

LONGITUDINALNO PRAĆENJE TITRA SPECIFIČNIH PROTUTIJELA NA VIRUS NEWCASTLESKE BOLESTI U SERUMU KOKOŠI NESILICA NAKON PROVEDENOG PROGRAMA IMUNOPROFILAKSE

Meštrović, Nika

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:716267>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -](#)
[Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Nika Meštrović

**LONGITUDINALNO PRAĆENJE TITRA SPECIFIČNIH PROTUTIJELA NA VIRUS
NEWCASTLESKE BOLESTI U SERUMU KOKOŠI NESILICA NAKON
PROVEDENOG PROGRAMA IMUNOPROFILAKSE**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

Sveučilište u Zagrebu
Veterinarski fakultet

Zavod za bolesti peradi s klinikom

Predstojnik zavoda: doc.dr.sc. Željko Gottstein

Mentor: doc.dr.sc. Željko Gottstein

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Izv. prof. dr. sc. Danijela Horvatek Tomić
2. Doc. dr. sc. Maja Lukač
3. Doc. dr. sc. Željko Gottstein

Zahvala

Zahvaljujem svojem mentoru doc.dr.sc Željku Gottstein, na pomoći, savjetima i podršci prilikom izrade diplomskog rada. Hvala Vam na strpljenju i razumijevanju .

Zahvaljujem svojim prijateljima i kolegama koji su mi bili veliki oslonac i motivacija tijekom studiranja i koji su mi uljepšali studentske dane.

Posebno hvala Dariji, na svim skriptama, savjetima, potpori i prijateljstvu.

I na kraju, najveće hvala mojoj obitelji na bezgraničnoj ljubavi i požrtvovanosti koju su mi pružili kako bih ostvarila svoje ciljeve. Hvala što ste vjerovali u mene.

Popis priloga

Slike

Slika 1. Virus newcastleske bolesti.....	2
Slika 2. Vrijednosti ELISA titra specifičnih protutijela za virus newcastleske bolesti na Farmi 1.....	14
Slika 3. Vrijednosti ELISA titra specifičnih protutijela za virus newcastleske bolesti na Farmi 2.....	16

Tablice

Tablica 1. Prikaz rezultata ELISA titra specifičnih protutijela za virus newcastleske bolesti na Farmi 1 sa srednjom vrijednosti, standardnom devijacijom (SD), indeksom cijepljenja (VI) i postotnim koeficijentom varijabilnosti (%CV) u jatima različite dobi.....	13
Tablica 2. Prikaz rezultata ELISA titra specifičnih protutijela za virus newcastleske bolesti na Farmi 2. sa srednjom vrijednosti, standardnom devijacijom (SD), indeksom cijepljenja (VI) i postotnim koeficijentom varijabilnosti (%CV) u jatima različite dobi.....	15

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA.....	2
2.1. Newcastleska bolest.....	2
2.1.1. Imunoprofilaksa.....	4
2.2. Imunosni sustav peradi.....	6
2.3. Urođena i stečena imunost.....	7
2.4. Određivanje titra protutijela za virus newcastleske bolesti.....	10
2.4.1. Inhibicija hemaglutinacije (IHA).....	10
2.4.2. Imunoenzimni test (ELISA).....	11
3. MATERIJALI I METODE.....	11
3.1. Imunoprofilaksa newcastleske bolesti u kokoši nesilica.....	11
3.2. Uzorci seruma korišteni u istraživanju.....	11
3.3. Pretraga seruma ELISA postupkom na titar specifičnih protutijela za virus newcastleske bolesti.....	11
4. REZULTATI.....	12
5. DISKUSIJA.....	17
6. ZAKLJUČCI.....	21
7. LITERATURA.....	22
8. SAŽETAK.....	30
9. SUMMARY.....	32
10. ŽIVOTOPIS.....	34

1. UVOD

Newcastleska bolest (NB) diljem svijeta predstavlja jednu od najznačajnijih virusnih zaraza peradi. Njen značaj nije samo u visokom pobolu i pomoru zaraženih jata već i u gospodarskim štetama koje nastaju zbog ograničene ili zabranjene trgovine iz područja i zemlja gdje se ova bolest javila (ALDOUS I ALEXANDER, 2001.). Zbog toga se ova bolest nalazi na listi A Međunarodnog ureda za epizootije (OIE) pa se i u Republici Hrvatskoj suzbija temeljem zakonskih odrednica (ANONYMOUS, 2019). Tim se mjerama prvenstveno naređuje da sva perad u ekstenzivnim uzgojima, te nojevi, golubovi i pernata divljač iz uzgoja, mora biti cijepljena protiv newcastleske bolesti dva puta godišnje cjevivom proizvedenim od soja La Sota, jednim od sljedećih postupaka primjene: pitkom vodom, okulonazalno ili raspršivanjem u skladu s uputom proizvođača cjeviva (ANONYMOUS., 2013.). Provođenjem specifične imunoprofilakse peradi pokušava se postići dovoljna razina specifičnih protutijela za virus newcastleske bolesti i time adekvatna zaštita koja sprječava izbijanje epizootija.

Humoralna imunost tj. titar specifičnih protutijela postignut imunoprofilaksom procjenjuje se imunoenzimnom probom (ELISA) ili inhibicijom hemaglutinacije (IHA) u serumu (KAPCZYNSKI i sur., 2013.; MILLER i KOCH, 2013.).

Zbog različitih načina primjene cjeviva i različitog učinka cjeviva na imunosni odgovor važno je pratiti varijacije titra protutijela cijepljene peradi kako bi se dobio uvid u postignute razine nakon različite vrste i postupaka primjene cjeviva u različitim dobnih kategorija lake pasmine kokoši.

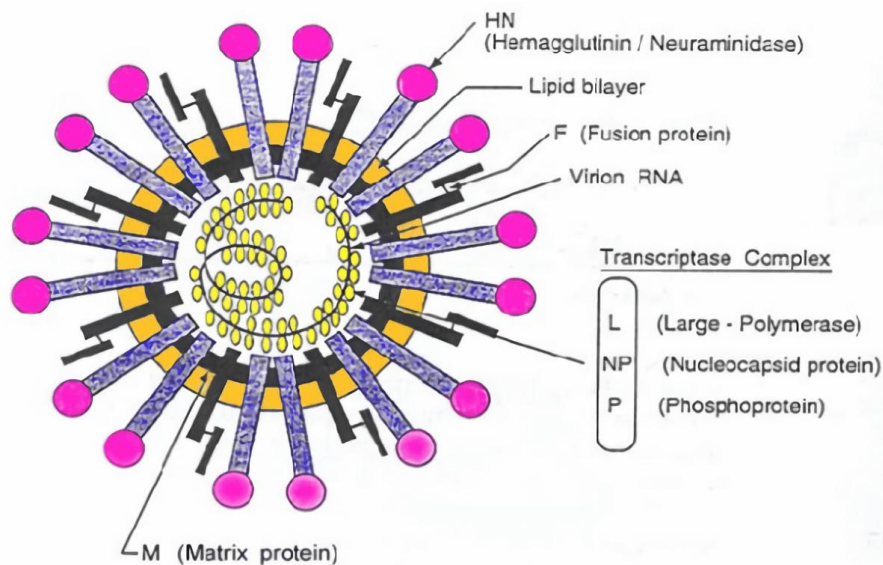
Cilj ovog diplomskog rada je analiza rezultata ELISA titra specifičnih protutijela na virus newcastleske bolesti nakon provedenog programa imunoprofilakse kako bi dobili prikaz dinamike titra longitudinalno u nekoliko uzastopnih i paralelnih jata na dvije velike farme kokoši nesilica lake pasmine.

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. Newcastleska bolest

Newcastleska bolest je izrazito zarazna bolest ptica i domaće peradi. Uzročnik je ptičji RNA *Orthoavulavirus* 1, poznat kao virus newcastleske bolesti (VNB), rod *Orthoavulavirus*, podporodica *Avulavirinae*, porodica *Paramyxoviridae* (ICTV, 2019.).

