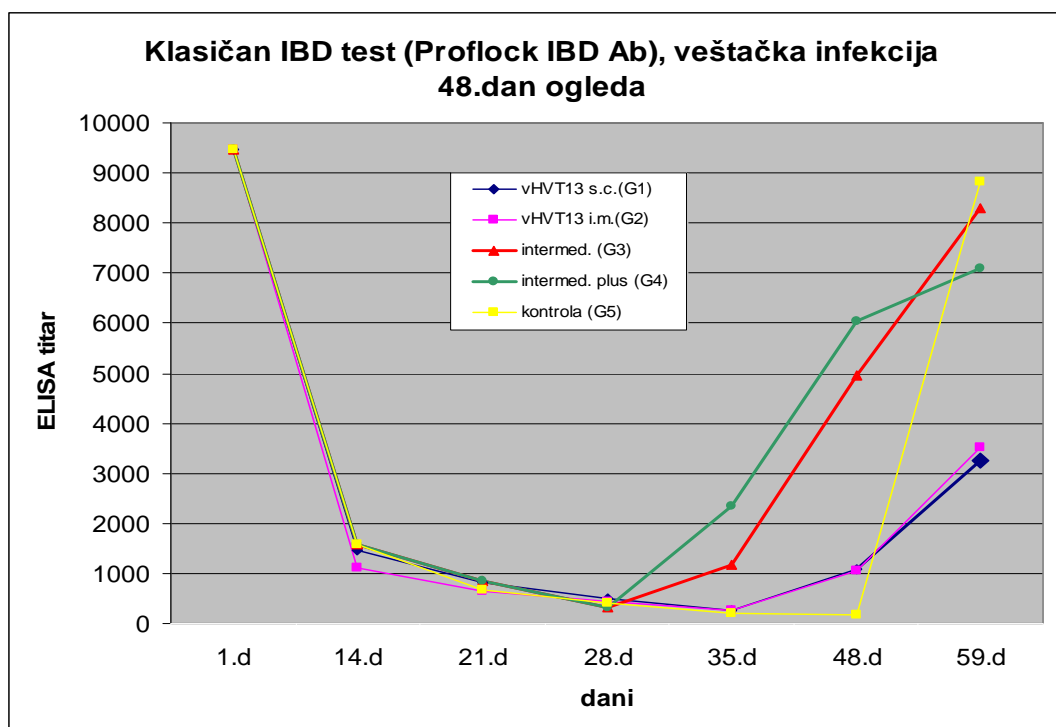
Grafikon 6. Grafički prikaz prosečne visine titra antitela protiv IBDV-a u krvnim serumima pilića, po grupama u svim terminima uzorkovanja. **Klasičan ELISA IBD test.**



Grafikon 7. Grafički prikaz prosečne visine titra antitela protiv IBDV-a u krvnim serumima pilića po grupama u svim terminima uzorkovanja. **Unapređeni ELISA IBD plus test.**

Pilići grupe G1 i G2 vakcinisani vektorskom vHVT13 vakcinom imali su niske titre specifičnih antitela, korišćenjem klasičnog ELISA IBD testa (Grafikon 6.) i visoke, više od 5000 jedinice titra, korišćenjem unapređenog ELISA IBD plus testa posle 3 do 4 nedelje starosti (Grafikon 7.). Nasuprot tome pilići vakcinisani živim atenuiranim vakcinama protiv IBD-a imali su visoke titre antitela merene sa oba testa posle 5,6 nedelja starosti (Tabela 13 i 14, grafikon 6 i 7). Pilići veštački inficirani iz svih grupa imali su značajno povećanje titra antitela mereno klasičnim IBD testom, ali i nakon infekcije najniži titrovi antitela su u grupama G1 i G2 sa vHVT13 vakcinom (Tabela 13, graf. 8).

Grupe G1 i G2 (vHVT13 vakcina) od 14. dana ogleda imale su signifikantno viši titar antitela ($p < 0,01$), od grupe G3 i G4 imunizovane atenuiranim živim vakcinama protiv IBD-a (grafikon 7.).



Grafikon 8. Grafički prikaz serokonverzije po grupama nakon izvršene veštačke infekcije 48. dana ogleda. klasičan **ELISA IBD test**

Brza serokonverzija utvrđena je 11 dana nakon veštačke infekcije. Klasičnim ELISA IBD testom, najviši porast prosečnog titra antitela 8828 izmeren je kod pilića izdvojenih iz grupe G5/A (nevakcinisani, veštački inficirani, zatim slede iz grupe G3, sa prosečnim titrom 8312 (intermedijarna vakcina), pa zatim grupa G4, prosečni titar 7087 i najmanji porast titra u grupama G1 i G2 (vHVT13) 3247, 3513 respektivno (Tabela 13, grafikon 8).

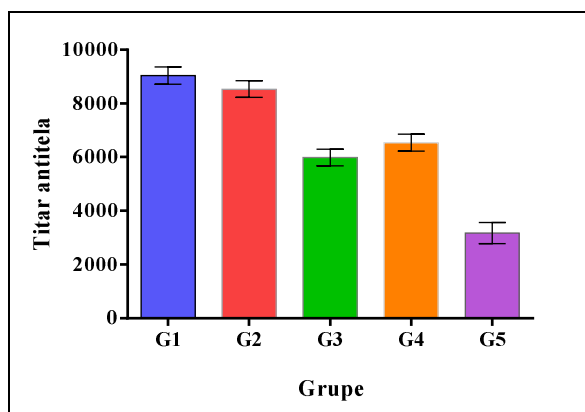
Tabela 15. Deskriptivne statističke vrednosti titra specifičnih antitela na IBD, ELISA IBD plus testom.

	N	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
G1	60	9033,55 ^{abc}	2494,22	322,0025	27,61	3272	14107
G2	60	8533,23 ^{def}	2395,71	309,2853	28,08	3356	12700
G3	60	5988,05 ^{adAg}	2414,42	311,6998	40,32	1103	10017
G4	60	6534,55 ^{beAh}	2456,45	317,13	37,59	1861	10430
G5	60	3176 ^{c fgh}	3065,12	395,7051	96,50	0,00	10017

Statistička signifikantnost prikazana je istim slovima: A, $p < 0,05$; a, $p < 0,01$

Tabela 15 kroz sumarne vrednosti titrova antitela u svim terminima merenja prikazuje bolju imunogenost vHVT13 vakcine.

Analizirajući prosečne vrednosti titra antitela na IBD unapređenim ELISA testom ustanovljeno je da je eksperimentalna grupa jedan (G1) imala najveću vrednost titra ($9033,55 \pm 2494,22$), ova vrednost je signifikantno veća od vrednosti titra eksperimentalnih grupa G3, G4 i G5 ($p < 0,01$). Nije ustanovljena signifikantna razlika između grupe G1 i grupe G2 ($8533,23 \pm 2395,71$). Takođe kod eksperimentalne grupe G2 je ustanovljen signifikantno veći titar ($p < 0,01$) u odnosu na G3, G4 i G5. Između eksperimentalnih grupa G3 ($5988,05 \pm 2414,42$) i G4 ($6534,55 \pm 2456,45$) ustanovljena je značajna statistička razlika u visini titra ($p < 0,05$). Najveće variranje, koje se ne nalazi u granicama homogenosti statističke serije, zabeleženo je kod G5 eksperimentalne grupe (96,50%).



Grafikon 9. Grafički prikaz prosečnih ELISA titrova (svi termini uzorkovanja) unapređenim IBD plus testom

5.4 Prikaz serokonverzije na osnovu titra antitela protiv atipične kuge živine (ND) HI testom i infektivnog bronhitisa (IB) ELISA testom

Tabela 16. Rezultati HI testa na ND kod pilića nosilja 70. dana ogleda

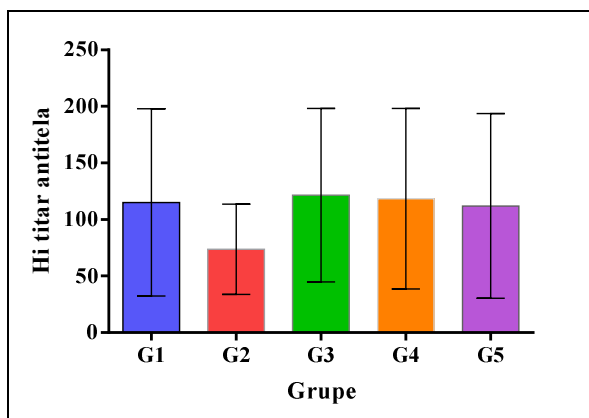
G1	G2	G3	G4	G5
1:32 (2 ⁵)-2x	1:32 (2 ⁵)-3x		1:32 (2 ⁵)-1x	1:32 (2 ⁵)-1x
1:64 (2 ⁶)- 3x	1:64 (2 ⁶)- 4x	1:64 (2 ⁶)- 5x	1:64 (2 ⁶)- 4x	1:64 (2 ⁶)- 5x
1: 128 (2 ⁷)-3x	1: 128 (2 ⁷)-3x	1: 128 (2 ⁷)-3x	1: 128 (2 ⁷)-3x	1: 128 (2 ⁷)-2x
1:256 (2 ⁸)- 2x		1.:256 (2 ⁸)-2x	1.:256 (2 ⁸)-2x	1.:256 (2 ⁸)-2x
$\bar{X} = 115.2$	$\bar{X} = 73.6$	$\bar{X} = 121.6$	$\bar{X} = 118,4$	$\bar{X} = 112$
Log 4,75	Log 4,30	Log 4,80	Log 4,78	Log 4,72

Nije zabeležena statistički značajna razlika u rezultatima Hi titra između grupa ($p > 0,05$). U okviru svih eksperimentalnih grupa zabeleženo je visoko variranje Hi titra antitela na ND, što se objašnjava imunizacijom isključivo atenuiranim živim vakcinama protiv atipične kuge živine do kraja ogleda.

Tabela 17. Deskriptivne statističke vrednosti Hi testa 70. dana ogleda

	N	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
G1	10	115,20	82,90	26,21	71,96	256,0	32,00
G2	10	73,60	40,05	12,67	54,42	128,0	32,00
G3	10	121,60	76,62	24,23	63,01	256,0	64,00
G4	10	118,40	79,89	25,26	67,48	256,0	32,00
G5	10	112,00	81,58	25,80	72,84	256,0	32,00

Analizirajući prosečne vrednosti 70 dana eksperimenta ustanovljeno je da je eksperimentalna grupa G3 imala najvišu vrednost Hi titra ($121,60 \pm 76,62$), dok je najniža vrednost zabeležena kod G2 grupe ($73,60 \pm 40,05$). Nisu ustanovljene signifikantne razlike između prosečnih vrednosti eksperimentalnih grupa ($p > 0,05$). Unutar svih eksperimentalnih grupa zabeleženo je visoko variranje, koje je bilo najveće kod 5 eksperimentalne grupe (72,84%) a najmanje kod 2 grupe 54,42%. Ovako visoko variranje Hi titara i relativno mala dubina statističkih serija su doprinele ne postojanju signifikantnih razlika između ostalih grupa.



Grafikon 10. Grafički prikaz visine prosečnih vrednosti Hi titra antitela na ND 70. dana oglada

Tabela 18. Rezultati pregleda krvi pilića na IB ELISA testom 70. dana oglada

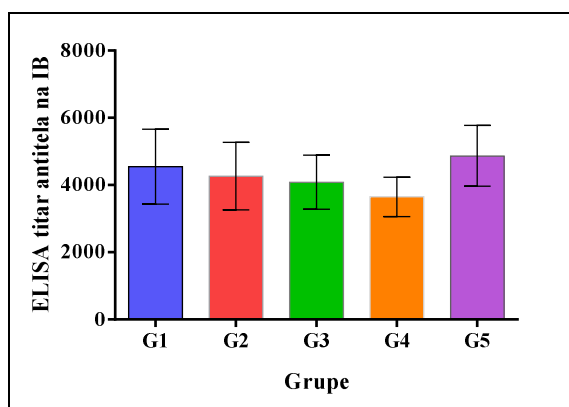
G1 Vhvt13 s/c	G2 vHVT13 i/m	G3 Intermedijalni soj vakcine IBD	G4 Intermedijalni plus soj IBD	G5 Kontrola bez vakcine IBD
4191	4664	3719	3839	5706
4464	4111	2947	3947	5948
4840	4179	4850	3659	5116
6092	2870	4452	3008	4077
4776	6084	3564	2748	5840
5192	3901	4189	4255	4479
2280	4400	2703	3486	4137
4625	2612	4876	4321	3623
5709	4834	4770	4268	3977
3268	4956	4717	2942	5759
$\bar{X} = 4543,7$	$\bar{X} = 4261,1$	$\bar{X} = 4078,7$	$\bar{X} = 3647,3$	$\bar{X} = 4866,2$
Ln 8,42	Ln 8,36	Ln 8,31	Ln 8,20	Ln 8,49

Tabela 19. Deskriptivne statističke vrednosti ELISA testa na IB, 70. dana ogleđa

	N	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
G1	10	4544	1116,00	352,9	24,56	6092	2280
G2	10	4261	1007,00	318,5	23,64	6084	2612
G3	10	4079	805,20	254,6	19,74	4876	2703
G4	10	3647 ^A	584,60	184,9	19,03	4321	2748
G5	10	4866 ^A	902,10	285,3	18,54	5948	3623

Statistička signifikantnost prikazana je istim slovima: A, $p < 0,05$

Analizirajući prosečne vrednosti visine titra antitela na IB (ELISA test) 70. dana ogleđa ustanovljeno je da je eksperimentalna grupa G5 imala najveće vrednosti ($4866 \pm 902,10$), dok je najmanja vrednost zabeležena kod grupe G4 ($3647 \pm 584,60$). Samo između ove dve grupe ustanovljene su signifikantne razlike ($p < 0,05$). Između ostalih grupa nisu ustanovljene signifikantne razlike ($p > 0,05$). Najveće variranje, koje se nalazi u granicama homogenosti statističke serije, zabeleženo je kod G1 eksperimentalne grupe (24,56%).

**Grafikon 11.** Grafički prikaz prosečnih vrednosti IB ELISA testa 70. dana ogleđa

Značajna razlika u visini titara specifičnih antitela na IB utvrđena je između grupe G4 i G5. Grupa pilića, G4 imunizovana atenuiranim živim vakcinom (intermedijarni plus soj) protiv IBV živine ima značajno niži titar antitela na IBV ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu G5 grupu. Između ostalih grupa nema značajne razlike.

Rezultati humoralnog imunskog odgovora koji su mereni 70. dana ogleada, analizirani su po grupama, radi upoređenja serokonverzije na IB i ND kod različito vakcinisanih grupa pilića protiv infektivne burzalne bolesti. Na osnovu rezultata visine HI titra i visine ELISA titra antitela, rekombinantna vHVT13 vektor vakcina ne interferira sa drugim klasičnim živim vakcinama na ND i IB, mereno 70. dana uzrasta pilića u našem ogledu (Tabela 16,17,18 i 19: Grafikon 10 i 11).

5.5 Rezultati pregleda limfocita iz periferne cirkulacije pilića dobijeni primenom protočne citometrije

5.5.1 Protočna citometrija imunoglobulina IgY (H+L) u perifernoj cirkulaciji pilića

Merenje imunoglobulina IgY (H+L) ili IgY B limfocitnih ćelija, i procentualni odnos zastupljenosti IgY i CD4⁺ T ćelija u perifernoj cirkulaciji pilića vršeno je u dva termina.

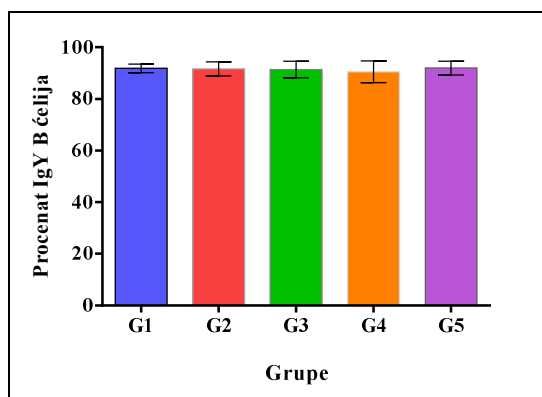
Prvo brojanje IgY izvršeno je 48. dana ogleada (20 dana nakon vakcinacije grupa pilića G3 i G4 živim atenuiranim vakcinama protiv IBD). Drugo brojanje IgY izvršeno je 59. dana ogleada (11 dana nakon veštačke infekcije).

Tabela 20. Deskriptivne statističke vrednosti procentualne zastupljenosti IgY (H+L) 48. dana ogleada

	N	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
G1	6	91,84	1,70	0,6943	1,85	94,52	89,93
G2	6	91,65	2,73	1,1130	2,97	94,52	87,76
G3	6	91,40	3,24	1,3230	3,54	95,14	85,71
G4	6	90,57	4,19	1,7090	4,62	94,67	83,78
G5	6	91,96	2,64	1,0770	2,87	96,45	89,12

Analizirajući prosečne vrednosti procentualne zastupljenosti imunoglobulina IgY 48. dana ogleada ustanovljeno je da su eksperimentalne grupe imale veoma ujednačene vrednosti. Nisu ustanovljene signifikantne razlike između prosečnih vrednosti procenata IgY B pozitivnih ćelija između grupa ($p > 0,05$). Koeficijent varijacije za ovaj parametar je bio izuzetno nizak i kretao se od 1,85% kod

eksperimentalne grupe G1 do 4,62% kod grupe G5, što ukazuje da su vrednosti u ispitivanim eksperimentalnim grupama bile ujednačene bez velikog variranja.

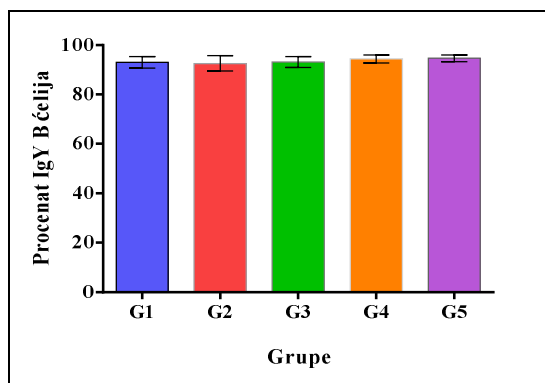


Grafikon 12. Grafički prikaz prosečnih vrednosti procentualne zastupljenosti IgY 48.dana ogleđa

Tabela 21. Deskriptivne statističke vrednosti procentualne zastupljenosti IgY (H+L) 59. dana ogleđa

	N	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
G1	6	92,97	2,33	0,9513	2,51	95,39	88,93
G2	6	92,56	3,11	1,2710	3,36	96,13	87,26
G3	6	93,13	2,20	0,8997	2,37	95,43	90,14
G4	6	94,36	1,58	0,6467	1,68	96,86	92,72
G5/A	6	94,59	1,41	0,5752	1,49	95,85	92,60

Analizirajući prosečne vrednosti procentualne zastupljenosti imunoglobulina IgY 59.dana ogleđa ustanovljeno je da su eksperimentalne grupe imale veoma ujednačene vrednosti, a najmanja prosečna vrednost zabeležena je u G2 grupi ($92,56 \pm 3,11$), dok je najveća zabeležena u G5/A grupi ($94,59 \pm 1,41$). Nisu ustanovljene signifikantne razlike između prosečnih vrednosti procenata IgY B pozitivnih ćelija između grupa ($p > 0,05$). Koeficijent varijacije za ovaj parametar je bio izuzetno nizak i kretao se od 1,49% kod eksperimentalne grupe G5 do 3,36% kod grupe G2, što ukazuje da su vrednosti u ispitivanim eksperimentalnim grupama bile ujednačene bez velikog variranja.