Virus newcastleske bolesti je pleomorfnog oblika, no može se doimati okruglo sa dijametrom od 100 do 500 nm (ALEXANDER, 2009.). Ima dvoslojnu lipidnu ovojniciu na čijoj površini se nalaze virusni hemaglutinin/neuraminidaza (HN) i fuzijski (F) proteini, odgovorni za njegovu patogenost (LAMB i PARKS, 2007.; MEULEMANS i sur., 2002.). Nukleokapsida proteina oblika je riblje kosti i povezana je s nukleoproteinom (NP) i fosfoproteinom (P) (MAST i DEMEESTERE, 2009.) .



Slika 1. : Virus newcastleske bolesti

(Izvor:<https://www.creative-biolabs.com/vaccine/vaccines-for-newcastle-disease-virus.htm>)

Od newcastleske bolesti obolijevaju brojne vrste ptica te sva domaća perad bez obzira na dob. Klinički obole kokoš, puran i golub, rijetko patke kod kojih može izazvati pad nesivosti i smanjenu oplodnju jaja. Uzročni virus razlikuje se u patogenosti sojeva i tropizmu pa su i klinički oblici veoma različiti (MAZIJA, 2012.).

Definirano je pet podtipova virusa newcastleske bolesti s obzirom na kliničko očitovanje i tropizam : 1. asimptomatski crijevni, 2. lentogeni - slabo patogen, 3. mezogeni - srednjeg stupnja patogenosti, 4. velogeni viscerotropni - jako patogeni sojevi sa simptomima hemoragičnog enteritisa te 5. velogeni neurotopni - jako patogeni sojevi sa simptomima od strane dišnog i živčanog sustava. Newcastleska bolest može biti uzrokovana infekcijom samo virulentnim (velogenim i mezogenim) sojevima (ANONYMOUS, 2012.).

Najvažniji način širenja virusa je seobom divljih ptica, pernate divljači i golubova. Prijenos virusa je isključivo horizontalni, najčešće aerosolom kontaminiranim virusom. Virus također može prodrijeti kroz ljusku jajeta i zaraziti zametak, što za posljedicu ima zaražavanje i uginuće zametka uslijed čega nema vertikalnog prijenosa zaraze (MAZIJA, 2012.). Glavna ulazna vrata virusa su sluznice dišnog i probavnog sustava. Zaražene ptice virus izlučuju izdahnutim zrakom, respiratornim iscjetkom i izmetom tijekom stadija inkubacije, kliničke manifestacije i kratkoročno tijekom rekonvalescencije (MILLER, 2014.).

Sumnja na newcastlesku bolest se postavlja na temelju nalaza naglog povećanog uginuća, znakova općeg infekcijskog sindroma, pada ili prestanka nesivosti i jaja loše kvalitete ljuske u cijepjenih nesilica, zelenog proljeva, otečene očne spojnice, podbratka i krijeste, dišnih i živčanih simptoma (MILLER i KOCH, 2013.).

Dijagnostika bolesti se temelji na kliničkim znakovima, patoanatomskom nalazu i dokazu porasta titra protutijela. Potvrđuje se izdvajanjem virusa nakon inokulacije kokošjih zametaka, dokazom serološkim probama kao što su IHA, ELISA i VN test (MAZIJA, 2012.). No, osnova dijagnostike i tipizacije virusa su molekularne metode poput PCR-a i Real Time PCR-a nakon čega se sekvenciranjem specifično namnoženog odsječka virusnog genoma izdvojeni soj može detaljno tipizirati (WANG i sur., 2001.).

Liječenje se ne provodi već se kod izbijanja bolesti provodi neškodljivo uklanjanje (“stamping out”), a prevencija pojave bolesti se temelji na provođenju biosigurnosnih mjera i imunoprofilakse (MAZIJA, 2012).

2.1.1. Imunoprofilaksa

Cijepljenje se u peradarstvu danas provodi s ciljem specifične zaštite peradi koristeći uglavnom živi, atenuirani, apatogeni soj virusa (HITCHNER i JOHANSON, 1948.), inaktivirani virus i njegove imunogene determinante (BANKOWSKI, 1957.; HANSON i surr.,1951.; HOFSTAD, 1955.; ROTT 1979.), ili rekombinantno, vektorsko cjepivo (MEULEMANS, 1988.). Većina zemalja provodi cijepljenje u svrhu kontrole newcastleske bolesti (ANONYMOUS, 1992.; 2013.). Cijepljenje protiv NB obvezatno je na cijelom teritoriju RH. Sva perad u ekstenzivnim uzgojima mora biti cijepljena dva puta godišnje protiv NB u razmaku od najmanje 4 mjeseca. Cijepi se vodom za piće, okulonazalno ili raspršivanjem. Perad u intenzivnom uzgoju mora biti cijepljena protiv NB tako da bude stalno imuna. U Hrvatskoj se za cijepljenje protiv NB u ekstenzivnim uzgojima peradi smije koristiti samo cjepivo proizvedeno od soja La Sota a kod intenzivnog uzgoja peradi cijepni soj nije propisan, ali cjepivo mora osigurati adekvatnu imunost (ANONYMOUS, 2020.).

Programi cijepljenja koji se koriste ovise o prisutnim materalnim protutijelima, učestalosti pojave i patogenosti terenskog soja, provedbi biosigurnosti, vrsti cjepiva koje se koristi i njegovim interakcijama s drugim cjepivima koja se koriste (WINTERFIELD, 1984.). Tri su glavna cilja cijepljenja peradi protiv newcastleske bolesti: 1.) smanjenje ili sprječavanje kliničke manifestacije bolesti; 2.) smanjenje količine izlučenog virulentnog virusa; i 3.) povećanje infektivne doze virusa (KAPCZYNSKI i sur., 2013.). Te ciljeve je teško postići s obzirom na to da trajanje imunosti peradi varira ovisno o korištenom cjepivu, imunitetu domaćina u trenutku cijepljenja i o imunogenosti cjepiva (ALEXANDER.,2003., WESTBURY i surr 1984.) . Potrebno je višestruko izlaganje živim atenuiranim cjepivima ili korištenje kombinacije atenuiranog i inaktiviranog cjepiva da bi se perad adekvatno zaštitila protiv cirkulirajućeg terenskog soja virusa (SENNE i sur., 2004.).

Najčešći sojevi koji se koriste ucjepivima za imunoprofilaksu NB su B1 i LaSota, proizvedeni od živih lentogenih sojeva virusa (ALEXANDER., 2003.). Korištenjem cjepiva od soja LaSota i njenog klona Clone 30 potiče se i lokalna imunost na sluznicama i sistemska imunost (BORLAND i ALLAN., 1980.). Glavne razlike između tih cjepiva su tropizam i sposobnost replikacije u pilića, koja je najveća kod soja LaSota što rezultira većom razinom neutralizirajućih protutijela (MEULEMANS, 1988). Stoga se soj LaSota gotovo uvijek koristi u zemljama u kojima je bolest endemska (DIEL i sur., 2012.). Živa cjepiva se najčešće ne apliciraju pojedinačno već na velikom broju peradi istovremeno. Razlog tome je da proces cijepjenja bude što brži i jeftiniji (Senne i sur., 2014). Nažalost, uvjeti držanja peradi često nisu idealni za takav način aplikacije cjepiva pa masovna distribucija obično pokrije samo 53% jata kada se koristi raspršivanje i 60% kada se cjepivo aplicira vodom (DEGEFA i sur., 2004.).

Osim živih atenuiranih cjepiva koriste se i inaktivirana u obliku uljnih adjuvansa. Apliciraju se parenteralno u mišić ili pod kožu te se moraju aplicirati pojedinačno, naravno uz višu cijenu proizvodnje (CHIMENO ZOTH i sur., 2008.). Ona se najčešće koriste za revakcinaciju peradi kod dužeg tijeka proizvodnje, kao što su rasplodne kokoši i nesilice. Obično se apliciraju nakon prvotnog cijepjenja atenuiranim cjepivima, a mogu se koristiti i samostalno kada je korištenje živih cjepiva kontraindicirano. Smatralo se da inaktivirana cjepiva ne potiču imunost na sluznicama, no istraživanja su potvrdila da i živa i inaktivirana cjepiva potiču tvorbu antitijela ne samo u serumu nego i u trahealnim i intestinalnim sluznicama (CHIMENO ZOTH i sur., 2008.). Ipak, razina potaknute stanične imunosti nakon inaktiviranih cjepiva je slaba. Učestalost revakcinacije ovisi o izloženosti i virulenciji terenskog soja (MILLER, 2014.).

Primjer imunoprofilakse kokoši nesilica:

Kokoši nesilice se cijepe prvi dan života u valionici atenuiranim cjepivom, najčešće raspršivačem. Booster doza se daje u dobi od 10-12 dana živim cjepivom. Dodatno cijepjenje se vrši s 5-6 tjedana te s 14-16 tjedana starosti s atenuiranim cjepivom a zatim s 20 tjedana starosti s inaktiviranim cjepivom (GALLILI i BEN-NATHAN, 1998).

Cilj imunoprofilakse je postizanje visoke razine humoralne i stanične imunosti peradi. Njena uspješnost uvelike ovisi o poštivanju biosigurnosnih mjera u jatima čime

se sprječava ulazak virusa u jato prije nego što se razvije adekvatna imunost. Osim toga, uspješnost cijepljenja ovisi i o tome da je barem 85% jedinki iz jata dobilo pravilnu dozu cjepiva i reagiralo razvojem adekvatnog imunosnog odgovora da bi se postigao imunitet krda (VAN BOVEN i sur., 2008).

2.2. Imunosni sustav peradi

Najznačajnija uloga imunosnog sustava je njegova sposobnost prepoznavanja stranih molekula tzv. antigena od strane različitih vrsta imunokompetentnih stanica (HAMMER, 1974.). Timus, Fabricijeva burza i koštana srž primarni su limfoidni organi ptica, dok su slezena, limfoidna tkiva povezana sa sluznicom (MALT), zametni centri i difuzna limfoidna tkiva sekundarni limfoidni organi. Ptice nemaju limfne čvorove, no organi slične funkcije su opisani u gusaka i labudova. Timus, u kojem se razvijaju T stanice, nalazi se obostrano na vratu ptica i sastoji se od 5 do 7 režnjeva. Fabricijeva burza je organ jedinstven za ptice i jedino je mjesto za diferencijaciju i sazrijevanje B stanica. Smješten dorzalno od kloake s kojom je povezan kanalom, ovaj organ služi razvoju matičnih stanica koje u njega pristižu tijekom embrionalnog razvoja i vrlo je aktivan kod mladih ptica, ali postupno atrofira nakon šest mjeseci (RATCLIFFE, 2005.). Bronhalno limfoidno tkivo (BALT) i limfoidno tkivo crijeva (GALT) nalaze se duž sluznice bronha odnosno crijeva (MASTELLER, 1996.). Važnu ulogu u dišnom sustavu ptica imaju heterofili kao važan dio imuniteta ptica. Unutar glave nalazi se limfoidno tkivo glave (HALT) lokalizirano u organima Harderovoj žlijezdi, suznoj žlijezdi i drugim strukturama u području glave (RATCLIFFE, 2005.) Harderova žlijezda nalazi se iza očnih jabučica i glavna je komponenta HALT -a. Sadrži veliki broj plazma stanica i glavno je tkivo za produkciju antitijela koja se izlučuju u području glave (MOBINI, 2012.) .

Bubrezi, jajnici, štitnjača, jetra, hipofiza, gušterača također sadrže limfoidne stanice. U neposrednoj blizini tih imfoidnih stanica nalaze se tkivni makrofagi. Tako je čitav organizam zaštićen isprepletenom mrežom sastavnica imunosnog sustava (SHARMA i RAUTENSCHLEIN, 2013.).

2.3. Urođena i stečena imunost

Urođena imunost peradi sastoji se od fizikalnih i kemijskih barijera te od stanica kao što su makrofagi, prirodno ubilačke stanice (NK cells), proteini sustava komplemenata i medijatori upale te citokini (KAPCZYNSKY i sur., 2013.). Urođeni imunosni odgovor započinje nakon prepoznavanja antigena pomoću receptora za prepoznavanje obrazaca (Patern Recognition Receptors - PRR) koji se nalaze na vanjskoj membrani ili citoplazmi imunoloških stanica domaćina (AKIRA i sur., 2001.; AKIRA, 2009.). PRR prepoznaje molekularne obrasce svojstvene patogenu (PAMPs) i tako pokreće unutarstanične signalne putove koji vode do inicijacije efektorskih molekula, uključujući kemokine, citokine i obrambene peptide domaćina (HDP) (ALEXOPOULOU i sur., 2001; SCHOGGINS i sur., 2011.), koji pak, koordiniraju imunološke odgovore posredovane stanicama i antitijelima doprinoseći uklanjanju patogena (PALM i MEDZHITOV, 2009; DAR i sur., 2015.). Stanice urođenog imunosnog odgovora imaju sposobnost prepoznavanja mnogih različitih patogena te započinju zaustavljanje i eliminaciju infekcije kroz nekoliko minuta i sati od prve ekspozicije (KUMAR i sur., 2011.) Za razliku od urođene imunosti, svaka pojedina stanica stečene imunosti (T i B limfociti) može prepoznati jedan specifičan dio patogena i moraju proći kroz klonsku ekspanziju prije nego što započnu svoju efektornu funkciju (ABBAS i sur., 2014.) .

Stečena imunost peradi je podijeljena na humoralnu i staničnu imunost (BUTCHER i MILES, 2019.) .

Humoralni imunosni odgovor temelji se na djelovanju slobodnih ili humoralnih antitijela. Njih tvore plazma-stanice koje nastaju od B limfocita. Svaki B limfocit specifičan je samo za određeni antigen, odnosno antigensku determinantu koju prepoznaje pomoću površinskih imunoglobulina (NAGLIĆ i HAJSIG, 1993.; ZEKARIAS i sur., 2002.). Postoje tri klase imunoglobulina koja nastaju kod peradi nakon izlaganja organizma nekom antigenu : IgM, IgY (IgG) i IgA. IgM se javlja u serumu 4-5 dana nakon kontakta s antigenom i nestaje za 10-12 dana. IgY se javlja nakon 5 dana s najvišom koncentracijom 3 tjedna nakon ekspozicije, nakon čega mu koncentracija polagano pada. IgY je bitan imunoglobulin kod peradi i mjeri se s većinom seroloških testova. Stoga, ako nas zanima titar IgY protutijela nakon cijepljenja peradi, serum se treba uzeti 3 tjedna nakon

cijepljenja za što bolju interpretaciju testa s obzirom na to da se titar do tada još povisuje. IgA se javlja 5 dana nakon izlaganja antigenu, i taj imunoglobulin se primarno nalazi u sekretima sluznica očiju, crijeva i respiratornog trakta. On služi za lokalnu zaštitu tih tkiva i smatra se bitnim za zaštitu peradi od virusa newcastleske bolesti na tim mjestima (BUTCHER i MILES, 2019.) IgA se koristi za procjenu lokalne imunosti nakon cijepljenja (AL-GARIB i sur., 2003.). Antitijela nemaju sposobnost ubijanja virusa ili bakterije izravno već se vežu za strani mikroorganizam stvarajući antigen-antitijelo kompleks blokirajući njihove receptore. Tako sprječavaju prihvaćanje virusa ili bakterije za receptore njihovih ciljnih stanica (BUTCHER i MILES, 2019.). Antitijela su najefikasnija u eliminaciji izvanstaničnih mikroorganizama no kada antigen prodre u stanicu humoralni imunosni odgovor nije dovoljan da ga eliminira. U toj situaciji, stanični imunosni odgovor dovodi do destrukcije antigena unutar stanice ili same zaražene stanice i tog antigena (ABBAS i sur., 2000.).