Grafikon 13. Grafički prikaz prosečnih vrednosti procentualne zastupljenosti IgY 59. dana ogleđa

5.5.2 Rezultati procentualne zastupljenosti i odnosa CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita u perifernoj cirkulaciji pilića metodom protočne citometrije

Tabela 22. Srednje vrednosti procenta (%) pozitivnih CD4 i CD8 ćelija ± standardn devijacija) i CD4⁺/CD8⁺ T ćelijski odnos

Površinski molekuli		CD ₄	CD ₈	CD ₄ /CD ₈
I Protočna Citometrija 28. dan ogleđa	G.1.	72,50 ± 2,40	27,50 ± 2,40	2,63
	G.2.	75,83 ± 6,15	24,17 ± 6,15	3,13
	G.3.	72,59 ± 3,44	27,41 ± 3,44	2,65
	G.4.	72,59 ± 3,44	72,59 ± 3,44	2,65
	G.5.	72,59 ± 3,44	27,41 ± 3,44	2,65
II Protočna Citometrija 48. dan ogleđa	G.1.	73,26 ± 3,44	26,74 ± 3,44	2,74
	G.2.	72,34 ± 1,86	27,66 ± 1,86	2,62
	G.3.	66,06 ± 1,56	33,94 ± 1,56	1,95
	G.4.	63,74 ± 1,94	36,26 ± 1,94	1,76
	G.5.	74,72 ± 2,80	25,28 ± 2,80	2,96
III Protočna citometrija 59. dan ogleđa	G.1.	51,717 ± 7,27	48,282 ± 7,27	1,071
	G.2.	52,353 ± 12,78	47,646 ± 12,78	1,098
	G.3.	51,53 ± 12,73	48,635 ± 12,73	1,063
	G.4.	52,14 ± 10,12	47,86 ± 10,12	1,089
	G.5/A.	49,918 ± 10,31	50,082 ± 10,31	0,997

I Citometrija (p>0,05); II citometrija (p<0,05); III citometrija (p>0,05)

Tabela 23. Procentualna zastupljenost i odnos CD4⁺/CD8⁺ T limfocita periferne krvi pilića 48. dana ogleda (nakon vakcinacija živim vakcinama protiv IBD)

Uzorci krvi		G.1.		G.2.		G.3.		G.4.		G.5.	
		%	Indeks	%	indeks	%	indeks	%	Indeks	%	Indeks
1.	CD4	71,71	2,53	70,29	2,37	67,80	2,105	65,10	1,86	71,71	2,53
	CD8	28,29		29,71		32,20		34,90		28,29	
2.	CD4	78,00	3,54	71,26	2,48	66,10	1,95	66,44	1,98	76,36	3,23
	CD8	22,00		28,74		33,90		33,56		23,64	
3.	CD4	67,94	2,11	72,29	2,61	64,79	1,837	62,19	1,645	76,70	3,29
	CD8	32,06		27,71		35,27		37,81		23,30	
4.	CD4	72,89	2,68	75,47	3,076	65,32	1,88	61,33	1,586	77,67	3,48
	CD8	27,11		24,53		34,68		38,67		22,33	
5.	CD4	73,33	2,75	71,36	2,49	68,04	2,13	62,86	1,69	75,00	3
	CD8	26,67		28,64		31,96		37,14		25,00	
6.	CD4	75,69	3,11	73,38	2,76	64,31	1,80	64,52	1,82	70,88	2,43
	CD8	24,31		26,62		35,69		35,48		29,12	
Srednja vrednost		73,26	2,74	72,34	2,62	66,06	1,95	63,74	1,76	74,72	2,96
		26,74		26,74		33,94		36,26		25,28	

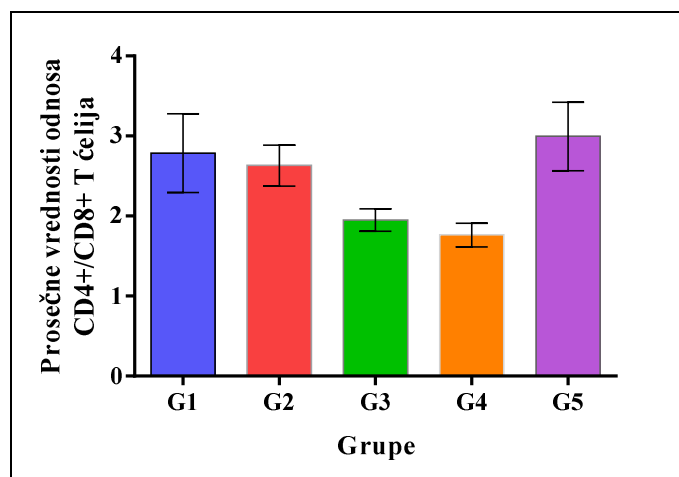
Tabela 24. Deskriptivne statističke vrednosti prosečnih odnosa CD4⁺ / CD8⁺ T limfocita 48. dana ogleda

	N	\bar{x}	SD	Sy	CV (%)	X max	X min
G1	6	2,79 ^{de}	0,49	0,2007	17,64	3,54	2,11
G2	6	2,63 ^{Ca}	0,26	0,1042	9,70	3,08	2,37
G3	6	1,95 ^{aeA}	0,14	0,0567	7,13	2,13	1,80
G4	6	1,76 ^{bcd}	0,15	0,0606	8,42	1,98	1,59
G5	6	2,99 ^{ab}	0,43	0,1744	14,28	3,48	2,43

Statistička signifikantnost prikazana je istim slovima: a, b, c, d, e, $p < 0,01$; A, $p < 0,05$

Analizom prosečnih vrednosti odnosa CD4⁺ / CD8⁺ T limfocita ustanovljeno je da je eksperimentalna grupa G4 imala najnižu vrednosti ($1,76 \pm 0,15$), što je statistički vrlo značajno manje ($p < 0,01$) od prosečne vrednosti grupa G1, G2, i G5. Eksperimentalna grupa G3 sa prosečnom vrednošću citometrije od $1,95 \pm 0,14$ statistički signifikantno je manja ($p < 0,01$) od vrednosti za grupe G1 i G5. Prosečna vrednost grupe G2 ($2,63 \pm 0,26$) značajno ($p < 0,05$) je veća od prosečne vrednosti grupe G3. Između

ostalnih grupa nisu ustanovljene signifikantne razlike ($p > 0,05$). Najveće variranje, koje se nalazi u granicama homogenosti statističke serije, zabeleženo je kod G1 eksperimentalne grupe (17,64%).



Grafikon 14. Grafički prikaz prosečnih vrednosti odnosa CD4⁺ / CD8⁺ T limfocita 48. dana oglada

6. DISKUSIJA

Infektivna burzalna bolest je veoma zarazna bolest mladih pilića, posebno između 3. i 6. nedelje starosti, kada se razvija akutni sindrom koji se klinički karakteriše depresijom, nakostrešenošću perja i visokim stepenom uginuća. Zbog velikih ekonomskih gubitaka, koji se izražavaju u direktnim i indirektnim štetama, koje nastaju usled pojave GB, a takođe i zbog imunosupresivnog efekta bolesti, istražuju se i u praksi se primenjuju tehnološki nove vakcine protiv IBD. Tokom prošle decenije, različite rekombinantne virusne vektor vakcine za živinu uvedene su u upotrebu u mnogim zemljama. Aktuelna epizootiološka situacija GB u našoj zemlji nije povoljna i nameće potrebu za primenom ovih vakcina. Neophodno je bilo da se veštačkom infekcijom proveriti da li vHVT13 vakcina u našim uslovima pruža dobru zaštitu od autohtonih vvIBD sojeva virusa, tim pre što u Srbiji nema iskustva u primeni genetički modifikovanih vakcina. Kakva je bezbednost i efikasnost vHVT13 vakcina, pošto je poznato da je odnos bezbednosti i efikasnosti kod živih vakcina u obrnutoj korelaciji. Vršili smo takođe poređenje efekata primene vHVT13 vakcina i živih atenuiranih vakcina protiv IBD na humoralni i celularni imunski odgovor i na postojanje imunskog jaza. Ove teme su bile predmet istraživanja mnogih autora:

Veštačku infekciju pilića, vvIBDV nakon obavljenih vakcinacija rekombinantnom vektor vakcinom (vHVT), živim atenuiranim vakcinama i imunokompleks vakcinom, sprovodili su brojni autori (Darteil et al., 1995; Tsukamoto et al., 2002; Rautenschlein et Haase, 2005; Bublot et al., 2007; Massi et al., 2008; Le Gros et al., 2009; Rania et al., 2012; Hesham Sultan et al., 2012; Lemiere et al., 2013).

Darteil et al. (1995) su veštačku infekciju IBD virusom sproveli sa dve vrste rekombinantnih ćurećih herpes virusnih vakcina (eng. Recombinant herpesvirus of turkey- vHVT). vHVT 001 i vHVT 002 i HVT parenteralno. Pilići su veštački inficirani 21. dana posle vakcinacije okularno sa infektivnom dozom IBDV 52/70 sojem. Rezultati eksperimentalne infekcije posle vakcinacije pokazuju da ekspresija VP2 proteina u HVT rekombinantnom virusu (vHVT 002) izaziva stvaranje anti VP2 neutrališućih antitela kod pilića, koja pouzdano štite sve vakcinisane piliće od uginuća (100% zaštita) i protiv oštećenja BF. Dok je sa vHVT 001 rekombinantnom vakcinom postignuta parcijalna zaštita protiv IBDV.

Massi et al. (2008) su takođe sproveli veštačku infekciju protiv IBD kod pilića nosilja 42. dana uzrasta što se unekoliko razlikuje od naših eksperimenata gde je

veštačka infekcija urađena 48. dana i na osnovu izračunavanja optimalnog vremena za vakcinaciju Massi et al. (2008) su veštačku infekciju izveli 42. dana ogleđa na grupama od po 15 pilića, dok smo mi veštačku infekciju sproveli nešto kasnije 48. dana uzrasta pilića na grupama od po 10 jedinki. Smatrali smo da je bilo neophodno da prođe bar dvadesetak dana od prve vakcinacije i dve nedelje od druge vakcinacije živim atenuiranim vakcinama kod grupa pilića G3 i G4, radi uspostavljanja aktivnog imunskog odgovora.

Prisustvo kliničkih znakova i stopa mortaliteta posle veštačke infekcije vv sojem IBDV sumirani su u tabeli 1. U grupi pilića nevakcinisanih a veštački inficiranih (G5/A), teške kliničke znake IBD kao što su depresija, nakostrešenost perja i vodenasti proliv, imale su sve kokice a pet od deset su uginule, za razliku od eksperimenata Massi et al. (2008) gde su od svih 15 obolelih, dve kokice uginule. U obe grupe pilića vakcinisane živim atenuiranim vakcinama, intermedijarnom i intermedijarnom plus vakcinom protiv IBD (G3, G4) po dve od deset kokica su pokazale kliničke znake bolesti i uginule. U eksperimentima Massi et al. (2008) posle vakcinacije sa živim atenuiranim vakcinama po 2 kokice od 15 su obolele i uginule a u grupi sa intermedijarnom plus vakcinom dve su obolele a jedna uginula. U grupi pilića vakcinisanih rekombinantnom vektorskom vakcinom vHVT13 (G1,G2) u našim eksperimentima kao i kontrolnoj grupi (G5/B), koja nije bila vakcinisana i inficirana, nije bilo kliničkih znakova bolesti niti je zabeleženo uginuće pilića.

Na osnovu kliničkih znakova i mortaliteta posle veštačke infekcije sa vv IBDV, potpuna zaštita je utvrđena kod grupa G1 i G2, koje su bile vakcinisane sa vHVT13, a delimična zaštita je postignuta kod pilića u grupama G3 i G4 vakcinisanih intermedijarnom ili intermedijarnom plus vakcinom. Može se reći da se naši rezultati potpuno poklapaju sa istraživanjima (Darteil et al., 1995; Massi et.al, 2008) kada je u pitanju zaštita od veštačke infekcije u grupama vakcinisanih sa vHVT vakcinama. Manje razlike postoje kod grupa sa živim atenuiranim vakcinama i kod nevakcinisanih a inficiranih grupa, za šta smatramo da su razlozi: jačina virusa, vreme i način sprovedene veštačke infekcije. U našem ogleđu suspenzija virusa za izvođenje veštačke infekcije pripremljena je na način opisan u Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2008). Fabricijusove burze su aseptično homogenizovane u avanu pomešane sa istom količinom fosfatnog pufera (PBS) i nerazređenog metilen hlorida. Smesa je homogenizovana u tkivnom blenderu i centrifugovana na 2000×g, 30 minuta. Nakon centrifugovanja, supernatant je dekantovan i zamrznut na -40°C do dalje

upotrebe. Dobijeni supernatant je bez razređenja upotrebljen za infekciju pilića. Za razliku od Massi et al. (2008) koji su virus za veštačku infekciju od $5,2 \log_{10}$ EID₅₀ razredili u 0,5 ml destilovane vode po piletu i aplikovali oralno. Mi smo aplikovanje virusa izvršili okulonazalno po 50 µl nerazređenog virusa. Iz navedenog se može zaključiti da je infektivna doza koju smo mi upotrebili veća od one koju su koristili Massi et al. (2008). Konačno kontrola infekcije gde je uginuće 50% (G5/A) govori o tome da je inokulum dobro napravljen.

Nakon veštačke infekcije vvIBDV, makroskopske lezije su uočene kod svih pilića nevakcinisane, a inficirane grupe (G5/A) i kod nekoliko ptica u grupama (G3 i G4) vakcinisanih atenuiranim živim vakcinama protiv infektivne burzalne bolesti.

Makroskopski nalaz (pato-anatomski nalaz) uginulih pilića nakon veštačke infekcije je tipičan nalaz za uginuća pilića od IBD (edem burze Fabrici, povećani, bleđi kao kuvani bubrezi, krvarenja u mišićima) koji je zabeležen samo kod uginulih pilića u grupama G3, G4 i G5/A (tabela 1). Jedino su u grupi G5/A (nevakcinisana/inficirana) obdukcijom utvrđena krvarenja na Fabricijusovim burzama i na sluzokoži proventrikulusa na par uginulih pilića.

Rezultati dobijeni u našem radu pokazuju, da vektor vakcina vHVT13 indukuje 100% zaštitu vakcinisanih pilića nakon veštačke infekcije sprovedene 48. dana uzrasta pilića sa našim autohtonim vvIBDV (tabela 1). Navedeni rezultati se slažu sa istraživanjima brojnih autora koji su koristili vHVT vektor vakcinu 1. dana kod brojlerskih pilića. Rania et al. (2012) navode da se upotrebom vHVT vakcina postiže zaštitni efekat kada se vrši veštačka infekcija vvIBDV (Challenge virus obezbeđen by Dr Helal (CLEVB)). Odličan nivo zaštite (90-100%) je zabeležen posle veštačke infekcije sa različitim sojevima vvIBD posle s/c ili in „ovo“ vakcinacije (Rania et al., 2012; Tsukamoto et al., 2002). Puna zaštita protiv veštačke infekcije obavljene između 3. i 6. nedelje postiže se, uprkos prisustvu visoke koncentracije MDA u vreme vakcinacije pilića (Bublot et al., 2007; Le Gros et al., 2009; Gelb et al., 2016). Takođe Hesham Sultan et al. (2012) navode u svojoj studiji, da se postiže 100% zaštita vakcinisanih brojlera sa vHVT vakcinom, kada je veštačka infekcija sprovedena 28 ili 35 dana uzrasta pilića sa egipatskim (Egypt/09 izolat) vvIBD.

Naši eksperimenti i eksperimenti autora sa kojima smo vršili poređenje, pokazuju da vektor vakcina vHVT13 omogućava odličnu zaštitu vakcinisanih pilića protiv veštačke infekcije. U eksperimentima Lemiere et al. (2013) dokazano je da su nevakcinisani brojlerski pilići zaštićeni od vvIBDV ako su njihovi roditelji vakcinisani

barem jednom vHVT vakcinom, posle veštačke infekcije sa 0,1ml virusa vvIBD (soj 89163/7.3 ANSES, Ploufragan, France) u uzrastu od 24 dana.



Jedan od parametara koji precizno pokazuje oštećenje BF, njenu hipertrofiju, odnosno atrofiju je B/BR odnos (Eng. bursa body weight ratio, b/bw ratio, Sharma et al.,1989) i/ili B/BI indeks (Eng. bursa body weight index, b/bw index, Lucio et Hitchner,1979). Radi ocene efekata primene vHVT13 i živih atenuiranih vakcina protiv IBDV na burzu Fabrici (BF) i radi procene zaštite nakon veštačke infekcije, u našem ogledu pratili smo odnos, masa BF/ telesna masa trupa pilića (B/BR odnos) i indeks BF (B/BI).

U uzrastu od 14 dana, pre primene živih atenuiranih vakcina a posle primene vHVT13 vakcine, nisu ustanovljene signifikantne razlike između prosečnih vrednosti eksperimentalnih grupa ($p > 0,05$, tabela 2 i 3 , grafikon 1). Drugo praćenje vršeno je 21. dana uzrasta pilića, kada takođe nisu ustanovljene signifikantne razlike između prosečnih vrednosti eksperimentalnih grupa ($p > 0,05$, tabela 4 i 5, grafikon 2). Naši rezultati za prva dva termina merenja B/BR su u skladu sa rezultatima Rautenschlein et al. (2011), premda su oni upoređivali efekte humoralnog i ćelijskog imuniteta, nakon *in,ovo* primene vHVT i imuno-kompleks vakcine na brojlerskim pilićima. Želatinizaciju BF su detektovali kod 6-30% pilića vakcinisanih sa imuno-kompleks vakcinom između 15. i 28. dana uzrasta pilića. Kako ističu autori vakcinacija grupe pilića sa vHVT vakcinom ne utiče na B/BR odnos dok su ptice vakcinisane imuno-kompleks vakcinom pokazale značajno smanjenje težine burze sa početkom od 21. dana uzrasta.