Stanični imunosni odgovor kod peradi, ljudi i sisavaca predstavljaju T limfociti (CHEN i sur., 1991). Svi T limfociti izražavaju površinski T-stanični receptor (T-cell receptor TCR) kojim imaju sposobnost prepoznati veliki broj različitih antigena. Postoje različite vrste T limfocita koje se prepoznaju po njihovim funkcijama i površinskim markerima. T limfociti uvijek izražavaju CD3 komplekse zajedno sa TCR molekulama, neovisno o tome koji TCR imaju izražen i antigenskoj specifičnosti TCR-a. Stoga, prisutnost CD3 na stanici označava da je ta stanica T limfocit. T limfociti koji imaju primarno regulatornu ulogu u stečenom imunosnom odgovoru se nazivaju T pomoćničke stanice (T helper cells - Th) i obično izražavaju i CD4 na svojoj površini (CHEN i sur., 1991.). CD4+ T pomoćničke stanice imaju ključnu ulogu u imunosnom sustavu (ARSTILA i sur., 1994) lučeći citokine i šaljući signale stanicama urođenog i stečenog imunosnog sustava. (ABBAS i sur., 2000). Osim T pomoćničkih stanica bitni su i citotoksični CD8+ T limfociti. Ovi limfociti će ubiti ciljne stanice poput stanica zaraženih virusom i neoplastičnih stanica koje sadrže endogeni antigen (ABBAS i sur., 2000.) Stanična imunost se može mjeriti proliferacijom limfocita ili proizvodnjom citokina nakon in vitro stimulacije antigenom (LAMBRECHT i sur., 2004.).

Imunosni odgovor na infekciju i cijepljenje virusom newcastleske bolesti

Prodiranje VNB-a u sluznice dišnog i probavnog sustava aktivira urođeni imunوسي odgovor te na tim mjestima dolazi do infiltracije epitela limfocitima, makrofagima i heterofilima (AL-GARIB i sur., 2003.). Nakon 6 sati od izlaganja vVNB splenociti proizvode IFN- α i IFN- β te interleukin 6 (IL-6) (RUE i sur., 2011.) IFN γ kojeg luče NK stanice i T limfociti aktivira makrofage i potiču staničnu imunost dan nakon infekcije. (DEGEN i sur., 2005.; LOWENTHALL i surr., 1995.). Sami urođeni imunوسي odgovor nije dovoljan da osigura preživljavanje domaćina nakon izlaganja vVNB-u. Nakon što virus nadiđe urođeni imunوسي odgovor, pokreću se stanični (REYNOLDS i MARAQA, 2000.a; LAMBRECHT i sur., 2004.) i humoralni odgovor. T-limfociti se diferenciraju u timusu proizvodeći stanice koje su sposobne brzo proliferirati nakon ponovnog izlaganja antigenu (LAMBRECHT i sur., 2004.). Stanična imunost potaknuta staničnim odgovorom tipa 1 (Th1-limfociti), koju karakterizira proizvodnja IFN- γ od strane makrofaga, može se detektirati tri dana nakon imunizacije živim cjepivom protiv NB-a (ANONYMOUS., 1992.), time odašilje signale za razvoj humoralnog odgovora. Makrofagi također potiču proizvodnju dušičnog oksida (NO) (SCHRODER, 2004.), te je količina proizvedenog NO povišena u ptica s višim titrom protutijela, ukazujući na povezanost stanične i humoralne imunosti (GUIMARAES, 2011.). Stanična imunost također nije dostatna da samostalno osigura preživljavanje domaćina nakon izlaganja vVNB-u (REYNOLDS i MARAQA, 2000.a). No, velika proizvodnja IFN- γ za vrijeme replikacije vNDVa u domaćinu smanjuje mortalitet i morbiditet (SUSTA i surr., 2013.). Nakon izlaganja VNB-u, B-limfociti se diferenciraju u plazma stanice koje luče sva tri tipa neutralizacijskih protutijela specifičnih za antigen (LAMBRECHT i sur., 2004.). Stvorena neutralizacijska protutijela za HN i/ili F glikoprotein vežu se za NB virion i sprječavaju njegovo vezanje za stanice domaćina, što smanjuje replikaciju virusa (TAYLOR i sur., 1990; LOKE i sur., 2005.).

Okolišni čimbenici, hranidba, stres, bakterijske superinfekcije i imunosupresivni virusi mogu uzrokovati imunosupresiju (GELB i sur.,2007.;HOERR.,2010.). Ako je Fabricijeva burza atrofirala zbog djelovanja virusa zarazne bolesti burze, imunوسي

odgovor prema bilo kojem primijenjenom cjepivu bit će smanjen (RAUTENSCLEIN i sur., 2007.) .

2.4. Određivanje titra protutijela za virus newcastleske bolesti

Uspješnost cijepljenja najčešće se provjerava dokazom porasta titra specifičnih protutijela, odnosno praćenjem humoralnog imunog odgovora nekoliko tjedana nakon cijepljenja (BALENOVIĆ, 2009.).

Titri protutijela protiv VNB mogu varirati ovisno o načinu aplikacije cjepiva i vrsti cjepiva koja se koristi (BANU., 2010.). Također mogu varirati kod različitih pasmina ili spolova kokoši zbog razlika u brzini metabolizma ili stresa izazvanog početkom nesenja (FRANKEN., 2004., OKWOR i EZE., 2013.).

Za potpunu kontrolu bolesti potrebno je tijekom cijeloga tehnološkog života jata provjeravati imunost serološkim probama, poput inhibicije hemaglutinacije (IHA), pri čemu je zadovoljavajući titar 1:40 ili viši u 90% pretraženih životinja. Kontrola imunosti provodi se najmanje tri tjedna nakon provedenog cijepljenja, dok je prije provedbe kontrole imunosti potrebno provjeriti datum cijepljenja (ANONYMOUS., 2013.).

Humoralna imunost tj. titar protutijela postignut cijepljenjem procjenjuje se imunoenzimnom probom (ELISA) ili inhibicijom hemaglutinacije (IHA) u serumu (KAPCZYNSKI i sur., 2013.; MILLER i KOCH, 2013.).

2.4.1 Inhibicija hemaglutinacije (IHA)

Svi sojevi VNB-a aglutiniraju eritrocite peradi. Ta aglutinacija je posljedica vezanja H/N proteina VNB-a za membrane eritrocita i naziva se hemaglutinacija (GRIMES, 2002.). IHA test se temelji na inhibiciji aglutinacije eritrocita u prisutnosti specifičnih protutijela na VNB u serumu (ALLAN i GOUGH, 1974.). Dodavanjem 4 HAJ virusa u mikrotitracijske plitice s različitim razrjeđenjima seruma može se pratiti izostanak aglutinacije eritrocita tj. inhibicija hemaglutinacije. IHA titar protutijela je najveće razrjeđenje seruma koji izaziva potpunu inhibiciju 4HAJ virusa (ANONYMOUS., 2021.).

2.4.2 Imunoenzimni test (ELISA)

Dostupni su različiti komercijalni ELISA kitovi. Oni se temelje na nekoliko različitih strategija za otkrivanje NDV antitijela, uključujući neizravnu, sendvič i blokirajuću ili konkurentnu ELISA–u. Ovisno o tipu ELISA testa koji se koristi mogu se otkriti protutijela na sve proteine VNB, dok je IHA test ograničen na antitijela usmjerena protiv HN proteina. Zbog toga ELISA pokazuje veću specifičnost i osjetljivost od IHA testa te daje više pozitivnih rezultata kod provjere cijepjenja (TABIDI i surr.,2004.; KOKATE i sur.,2017.). Također, usporedne studije su pokazale da su ELISA testovi reproducibilni i da imaju visoku osjetljivost i specifičnost te da dobro koreliraju s IHA testom (BROWN i sur., 1990). Nedostatak komercijalnih ELISA testova je što su vrsno specifični za domaćina (ANONYMOUS., 2021.).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Imunoprofilaksa newcastleske bolesti u kokoši nesilica

Imunoprofilaksa newcastleske bolesti kokoši nesilica na praćenim farmama sastoji se od višekratne primjene živog atenuiranog cjepiva, prvo primijenjenog postupkom raspršivanja pilićima u valionici, a potom u dva navrata putem pitke vode u 4. i 9. tjednu, najčešće koristeći soj La Sota. Nakon toga u dobi 17-19 tjedana, a neposredno prije premještaja u proizvodne objekte, koristi se viševaljano inaktivirano cjepivo koje se primjenjuje i.m. ili s.c.

3.2. Uzorci seruma korišteni u istraživanju

Za istraživanje su korišteni rezultati dobiveni od uzoraka seruma dostavljenog na kontrolu titra protutijela nakon provedene imunoprofilakse na farmama. Uzorci seruma dobiveni su vađenjem krvi iz krilne ili jugulane vene. Nakon koagulacije i retrakcije ugruška odvojen je serum centrifugiranjem i pohranjen na – 20 °C do pretrage.

3.3. Pretraga seruma ELISA postupkom na titar specifičnih protutijela za virus newcastleske bolesti

Za dokaz titra specifičnih protutijela na virus newcastleske bolesti korišten je komercijalni ND ELISA kit (Biocheck, Nizozemska) prema uputama proizvođača. Nakon inkubacije seruma i ispiranja na mikrotitarskoj pločici, očitana je optička gustoća pri 405 nm na

spektrofotometru μ Quant (Bio-Tek Instruments, SAD), na temelju čega je izračunat titar pojedinog seruma.

Prema uputama proizvođača izračunat je postotni koeficijent varijacije (%CV) te indeks cijepjenja (VI), kao vrijednosti koje ukazuju na uspješnost imunoprofilakse.

$$\%CV = SD \times 100 / \text{Srednja vrijednost}$$

$$VI = \text{Srednja vrijednost} / \%CV$$

4. REZULTATI

Rezultati istraživanja su prikazani pojedinačno i kao srednja vrijednost titra specifičnih protutijela u određenom jatu uz standardnu devijaciju kao oznaku varijabilnosti titra. %CV je koeficijent varijabilnosti je specifičan pokazatelj koji prikazuje koliko titar specifičnih protutijela varira unutar jata. Što je CV niži to je titar uniformniji i bolji je imunosni odgovor u jatu i obrnuto. %CV < 40% je odličan, 40-60% je dobar , iznad 60% je potrebna korekcija. VI je indeks cijepjenja. Viši VI javlja se kod višeg titra specifičnih protutijela i nižeg %CV te time ukazuje na bolji imunosni odgovor u jatu i obrnuto (BLOCHECK, 2017.).

U tablici 1. navedeni su rezultati ELISA titra specifičnih protutijela za virus newcastleske bolesti na farmi 1, u 7 jata kokoši nesilica držana u različitim objektima, od čega je u 5 jata titar protutijela mjeren dva puta longitudinalno u razmaku od 7 tjedana. Jato u objektu VP starosti 77 tjedana ima srednju vrijednost titra protutijela od 9176 , CV 44% i VI 209 dok jato iste starosti u drugom objektu – VK ima veću srednju vrijednost titra protutijela 14341, CV 47%, VI 38. Jato u objektu K4 starosti od 69 tjedana ima srednju vrijednost titra protutijela 10895, CV 89%, VI 122. Jato iste starosti u objektu K5 je ima nižu srednju vrijednost titra protutijela 9306, CV 54%, VI 172. Oba ta jata su u starosti od 76 tjedana starosti imala nižu srednju vrijednost titra specifičnih protutijela i VI.

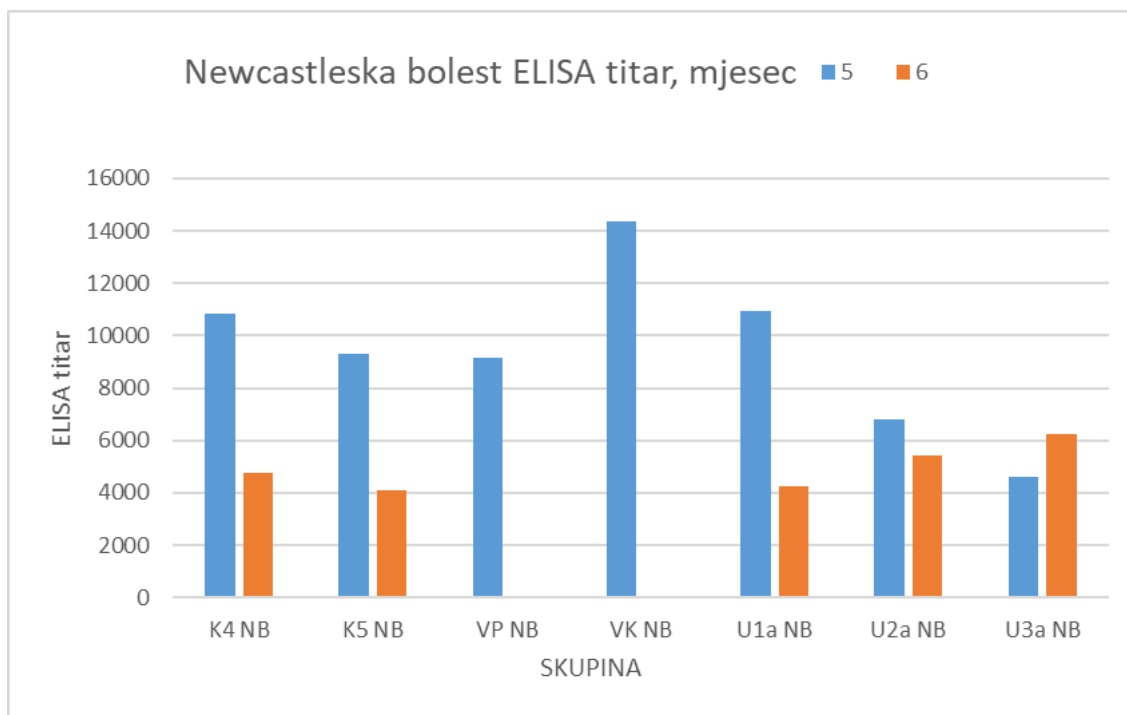
Mlađa jata u objektima U2a i U3a starosti 13 tjedana i ista ta jata u starosti od 20 tjedana imaju niži titar specifičnih protutijela i niži VI u odnosu na jata od 69 i 77 tjedana starosti. Jato U1a starosti 13 tjedana ima srednju vrijednost specifičnih titra protutijela 10931,

%CV 36 i VI 306 , te isto to jato s 20 tjedana starosti u drugom objektu (K2) ima niži titar specifičnih protutijela od 4255, %CV 74 i VI 57.

Tablica 1. Prikaz rezultata ELISA titra specifičnih protutijela za virus newcastleske bolesti na Farmi 1 sa srednjom vrijednosti, standardnom devijacijom (SD), indeksom cijepjenja (VI) i postotnim koeficijentom varijabilnosti (%CV) u jatima različite dobi.

OBJEKT	V-Prizemlje	V-Kat	K4	K5	U1a	U2a	U3a	K1 (U1a)	K2 (U2a)	K3(U3a)	K4	K5
DOB (tj.)	77	77	69	69	13	13	13	20	20	20	76	76
TITAR	14884	1557	19868	15273	2861	14652	5858	2117	4899	8329	6342	965
	13354	4096	2499	12877	12740	1912	3059	8789	2253	2157	6071	4313
	1912	18400	512	2328	13867	7927	5558	3713	7342	7038	1309	160
	10002	17608	3086	8910	7114	6336	2048	567	7690	6130	6167	1084
	8801	19137	4868	14242	13887	3264	4240	7773	7720	8528	2554	8650
	11067	18004	19349	10535	11668	7196	2560	3130	2419	8104	6309	2157
	4752	18762	23159	12754	12303	4253	1639	8333	6273	4627	5495	7104
	5414	16167	21179	9654	13006	11402	5182	1349	7021	3508	5644	8445
	10576	15334	3134	6322		4315	11122	2524	3253	7919	3157	
	10999			171								
SREDNJA VRIJEDNOST	9176	14341	10850	9306	10931	6806	4585	4255	5430	6260	4783	4110
SD	4031	6669	9643	5027	3911	4085	2901	3177	2276	2326	1912	3523
VI	209	308	122	172	306	113	72	57	130	168	120	48
%CV	44	47	89	54	36	60	63	75	42	37	40	86

Na slici 2. su prikazane vrijednosti ELISA titra specifičnih protutijela za virus newcastleske bolesti na farmi 1 iz kojih se vidi da jato VK ima najviši titar protutijela u odnosu na ostala jata dok U3a jato ima najniži. Također se vidi da su sve vrijednosti titra specifičnih protutijela u 5. mjesecu više od vrijednosti dobivenih u 6. mjesecu, izuzev U3a jata kojem je titar bio viši u 6. mjesecu u odnosu na 5. mjesec. U 6. mjesecu je jato iz objekta U3a imalo najviši titar specifičnih protutijela u odnosu na ostala jata, dok je jato iz objekta K5 imalo najniži.