Sedam dana nakon prve vakcinacije (35. dana ogleđa) u grupama G3 i G4, koje su vakcinisane atenuiranim živim vakcinama, intermedijarnom i intermedijarnom plus protiv IBDV (redom navođenja), analizom prosečnih vrednosti B/BR odnosa ustanovljeno je da je eksperimentalna G4 imala najmanju vrednost B/BR ($1,62 \pm 0,02$), što je statistički značajno manje od prosečne vrednosti svih eksperimentalnih grupa ($p < 0,01$). Grupa G3, sa prosečnom vrednošću B/BR odnosa od $3,10 \pm 0,19$, je statistički signifikantno manja ($p < 0,01$) od B/BR odnosa za grupe G1,G2 i G5 (Tabela 6 i 7, grafikon 3).

Naš nalaz značajno nižih prosečnih vrednosti B/BR i B/BI (Tabela 12) pilića nakon vakcinacije živim atenuiranim vakcinama, kao mera nepotpune zaštite i

oštećenja BF u korelaciji je sa stavovima Block et al. (2007) i Bublot et al. (2007) koji navode da se pojave lezija na burzama javljaju posle infekcije klasičnim i intermedijernim sojevima virusa za razliku o vektorskih vHVT, koje ne izazivaju lezije na burzama. Tridesetpetog dana našeg oglada B/BI vrednosti za grupu G3 su 0,59 a za grupu G4 su 0,31 što predstavlja atrofiju burze Fabrici koju uvek prate i histološke promene (Lucio et Hitchner, 1979). Rezultati koji idu u prilog našim nalazima a to je da nema smanjenja B/BR odnosa nakon vakcinacije grupa pilića sa vHVT13 vakcinom, a da je utvrđeno smanjenje odnosa B/BR i B/BI indeksa nakon vakcinacija atenuiranim živim vakcinama, su izneli Hesham Sultan et al. (2012), uporedivši B/BR odnose po 10 pilića poreklom sa farme gde su pilići vakcinisani sa vHVT vakcinom i farme gde su pilići vakcnisani sa živim atenuiranim vakcinama protiv IBD (1.dana im. 14.dana im plus vakcinom). U četvrtoj (dve nedelje posle vakcinacije atenuiranim živim vakcinama) i šestoj nedelji uzrasta brojlerskih pilića utvrdili su značajno niži odnos B/BR ($p < 0.001$) na farmi gde su upotrebljene žive atenuirane vakcine.

Jedanaest dana posle veštačke infekcije (59. dana oglada), analizom prosečnih vrednosti B/BR odnosa, ustanovljeno je da je grupa G5/B (nevakcinisana, neinficirana) imala najveću vrednost ($5,33 \pm 1,02$), što je statistički vrlo značajno veća od prosečne vrednosti svih grupa ($p < 0,01$). Grupe G1 i G2 (vHVT13 vakcinacija) sa prosečnim vrednostima B/BR odnosa ($4,12 \pm 0,55$ i $3,50 \pm 0,20$), redom navođenja, statistički signifikantno su veće ($p < 0,01$) od vrednosti B/BR odnosa za grupe G3, G4, i G5/A (nevakcinisana, inficirana) a iznosile su 1,55; 1,22 i 0,69 redom navođenja (Tabela 8 i 9, grafikon 4).

Veličina BF i odnos masa burze/telesna masa pilića (Bursa/body weight ratio B/BR) su značajno smanjene samo u grupama vakcinisanih sa atenuiranim živim vakcinama (G3 i G4) nakon vakcinacije protiv IBD i kod istih grupa (G3 i G4) i nevakcinisane kontrole (G5/A) posle veštačke infekcije, dok to smanjenje nije registrovano kod grupa sa vHVT13, mereno 14, 21. 28. i 35.dana oglada. Iste grupe G1 i G2 vakcinisane vHVT13 vakcinom, posle veštačke infekcije imale su značajno smanjenje B/BR odnosa u poređenju sa grupom G5/B (nevakcinisana, neinficirana) ali ne u meri koliko grupe vakcinisane atenuiranim živim vakcinama (G3 i G4). I posle veštačke infekcije vvIBDV svih grupa, statistički je značajno veći prosečan B/BR odnos ($p < 0,01$) grupa G1 i G2 (vHVT13) u poređenju sa grupama G3 i G4 (žive atenuirane vakcine) i grupom G5/A (nevakcinisana a inficirana). Na ovaj način B/BR i B/BI vrednosti ukazuju na oštećenje BF, izazvano vakcinacijama i veštačkom

infekcijom kod grupa G3 i G4 sa živim modifikovanim vakcinama protiv IBD i na postojanje manjih burzalnih oštećenja kod grupa G1 i G2 sa vHVT13 vakcinom nakon veštačke infekcije u našem ogledu.

Naši rezultati se delimično slažu sa ogledom Massi et al. (2008) koji su dokazali da šest dana posle druge vakcinacije živim atenuiranim vakcinama (intermedijarne jačine) a 14 dana nakon vakcinacije intermedijarnom plus vakcinom u uzrastu pilića od 31. dana, nema značajnih razlike B/BR odnosa između grupa (4,06-5,32). Naši nalazi stanja burzi nakon vakcinacija živim atenuiranim vakcinama su suprotni ovim (Tabela 6 i 7, grafikon 3). Smatramo da je interferencija vakcinalnog virusa živih vakcina sa visokim MDA u njihovom ogledu oslabila uticaj i usporila delovanje vakcinalnog virusa, te nisu ustanovili značajne razlike B/BR vrednosti nakon vakcinacija živim atenuiranim vakcinama. Takođe kada je reč o grupi pilića koji su vakcinisani sa IM plus vakcinom, merenje burzi posle vakcinacije u njihovom ogledu usledilo je 14 dana a kod nas svega 8 dana nakon vakcinacija živim atenuiranim vakcinama protiv IBD.

Njihovi rezultati pokazuju da se težina burzi i B/BR odnos dramatično smanjuju u nevakcinisanoj grupi pilića koja je naknadno inficirana i u svim grupama vakcinisanim sa atenuiranim živim vakcinama (1,07-1,19), nakon što su sprovedli veštačku infekciju. Veličina burzi i B/BR odnos nisu se negativno odrazili u grupi nevakcinisana/neinficirana (5,26) dok je manji negativni uticaj utvrđen u grupi pilića vakcinisanih vHVT13 (3,71). Naši rezultati B/BR posle veštačke infekcije su stoga veoma slični sa rezultatima Massi et al. (2008).

Potpunu zaštitu (100% zaštite) od oštećenja BF, posle veštačke infekcije pilića vakcinisanih rekombinantnom vakcinom (vHVT002) objavili su Darteil et al. (1995). Međutim pilići su u njihovom ogledu veštački inficirani 21. dana posle vakcinacije, a infekcija je izvršena u oko, klasičnim sojem IBDV virusa oznake 52/70.

Procenu zaštite, merenjem B/BR odnosa nakon veštačke infekcije brojerskih pilića, poreklom od različito vakcinisanih roditelja vršili su Lemiere et al. (2013). Njihovo istraživanje pokazuje prednost vakcinacije roditelja vHVT vakcinom za njihove potomke. Nepotpunu zaštitu od veštačke infekcije vvIBD merenu B/BR odnosom utvrdili su od 7. dana posle veštačke infekcije između grupa inficiranih i ne inficiranih potomaka poreklom od roditelja vakcinisanih samo inaktivisanom IBD vakcinom. Te razlike nema kod veštački inficiranih i neinficiranih pilića, poreklom od roditelja koji su vakcinisani vHVT vakcinom u toku odgoja.

Analizom prosečnih vrednosti B/BR odnosa 70. dana, na kraju eksperimenta ustanovljeno je da je eksperimentalna grupa G5 (kontrolna) imala najveće vrednosti ($4,76 \pm 0,35$) što je statistički značajno viša vrednost od prosečne vrednosti eksperimentalnih grupa G2, G3, i G4 ($p < 0,01$). Eksperimentalna grupa G1 sa prosečnom vrednošću B/BR odnosa $4,65 \pm 0,51$ statistički je takođe signifikantno veća ($p < 0,01$) od B/BR odnosa za grupe G2, G3, i G4. Između G1 (vHVT13, s/c) i G5 (kontrolne) gotovo da nema razlike (Tabela 10 i 11, grafikon 5, slika 6). Na kraju ogleđa prema proceni na osnovu B/BR vrednosti najbolje rezultate daje subkutana primena vHVT13 vakcine kod pilića nosilja, u poređenju sa živim atenuiranim vakcinama i i/m aplikovanoj vHVT13 vakcini. Naši nalazi se slažu sa rezultatima Prandini (2012), Rautenschlein et. al. (2013), Prandini et. al. (2016), koji su takođe vršili poređenje efekata vakcinacija vektorskom vHVT13 i živim atenuiranim IBD vakcinama. Post mortalnim pregledom žrtvovanih pilića na kraju ogleđa ustanovili su signifikantno veći B/BR odnos u grupi pilića koja je vakcinisana vektor vakcinom u odnosu na grupe vakcinisane živim vakcinama.

Takođe smo računali i indeks burze (B/BI) radi poređenja, jer su neki autori oštećenja burze izražavali burzalnim indeksom B/BI (Rania et al., 2012), a i radi utvrđivanja kada je nastupila burzalna atrofija. Na ogleđu Rania et al. (2012) posle veštačke infekcije pilića vvIBDV, vakcinisanih vHVT vakcinama, B/BI (indeks burze) se kretao od 0,9 do 1,3 što je dobro jer sve vrednosti preko 0,7 pokazuju da na burzama nisu nastale histološke promene nakon veštačke infekcije. U našem ogleđu posle vakcinacija u grupama vakcinisanih sa vHVT 13 vakcinom B/BI indeks se kretao od 0,82 do 1,18 dok je kod grupa sa atenuiranim živim vakcinama ustanovljena atrofija BF (0,59 i 0,31), nakon veštačke infekcije grupe G1 i G2 su imale B/BI oko granice atrofije 0,66 i 0,77 dok su grupe pilića sa živim atenuiranim vakcinama G3 i G4 i G5/A (ne vakcinisana, veštački inficirana) imale B/BI indekse 0,29, 0,23, i 0,13 što predstavlja totalnu atrofiju BF (Tabela 12).



Rezultati ELISA testiranja na IBD, krvnih seruma pilića prikazani su u tabelama 13 i 14. Istovremeno su korišćena dva ELISA kita za detekciju IBDV antitela. ProFlok IBD Ab test kit („klasičan“ IBD test) i ProFlok Plus IBD Ab test kit („unapređeni“ IBD plus test). Prag pozitivnosti za klasičan test je postavljen na jedinici titra od 554 a za unapređeni test 1002 jedinice titra.

Utvdili smo smanjenje (prirodna eliminacija) maternalnih antitela od početnog nivoa 9477 (MDA meren klasičnim IBD testom) kod svih grupa u našem ogledu do četvrte nedelje uzrasta pilića. Posle upotrebe atenuiranih živih vakcina u grupama G3 i G4, pete nedelje pa na dalje beležimo stvaranje aktivnog imunskog odgovora od 1160 do 5515 za grupu G3 (im. vakcina) a za grupu G4 (im. plus vakcina) od 2352 do 6517 jedinice titra (Tabela 13, grafikon 6). U isto vreme utvdili smo da je serološki odgovor antitela meren klasičnim IBD ELISA testom bio nizak kod grupe G1 i grupe G2 vakcinisane vHVT13 vakcinom, naročito od 21. do 48.dana (Tabela 13, grafikon 6) a relativno visok u grupama G3 i G4 (naročito posle 5.nedelje ogleđa) koje su vakcinisane živim atenuiranim vakcinama. Kada su grupe pilića G1 i G2 imale najniže prosečne titrove antitela na IBD 825, 498 i 254 jedinice titra za G1, 21.,28. i 35. dana ogleđa redom navođenja a grupa G2 659, 430 i 275 redom navođenja, istovremenim testiranjem krvnih seruma pilića, unapređenim ELISA IBD Plus testom, 21., 28. i 35. dana ogleđa prosečan titar za grupu G1 je iznosio 6831, 6001 i 8154 respektivno a za grupu G2, 5097, 6647 i 8204 (Tabela 14, grafikon 7). Naše paralelno merenje nivoa antitela sa oba kit kompleta pokazuje da klasičan ELISA IBD test nije u mogućnosti da u dovoljnoj meri utvrdi prisustvo antitela sintetisanih nakon vakcinacije pilića sa rekombinantnom vHVT13 vakcinom. Isti rezultat ne detektovanja anti VP2 antitela nakon vakcinacije pilića nosilja vHVT13 vakcinom, merenih klasičnim ELISA testom objavili su Prandini et al. (2008) i Massi et al. (2008). Razlika u nivoima se objašnjava prirodnom antigena koji se koristi za detekciju antitela. Klasičan IBD ELISA test koristi antigen klasičnog porekla odgajen i oslabljen na kulturi tkiva a IBD Plus ELISA test koristi izvorni burzalni virus, umnožen i prečišćen iz inficirane BF (Le Gros, 2009). S obzirom da se adaptacijom na kulturi tkiva može promeniti antigenost VP2 proteina, novi ELISA, ProFlok Plus IBD Ab test je razvijen tako što su ELISA ploče obložene prirodnim IBD virusnim antigenom poreklom iz BF. Ovaj poboljšani test je osetljiviji od klasičnog testa i u visokoj korelaciji sa VN testom (Vakharia et al., 2000).

Dobra serokonverzija antitela na IBD koju smo utvdili kod grupa pilića (G3 i G4) vakcinisanih živim atenuiranim vakcinama posle 28 dana ogleđa klasičnim ELISA testom (Tabela 13), nije utvrđena (nedostatak imunskog odgovora do 42. dana kada je vršena veš. infekcija) na sličnim ogleđima Prandini et al. (2008); Massi et al. (2008) iz razloga što su oni živim atenuiranim vakcinama sproveli vakcinaciju 17. i 25. dana ogleđa kada je još uvek titar maternalnih antitela bio vrlo visok (17.dana je iznosio 1300, klasičnim testom), što je mnogo više od 500 koji modifikovana vakcina može da

probije (break through titar). Tako visok nivo antitela, kada su sproveli vakcinaciju, ometao je stvaranje imunskog odgovora pilića vakcinisanih živim atenuiranim vakcinama. Zbog navedenih smetnji mi smo u ogledu atenuirane žive vakcine koristili u optimalnom vremenu vakcinacije, kada je maternalni titar dovoljno opao i samim tim nije ometao stvaranje imunskog odgovora, a to je bilo 28. dana za grupu G3 a 26. dana za grupu G4. Vakcinacija u optimalno vreme je bila neophodna radi objektivnog poređenja efekata primene vHVT13 i živih atenuiranih vakcina, kao što su Rautenschlein et. al. (2013), upoređivali efekte vHVT13 vakcina sa efektima živih vakcinana na imunski odgovor, takođe izbegavajući njihovu interferencu sa MDA.

Prisustvo maternalnih antitela (MDA) IBDV kod mladih pilića predstavlja veliki problem zbog interferencije sa klasičnim atenuiranim IBD vakcinama, odnosno dolazi do ometanja njihovog dejstva. Zbog toga u prisustvu MDA određivanje vremena aktivne imunizacije sa klasičnim vakcinama ostaje komplikovano. S obzirom na varijabilnost pojedinačnih titrova, čak i procena optimalnog vremena vakcinacije po Deventer formuli definitivno ne rešava ovaj problem. U ogledu Massi et al. (2008) kada se pilići prerano vakcinišu sa živim atenuiranim vakcinama, ELISA rezultati pokazivali su nedostatak odgovora antitela odnosno nedovoljan imunski odgovor posmatran od 31. dana do sprovedene veštačke infekcije 42.dana.

Studije koje su sproveli Block et al.(2007) na nekoliko brojerskih jata koja su imala maternalna antitela, pokazale su da su pilići vakcinisani intermedijarnim sojem vakcine protiv IBD, više od jednog dana pre izračunate optimalne vakcinacije, stvarali humoralni imunski odgovor kasnije ili se imunski odgovor nije detektovao do klanja pilića.

Pregled krvnih seruma pilića grupa G3 i G4 vakcinisanih živim atenuiranim vakcinama pokazuje pad titra antitela ispod zaštitnog nivoa u četvrtoj nedelji ogleda. Nakon pada titra maternalnih antitela, pilići koji nisu reagovali na vakcinaciju postaju osetljivi na IBDV infekciju. I pored vakcinacije obavljene u optimalnom vremenu naši rezultati ilustruju više ili manje imunski jaz posmatran u grupama vakcinisanih sa živim atenuiranim vakcinama krajem treće i tokom četvrte nedelje meren klasičnim ELISA testom, kada je nivo antitela opao ispod 843 sve do 317 jedinice titra (Tabela 13, grafikon 6). I pored dobrog tajminga vakcinacije živim atenuiranim vakcinama imunski jaz u našem ogledu postoji 4. nedelje, a tamo gde je loš tajming dešava se i od 3. do 5 nedelje. Prandini et al. (2008) i Massi et al.(2008) su izvestili da je kod njih jaz počinjao od druge nedelje, već napomenuto zbog prevremene vakcinacije.

Za utvrđivanje nivoa antitela protiv IBD nakon vakcinacije rekombinantnom vektor vHVT13 vakcinom u grupama G1 i G2 neophodan je unapređeni ELISA IBD plus test. Takođe IBD plus test detektuje antitela sintetisana imunizacijom pilića živim atenuiranim vakcinama (G3 i G4) i antitela izazvana infekcijom divljim IBD virusom. Zaštita od infekcije vHVT13 virusom je postavljena na titar antitela oko 3000 jedinica (Le Gros et al., 2009). IBD Plus testom 28 dana našeg ogleada u grupama vakcinisanim živim atenuiranim vakcinama, registrovan je „kritičan“ ELISA titar antitela. Za grupu G3 prosečan titar antitela je iznosio 2644 (niži nego što je preporučeno) a za grupu G4 3247 (malo viši nego što je preporučeno). Kao što je pokazao i klasičan IBD test u istom terminu sa titrovima nižim od zaštitnih za grupe G3 i G4 (titar antitela 317).