Slika 2. Vrijednosti ELISA titra specifičnih protutijela za virus newcastleske bolesti na Farmi 1.

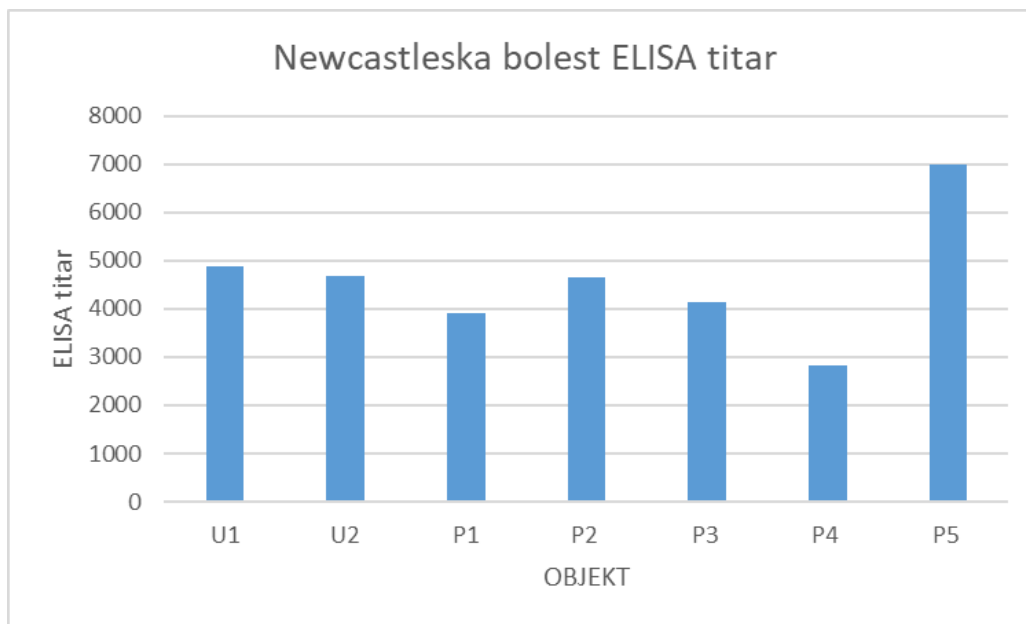
U tablici 2. su prikazani rezultati ELISA titra specifičnih protutijela za virus newcastleske bolesti na farmi 2. Prikazane su vrijednosti titra za 7 jata s njihovim srednjim vrijednostima specifičnog titra protutijela, standardnom devijacijom (SD), koeficijentom varijabilnosti (%CV) i indeksom cijepljenja (VI).

U tablici se vidi da jato iz objekta U1 starosti 17 tjedana ima srednju vrijednost titra protutijela 488, %CV 44 i VI 209. Jato iste starosti u objektu U2 ima približno iste vrijednosti. Jato u objektu P1 starosti 22 tjedana ima srednju vrijednost titra protutijela 3915, %CV 89, IV 122, dok jato iste starosti u objektu P5 ima srednju vrijednost titra protutijela 7007 te %CV 63 i VI 72. Jato u objektu P3 starosti 53 tjedana ima srednju vrijednost titra protutijela 4139, %CV 36 i VI 306, pri čemu jato iste starosti u objektu P4 ima srednju vrijednost titra protutijela 2835, %CV 60 i VI 113. Jato u objektu P2 starosti 70 tjedana ima srednju vrijednost titra protutijela 4662, %CV 54 i VI 172.

Tablica 2. Prikaz rezultata ELISA titra specifičnih protutijela za virus newcastleske bolesti na Farmi 2. sa srednjom vrijednosti, standardnom devijacijom (SD), indeksom cijepjenja (VI) i postotnim koeficijentom varijabilnosti (%CV) u jatima različite dobi.

OBJEKT	U1	U2	P1	P2	P3	P4	P5
DOB (tj.)	17	17	22	70	53	53	22
TITAR	2772	1536	1428	7750	5253	1495	8253
	7572	4308	8640	1521	6243	1349	7650
	2765	5817	1591	4475	6657	395	4981
	4731	3468	2435	6054	3832	233	7654
	9688	7066	5945	101	6342	2498	7455
	3059	6868	1919	6174	3081	332	7637
	5325	1966	2101	6356	356	8177	7280
	4158	5018	7260	4862	1346	8203	5144
	4131	3878					
4677	6752						
SREDNJA VRIJEDNOST	4888	4668	3915	4662	4139	2835	7007
SD	2210	1991	2896	2601	2396	3390	1232
VI	209	308	122	172	306	113	72
%CV	44	47	89	54	36	60	63

Na slici 3. su prikazane vrijednosti ELISA titra specifičnih protutijela za virus newcastleske bolesti na farmi 2 iz kojih je vidljivo da se titar u sedam jata kreće u rasponu od 2800 do 7000, pri čemu jato iz objekta p5 ima najviši titar specifičnih protutijela u odnosu na ostala jata, dok jato iz objekta P4 ima najniži.



Slika 3. Vrijednosti ELISA titra specifičnih protutijela za virus newcastleske bolesti na Farmi 2.

5. DISKUSIJA

Newcastleska bolest je jedna od najznačajnijih bolesti peradi. Njen značaj je u velikom pobolu i pomoru oboljele peradi i posljedično velikoj gospodarskoj šteti koja nastaje. Iz tog razloga većina zemalja ima propisane programe imunoprofilakse kako bi se smanjilo izbijanje ove bolesti na minimum. Cilj imunoprofilakse je postizanje odgovarajuće razine humoralne i stanične imunosti cijepljene peradi kako bi se suzbila pojava kliničke bolesti te lučenje i širenje virusa kroz jato i na druge farme. Provjerom razine nastale humoralne

imunosti tj. titra specifičnih protutijela ELISA testom može se dobiti okvirna slika o zaštićenosti cijepljenih jata. S obzirom na to da imunosni odgovor koji nastaje nakon cijepjenja ovisi o različitim čimbenicima kao što su vrsta cjepiva, način primjene cjepiva, terenskom divljem soju virusu, uvjetima držanja peradi itd., sam titar specifičnih protutijela varira između peradi u pojedinim jatima i između jata međusobno. U ovom radu analizirani su rezultati ELISA testa u svrhu praćenja dinamike titra protutijela kroz dvije farme kokoši nesilica koje provode vlastiti uzgoj.

U istraživanju je pretraživan titar specifičnih protutijela za 19 jata peradi različite dobi na dvije farme komercijalnim ND ELISA kitom.

Iz priloženih rezultata u radu primijećuje se da na farmi broj 1 raspon titara između jata varira od najnižeg koji iznosi 4110 do najvišeg koji iznosi 14341. Niži titri većinom pripadaju mlađim jatima u dobi od 13 tjedana. Ti titri se smatraju zadovoljavajućim s obzirom na to da su ta jata primila samo živo cjepivo koje se uobičajeno kreće od 2000 do 8000 (BIOCHEK, 2017.). Istim tim jatima je ponovno izmjeren titar s 20 tjedana starosti nakon aplikacije inaktiviranog cjepiva te nije zabilježen značajan porast titra specifičnih protutijela. Štoviše, jatu u objektu U1a je titar specifičnih protutijela manji za više od 50% nakon prvotno visokog titra. Treba uzet u obzir da bi razlog tome mogao biti nepravilno uzimanje uzoraka. Nadalje postoji vjerojatnost da bi se vrijednosti tih titara s vremenom povećale. Starija jata su u prosjeku imala veći titar specifičnih protutijela što se podudara s činjenicom da bi titar trebao biti veći nakon primjene inaktiviranog cjepiva. Unatoč tome titari protutijela većine starijih jata su ispod preporučenih vrijednosti od 10000 do 25000 (BIOCHEK, 2017.), te samo dva jata imaju zadovoljavajuć titar specifičnih protutijela. Kod jata K4 i K5 od dobi 69 tjedana do 76 tjedana dolazi do pada titra specifičnih protutijela od prosječno 4000. To se može objasniti činjenicom da se stimulacija imunosnog sustava inaktiviranim cjepivom smanjuje s vremenom (HAMAL i surr., 2006). S druge strane, jata starosti 77 tjedana zadržala su više titreve, u iznosu od 9176 i 14341. Ako se uzmu u obzir sva jata prema dobi, 41% jata ima zadovoljavajući titar specifičnih protutijela.