Nasuprot utvrđenom postojanju imunskog jaza nakon primene živih modifikovanih vakcina protiv IBD, koristeći poboljšani IBD Plus ELISA test, aktivan i jaki anti VP2 imunski odgovor kod grupa pilića G1 i G2 sa vHVT13 vakcinom, je utvrđen od treće nedelje ogleada, i iznosio je 6831 i 5097 jedinice titra, redom navođenja (tabela 14, grafikon 7). Visok nivo humoralnog imunskog odgovora grupa G1 i G2, pokazao je da je bio u korelaciji sa zaštitom od veštačke infekcije. Rezultati našeg ispitivanja koji se odnose na nivoe antitela nakon primene vektorske vHVT13 vakcine kod pilića, se slažu sa istraživanjima Massi et al. (2008) koji navode da su nakon primene vHVT utvrdili više titrove od 6000 jedinica, i uvek više od 4000 jedinice titra od 21 do 56 dana a kasnije tokom njihovog ogleada i više (Prandini, 2008; Le Gros, 2009). Nije se stvorila praznina u zaštiti protiv IBD grupa G1 i G2 u našem ogleadu (imunskog jaza nema u grupama vakcinisanih vHVT13 vakcinom). Stoga vakcinacijom pilića vHVT vakcinom protiv IBD, izbegavamo imunski jaz, koji je najčešće između treće i pete nedelje uzrasta pilića, a to je i najkritičniji period za infekciju divljim IBD virusom jer je to vreme najintenzivnijeg razvoja BF i tada se bolest najčešće klinički manifestuje (Resanović, 2015). Ovaj raniji imunski odgovor može da se dobije jer na efikasnost vHVT vakcina ne utiče prisustvo visokih nivoa MDA (Le Gros et al., 2009; Zorman Rojs et al., 2011), i njihova upotreba može biti bilo in „ovo“ ili 1. dana u inkubatoru. Primenom rekombinantnih vakcina uklanjamo pitanje optimalnog vremena vakcinacije sa atenuiranim živim vakcinama (Bublöt et al., 2007).

Nakon veštačke infekcije, klasičnim ELISA IBD testom utvrdili smo brzu serokonverziju antitela na IBD kod svih grupa pilića, izuzev grupa vakcinisanih vHVT13 vakcinom sa utvrđenim sporijim porastom antitela. Jedanaest dana nakon veštačke infekcije (Tabela 13, grafikon 8) detektovali smo najviši porast prosečnog

titra antitela, upotrebom klasičnog ELISA testa, od 8828 u grupi pilića izdvojenih iz grupe G5 (nevakcinisana, veštački inficirana), zatim sledi grupa G3 (im vakcina) sa prosečnim titrom 8312 pa zatim grupa G4 (im plus), prosečni titar 7087 i najmanji porast titra u grupama G1 i G2 (vHVT13) 3247, 3513 redom navođenja. Brzu serokonverziju posle veštačke infekcije, sa oba ELISA testa u svim grupama pilića, osim grupe pilića vakcinisane vHVT13 koja je bila samo malo uvećana, takođe su objavili Prandini et al. (2008). Vrlo velika sličnost naših rezultata je sa nalazima serokonverzije posle veštačke infekcije pilića koju su Massi et al. (2008) sprovedi nešto ranije nego mi, 42. dana ogleada, merena takođe 11 dana nakon infekcije. Klasičnim ELISA testom prvo se registruje porast nevakcinisane a inficirane grupe pilića na oko 7600, zatim dve grupe pilića sa različitim intermedijarnim vakcinama na oko 7100, potom intermedijarna plus grupa oko 6100 i grupa pilića vakcinisana vHVT vakcinom oko 2100 jedinice titra. Sa IBD plus testom 53. dana njihovog ogleada nivo specifičnih antitela grupa pilića sa vHVT vakcinom relativno miruje sa blagim povećanjem na oko 7000, ostale od 1800 do 2500 imaju porast na oko 7000 jedinice titra a nevakcinisana inficirana grupa prelazi nivo 7000 jedinice titra. Nakon veštačke infekcije mi smo u ogleadu detektovali brzu serokonverziju klasičnim IBD testom, a o rapidnoj serokonverziji koju su detektovali sa oba ELISA testa, klasičnim i unapređenim testom izvestili su Massi et al. (2008). Nagli porast titra antitela nakon veštačke infekcije nevakcinisane grupe je očekivan zbog njihove potpune osetljivosti na infekciju. Nešto viši nivo serokonverzije (nakon veštačke infekcije) pilića vakcinisanih intermedijarnom u odnosu na piliće vakcinisane intermedijarnom plus vakcinom govori nam o većoj imunogenosti i sposobnosti im plus vakcina u zaštiti protiv IBD. Serokonverzija nakon infekcije se razvija i kod vHVT vakcinisanih pilića iako klasičan IBD test pre veštačke infekcije nije u dovoljnoj meri detektovao anti VP2 antitela. Nakon infekcije titar antitela je iznosio oko 3000 jedinice, kao odgovor na aktivost vv IBD virusa ali i dalje je to veoma niža vrednost serokonverzije nego kod ostalih grupa. Međutim odlična serokonverzija vHVT grupe, postignuta je 48. ogleada (pre veštačke infekcije) od 11447 jedinice titra, utvrđena merenjem unapređenim ELISA testom. Prema Prandini et al. (2008) i Massi et al. (2008) grupa pilića sa vHVT vakcinom relativno miruje sa blagim povećanjem titra nakon infekcije ukoliko se koristi IBD plus test, tako da odlična serokonverzija nakon vakcinacije vHVT13 vakcinama sugeriše njihovu bolju imunogenost, odnosno anti VP2 antitela izazvana vHVT13 vakcinom su zaštitna i

protiv vv IBD virusa i sprečavaju pojavu kliničkih simptoma bolesti, a samim tim i reakcija antitela u vidu serokonverzije je manja kod vHVT vakcinisanih grupa pilića.

Koristeći rezultate nalaza titra specifičnih antitela protiv IBDV-a, dobijenih ELISA IBD plus testom, vršili smo poređenja o uspešnosti vakcinacije i visini serokonverzije po grupama pilića vakcinisanih različitim vrstama vakcine. Za statističku obradu uzeti su rezultati svih termina uzorkovanja, osim prvog dana. Analizirajući prosečne vrednosti ustanovili smo da je grupa G1 imala najveću prosečnu vrednost titra antitela (9033 ± 2494), a ova vrednost je signifikantno veća od vrednosti titra grupa G3, G4 i G5 ($p < 0.01$). Značajna razlika između grupe G1 i grupe G2 (8353 ± 2395) nije ustanovljena. Samim tim je kod grupe G2 ustanovljen signifikantno veći titar ($p < 0.01$) u odnosu na G3, G4 i G5. Između grupa G3 (5988 ± 2414) i G4 (6534 ± 2456) ustanovljena je značajna razlika ($p < 0.05$). U našem eksperimentu, merenjem IBD Plus testom vrlo značajne razlike u visini titrova antitela su zabeležene u svim intervalima ogleada (14., 21., 28., 35., 48 i 70. dan) između grupa pilića vakcinisanih vHVT13 vakcinom (G1 i G2) i grupa vakcinisanih živim atenuiranim vakcinama (G3 i G4). Poredeći dve žive atenuirane vakcine protiv IBD (G3 i G4), značajno viši nivo titra antitela je utvđen u grupi G4 (im plus vakcina) (Tabela 14 i 15, grafikon 7 i 9). Razlike u visini prosečnih titrova antitela nakon pojave aktivnog imunskog odgovora kod grupa sa živim modifikovanim vakcinama (od 35. dana ogleada) kreću se od 2000 do 3000 jedinice titra, pa i više, za koliko su u stvari u našem ogledu rekombinantne vektor vHVT13 vakcine pokazale veću imunogenost u odnosu na žive atenuirane vakcine protiv IBD (Tabela 14, grafikon 7). Slične rezultate kada je reč o boljoj imunogenosti vHVT u odnosu na atenuirane žive vakcine iznose (Prandini et al., 2008; Massi et al., 2008; Lemiere et al., 2013). Lemiere et al. (2013) vršili su serološki monitoring pilića od roditelja različito vakcinisanih protiv IBD. Prvu grupu pilića su vakcinisali vektorskom vHVT, drugu vektor vHVT i inaktivisanom i treću grupu samo inaktivisanom vakcinom protiv IBD. Tokom toga pilića IBD plus testom pratili su kinetiku smanjenja antitela. Značajna razlika srednjih vrednosti titara je zabeležena između prve i treće i druge i treće grupe u svim intervalima merenja. Nema značajne razlike između prve i druge grupe, odnosno između pilića poreklom od roditelja koji su najmanje jednom primili vHVT vakcinu protiv IBD prvog dana odgoja. Kod pilića poreklom od roditelja vakcinisanih vektor vHVT13 vakcinom utvrđen je viši titar antitela na IBD sa sporijom kinetikom smanjenja antitela.

Može se reći da se naše poređenje o uspešnosti raličitih IBD vakcina mereno kroz dostignuti nivo antitela, poklapa sa istraživanjima koja ukazuju da su vHVT vektor vakcine imunogenije od atenuiranih živih vakcina (Bublott et al., 2007; Le Gros et al., 2009).

Serološki monitoring jata IBD plus ELISA testom i korišćenje novih smernica za tumačenje rezultata je vrlo koristan za procenu efikasnosti vakcinacije kao i dužine perzistencije antitela, posle vakcinacije vHVT vakcinama. Naši rezultati pokazuju da su prosečni titrovi antitela bili uvek viši od 5000 jedinica. Najniži u trećoj nedelji 5097 u grupi G2 i u četvrtoj nedelji 6001 jedinice titra u grupi G1. Najviši prosečan nivo titra antitela utvrđen je krajem sedme nedelje oglada i iznosio je 11447. Visok nivo titra antitela održao se do 10. nedelje i kraja eksperimenta, kada je iznosio 11283 u grupi G1 i 10970 jedinice titra u grupi G2 (tabela 14, grafikon 7). Koeficijenti varijacije grupa vakcinisanih vHVT 13 vakcinom su bili obično ispod 30% (od 4 do 34%), što ukazuje na homogen i uniforman imunski odgovor. Testiranjem svih seruma pilića vakcinisanih vHVT13 vakcinom nismo registrovali jedinice koje nisu reagovala na vakcinaciju a stopu registrovanih jedinki (na 1100 ptica) koje su bez odgovora na vakcinaciju od 0,4% ptica utvrdili su Prandini et al. (2008).

Visina titra antitela od 11447 u 7 nedelji našeg oglada, što je $4,05 \log_{10}$ je identičan rezultatu Tsukamoto et al. (2002) i Rania et al. (2012) koji su izneli da je kod SPF pilića vHVT vakcina izazvala visok titar $4 \log_{10}$, sa dugotrajnim platoon oko 6. nedelje uzrasta pilića. Pomenuto je da je kod nas najviši titar antitela dostignut u 7 nedelji 11447 jedinice a da je u vrhu ostao do 10 nedelje oglada. Rania et al. (2012) su izvestili da zbog ćelijske prirode vektor vakcine (HVT virus je vezan za ćeliju), ona omogućava dugotrajnu zaštitu, duže od 9 meseci prema njihovom eksperimentu. Tsukamoto et al. (2002) dalje izveštavaju da imunski odgovor na VP2-IBD antigen raste za 16 nedelja kod pilića posle vakcinacije sa vHVT. Kao razlog navode akumuliranje VP2 antigena u citoplazmi iz koje vrši kontinuirani podražaj imunskog sistema pilića. Naš ogled je trajao kraće i u okviru tog perioda postignut je visok zaštitni titar antitela koji je trajao tokom celog oglada što se slaže sa rezultatom Rania et al. (2012) koji su najviši ELISA titar utvrdili 4 nedelje posle vakcinacije, a posle se titar postepeno smanjivao do kraja eksperimenta, ali unutar zaštitnog nivoa. Najviši SN titar je dobijen u trećoj nedelji posle vakcinacije i ostao je u vrhu do 9. nedelje posle vakcinacije i onda je titar postepeno opadao. Može se reći da se naši rezultati serokonverzije podudaraju sa istraživanjima koja ukazuju da je dobra vakcinacija sa

vHVT vektor vakcinom uvek praćena odličnom serokonverzijom (Bublöt et al., 2007) i da se serokonverzija može registrovati 6 nedelja posle vakcinacije kod brojlera (Ismail and Saif, 1991; Bublöt et al., 2007; Le Gros et al., 2009).

Sa kombinovanom upotrebom oba IBD ELISA testa bolje se vrši monitoring i razlikovanje između vHVT izazvanih antitela (anti VP2 koja se samo detektuju IBD Plus testom) i IBDV infekcijom indukovanim antitelima (uključujući i anti VP3 koja se detektuju klasičnim IBD testom). Visoki titrovi antitela su detektovani kod IBDV zaraženih pilića ili pilića koji su vakcinisani živim atenuiranim vakcinama, koristeći oba testa. Nasuprot pilići vakcinisani vHVT vakcinama su imali visoke titrove antitela sa IBD Plus ELISA testom i niske titre sa klasičnim IBD testom (Prandini et al., 2008; Massi et al., 2008). Naš ogled i ogledi drugih autora jasno su pokazali da se kombinovanom upotrebom oba IBD ELISA testa jednostavno pravi razlika između pilića vakcinisanih vektorskom vHVT13 i živim atenuiranim vakcinama. Međutim kada je u pitanju razlikovanje titra antitela od pilića vakcinisanih živim atenuiranim vakcinama i pilića posle prirodne ili veštačke infekcije sa vvIBD virusom razlika u serokonverziji se utvrđuje tako što se posmatra porast titra antitela klasičnim IBD testom (naš ogled), koji bi kod vektorskih vHVT13 bio nizak, a posle infekcije u toj grupi on raste ali svakako mnogo manje nego kod pilića vakcinisanih živim vakcinama koji su nakon toga inficirani ili kod inficiranih pilića.

Uporednom analizom sa unapređenim IBD plus testom nivo specifičnih antitela pilića sa vHVT13 vakcinom (koji je već vrlo visok), nakon infekcije relativno miruje sa blagim povećanjem. Pilići vakcinisani živim vakcinama pre infekcije, imaju značajno niži titar od vHVT vakcinisanih IBD plus testom i oni će nakon infekcije gotovo dostići njihov nivo, dok će nevakcinisani a inficirani sa serokonverzijom prebaciti nivo vHVT vakcinisanih pilića (Massi et al., 2008).

Međutim ima i mišljenja da to nije potpuno precizno i dovoljno i da sadašnji IBD testovi ne dozvoljavaju diferencijaciju između zaraženih pilića i pilića vakcinisanih sa atenuiranim živim vakcinama. To je problem, posebno kada se posmatraju lezije na burzi. Za razliku od vektorskih vHVT, klasične atenuirane vaccine čak i intermedijarni sojevi, takođe mogu izazvati burzalne lezije, i jedini način da se napravi razlika vakcinisanih od zaraženih pilića je da se amplifikuju i sekvenciraju delovi RNA soja virusa IBD odgovornog za oštećenja BF (Block et al., 2007; Bublöt et al., 2007).

Rezultati mnogih studija ukazuju na sposobnost vHVT vakcina da izazovu imunski odgovor pilića sa visokim nivoima MDA (Le Gros et al., 2009; Zorman Rojs et al., 2011). Međutim pilići vakcinisani atenuiranim živim vakcinama i odgovor antitela u tom uzrastu, pokazuju da intermedijarne vakcine nemaju sposobnost da prevaziđu MDA. S druge strane, IBD atenuirane vakcine mogu da (interferiraju sa ostalim vakcinacijama) ometaju druge vakcine (Mazariegos et al., 1999).

Radi ispitivanja uticaja vHVT vakcina protiv IBD na serokonverziju i uspešnost drugih atenuiranih vakcina koje se koriste za zaštitu od značajnih bolesti, 70. dana na kraju eksperimenta izvršili smo kontrolu imunskog odgovora na ND i IB živine kod svih grupa (Tabele 16,17,18,19; Grafikoni 10 i 11). Prosečne vrednosti za HI test grupa G1,G2,G3,G4 i G5 su recipročne vrednosti 115,2; 73,6; 121,6; 118,4 i 112 redom navođenja ili 4,75; 4,30; 4,80; 4,78 i 4,72 log 2, redom navođenja. Nisu ustanovljene značajne razlike između prosečnih vrednosti HI titra antitela na ND ($p > 0,05$). Kod svih grupa zabeleženo je visoko variranje u HI titrima koje je nastalo verovatno zbog toga što su do kraja našeg oglada bile sprovedene tri vakcinacije atenuiranim živim vakcinama protiv ND, bez buster uljne inaktivisane vakcine koja bi stabilizovala imunski odgovor i prikazala ga sa manjim varijacijama. Idući rezultat našem, prezentuju Hesham Sultan et al. (2012), koji takođe razmatraju uticaj IBDV vakcina na serološki odgovor protiv drugih bolesti, prikazujući rezultate na ND i AI. Nisu ustanovili značajne razlike u HI titrovima antitela za AI i ND kod pilića u dve različito vakcinisane farme 35. dana starosti pilića. HI titrovi antitela na ND iznosili su 4,6 log₂ i 4,3 log₂ za piliće na farmama A i B, redom navođenja, farma A sa rHVT, a farma B sa intermedijarnom i intermedijarnom plus vakcinom. Oglad pokazuje da rHVT vektor vakcina ne interferira sa živim vakcinama protiv ND i AI, što su takođe ranije ustanovili Bublot et al. (2007).

Prosečni titrovi antitela na IB utvrđeni ELISA testom kod pilića koji su prethodno vakcinisani Masachussets sojem i varijantnim IB virusima, utvrđeni na kraju oglada iznosili su za grupe G1,G2,G3,G4 i G5: 4543,7; 4261,1; 4078,7; 3647,3 i 4866,2, redom navođenja. Samo je između grupa G5 (kontrolna grupa) i G4 (im plus) ustanovljena značajna razlika prosečnih titrova na IB ($p > 0,05$), u korist kontrolne grupe pilića (Tabela 18 i 19, grafikon 11). Moguće je da je intermedijarna plus Nobilis 228E vakcina protiv IBD kojom su vakcinisani pilići iz grupe G4 proizvela kratku i prolaznu imunosupresiju koja se reflektovala na titar antitela na IBV ili ELISA metod kojim su utvrđivana antitela na IBV nije dao najpreciznije podatke o aktuelnoj zaštiti protiv IBV.

Mišljenje temeljimo na saznanjima Rautenschlein et Haase (2005), da je oporavak oštećene BF sporiji zbog većeg priliva (nakupljanja) aktiviranih T ćelija koje imaju negativan uticaj na oporavak burzalnih folikula. I da destrukcija Fabricijusove burze (što se drastično desilo u grupi G4) može nepovoljno uticati na rezultat vakcinacije protiv infektivnog bronhitisa (Sundick et al., 1973).

Da imunosupresivni efekat intermedijarnih plus vakcina može da utiče na zaštitu živim vakcinama protiv drugih bolesti utvrdili su Rautenschlein et al. (2011) posle primene vHVT i imuno-kompleks vakcine (koja sadrži intermedijarni plus soj IBD) in ovo vakcinacijom pilića. Pilići iz grupe koja je vakcinisana sa imuno-kompleks vakcinom, a koji su vakcinisani protiv ND 15. dana posle izvođenja, u vreme kada IBD vakcinalni virus izaziva lezije na BF (jasno objašnjeno histološkim ispitivanjima od 12. dana a B/BR odnosom od 21.dana), imali su niži titar antitela na ND u odnosu na grupu pilića vakcinisanu vHVT vakcinom.

Ova studija pokazuje da imuno-kompleks vakcine vrše blagu imunosupresiju odgovora antitela nakon ND vakcinacije, a da vHVT vakcina ne stvara vidljive efekte (nisu utvrđeni efekti) na imunski odgovor protiv ND što je utvrđeno i u našem ogledu.

U našim istraživanjima je pokazano da vHVT13 vakcine nisu imunosupresivne, a na osnovu imenskog odgovora na ND i IB, premda nismo ustanovili ni bolju serokonverziju vHVT13 vakcinisanih grupa pilića protiv drugih bolesti. Rezultati imenskog odgovora na ND i IB nakon primene vHVT13 vakcine u našem ogledu, slažu se sa ispitivanjima Bublot et al. (2007) i Rania et al. (2012), čija su eksperimentalna ispitivanja pokazala da vHVT vakcina nije ometala imunski odgovor posle vakcinacije klasičnim ND ili IB vakcinama. Takođe, Darteil et al. (1995) i Pitcovski et al. (2003) su dokazali da čak i aplikacija trostruke doze vakcine vHVT (rVP2 antigen) kod ptica ne ometa sintezu antitela nakon vakcinacije protiv atipične kuge živine ili infektivnog bronhitisa klasičnim živim vakcinama u daljem toku odgoja.

Drugačije rezultate od naših, odnosno bolju serokonverziju na druge klasične vakcine protiv značajnih bolesti pilića vakcinisanih vHVT13 vakcinom, prikazuju Prandini (2012) i Rautenschlein et al. (2013). Viši titar antitela su utvrdili protiv ND, IB i EDS u grupi pilića vakcinisanih vHVT vakcinom u poređenju sa grupama vakcinisanim im i im plus IBD vakcinom, ukazujući na oštećenja B ćelija kod pilića vakcinisanih sa živim atenuiranim vakcinama. Treba reći da su naši vakcinalni programi bili dosta različiti. Pre svega autori su 42. dana ogleda koristili buster uljnu inaktivisanu polivalentnu vakcinu. A takođe zaštita protiv IB varijantnim sojem je bila

znatno ranije obavljena nego kod nas. Mi smo zaštitu drugim atenuiranim vakcinama u vreme oglada uradili u skladu sa našom terenskom praksom gde se tako rano ne praktikuje primena inaktivisane vakcine. U međuvremenu takođe primenjujemo raniju zaštitu varijantnim IB vakcinama kod pilića.

Potpuno drugačije Ashash et al. (2013), prezentuju da su pilići vakcinisani sa klasičnim živim vakcinama stekli raniju i bolju zaštitu protiv vvIBD nego pilići vakcinisani sa vHVT i imuno-kompleks vakcinama. Oni zaključuju da zaštita sa klasičnim živim atenuiranim IBD vakcinama obezbeđuje da nema negativnog efekta na imunski odgovor nakon vakcinacije ND vakcinama, što je rezultat i našeg oglada. Autori postavljaju pitanje da li uopšte neka vakcina zbog diversifikacije virulencije IBDV može da zaštiti protiv vvIBD, IBDV i varijantnih sojeva.



Protočna citometrija (eng. flow cytometry) manje se primenjuje kod živine nego kod ljudi, i više se fokusira na karakterizaciju ćelija u BF, timusu i slezini kod pilića, premda ima nekoliko studija sa imunofenotipizacijom periferne krvi kod pilića (Czekaj et al., 2005; Bohls et al., 2006; Fair et al., 2008).

O efektima vakcina protiv IBD na cirkulišuće B i T ćelijske populacije, citometrijskim analizama perifernih krvnih leukocita izveštavali su Corley and Giambrone (2002) i Rautenschlein et al. (2011). Rautenschlein et al. (2011) su posle *in ovo* primene vHVT i imuno-kompleks vakcine, utvrdili da imuno-kompleks indukuje značajnu redukciju broja cirkulišućih B ćelija od 21. dana posle izvođenja. Imuno-kompleks vakcine pogađaju humoralni imunski sistem, smanjujući cirkulišuće i intraburzalne B ćelije (Bu-1 pozitivne B ćelije). I pored toga što se vHVT vakcina detektuje ne samo u slezini već i u BF (PCR) ona ne stvara vidljive (ne detektovani) efekte na T ili B ćelijske populacije limfocita.

Prandini (2012), Rautenschlein et al. (2013) i Prandini et al. (2016) su dokazali da žive modifikovane vakcine smanjuju broj cirkulišućih B limfocita (brojanje vršeno 42. dana starosti pilića) u poređenju sa rekombinantnom vektor vHVT13 vakcinom. Dve nedelje posle vakcinacije grupe pilića, modifikovanim živim IBD vakcinama (intermedijarna i intermedijarna plus), analiza protočnom citometrijom pokazala je značajno smanjenje procenta cirkulišućih B ćelija u poređenju sa grupom pilića koja je vakcinisana vektor vHVT13 vakcinom i kontrolnom grupom.

Do sada su radi detekcije B cirkulišućih limfocita uglavnom korišćena obojena IgM⁺ i Bu-1b obeležena monoklonska antitela (mAb) za površinske receptore (markere)

IgM B limfocita, iz čijih plazma ćelija nastaju imunoglobulini M klase (IgM). Imunoglobulini M klase su primarna, kratkotrajna antitela koje proizvode B ćelije i koja se stvaraju kao odgovor na početku ekspozicije antigena. Mi smo ispitivali nivoe imunoglobulina Y (H+L) (IgY), 48. dana ogleđa, 20 dana nakon primene živih vakcina (tabela 20, grafikon 12) i 59. dana ogleđa, 11 dana nakon veštačke infekcije (tabela 21, grafikon 13). IgY su najbrojniji kod ptica, nalaze se u krvi i žumancetu i po funkciji i strukturi su najbliži imunoglobulinima G (IgG) i imunoglobulinima E (IgE) kod sisara. Koristili smo Rabbit (Isotype) anti-Chicken IgY(H+L) sekundarna poliklonska antitela obojena fluorescein isothiocyanatom (FITC), prikazano kao zelena fluorescencija na dijagramima i histogramima (Prikaz 1. a,b,c,d,e,f,g, tačkasti plot, histogram i Prikaz 2. a,b i c). u odeljku metode.

Četrdesetmog dana ogleđa nije utvrđena statistička razlika ($p > 0,05$) u nivoima IgY B ćelija između grupa vakcinisanih vektor vakcinama (G1 i G2), grupa vakcinisanih živim atenuiranim vakcinama (G3 i G4) i kontrolne grupe (G5). Prosečne vrednosti procenata IgY B pozitivnih ćelija u ispitivanim eksperimentalnim grupama bile su ujednačene bez velikog variranja i kretale se od 90,57 do 91,96 % IgY. Pedesetdevetog (59.) dana ogleđa takođe nije utvrđena statistička razlika ($p > 0,05$) u nivoima IgY B ćelija između grupa vakcinisanih vektor vakcinama (G1 i G2), grupa vakcinisanih živim atenuiranim vakcinama (G3 i G4) i kontrolne grupe (G5). Prosečne vrednosti procenata IgY B pozitivnih ćelija u ispitivanim eksperimentalnim grupama bile su ujednačene bez velikog variranja i kretale se od 92,56 do 94,96 % IgY. Visok procenat imunoglobulina Y klase pokazuje da su to najbrojnija antitela u krvi pilića, da nastaju kasnije za razliku od imunoglobulina M koji predstavljaju primarna antitela i brže nestaju iz cirkulacije i da sekundarna poliklonska anti pileća IgY antitela koja su koršćena za analizu obezbeđuju veću osetljivost za vezivanjem imunoglobulina IgY od primarnih monoklonskih antitela.

Za razliku od utvrđenih smanjenja nivoa IgM B cirkulišućih ćelija nakon primene živih atenuiranih vakcina protiv IBVDV (Prandini et al., 2016) i značajne redukcije broja cirkulišućih B ćelija izazvane imuno-kompleks vakcinom u odnosu na vektor vakcine i kontrolnu grupu (Corley and Giambrone, 2002; Rautenschlein et al., 2011), nema smanjenja nivoa IgY nakon vakcinacija niti nakon veštačke infekcije. 59. dana našeg ogleđa (11 dana nakon veštačke infekcije) rezultati protočne citometrije takođe pokazuju da nema statističkih razlika između grupa, u nivoima IgY klase

(Tabela 20 i 21). Procenat IgY pozitivnih ćelija je oko 80% a u odnosu na CD4⁺ od 92,56 do 94,59 %.

Može se reći da se naši rezultati poklapaju sa istraživanjima Hirai et al. (1981) i Petkov et al. (2009) koji navode da pored registrovanog pada broja (dve subpopulacije) IgM B ćelija u BF nakon veštačke infekcije, i obe grupe IgG i IgM B ćelija u slezini, posle veštačke infekcije, nisu uočili pad IgG ćelija u perifernoj cirkulaciji.

Isti autori navode da i pored smanjenja populacija B ćelija u burzi Fabrici posle izlaganja pilića virusom IBD, ne dolazi do smanjenja nivoa ukupnih serumskih imunoglobulina (IgA, IgY i IgM), niti da IBD virus utiče na IgY i IgA B ćelije u slezini pilića. S tim što su merenje nivoa imunoglobulina IgY vršili ELISA testom.

Humoralna imunodepresija i imunosupresija od IBDV (može biti povezana sa lizom antitela proizvedenim od IgM B limfocita) koja je utvrđena i nastaje zbog deplecije pre svega IgM B limfocitnih ćelija u BF (Rodenberg et al., 1994; Kim et al., 2000; Petkov et al., 2009) i smanjenja primarnih antitela produkovanih od IgM B limfocita u perifernoj cirkulaciji (Da Silva Martins et al., 1992; Prandini et al., 2016) i ne odnosi se na serumske imunoglobuline Y klase (Hirai et al., 1981; Petkov et al., 2009). Na nivoe procentualne zastupljenost IgY u perifernoj cirkulaciji 48. dana oglada nisu imale uticaj različite vakcine korišćene protiv IBD. Žive atenuirane vakcine nisu uticale na smanjenje IgY B ćelija u perifernoj cirkulaciji kao što je utvrđeno za IgM B ćelije. Takođe na nivo procentualne zastupljenost IgY u perifernoj cirkulaciji 59. dana oglada nije imala uticaj veštačka infekcija vvIBD virusom kao što je utvrđeno za IgM B ćelije u perifernoj cirkulaciji pilića.

Činjenica da nismo utvrdili smanjenje imunoglobulina IgY u cirkulaciji nakon veštačke infekcije (tabela 20,21) je u skladu sa mišljenjem Resanović (2015) da virus GB dovodi do citolitičke infekcije IgM pozitivnih B limfocita te je samo primarni odgovor antitela (IgM) oštećen dok je sekundarni očuvan (IgY). Smatra se da destrukcija Ig produkujućih B ćelija predstavlja verovatno glavni mehanizam nastanka imunosupresije humoralnog imunskog odgovora.

Limfocitni ćelijski površinski molekuli se rutinski detektuju sa anti-leukocitnim monoklonskim antitelima (mAb). Koristeći različite kombinacije monoklonskih antitela, moguće je profilisati i izvršiti imunofenotipizaciju različitih leukocitnih subpopulacija.

Pileća (*Gallus gallus domesticus*) populacija T limfocitnih ćelija može da se podeli, u podskupove na osnovu ekspresije (izražaja) njihovih proteina na površini

ćelija, kao što su klasteri diferencijacije (CD-cluster of differentiation, ćelijski površinski markeri, antigeni na površini T ćelija, proteinski receptori na površini, biljezi itd). Najzastupljeniji i najviše izučavani CD molekuli su $CD4^+$ i $CD8^+$, koji su markeri za dva različita subtipa T limfocita. Mnoge virusne infekcije indukuju jake odgovore T ćelija (Doherty and Christensen, 2000). Nekoliko vrsta virusa kao što je i HIV kod ljudi, dovodi do uništavanja $CD4^+$ T ćelija. Odnos $CD4^+$ / $CD8^+$ cirkulišućih limfocita je važan za dijagnozu nekih virusnih bolesti kod ljudi (Altfeld and Rosenberg, 2000), važan je i za razumevanje bolesti kod kičmenjaka. Smatra se da su T ćelije takođe kritičan aspekt za istraživanje imunskog sistema i kod ptica (Sitati and Diamond, 2006).

Imuna kompetencija domaćina može da se proceni na osnovu nekoliko parametara, uključujući i određivanje cirkulišućih populacija T limfocita (Dietert et al., 1994). Smatra se da su populacije limfocita periferne krvi pilića određene genetskom kontrolom (Ewald et al., 1996; Zekarias et al., 2002). Postoji nekoliko studija koje su ocenile populacije limfocita u kontekstu pojedinih bolesti. Količina i proporcija T ćelijskih populacija iz periferne krvi ima uticaj na imunokompetenciju i odgovorne su za osetljivost ili rezistenciju na bolesti (Wilson et al., 1992; Yun et al., 2000).

U radu smo u tri vremenska termina ogleda analizirali odnos T helper i T citotoksičnih limfocita iz periferne cirkulacije pilića protočnom citometrijom. Za analizu su korišćena $CD4^+$ monoklonska antitela obeležena FITC konjugatom i $CD8^+$ monoklonska antitela obeležena phycoerythrin (RPE) konjugatom. Upoređivali smo $CD4^+$ / $CD8^+$ T ćelijski odnos kao meru imunokompetencije (Char et al., 1990). Prosečne vrednosti procenata pozitivnih $CD4^+$ i $CD8^+$ ćelija i prosečan odnos $CD4^+$ i $CD8^+$ T ćelija 28. dana ogleda (pre primene atenuiranih živih vakcina protiv IBD) je iznosio od 2,63 do 3,13 kod svih grupa (Tabela 22). Nisu utvrđene značajne razlike prosečnih odnosa $CD4^+$ / $CD8^+$ po grupama ($p > 0,05$). Rezultati prosečnih odnosa $CD4^+$ / $CD8^+$ pre primene živih atenuiranih vakcina protiv IBD, u skladu su sa rezultatima Bridle et al. (2006) koji su imunofenotipizacijom limfocitnih subpopulacija u perifernoj krvi živine ustanovili da je odnos $CD4^+$ / $CD8^+$ T limfocita laboratorijski uzgajanih pilića bio od 2,93 do 3,25 i slažu se sa rezultatima Fair et al. (2008) koji su imunofenotipizacijom populacije limfocita iz periferne krvi pilića odgajanih u sistemu slobodnog gajenja (eng. free-range), ustanovili da su $CD4^+$ monoklonska antitela reagovala sa 4-31% limfoidnih ćelija krvi a $CD8^+$ od 1-10% limfoidnih ćelija krvi, što znači da su $CD4^+$ T ćelije zastupljene gotovo tri puta više u perifernoj kvi živine. Različiti procenti

populacija limfocita u odnosu na vrednosti koje smo mi dobili u istraživanju mogu da se objasne time što su Fair et al. (2008) istovremeno pratili broj T ćelija u odnosu na ukupne limfoidne ćelije, dok se naš rezultat odnosi samo na međusobni odnos $CD4^+$ i $CD8^+$ T ćelija. Naime Fair et al. (2008) su koristili sledeća anti-pileća antitela, u kombinaciji, za protočnu citometriju: $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ i $CD45^+$ koja su eksprimirana na svim hematopoetskim ćelijama i koja pokazuju ukupne limfoidne ćelije krvi.

Prosečne vrednosti procenata pozitivnih $CD4^+$ i $CD8^+$ ćelija i prosečan odnos $CD4^+$ i $CD8^+$ T ćelija 48. dana ogleđa (20 dana nakon prve primene atenuiranih živih vakcina protiv IBDV i 14 dana nakon druge primene istih vakcina), pokazuje vrlo značajnu razliku ($p < 0,01$) po grupama pilića vakcinisanih različitim vakcinama protiv infektivne burzalne bolesti. Grupe G1 i G2 (vHVT13 vakcina protiv IBD) i kontrolna grupa G5 su imale prosečan odnos $CD4^+/CD8^+$ T ćelija: 2,74; 2,62; 2,96 redom navođenja i između njih nema značajnih razlika (Tabela 23,24, grafikon 14). Prosečni odnos $CD4^+/CD8^+$ T ćelija u grupi G3 (intermedijarna vakcina protiv IBD) i grupi G4 (intermedijarna plus vakcina) opada na 1,95 i 1,76 redom navođenja (tabela 25,26, grafikon 14). Grupa G3 sa prosečnom vrednošću odnosa $CD4^+/CD8^+$ T ćelija od 1,95 statistički signifikantno je manja ($p < 0,01$) od vrednosti za grupe G1 i G5 i značajno manja ($p < 0,05$) od grupe G2. Grupa G4 imala je najniži prosečan odnos $CD4^+$ i $CD8^+$ T ćelija od 1,76, što je statistički signifikantno manje ($p < 0,01$) od prosečne vrednosti grupa G1 i G2 (vHVT13) i G5 (kontrola). Statistička analiza pokazuje da upotreba rekombinantne vHVT13 vakcine za zaštitu od IBD virusa ne utiče na smanjenje odnosa $CD4^+/CD8^+$ T ćelija u perifernoj cirkulaciji pilića. Upotreba živih atenuiranih vakcina protiv IBD utiče i značajno smanjuje odnos $CD4^+/CD8^+$ T ćelija u perifernoj cirkulaciji pilića.

Naši rezultati se slažu sa zapažanjima Bridle et al. (2006) koji ukazuju na to da genetska selekcija, intenzivna imunizacija i drugi faktori životne sredine uključeni kod komercijalno gajene živine imaju značajan modulatorni efekat na T limfocite, utičući na $CD4^+/CD8^+$ odnos kao meru imunokompetencije. Taj odnos kod komercijalno uzgajanih pilića, intenzivno vakcinisanih i starijih je manji i kreće se od 1,3 do 1,9 a kod nas je iznosio za grupu G3 (1,95) a za grupu G4 (1,76). Nešto manje proporcije su zabeležene u studiji Fair et al. (2008) a zavisile su najverovatnije od starosti živine u ogleđu. I drugi autori su utvrđivali limfocite iz cirkulacije kod mladih nosilja do godinu dana starosti. Nivo cirkulišućih T ćelija pilića opada sa starošću (Cheng et al., 2001; Berndt et al., 2006), a rezultati su slični sa rezultatima prethodnih autora. Intenzivna

imunizacija protiv zajedničkih živinskih patogena (u našem slučaju imunizacija živim atenuiranim vakcinama protiv IBD) utiče na proporciju i odnos cirkulišućih T ćelija. Posle intenzivnih imunizacija beleži se povećanje procenta $CD8^+$ T citotoksičnih ćelija krvi a samim tim je smanjen odnos T limfocita ($CD4^+/CD8^+$). U grupama G1 i G2 gde je primenjena rekombinantna vektorska vakcina (vHVT13) nije zabeležen smanjeni odnos $CD4^+/CD8^+$ T cirkulišućih limfocita.