Pojedinačni titar protutijela unutar jata međusobno varira od zadovoljavajućih do onih koji uopće ne pružaju zaštitu. Npr. kokoš u objektu K4 starosti 69 tjedana koja u odnosu

na srednju vrijednost titara u jatu od 10850, koji je zadovoljavajuć, ima titar od samo 512 te se smatra da takav titar ne pruža zaštitu.

Koeficijent varijabilnosti (%CV) među jatima varira od najnižeg u vrijednosti od 37 do najvišeg u vrijednosti od 89. Samo jedno od mlađih jata (U1a) pokazuje zadovoljavajući %CV niži od 60 za živi vakcine, dok samo jedno od jata (K3-U3a) nakon primanja inaktivirane vakcine pokazuje zadovoljavajuć %CV manji od 40. Za očekivati je da mlađe kategorije peradi koje su primile samo živo cjepivo imaju niže titreve sa većom varijabilnosti, time i višim %CV i nižim VI vrijednostima. To je stoga što je kod tih kategorija važno da dođe do kontakta sa antigenom i konverzije titra protutijela, potičući primarno lokalnu imunost na sluznicama, neovisno o sistemskoj visini titra.

Indeks cijepljenja koji daje omjer srednjih vrijednosti titara protutijela sa %CV je dobar pokazatelj uspješnosti cijepljenja i zaštićenosti peradi s obzirom na to da je on viši što je viši titar a niži %CV i obrnuto. Vrijednosti između jata za VI se kreću od najviše vrijednosti od 309 do najniže u vrijednosti od 48. Optimalno, VI bi se nakon inaktivirane vakcine trebao kretati od 300 pa sve do 2000. U ovom istraživanju samo jedno jato koje je primilo inaktivirano cjepivo ima VI viši od 300 (V-Kat). To se podudara s njegovim višim vrijednostima titra protutijela i nižim vrijednostima koeficijenta varijabilnosti (%CV). Za živu vakcinu referente vrijednosti bi se trebale kretati od 100 do 300 kao optimalne. U našem istraživanju su dva jata na farmi 1 imala VI vrijednosti u tom rasponu (U1a).

Rasponi titara specifičnih protutijela na farmi 2 između jata se kreću od najnižeg koji iznosi 2853 do najvišeg koji iznosi 7007. Od 7 jata samo dva (U1 i U2) imaju zadovoljavajuć titar specifičnih protutijela što daje 27%. Oba jata sa zadovoljavajućim titrom su mlađa jata starosti 17 tjedana koja su primila samo živu vakcinu. Sva starija jata koja su primila inaktiviranu vakcinu imaju ne zadovoljavajući titar specifičnih protutijela.

Koeficijent varijabilnosti (%CV) varira između jata od najnižeg koji iznosi 36 do najvišeg koji iznosi 89. Mlađim jatima od 17 tjedana %CV je manji od 60 što nam ukazuje da su pojedini titrevi unutar tih jata uniformni tj. nema značajnih odstupanja u pojedinačnim titreviima unutar jata.

Kod starijih jata koja su primila inaktivirano cjepivo samo jedno jato (P3) ima %CV < 40% koje se smatra zadovoljavajućim. Ostala jata pokazuju viši %CV, npr. jato u objektu P1

sa %CV od 89 . Viši %CV je tu logičan s obzirom na to da se iz rezultata vidi da titrevi protutijela pojedinih kokoši tog jata međusobno značajno variraju u vrijednostima.

VI na farmi broj 2 adekvatan je u dva mlađa jata koja su primila samo živu vakcinu . To se podudara s vrijednostima njihovih titreva i %CV. Od jata koja su primila inaktivirano cjepivo samo jedno jato ima zadovoljavajuć VI (P3) unatoč ne zadovoljavajućem titru toga jata. To je objašnjivo dobrim koeficijentom varijabilnosti unutar toga jata. Suprotno tome jato u objektu P5 ima viši titar specifičnih protutijela no uslijed prisutnog višeg %CV posljedično je IV tog jata ne zadovoljavajuć.

Iz rezultat se može zaključiti da 7 od sveukupno 19 pretražvanih jata ima zadovoljavajući titar specifičnih protutijela što čini 36%, odnosno 41% na farmi 1 i 27% na farmi 2. Od sveukupno 168 kokoši 65 ima adekvatan zaštitni titar, odnosno 38%, dok je u sličnom istraživanju u Njemačkoj postotak kokoši sa zaštitnim titrom bio 88% (OBERLÄNDER i sur., 2020.). Suprotno, istraživanje u Mozambique je pokazalo da samo 23% pregledanih jata ima zaštitni titar za VNB (FRECHAUT i surr., 2015.). To nam govori da farme u našem istraživanju nemaju zadovoljavajuć titar u više od 62% pretražene peradi. Iznimke su mlađa jata kod kojih svi uzorci unutar jata imaju zadovoljavajući titar protutijela. Razlog nižem postotku adekvatno zaštićenih jata može biti i relativno malen broj uzoraka za neka jata. Prema BioChekovom priručniku (BIOCHEK, 2017.) za interpretaciju rezultata navedeno je da je najmanji potreban broj uzoraka za vjerodostojnost rezultata 23. Manji broj uzoraka pokazao je veće varijacije u srednjim vrijednostima titara između jata te u %CV i VI vrijednostima. U ovom istraživanju se broj uzoraka po jatu kretao između 8 i 10 što može biti malo za pravilnu interpretaciju. Osim broja uzoraka, greške prilikom uzimanja i čuvanja uzoraka također mogu utjecati na dobivene vrijednosti. Ovisno o čimbenicima kao što su prevladavajući terenski virus, aplikacija cjepiva, vrsta cjepiva, temperatura okoliša, prehrana peradi itd. titar specifičnih protutijela od 4000 na jednoj farmi može biti dovoljan za zaštitu peradi od VNB. Na drugoj farmi s drugačijim uvjetima ta ista vrijednost titra protutijela neće štiti perad (BIOCHECK, 2017.).

Uobičajene greške u cijepljenju su loša priprema cjepivas predugim vremenskim razmakom između otapanja i primjene cjepiva, zagađeni sustavi za napajanje i upotreba previše tople ili kontaminirane vode za primjenu cjepiva. Sve takve pogreške rezultiraju

padom doze cjepiva po piletu ili čak primjenom potpuno uništenog virusa što cijepljenje čini manje ili neučinkovitim (JUNGBACK i surr., 2012.).

Osim toga, bilo koja vrsta stresa može kod peradi smanjiti razinu imunosti i tako smanjiti titar specifičnih protutijela na cjepivo (NUMAN i surr., 2005.). Kako znamo da se perad u ovom istraživanju cijepila inaktiviranim cjepivom neposredno prije premještanja u proizvodne objekte, niži titar protutijela uočen kod U1a U2a i U3a jata s 20 tjedana starosti bi se mogao pripisati i stresu nakon premještanja. Naravno, to ne znači da taj titar s vremenom neće narast na adekvatnu vrijednost.

Iz svega navedenog proizlazi da je neophodno provjeravati specifičan titar protutijela peradi. Tako provjerom rezultata možemo dobiti uvid ne samo u zaštićenost peradi protiv newcastleske bolesti nego i na ispravnost primjene cjepiva, uzimanja i čuvanja te broja uzoraka i načina držanja peradi .