Pedesetdevetog dana ogleđa (11 dana nakon veštačke infekcije vvIBDV), prosečan odnos $CD4^+/CD8^+$ T ćelija je kod svih eksperimentalnih grupa snižen i iznosio je 1,071; 1,098; 1,063; 1,089; 0,997, redosledom od grupe G1 do grupe G5, indikujući smanjenje imunokompetencije (Tabela 22). Nisu utvrđene značajne razlike prosečnih odnosa $CD4^+/CD8^+$ T ćelija između grupa ($p>0,05$). Za razliku od dobijenih prosečnih vrednosti odnosa $CD4^+/CD8^+$ T ćelija krvi posle vakcinacija, gde se beleži bolji odnos kod grupa pilića vakcinisanih vHVT13 vakcinom, nakon veštačke infekcije odnos $CD4^+/CD8^+$ T ćelija je identičan i smanjen kod svih grupa pilića, nezavisno od vrste vakcine i načina vakcinacije protiv IBD. Nakon veštačke infekcije pilića vv IBD virusom i kod grupa pilića G1 i G2 sa vHVT13 vakcinom utvrđeno je smanjenje odnosa $CD4^+/CD8^+$ T ćelija krvi. Smanjenje odnosa $CD4^+/CD8^+$ T ćelija krvi nakon veštačke infekcije je u skladu sa promenama odnosa burzalnih T ćelija nakon infekcije IBD virusom koje su utvrdili Kim et al., (2000). U njihovim eksperimentima prvih 7 dana nakon infekcije broj $CD4^+$ i $CD8^+$ T ćelija je podjednak nema razlike u broju kod T ćelija. Nakon 7 dana infekcije i kasnije oko 2. nedelje, relativan broj burzalnih $CD4^+$ T ćelija opada na 10% od ukupnih burzalnih ćelija a nasuprot tome raste broj $CD8^+$ T (T citotoksični limfocit) ćelija iznad 20%. Razlika je u veličini odnosa $CD4^+/CD8^+$ koji je kod burzalnih T ćelija pre infekcije oko 1, a kod cirkulišućih T ćelija pre infekcije dosta viši i iznosi od 2 do 3. Posle infekcija IBD virusom nema smanjenja ukupnih T ćelija u BF i krvi, naprotiv njihov broj se uvećava ali dolazi do promene odnosa $CD4^+/CD8^+$ (Helper/Suppressor (H/S) ratio) i smanjivanja regulatornih $CD4^+$ T limfocita i povećanja efektorskih $CD8^+$ citotoksičnih T limfocita.

Bez obzira što je nakon infekcija IBD virusom utvrđena humoralna imunodepresija i pad broja B limfocita a nije uočena celularna imunodepresija i pad T ćelija krvi i burze (naprotiv dolazi do povećanja njihovog ukupnog broja) (Rodenberg et al.,1994), nakon infekcije dolazi do promene u zastupljenosti T limfocita (imunomodulatorne prirode) koje utiču na imunokompetenciju domaćina.

7. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata i podataka iz literature, može se zaključiti sledeće:

1. Na osnovu praćenja kliničkih znakova i mortaliteta pilića nakon veštačke infekcije vvIBDV, potpuna zaštita je postignuta kod grupa G1 i G2 koje su vakcinisane rekombinantnom vHVT13 vakcinom protiv infektivne burzalne bolesti, a delimična, kod pilića u G3 i G4 grupi vakcinisanih intermedijarnom ili intermedijarnom plus vakcinom protiv infektivne burzalne bolesti.
2. Nakon veštačke infekcije nisu uočene patoanatomske promene u grupama pilića vakcinisanih rekombinantnom vHVT13 vakcinom (G1 i G2), dok su u grupama G3 i G4 vakcinisanih živim atenuiranim vakcinama uočene patoanatomske promene tipične za infektivnu burzalnu bolest samo kod uginulih jedinki.
3. Vrednosti indeksa „masa burze/telesna masa-BBR i BBI indeksa“, nakon vakcinacije, nakon veštačke infekcije i na kraju eksperimenta kod G3 i G4 grupe pilića vakcinisanih živim atenuiranim vakcinama protiv infektivne burzalne bolesti su bile statistički značajno niže u odnosu na kontrolnu grupu i u odnosu na grupe pilića G1 i G2 vakcinisanih rekombinantnom vHVT13 vakcinom, što ukazuje na to da je nakon veštačke infekcije stepen oštećenja i atrofije burze Fabricii znatno manje izražen kod grupa pilića imunizovanih rekombinantnom vHVT13 vakcinom, ali da i dalje postoji delimična atrofija.
4. Određivanjem titra antitela na virus infektivne burzalne bolesti i njihovih prosečnih vrednosti u svim terminima uzorkovanja krvi, određivanih IBD plus ELISA testom („unapređena ELISA“), utvrđeno je da su G1 i G2 grupe pilića vakcinisanih rekombinantnom vHVT13 vakcinom imale značajno veće vrednosti ($p < 0.01$) u odnosu na vrednosti titra antitela G3 i G4 grupe pilića vakcinisanih živim atenuiranim vakcinama protiv infektivne burzalne bolesti, što je dokaz bolje imunogenosti rekombinantne vHVT13 vakcine.
5. U četvrtoj nedelji starosti uočava se pad titra antitela protiv infektivne burzalne

bolesti određivanih klasičnim i „unapređenim“ IBD plus ELISA testom, kod pilića vakcinisanih živim atenuiranim vakcinama protiv IBD, što nije ustanovljeno kod pilića vakcinisanih rekombinantnom vHVT13 vakcinom, što predstavlja dokaz uspešnog prevazilaženja opadanja specifičnih antitela nakon imunizacije rekombinantnom vHVT13 vakcinom.

6. Rekombinantna vHVT13 vakcina protiv IBD nije suprimirala imunski odgovor nakon imunizacije pilića protiv atipične kuge žiivine i infektivnog bronhiitsa, jer nije ustanovljena značajna razlika prosečnih vrednosti titra antitela na atipičnu kugu živine ($p > 0,05$), dok je na infektivni bronhitis ustanovljena značajna razlika samo između G4 i G5 grupe na kraju ogleđa ($p < 0,05$).

7. Određivanjem koncentracije imunoglobulina klase Y (IgY) nije bilo statistički značajnih razlika između grupa ni nakon vakcinacije protiv IBD, niti nakon veštačke infekcije.

8. Određivanjem prosečnih vrednosti pozitivnih $CD4^+$ i $CD8^+$ limfocita i njihovog međusobnog odnosa nakon vakcinacije protiv IBD ustanovljeno je da su te vrednosti statistički značajno niže kod grupa pilića imunizovanih atenuiranim živim vakcinama, u odnosu na vrednosti kod grupa pilića imunizovanih, rekombinantnom, vHVT13 vakcinom i kod nevakcinisane grupe pilića, na osnovu čega se može zaključiti da je došlo do delimične supresije celularnog imunskog odgovora nakon imunizacije rekombinantnom vHVT13 vakcinom, ali u manjem stepenu u odnosu na supresiju izraženu kod pilića imunizovanih živim atenuiranim vakcinama.

9. Nakon veštačke infekcije vvIBD virusom prosečan odnos $CD4^+ / CD8^+$ T limfocita u perifernoj krvi pilića je kod svih grupa statistički značajno snižen, bez značajnih razlika između grupa, indikujući smanjenje imunokompetencije bez obzira na način vakcinacije protiv IBD.

8. LITERATURA

1. Allan W.H., Faragher J.T., Cullen G.A., 1972: *Immunosuppression by the infectious bursal agent in chickens immunized against Newcastle disease*. The Veterinary Record 90, 511 – 512.
2. Altfeld M., Rosenberg E., 2000: *The role of CD4 T helper cells in the cytotoxic T lymphocyte response to HIV-1*. Current Opinion in Immunology 12, 375–380.
3. Ashash U., Caroline B.M., Finger A., Perelman B.Z., Gnemenko A., Dmitrieva M., 2013: *Evaluation of different vaccination technologies against very virulent IBDV-one dose vaccine solution fits all the different IBDV field strains and different husbandries*. Proc. XVIIIth WVPA Nantes, France, p 590.
4. Ashraf S., Tang Y., Saif Y.M., 2007: *Development of differential RT-PCR assays and molecular characterization of the complete VP1 gene of five strains of very virulent infectious bursal disease virus*. Avian. Dis., 51: 935-941.
5. Audi S., Pauković Č., Karlović M., Roman N., Medven M., Mojžišek M., 1972: Simpozijum Živinarski dani, Beograd 1972.
6. Bart van Leerdam B, Slacum G.A, Barend van Dam BA, 2013: *Use of a Classical ELISA to Detect Antibodies Following Vaccination with Recombinant HVT Vectored Vaccines for IBD*. Proc. XVIIIth WVPA Nantes, France, p 616.
7. Bayliss C.D., Peters R.W., Cook J.K.A., Reece R.I., Howews K., Binns M.M., Bournnell M.E.G., 1991: *A recombinant fowlpox virus that expresses the VP2 antigen of infectious bursal disease virus induce protection against mortality caused by the virus*. Arch. Virol., 120, 193-205.
8. Benton W.J., Cover M.S., Rosenberger J.K., Lake R.S., 1967: *Physico-chemical properties of the infectious bursal agent (IBA)*. Avian Diseases, 11, 438 – 445.
9. Berndt, A., Pieper, J., Methner, U., 2006: *Circulating $\{\gamma\}\{\delta\}$ T cells in response to Salmonella enterica serovar enteritidis exposure in chickens*. Infect. Immun., 74, 3967–3978.
10. Block H.K., Meyer-Block K., Rebeski D.E., Schar H., deWit S., Rohn K., Rautenschlein S., 2007: *“A Field Study on the Significance of Vaccination against Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) at the Optimal Time Point in Broiler Flocks with Maternally Derived IBDV Anti-bodies,”* Avian Pathology, Vol. 36, No.5, 401-409.
11. Bohls R.L., Smith R., Ferro P.J., Silvy N.J., LI Z., Collisson E.W., 2006: *The use of flow cytometry to discriminate avian lymphocytes from contaminating thrombocytes*. Developmental and Comparative Immunology 30, 843–850.
12. Boot HJ, ter Huurne AA, Hoekman AJ, Peeters BP, Gielkens AL.,2000: *Rescue of virulent and mosaic infectious bursal disease virus from cloned cDNA: VP2 is not determinant of the very virulent phenotype*. J Virol, 74 (15): 6701-6711.
13. Box P., 1989: *High maternal antibodies help chickens beat virulent virus*. World Poult., 53, 17-19.

14. Boyd L.R., Ward H.A., 1984: *Lymphoid antigenic determinants of the chicken*. Developmental and Comparative Immunology 8, 149 – 167.
15. Brandt M, Yao K, Liu M, Heckert RA, Vakharia VN., 2001: *Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus*. J Virol., 75 (24):11974-82.
16. Bridle B.W., Julian R., Shewen P.E., Vaillancourt J.P., Kaushik A.K., 2006: *T lymphocyte subpopulations diverge in commercially raised chickens*. Can. J. Vet. Res., 70, 183–190.
17. Brown M.D., Green P., Skinner M.A., 1994: *VP2 sequences of recent European 'very virulent' isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of 'classical' strains*. J.Gen.Virol., 75, 675-680.
18. Bublot M, Pritchard N, Le Gros FX, Goutebroze S., 2007: *Use of a vectored vaccine against infectious bursal disease of chickens in the face of high-titred maternally derived antibody*. J Comp Pathol., 137, 581-584.
19. Burkhardt E., Müller H., 1987: *Susceptibility of chicken blood lymphoblasts and monocytes to IBDV*. Arch. Virol., 94, 297-303.
20. Caston J.R.,Martinez-Torrecuadrada J.L., Maraver A., Lombardo E., Rodriguez J.F., Casal J.I., Carrascosa J.L., 2001: *C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly*. Journal of Virology 75, 10815 – 10828.
21. Char D, Sanchez P, Chen CL, et al., 1990: *A third sublineage of avian T cells can be identified with a T cell receptor-3-specific antibody*. J Immunol., 145, 3547–3555.
22. Cheng H.W., Eicher S.D., Chen Y., Singleton P., Muir W.M., 2001: *Effect of genetic selection for group productivity and longevity on immunological and hematological parameters of chickens*. Poult.Sci., 80, 1079–1086.
23. Chettle N.J., Stuart J.C., Wyeth P.J., 1989: *Outbreaks of virulent infectious bursal disease in East Anglia*. Vet. Rec., 125, 271-272.
24. Cho B.R., Snyder D.B., Lana D.P., Marquardt W.W., 1987: *Infectious bursal disease: rapid diagnosis by immunoperoxidase monoclonal antibody stain*. In Proc. 36th Western Poultry Disease Conference, 3-5 March, Davis, California. University of California, Davis, 112.
25. Cho Y., Edgar S.A., 1972: *Characterization of the infectious bursal agent*. Poult. Sci., 51, 60-69.
26. Ciriaco E., Pinera P.P., Diaz-Esnal B., Laura R., 2003: *Age-related changes in the avian primary lymphoid organs (thymus and bursa of Fabricius)*. Microsc. Res. Technol., 62, 482-487.
27. Corley, M.M., Giambone, J.J., 2002: *Immunosuppression in specific-pathogen-free broilers administered infectious bursal disease virus vaccines by in ovo route*. Avian dis., 46, 810-815.
28. Cosgrove A.S., 1962: *An apparently new disease of chickens. Avian nephrosis*. Avian Dis., 6, 385-389.
29. Czekaj H., Samorek-Salamonowicz E., Kozdrun W., Bednarek D., and Krol

- K., 2005: *Analysis of T lymphocyte populations in peripheral blood of chickens infected with reoviruses*. *Medycyna Weterynaryjna* 61: 703–705.
30. Da Silva Martins N.R., Mockett A.P.A., Cook J.K.A., 1992: *The immunoglobulin M response in chicken serum to infectious bursal disease virus*. *Avian Pathology* 21, 517 – 521.
 31. Darteil R, Bublot M, Laplace E, Bouquet JE, Audonnet JC, Riviere M, 1995: *Herpes virus of turkey Recombinant viruses expressing Infectious bursal disease virus VP2 immunogen induce protection against an IBDV virulent challenge in chickens*. *Virology*, 211, 2, 481-490.
 32. Davison F., Kaspers B., Schat K.A., 2008: *Structure of the avian lymphoid system*. *Avian Immunology*, p: 22-27.
 33. De Wit J.J., 1999: *Gumboro disease: optimising vaccination*. *Int. Poult. Prod.*, 7(5),19-21.
 34. De Wit J.J., 2001: *Counting the cost of IBDV*. *World Poultry, Magazine on Production Processing & Marketing*, October 2001. Pp: 6-7.
 35. Dietert RR, Golemboski KA, Austic RE., 1994: *Environment-immune interactions*. *Poult. Sci.*, 73, 1062-1076.
 36. Dobrosavljević I., Vidanović D., Velhner M., Miljković B., Lako B., 2014: *Detection of infectious Bursal Disease virus in specific pathogen free chickens that were vaccinated and challenged with a very virulent strain*. *Acta Veterinaria Hungarica*, volume 62 (2), 264-273.
 37. Doherty P.C., Christensen J.P., 2000: *Assessing complexity: the dynamics of virus-specific T cell responses*. *Annual Review of Immunology* 18, 561–592.
 38. Ducatelle R.V.A., Uyttebroek E., De Ruysse L., Mast J., Goddeeris B., 1995: *Infectious bursal disease in Europe, consequences of changing epidemiological conditions*. In book: 'International Poultry Symposium Summit on Infectious Bursal Disease, proceedings, April 3-4, 1995,' p: 10-14.
 39. Eterradossi N., Arnauld C., Tekaiia F., Toquin D., Le Coq H., Rivallan G., Guittet M., Domenech J., Van den Berg T.P., Skinner M.A., 1999: *Antigenic and genetic relationship between European very virulent infectious bursal disease viruses and an early West African isolate*. *Avian pathology*, 28, 36-46.
 40. Eterradossi N., 1995: *Progress in the diagnosis and prophylaxis of infectious bursal disease in poultry*. In *Comprehensive Reports on Technical Items presented to the International Committee or to regional commissions*. Office International des Epizooties, Paris, 75-82.
 41. Ewald S.J., Lien Y.Y., Li L., 1996: *B-haplotype control of CD4/CD8 subsets and TCR V beta usage in chicken T lymphocytes*. *Vet Immunol Immunopathol.*, 53, 285–301.
 42. Fahey K.J., Erny K., Crooks J.A, 1989: *Conformational immunogen on VP2 of infectious bursal disease virus that induces virus-neutralizing antibodies that passively protect chicken*. *J. Gen. Virol.*, 70, 1473-1481
 43. Fair JM, Taylor-McCabe KJ, Shou Y, Marrone BL, 2008: *Immunophenotyping of chicken peripheral blood lymphocyte subpopulations: Individual variability and repeatability*. *Veterinary Immunol. and Immunopathology*, 125, 268-273.

44. Faragher J.T., 1972: *Infectious bursal disease of chicken*. Vet. Bull., 42, 361-369.
45. Faragher J.T., Allan W.H., Wyeth C.J., 1974: *Immunosuppressive effect of infectious bursal agent on vaccination against Newcastle disease*. Vet. Rec., 95, 385-388.
46. Fernandez Arias A., Martinez S., Rodriguez J.F., 1997: *The major antigenic protein of infectious bursal disease virus, VP2, is an apoptotic inducer*. Journal of Virology, 71, 8014-8018.
47. Gardner H., Kerry K., Riddle M., Brouwer S., Gleeson L., 1997: *Poultry virus infection in Antarctic penguins*. Nature, 15,387 (6630), 245.
48. Gelb J, Jackwood DJ, Brannick EM, Ladman BS, 2016: *Efficacy of recombinant HVT-IBDV vaccines administered to broiler chicks from a single breeder flock at 30 and 60 weeks of age*. Avian Dis., 60, 603-612.
49. Giambrone J.J., Ewert D.L., Eidson C.S., 1977: *Effect of infectious bursal disease virus on the immunological responsiveness of the chickens*. Poul.Sci., 56(5): 1591-1594.
50. Glick B., Chang T.S., Jaap R.G., 1956: *The bursa of Fabricius and antibody production on the domestic fowl*. Poultry Science 35, p. 224.
51. Goddard R.D., Wyeth P.J., Varney W.C., 1994: *Vaccination of commercial layer chicks against infectious bursal disease with maternally derived antibodies*. Vet. Rec., 135 (12): 273-274.
52. Goutebroze S., Curet M., Jay M.L., Roux C., Le-Gros F.X., 2003: *“Efficac Recombinant Vaccine HVT-VP2 against Gumboro Disease in the Presence of Maternal Antibodies”*. British Poultry Science, Vol. 44, No. 5, 824-825.
53. Gumati M.K., Magyar A., Nagy N., Kurucz E., Belfoldi B. and Olah I., 2003: *Extracellular matrix of different composition supports the various splenic compartments of quinea fowl*. Cell Tissue Res., 312, 333-343.
54. Haddad E.E., Whitfill C.E., Avakian A.P., Ricks C.A., Andrews P.D., Thoma J.A., Wakenell P.S., 1997: *Efficacy of a novel infectious bursal disease virus immune complex vaccine in broiler chickens*. Avian Dis., 40, 553-561.
55. Hein R., Slacum G., Lynch P., Honegger K., 2008: *Recombinant HVT/ILT Vaccine (INNOVAX-ILT) Field Application Issues*. Proc.43rd. Nat.Meeting on Poultry Health and Processing Ocean City Md.73.
56. Hein R., 2009: *Novel HVT/ILT Recombinant Vaccine to Simultaneously Control Infectious Laryngotracheitis and Marek's Disease in Chickens (INNOVAX-ILT)*. Proc.VI Int.Symposium on Avian Corona and Pneumoviruses Rauschholzhausen Germany, 385-386.
57. Hein RG, 2011: *Issues of the Poultry Recombinant Viral Vector Vaccines which May Cause an Effect on the Economic Benefits of those Vaccines*. XVII World Veterinary Poultry Association (WVPA) Congress in Cancún, Mexico, August 14-18, p 477-479.
58. Heine H.G., Boyle D.B., 1993: *Infectious bursal disease virus structural protein VP2 expressed by a fowlpox virus recombinant confers protection against disease in chickens*. Arch. Virol., 131 (3-4), 277-292.

59. Henry C.W., Brewer R.N., Edgar S.A., Gray B.W., 1980: *Studies on infectious bursal disease of chickens: 2 – scoring microscopic lesions in the bursa of Fabricius, thymus, spleen and kidney in gnotobiotic and battery reared white Leghorns experimentally infected with infectious bursal disease virus*. *Poult. Sci.*, 59, 1006-1017.
60. Hesham Sultan, Hussein A.H., Alaa G. Abd El-Razik, Sallah El-Balall, Shaima M. Talaat and Awad A. Shehata, 2012: *Efficacy of HVT-IBDV Vector Vaccine Against Recent Egyptian vvIBDV in Commercial Broiler Chickens*. *International Journal of Poultry Science* 11 (11): 710-717.
61. Hiraga M., Nunoya T., Otaki Y., Tajima M., Saito T., Nakamura T., 1994: *Pathogenesis of highly virulent infectious bursal disease virus infection in intact and bursectomized chickens*. *J. Vet. med. Sci.*, 56, 1057-1063.
62. Hirai K., Calnek B.W., 1979: *In vitro replication of infectious bursal disease virus in established lymphoid cell lines and chickens B lymphocytes*. *Infect. Immun.*, 25 (3), 964-970.
63. Hirai K., Shikamura S., Hirose M., 1972: *Immunodiffusion reaction to avian infectious bursal virus*. *Avian Dis.*, 16, 961-964.
64. Hirai K., Funakoshi T., Nakai T., Shimakura S., 1981: *Sequential changes in the number of surface immunoglobulin-bearing B lymphocytes in infectious bursal disease virus-infected chickens*. *Avian Dis.*, 25, 484-496.
65. Hoerr, F.J., 2010: *Clinical aspects of immunosuppression in poultry*. *Avian diseases* 54, 2-15.
66. Howie R.I., Thorsen J., 1981: *Identification of a strain of infectious bursal disease virus isolated from mosquitoes*. *Canadian journal of Comparative Medicine*, 45, 315-320.
67. Hudson P.J., McKern N.M, Power B.E, Azad A.A., 1986: *Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus*. *Nucleic Acid Research*, 14, 5001-5012.
68. Inoue M., Fukuda M., Miyano K., 1994: *Thymic lesions in chicken infected with infectious bursal disease virus*. *Avian Dis.*, 38 (4), 839-846.
69. Islam M.R., Zierenberg K., Müller H., 2001b: *The genome segment B encoding the RNA-dependent RNA polymerase protein VP1 of very virulent infectious bursal disease virus (IBDV) is phylogenetically distinct from that of all other IBDV strains*. *Archives of Virology* 146, 2481 – 2492.
70. Ismail, N.M., Saif Y.M., 1991: *Immunogenicity of Infectious bursal disease viruses in chickens*. *Avian Dis.*, 35(3):460-469.
71. Ivan J., Velhner M., Ursu K., German P., Mato T., Dren C.N., Meszaros J., 2005: *Delayed vaccine virus replication in chickens vaccinated subcutaneously with an immune complex infectious bursal disease vaccine: quantification of vaccine virus by real-time polymerase chain reaction*. *Canadian Journal of Veterinary Research* 69, 135-142.
72. Jackwood D.J., Sommer S.E., Odor E., 1999: *Correlation of enzyme-linked immunosorbent assay titers with protection against infectious bursal disease virus*. *Avian Dis.*, 43(2), 189-197.

73. Jeurissen, S.H., Janse, E.M., Lehrbach, P.R., Haddad, E.E., Avakian, A., Whitfill, C.E., 1998: *The working mechanism of an immune complex vaccine that protects chickens against infectious bursal disease*. Immunology 95, 494-500.
74. Jungmann A., Nieper H., Müller H., 2001: *Apoptosis is induced by infectious bursal disease virus replication in productively infected cells as well as in antigen-negative cells in their vicinity*. Journal of General Virology 82, 1107-1115.
75. Juul-Madsen H.R., O.L. Nielsen, T. Krough-Maibom, C.M. Rontved, T.S. Dalgaard, N. Bumstead, P.H. Jørgensen., 2002: *Major histocompatibility complex-linked immune response of young chickens vaccinated with an attenuated live infectious bursal disease virus vaccine followed by an infection*. Poult. Sci., 81(5):649-656.
76. Kabell Susanne, Handberg K.J., Kusk M., Bisgaard M., 2005a: *Detection of Infectious Bursal Disease Virus in Various Lymphoid Tissues of Experimentally Infected Specific Pathogen Free Chickens by Different Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assays*. Avian Diseases 49, 534-539.
77. Kaiser P., Balic A., 2014: *The Avian Immune System*, in: Sturkie's Avian Physiology 6th Edition (ed. Scanes C.), Elsevier / Acad. Press, San Diego, USA, 403-418.
78. Khan M.Y., Hashimoto Y., 1996: *An immunohistochemical analysis of T-cell subsets in the chicken bursa of Fabricius during postnatal stages of development*. Journal of Veterinary Medical Science 58, 1231 - 1234.
79. Kibenge F.S.B., Hillon A.S.D., Russel R.G., 1988: *Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus*. Journal of General Virology, 69, 1757-1775.
80. Kibenge, F.S.B., Qian, B., Cleghorn, J.R., Martin, C.K., 1997: *Infectious bursal disease virus polyprotein processing does not involve cellular proteases*. Archives of Virology, 142:12, 2401-2419.
81. Kim IJ, You SK, Kim H, Yeh HY, Sharma JM, 2000: *Characteristics of bursal T lymphocytes induced by infectious bursal disease virus*. J. Virol., 74, 19, 8884-8892.
82. Kouwenhoven B., Van Den Bos J., 1994: *Control of very virulent infectious bursal disease (Gumboro disease) in the Netherlands with more virulent vaccines*. International symposium on infectious bursal disease and chicken infectious anemia, World Vet. Poult. Assoc. Ravischolchavsén, Germany, 21-24 June, 264-271.
83. Kusk M., Kabell S., Jørgensen P.H., Handberg K.J., 2005: *Differentiation of five strains of infectious bursal disease virus: Development of a strain-specific multiplex PCR*. Veterinary Microbiology 109, 159-167.
84. Lam KL., 1998: *Alteration of chicken heterophil and macrophage functions by the infectious bursal disease virus*. Microb Pathogen 25: 147-155.
85. Lange H., Müller H., Käufer I., Becht H., 1987: *Pathogenic and structural properties of wild type infectious bursal disease virus (IBDV) and virus grown in vitro*. Archives of Virology 92, 187-196.

86. Lasher H.N., Shane S.M., 1994: *Infectious bursal disease*. World poult. Sci. J., 50, 133-166.
87. Le Gros FX, Dancer A, Giacomini C, Pizzoni L, Bublot M, Graziani M, Prandini F, 2009: *Field efficacy trial of a novel HVT-IBD vector vaccine for 1-day-old broilers*. Vaccine 27: 592-596.
88. Le Gros FX, 2009: *IBD Efficacy data in presence of Maternal Antibodies in Broilers and Layers with a Novel Vector HVT-IBD vaccine*. Proc.VI Int. Symposium on Avian Corona and Pneumoviruses, Rauschholzhausen Germany, p. 376-384.
89. Le Nouen C., Rivallan G., Toquin D., Eterradossi N., 2005: *Significance of the genetic relationships deduced from partial nucleotide sequencing of infectious bursal disease virus genome segments A or B*. Archives of Virology 150, 313–325.
90. Le Nouen C., Rivallan G., Toquin D., Darlu P., Morin Y., Beven V., De Boissesson C., Cazaban C., Gardin Y. and Eterradossi N., 2006: *Very virulent infectious bursal disease virus: reduced pathogenicity in a rare natural segment B-reassorted isolate*. Journal of General Virology 87, 209–216.
91. Lemiere S., Gauthier J.C., Kodjo A., Vinit L., Delvecchio A., Prandini F., 2013: *“Disease (IBD). Challenge in Progeny Born to Parents Having Received a Vaccination Program Using a Herpesvirus of Turkey-Infectious Bursal Disease (HVT-IBD) Vector Vaccine”*. World J Vaccines, 3, 46-51.
92. Leong J.C., Brown D., Dobos P., Kibenge F., Ludert J.E., Müller H., Mundt E., Nicholson B., 2000: Birnaviridae. In: M.H.V. Regenmortel, C.M. Fauquet, D. H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J.Manioloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle, R.B. Wickner (Eds.). Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses, Academic Press, p. 481 – 490.
93. Letzel T, Coulibaly F, Rey FA, Delmas B, Jagt E, van Loon AA, Mundt E., 2007: *Molecular and structural bases for the antigenicity of VP2 of infectious bursal disease virus*. J Virol., 81(23):12827-35.
94. Lin Z., Kato A., Otaki Y., Nakamura T., Sasmaz E., Ueda S., 1993: *Sequence comparisons of a highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan*. Avian Dis., 37 (2), 315-323.
95. Lucio B., Hitchner S.B., 1979: *Infectious bursal disease emulsified vaccine: effect upon neutralizing antibody levels in the dam and subsequent protection of the progeny*. Avian Dis., 23, 466-478.
96. Lucio B., 1987: *Quantitative agar gel precipitation test: an alternative for monitoring infectious bursal disease vaccination programs*. In Proc. 36th Western Poultry Disease Conference, 3-5 March. University of California, Davis, 116-119.
97. Lukert P.D., Saif Y.M, 1997: *Infectious bursal disease*. In Disease of poultry, 10th Ed. Iowe State University Press, Ames, 721-738.
98. Lukert P.D. and Saif YM., 2003: *Infectious bursal disease*. In Disease of poultry, 11th Ed. Iowe State University Press, Ames, USA, 161-180.
99. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2008,

- Infectious Bursal Disease (Gumboro Disease), Chapter 2.3.12., pp. 549 – 565.
100. Maris P., 1986: *Désinfection des bâtiments: le vide sanitaire en aviculture*. Point vét., 18, 635-639.
 101. Marquardt W.W., Johnson R.B., Odenwald W.F., Schlotthober B.A., 1980: *An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring antibodies in chickens infected with infectious bursal disease virus*. Avian.Dis., 24(2):375-385.
 102. Massi P, Tosi G, Fiorentini L., 2008: *Experimental challenge trial with a “very virulent” strain of Infectious Bursal Disease virus (vvIBDV) in commercial pullets vaccinated with an IBD vectored vaccine or with three different modified live vaccines*. Zootecnica International, November, 50-57.
 103. Maw M.T., Yamaguchi T., Kasanga C.J., Terasaki K., Fukushi H., 2006: *A Practical Tissue Sampling Method Using Ordinary Paper for Molecular Detection of Infectious Bursal Disease Virus RNA by RT-PCR*. Avian Diseases 50, 556-560.
 104. Mazariegos, L.A., Lukert P.D., Brown J., 1999: *Pathogenicity and immunosuppressive properties of infectious bursal disease intermediate strains*. Avian. Dis., 34, 203-208.
 105. McAllister J.C., Steelman C.D., Newberry L.A., Skeeles J.K., 1995: *Isolation of infectious bursal disease virus from the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (panzer)*. Poultry Sci., 74, 45-49.
 106. McFerran J.B., McNulty M.S., McKillop E.R., Connor T.J., McCracken R.M., Collins D.S., Allan G.M., 1980: *Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys and ducks: demonstration of a second serotype*. Avian Pathol., 9, 395-404.
 107. McFerran J.B., 1993: *Infectious bursal disease*. In *Virus infections of birds*. Elsevier Science, Amsterdam, 213-228.
 108. McIlroy S.G., Goodall E.A., McCracken R.M., 1989: *Economic effects of subclinical infectious bursal disease on broiler production*. Avian pathol., 18 (3), 465-480.
 109. McIlroy S.G., Goodall E.A., Bruce D.W., McCracken R.M., McNulty M.S., 1992: *The cost benefit of vaccinating broiler flock against subclinical infectious bursal disease*. Avian Pathol., 21(1), 65-76.
 110. Melson L., Jensen K., 2011: *Duration of Immunity in Chickens Following Vaccination with a Recombinant Herpesvirus of Turkeys Vaccine Expressing the Fusion(F) Antigen of Newcastle Disease Virus*. Proc.1st International Avian Resp. Dis.Conf. Athens USA, 59.
 111. Meulemans G., Antoine O., Halen P., 1977: *Application de l'immunofluorescence au diagnostic de la maladie de Gumboro*. Bull. Off.int.Epiz., 88, 225-229.
 112. Meulemans G., Decaesstecker M., Halen P., Froyman R., 1987: *Comparaison des tests ELISA et de seroneutralisation pour la recherche des anticorps contre le virus de la maladie Gumboro. Applications pratiques du test ELISA*. Rec.Med.Vet., 163, 561-565.

113. Meza G.G., 1984: 2512 *Infectious bursal disease virus (IBDV) for broiler vaccination*. XVII World's Poultry Congress and Exhibition, World Poultry Science Association, Proceedings and Abstracts, p. 535 – 537.
114. Miler H., Nitschke R., 1987: *The two segments of the infectious bursal disease virus are circularised by a 90 Kda protein*. Virology, 159: 174-177.
115. Mundt E., 1999: *Tissue culture infectivity of different strains of infectious bursal disease virus is determined by distinct amino acids in VP2*. J. Gen. Virol., 80: 2067-76.
116. Nagarajan M.M., Kibenge F.S.B., 1997b: *The 5'-terminal 32 base pairs conserved between genome segment A and B contain a major promoter element of infectious bursal disease virus*. Archives of Virology, 142, 2499-2514.
117. Naglić T., Hajsig D., 1993: Veterinarska imunologija, Školska knjiga, Zagreb
118. Neighbor N.K., Newberry L.A., Bayyari G.R., Skeeles J.K., Beasley J.N., Mcnew R.W., 1994: *The effect of microaerosolized hydrogen peroxide on bacterial and viral poultry pathogens*. Poultry Science. 73(10): 1511-1516.
119. Nunoya T., Otaki, Tajima M., Hiraga M., Saito T., 1992: *Occurrence of acute infectious bursal disease with high mortality in Japan and pathogenicity of field isolates in SPF chickens*. Avian Dis., 36, 597-609.
120. Office International des Epizooties (OIE), 2000: Manual standards for diagnostic test and vaccines, 4th Ed. OIE, Paris, 615-628.
121. Ogawa M., Yamaguchi T., Setiyono A., Ho T., Matsuda H., Furusawa S., Fukushi H., Hirai K., 1998: Some characteristics of a cellular receptor for virulent infectious bursal disease virus by using flow cytometry. Archives of Virology 143, 2327 – 2341.
122. Okoye J.O.A., Uzoukwu M., 1990: *Pathogenesis of infectious bursal disease in embryonally bursectomized chickens*. Avian Pathology 19, 555 – 569.
123. Okoye J.O., Iguomu E.P., Nwosuh C., 1990: *Pathogenicity of an isolate of infectious bursal disease virus in local Nigerian ducks*. Trop. Anim. Health. Prod., 22(3): 160-162.
124. Oppling V., Muller H., Becht H., 1991: *The structural polypeptide VP3 of infectious bursal disease virus carries group – and serotype-specific epitopes*. J. Gen. Virol., 72, 2275-2278.
125. Petkov DI, Linnemann EG, Kapczynski DR, Sellers HS, 2009: *Identification and Characterization of Two Distinct Bursal B-Cell Subpopulations following Infectious Bursal Disease Virus Infection of White Leghorn Chickens*. Avian Diseases, 53, 3, 347-355.
126. Philip R.G., Moitra R.N., 1993. *An outbreak of infectious bursal disease in Poltry in Bhutan*. Bhutan J. Anim. Husbandry., 14: 29-32.
127. Pinck J.R., Vainio O., Rijnbeek A.M., 1985: *Clones lymphocytes in individual follicles of the bursa of Fabricius*. European Journal of Immunology, 15, 83-87.
128. Pitcovski J., Gutter B., Gallil G., Goldway M., Perelman B., Gross G., Krispel S., Barbakov M., Michael A., 2003: *Development and large-scale use of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of*

- chickens*. Vaccine, 21, 4736-4743.
129. Prandini F., Simon B., Jung A., Pöppel M., Lemiere S., Rautenschlein S., 2016: *Comparison of infectious bursal disease live vaccines and a HVT-IBD vector vaccine and their effects on the immune system of commercial layer pullets*. Avian Path., 45, 114-125.
 130. Prandini F., 2012: *Healthy Immune Systems Mean Chickens Respond Better to Other Vaccines*. ThePoultrySite, http://www.positiveaction.info/pdfs/stars/Merial_IHP_1-4_2012.pdf.
 131. Prandini F, Bublot M, Le Gros FX, Dancer A, Pizzoni L, Lamichane C, 2008: *Assessment of the immune response in broilers and pullets using two ELISA kits after in ovo or day-old vaccination with a vectored vaccine (VAXXITEK® HVT+IBD)*. Zootechnica International 9, septembar, 40-50.
 132. Ragland WL, Novak R, Attrache J, Savic V, Ester K., 2002: *Chicken Anemia Virus and Infectious Bursal Disease Virus interfere with Transcription of chicken IFN- α and IFN- γ mRNA*. Journal of interferon and cytokine research 22: 437-441.
 133. Rania A., El-Sanousi A., El-Mahdy S.S., 2012: *Laboratory Evaluation of Live Recombinant HVT-IBD Vaccine*. Report and Opinion 4(4):1-11. 2012. <http://www.sciencepub.net/report>
 134. Raue R., Islam M.R., Islam M.N., Islam K.M., Badhy S.C., Das P.M., Müller H., 2004: *Reversion of molecularly engineered, partially attenuated very virulent infectious bursal disease virus during infection of commercial chickens*. Avian Pathology 32, 79 – 86.
 135. Rautenschlein S., Yeh H.Y., Njenga M.K., Sharma J.M., 2002a: *Role of intrabursal T cells in infectious bursal disease virus (IBDV) infection: T cells promote viral clearance but delay follicular recovery*. Archives of Virology 147, 285 – 304.
 136. Rautenschlein S., Yeh H.Y., Sharma J.M., 2002b: *The role of T cells in protection by an inactivated infectious bursal disease virus vaccine*. Veterinary Immunology and Immunopathology 89, 159 – 167.
 137. Rautenschlein S., Haase Ch., 2005: *Differences in the immunopathogenesis of infectious bursal disease virus (IBDV) following in ovo and post-hatch vaccination of chickens*. Veterinary Immunology and Immunopathology 106, 139–150.
 138. Rautenschlein S., Lemiere S., Simon B., Prandini F., 2011: *A comparison of the effects on the humoral and cell-mediated immunity between an HVT-IBD vector vaccine and an IBDV- immune complex vaccine after in ovo vaccination of commercial broilers*. Proc. XVIIth WPAC Cancun, Mexico, p 810-823.
 139. Rautenschlein S, Stephane L, Francesko P, 2013: *Evaluation of the effects of an HVT-IBD vector vaccine on the immune system of layer pullets in comparison with two commercial live IBD vaccines*. Proc. XVIIIth WPAC Nantes, France, p 612.
 140. Resanović R., 2015: *Klinički aspekti imunosupresije živine*. Vet. Glasnik 69 (1-2) 91-99.

141. Rodenberg J, Sharma JM, Belzer SW, Nordgren Rm, Naqi S, 1994: *Flow Cytometric analysis of B cell and T cell subpopulations in SPF chickens infected with Infectious Bursal Disease Virus*. Avian Diseases, 38, 1, 16-21.
142. Roh JH, Kang M, Wei B, Yoon RH, Seo HS, Bahng JY, Kwon JT, Cha SY, Jang HK, 2016: *Efficacy of HVT-IBD vector vaccine compared to attenuated live vaccine using in ovo vaccination against a Korean very virulent IBDV in commercial broiler chickens*. Poultry Sci., 95:1020-1024.
143. Romanoff A.L., 1960: In book: *The avian Embryo, structural and functional development*, Macmillian, New Yourk.
144. Roney C.S., Freund R.C., 1988: *A comparison of infectious bursal disease antibody titers using different antigens in the serum neutralization and enzyme-linked immunosorbent assay tests*. In proc. 37th Western Poultry Disease Conference, Davis, California. University of California, Davis, p:17-20.
145. Rosenberger J.K. and S.C. Rosenberger, 2006: *ILT Vaccines Field and Laboratory Assessments*. Proc. 41st Nat. Meeting on Poultry Health and Processing Ocean City Md. 81-85.
146. Rukavina V., 2002: *Obrambeni sustav, stanice, tkiva, tkiva i organi*, Duovet, Zagreb, ISBN 953-99040-0-5, 107-117.
147. Saif Y.M., 1998: *Infectious Bursal Disease and Hemorrhagic Enteritis*. Poultry Science, 77, 1186-1189.
148. Sapats S.I., Ignjatovic J., 2000: *Antigenic and sequence heterogeneity of infectious bursal disease virus strains isolated in Australia*. Archives of Virology 145, 773 – 785.
149. Schat K.A., 1994: *Influence of infection with infectious bursal disease virus or chicken infectious anaemia virus on the avian immune system*. In book: 'International symposium on infectious bursal disease and chicken infectious anaemia, Rauischholchausen, Germany, 21-24 june,' p:17-21.
150. Schnitzler D., Bernstein F., Muller H., Becht H., 1993: *The genetic basis for the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal disease virus*. Journal of General Virology, 74:8,1563-1571.
151. Sharma J.M., Dohms J.E., Metz A.L., 1989: *Comparative pathogenesis of serotype 1 and variant serotype 1 isolates of infectious bursal disease and their effect on humoral and cellular immune competence of SPF chickens*. Avian Dis., 33, 112-124.
152. Sharma J.M., Dohms J.E., Walser M., Snyder D.B., 1993: *Presence of lesions without virus replication in the thymus of chickens exposed to infectious bursal disease virus*. Avian Dis., 37(3), 741-748.
153. Sharma J.M., Karaca K., Pertile T., 1994: *Virus-induced immunosuppression in chickens*. Poult. Sci., 73, 1082-1086.
154. Sharma J.M., 1997: *The structure and function of the avian immune system*. Proceedings of the Xth International Congress of the World Veterinary Poultry Association, Budapest, Hungary, 18-22 August, p. 229 – 230.
155. Sharma J.M., 1999: *Potent Vaccine for Deadly Virus*. In Minnesota Impacts-Poultry.

156. Sharma J.M., Kim I.J., Rautenschlein S., Yeh H.Y., 2000: *Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression*. Dev. Comp. Immunol., 24(2-3), 223-235.
157. Sitati E.M., Diamond M.S., 2006: *CD4(+) T-cell responses are required for clearance of West Nile virus from the central nervous system*. Journal of Virology 80, 12060–12069.
158. Skeeles J.K., Slacvik M., Beasley J.N., Brown A.H., Meinecke C.F., Maruca S., Welch S., 1980: *An age-related coagulation disorder associated with experimental infection with infectious bursal disease virus*. Am. J.vet. Res., 41(9), 1458-1461.
159. Slacum G., Hein R.G., Lynch P., 2009: *The Compatibility of Recombinant HVT vaccines and other MD vaccines*. Proc.76th Western Poultry Dis. Conf.Sacramento, 2009.
160. Smits W., 1977: *Gumboro disease: Significance and control*. Poultry Symposium in Denmark. January 25, 1977.
161. Snyder DB, Lana DP, Savage PK, Yancey FS, Mengel SA, Marquardt WW, 1988: *Differentiation of infectious bursal disease viruses directly from infected tissues with neutralizing monoclonal antibodies: evidence for a major antigenic shift in recent field isolates*. Avian Dis., 32, 535-539.
162. Snyder D.B., 1990: *Changes in the field status of infectious bursal disease virus- Guest Editorial*. Avian Pathol., 19, 419-423.
163. Snyder D.B., Yancey F.S., Savage P.K., 1992: *A monoclonal antibody-based agar gel precipitin test for antigenic assessment of infectious bursal disease viruses*. Avian Pathol., 21, 153-157.
164. Snyder D.B., Vakharia V.N., Savage P.K., 1992: *Naturally occurring-neutralizing monoclonal antibody escape variants define the epidemiology of infectious bursal disease viruses in the United States*. Arch.Virol., 127, 89-101.
165. Stewart C.C. and J.K.A. Nicholson, 2000: *Immunophenotyping*. Wiley- Liss, New York, p. 442.
166. Stuart J.C., 1989: *Acute infectious bursal disease in poultry*. Vet. Rec., 125(10), 281.
167. Sundick R., Albini B., Wick G., 1973: *Chicken Harder's gland: Evidence for a relatively pure bursa-dependant lymphoid cell population*. Cellular immunology 7, 332 – 335.
168. Tanimura N., Sharma J.M., 1997: *Appearance of T cells in the bursa of Fabricius and cecal tonsils during the acute phase of infectious bursal disease virus infection in chickens*. Avian Dis., 41, 638–645.
169. Tanimura N., Sharma J.M., 1998: *In situ apoptosis in chickens infected with infectious bursal disease virus*. Journal of Comparative Pathology, 118:1,15-27.
170. Thiry G., Paarni G., Nordgren R., Colau D., 1994: *Evaluation of safety and efficacy of vaccination of chickens with live recombinant fowlpox expressing infectious bursal disease virus antigens*. In Proc.First International Symposium on infectious bursal disease and chicken infectious anaemia, 21-24 June,

- Rauischholzhausen, Germany. WVPA, Giessen, 336-339.
171. Thornton Denise H., Pattison M., 1975: *Comparison of vaccines against infectious bursal disease*. Journal of Comparative Pathology 85, 587 – 610.
 172. Toivanen Auli, Toivanen P., 1987a: *Avian Immunology: Basis and Practice, Volume I*, CRC Press, inc, Boca Raton, Florida.
 173. Toivanen Auli, Toivanen P., 1987b: *Avian Immunology: Basis and Practice, Volume II*, CRC Press, inc, Boca Raton, Florida.
 174. Tsukamoto K., Saito S., Saeki S., Sato T., Tanimura N., Isobe T., Mase M., Imada T., Yuasa N., Yamaguchi S., 2002: *Complete, long-lasting protection against lethal infectious bursal disease virus challenge by a single vaccination with an avian herpesvirus vector expressing VP2 antigens*. Journal of Virology 76, 5637 – 5645.
 175. Vakharia VN, Snyder DB, Mengel-Whereat SA., 2000: *Chimeric infectious bursal disease virus Cdna clones, expression products and vaccines based thereon*. U.S. patent 6, 156,314.
 176. Vakharia V.N., 2003: *Development of Recombinant Vaccines Against IBDV in Chickens and IPNV in Fish*. Lecture, April 2003. Panum Institute
 177. Van den Berg T.P., 2000: *Acute infectious bursal disease in poultry. A review*. Avian pathol., 29, 175-193.
 178. Van den Berg T.P., Morales D., Muelemans G., 1997: *Use of a baculovirus expressed VP2 sub-unit protein for diagnosis and control of infectious bursal disease*. In book: 'XI th International Congress of the World Veterinary Poultry Association, Budapest, Hungary, 18-22 August, Pp: 57.
 179. Van den Berg T.P., Gonze M., Meulemans G., 1991: *Acute infectious bursal disease in poultry: isolation and characterization of a highly virulent strain*, Avian Pathology 20(1), 133 – 143.
 180. Van den Berg T.P., Muelemans G., 1991: *Acute infectious bursal disease in poultry: protection afforded by maternally derived antibodies and interference with live vaccination*. Avian pathol., 20(3), 409-421.
 181. Van Loon A.A., de Haas N., Zeyda I., Mundt E., 2002: *Alteration of aminoacids in VP2 of very virulent infectious bursal disease virus results in tissue culture adaptation and attenuation in chickens*. Journal of General Virology 83, 121 – 129.
 182. Vasconcelos A.C., Lam K.M., 1994: *Apoptosis induced by infectious bursal disease virus*. Journal of General Virology, 75, 1803-1806.
 183. Velhner Maja, Mitevski D., Potkonjak Dubravka, Stojanović Dragica, Kovačević Mira, Petrović T. and Aleksić-Kovačević Sanja, 2010: *Biological properties of a naturally attenuated infectious bursal disease virus isolated from a backyard chicken flock*. Acta Veterinaria Hungarica 58 (4), 499–509.
 184. Velhner Mirjana, Kosovac A., Babić M., 1980: *Gumboro bolest: Neke karakteristike pojavljivanja u Vojvodini i uticaj infekcije uzročnikom na postvakcinalni imunitet pilića protiv kokošije kuge*. Peradarstvo br. 5, str. 58 – 62.
 185. Velhner Mirjana, Kosovac A., Vasić N., Lukić J., 1976: *Gumboro bolest u*

- Vojvodini – izolacija i dokaz njegovog prisustva agar gel difuzionom metodom. In book: 'Živinarski dani 1976, Oteševo, 6-8 Oktobar, ' p:155-160.
186. Vervelde L., Davison T.F., 1997: *Comparison of the in situ changes in lymphoid cells during infection with infectious bursal disease virus in chickens of different ages.* Avian Pathology, 26:4, 803-821.
 187. Vindevogel H., Gouffaux M., Meulemans G., Duchatel J.P., Halen P., 1976: *Maladie de Gumboro: distribution et persistence du virus chez le poussin inocule. Etudes sur la transmission de la maladie.* Avian pathol., 5, 31-38.
 188. Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito T, Wang YH, Cao W, 2005: *Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus.* Nature, 436:1181–5.
 189. Weisman J., Hitchner S.B., 1978: *Virus neutralization versus agar-gel precipitin tests for detecting serological response to infectious bursal disease virus.* Avian Dis., 22, 598-603.
 190. Weiss E., Kaufer-Weiss I., 1994: *Pathology and pathogenesis of infectious bursal disease.* In book: 'International symposium on infectious bursal disease and chicken infectious anaemia, Rauischholchausen, Germany, 21-24 june, 1994,' p:116-118.
 191. Whitfill C.E., Haddad E.E., Ricks C.A., Skeeles J.K., Newberry L.A., Beasley J.N., Andrews P.D., Thoma J.A., Wakenell P.S., 1995: *Determination of optimum formulation of a novel infectious bursal disease virus (IBDV) vaccine constructed by mixing bursal disease antibody with IBDV.* Avian Diseases 39, 687 – 699.
 192. Williams C.J., Hopkins B.A., 2011: *Field evaluation of the accuracy of vaccine deposition by two different commercially available in ovo injection systems.* Poultry Science, 90, 223-226.
 193. Wilson TJ, Van de Water J, Mohr FC, 1992: *Avian scleroderma: evidence for qualitative and quantitative T cell defects.* J Autoimmun., 5, 261–276.
 194. Winterfield R.W., Adly A.M., Bickford A., 1972: *Infectivity and distribution of infectious bursal disease virus in the chicken. Persistence of the virus and lesions.* Avian Dis., 16, 622-632.
 195. Wu C.C., Rubinelli P., Lin T.L., 2007: *Molecular detection and differentiation of infectious bursal disease virus.* Avian Diseases 51, 515–526.
 196. Wyeth P.J., Chettle N.J., Mohepat A.R., 1992: *Use of an inactivated infectious bursal disease oil emulsion vaccine in commercial layer chicks.* Vet. Rec., 130, 30-32.
 197. Wyeth P.J., 1980: *Passively transferred immunity to IBD following live vaccination of parent chickens by two different routs.* Vet. Rec., 106, 289 –290.
 198. Wyeth P.J., Cullen G.A., 1979: *The use of an inactivated infectious bursal disease oil emulsion vaccine in commercial broiler parent chickens.* Vet. Rec., 104, 188-193.
 199. Wyeth P.J., Cullen G.A., 1978: *Transmission of immunity from inactivated infectious bursal disease oil emulsion vaccinated parent chickens to their chicks.* Vet. Rec., 102, 362-363.

200. Yao K., Goodwin M.A., Vakharia V.N., 1998: *Generation of a mutant infectious bursal disease virus that does not cause bursal lesions*. Journal of Virology, 72: 4, 2647-2654.
201. Yun CH, Lillehoj HS, Choi KD., 2000: *Eimeria tenella* infection induces local gamma interferon production and intestinal lymphocyte subpopulation changes. Infect Immun., 68:1282–1288.
202. Zekarias B, Ter Huurne AA, Landman WJ, 2002: *Immunological basis of differences in disease resistance in the chicken*. Vet Res., 33:109–125.
203. Zorman Rojs O, Krapež U, Slavec B, Juršič-Cizerl R, Poljanec T, 2011: *Field efficacy of different vaccines against Infectious bursal disease in broiler flocks*. Acta Vet Hung., 59, 3, 385-398.
204. Müller H., Mundt E., Eterradossi N., Islam MR., 2012: *Current status of vaccines against infectious bursal disease*. Avian Path., 41, 133-139.
205. Müller H., Scholtissek C., Becht H., 1979: *The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA*. Journal of Virology, 31, 584 – 589.
206. Müller H., Lange H., Becht H., 1986: *Formation, characterization and interfering capacity of a small plaque mutant and of incomplete virus particles of the infectious bursal disease virus (IBDV)*. Virus Research, 4, 297 – 309.
207. Müller H., Islam R., Raue R., 2003: *Research on infectious bursal disease – the past, the present and the future*. Veterinary Microbiology, 97, 153 – 165.

BIOGRAFIJA AUTORA

Miroljub D. Dačić je rođen 31. jula 1964. godine u Paraćinu. Osnovnu i srednju školu završio je u Paraćinu. Pripravnički staž obavio je u veterinarskoj stanici Paraćin u Paraćinu a stručni ispit je položio 1993. godine. Fakultet veterinarske medicine u Beogradu upisao je 1984. godine i diplomirao 1992. godine sa prosečnom ocenom 8.74. Specijalističke studije epizootiologije sa temom „Imunoprofilaksa živine na epizootiološkom području Kragujevac“, završio je novembra 1994. godine i stekao zvanje specijalista iz epizootiologije zaraznih i parazitskih bolesti. Magistarske studije je završio odbranom teze „Uticaj Gamboro bolesti na ekonomske gubitke u živinarstvu na epizootiološkom području Šumadije i Pomoravlja“ 19.05.2005. godine. Od oktobra 1993. godine zaposlen je u Veterinarskom specijalističkom institutu „Jagodina“ u Jagodini.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Miroљub D. Dačić

број уписа _____

Изјављујем


да је докторска дисертација под насловом

Imunski odgovor koka nosilja u odgoju nakon primene rekombinantne vektorske i živih modifikovanih vakcina protiv infektivne burzalne bolesti

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, 20.03.2018.

Потпис докторанда



Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Miroљub D. Dačić

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада **Imunski odgovor koka nosilja u odgoju nakon primene
rekombinantne vektorske i živih modifikovanih vakcina protiv infektivne burzalne
bolesti**

Ментор Prof. dr Radmila Resanović

Потписани Miroљub Dačić

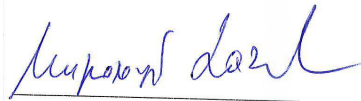
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 20.03.2018.

Потпис докторанда



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Imunski odgovor koka nosilja u odgoju nakon primene rekombinantne vektorske i živih modifikovanih vakcina protiv infektivne burzalne bolesti

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

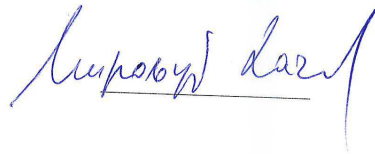
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 20.03.2018.

Потпис докторанда



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.