5. ZAKLJUČCI

Slijedom opisanih rezultata istraživanja valja zaključiti:

1. 36% od ukupno 19 pretraženih jata ima zadovoljavajući prosječan titar protutijela prema Biochekovim referentnim vrijednostima, 26% ima adekvatan %CV a 31% ima adekvatan VI.
2. Postoje značajne varijacije u vrijednostima rezultata između jata međusobno i između pojedinih uzoraka unutar jata

3. Niski titrevi specifičnih protutijela mogu biti uzrokom premalenog broja testiranih seruma po jatu te je za pravilnu interpretaciju rezultata potreban adekvatan broj uzoraka.
4. Kontinuirano praćenje titra specifičnih protutijela u peradarstvu ima veliku važnost jer daje uvid u zaštićenost jata od newcastleske bolesti odnosno u uspješnost provedenog programa cijepljenja.

6. LITERATURA

1. ABBAS, A. K., A. H. LICHTMAN, S. PILLAI (2014): Cellular and Molecular Immunology. 8th ed. Saunders/Elsevier, Philadelphia, PA.
2. AKIRA, S. (2009): Pathogen recognition by innate immunity and its signaling. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 85, 143–156.
3. AKIRA, S., K. TAKEDA, T. KAISHO (2001): Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology* 2, 675–680

4. ALDOUS, E. W., D. J. ALEXANDER (2001): Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). *Avian Pathol.* 30, 117–128.
5. AL-GARIB S. O., A. L. J. GIELKENS, E. GRUYS, G. KOCH (2003): Review of Newcastle disease virus with particular references to immunity and vaccination. *Worlds. Poult. Sci. J.* 59, 185–200.
6. ALEXANDER D.J. (2003): Newcastle disease. U: *Diseases in Poultry* (Ur. Saif Y.M.). Ames, Iowa, Iowa State Press, 64-87.
7. ALEXANDER, D. J. (2009): Ecology and epidemiology of Newcastle disease. U: *Avian influenza and Newcastle disease – a field and laboratory manual.* (Ur. Alexander, D. J., I. Capua). Springer-Verlag Italia, Milano, 19–26.
8. ALEXOPOULOU, L., A. CZOPIK HOLT, R. MEDZHITOV, R.A. FLAVELL (2001): Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappa B by Toll-like receptor 3. *Nature* 413,732–738.
9. ALLAN W.H., R.E. GOUGH (1974): A standard haemagglutination inhibition test for Newcastle disease (1). Comparison of macro and micro methods. *Veterinary Record* 95, 120-123
10. ANONYMOUS (1992): *Commission of the European Communities: Council Directive 92/66/EEC of 14 July 1992 introducing Community measures for the control of Newcastle disease.* European Commission, Brussels. (last accessed on 24th August 2021.:<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT?qid=1512930068146&uri=CELEX:31992L0066>)
11. ANONYMOUS (2013): Pravilnik o mjerama kontrole Newcastleske bolesti. Narodne novine br. 45/2013.
12. ANONYMOUS (2013): Newcastleska bolest peradi. Ministarstvo poljoprivrede, Uprava za Veterinarstvo i sigurnost hrane, Planinska 2a, 10000 Zagreb.
13. ANONYMOUS (2019): Naredba o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2019. godini. Narodne novine br. 82/2013.
14. ANONYMOUS (2020): Priručnik za newcastlesku bolest NACIONALNI KRIZNI PLAN. MINISTARSTVO POLJOPRIVREDE Uprava za veterinarstvo i sigurnost

hrane10000 Zagreb, Planinska 2A KLASA: 322-01/20-01/187 URBROJ: 525-10/1315-20-2

15. ANONYMOUS (2021): Newcastle disease (Infection with Newcastle disease virus). Chapter 3.3.14. U: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Office International des Epizooties (OIE), Paris, 576–589. (last accessed on 28th of August 2021. : http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf).
16. ARSTILA, P. T., O. VAINIO, O. LASSILA (1994): Central role of CD4+ T cells in avian immune response. *Poult. Sci.* 73, 1019–1016.
17. BANKOWSKI, R.A. (1957): A modified live Newcastle disease virus vaccine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 96, 114-118.
18. BANU, N., M. ISLAM, M. CHOWDHURY, M. ISLAM (2010): Determination of immune response of Newcastle disease virus vaccines in layer chickens. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*, 7(2), 329–334.
19. BALENOVIĆ, M., V. SAVIĆ, A. EKERT KABALIN, L. JURINOVIĆ (2009): Izračun relativne količine gRNK za kokošji IFN- nakon stimulacije virusom Newcastleske bolesti soj La Sota. *STOČARSTVO* 63, 93–102.
20. BIOCHECK (2017) : Interpretation and Application of Results Manual
21. BORLAND L.J., W.H. ALLAN (1980): Laboratory tests for comparing live lentogenic newcastle disease vaccines. *Avian Pathol* 9(1), 45–59.
22. BROWN J., R.S. RESSURECION, T.G. DICKSON (1990). The relationship between the hemagglutination-inhibition test and the enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody to Newcastle disease. *Avian Dis.* 34, 585–587
23. BUTCHER, G. D., R.D. MILES (2019) : PUBLICATION #VM74, one of a series of the Veterinary Medicine-Large Animal Clinical Sciences Department, UF/IFAS Extension. U.S. Department of Agriculture, UF/IFAS Extension Service, University of Florida, IFAS, Florida A & M University Cooperative Extension Program, and Boards of County Commissioners Cooperating. Nick T. Place, dean for UF/IFAS Extension (last accessed on 22 August 2021. : <https://edis.ifas.ufl.edu/pdf/VM/VM01600.pdf>)

24. CHEN, C-L., J. M. PICKEL, J. M. LATHI, M. D. COOPER (1991): Surface markers on avian immune cells. U: Avian Cellular Immunology (Ur. J. M. Scharma) CRC Press, Boca Raton, FL, SAD, 1–22.
25. CHIMENO ZOTH S., E. GOMEZ, E. CARILLO, A. BERINSTEIN (2008): Locally produced mucosal IgG in chickens immunized with conventional vaccines for Newcastle disease virus. *Braz. J Med. Biol. Res.* 41, 318-323
26. DAR, A., M. TIPU, H. TOWNSEND, A. POTTER, V. GERDTS, S. TIKOO (2015): Administration of poly[di(sodium carboxylatoethylphenoxy)phosphazene] (PCEP) and avian beta defensin as adjuvants in inactivated inclusion body hepatitis virus and its hexon protein-based experimental vaccine formulations in chickens. *Avian Diseases* 59, 518–524.
27. DEGEFA, T., L. DADI, A. YAMI, G. MARIAM, M. NASSIR (2004): Technical and economic evaluation of different methods of Newcastle disease vaccine administration. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 51, 365-369
28. DEGEN, W. G. J., N. van DAAL, N. L. ROTHWELL, P. KAISER, V. E. J. C. SCHIJNS (2005): Th1/Th2 polarization by viral and helminth infection in birds. *Vet. Microbiol.* 105, 163–167.
29. DIEL, D.G., L. SUSTA, S. CARDENAS_GARCIA, M.L. KILLIAN, C.C. BROWN, P. J. MILLER, C.L. AFONSO (2012): Complete genome and clinicopathological characterization of a virulent Newcastle disease virus isolate from South America, *J. Clin. Microbiol.* 50.
30. FRANKEN D. (2004): Vergleichende Untersuchungen zur humoralen Immunantwort verschiedener Hühnerrassen nach Impfungen gegen Newcastle-Krankheit, infektiöse Bronchitis, infektiöse Bursitis und aviäre Enzephalomyelitis im Rahmen der Rassegeflügelleistungsprüfungen in den Jahren 1993/94 und 1995/96. Zugl.: Univ., Diss, 2004. 1st ed. Edition scientifique. Wetttenberg: VVB Laufersweiler; 216.
31. GELB, J., B.S. LANDMAN, M.J. LICATA, M.H. SHAPIRO, L.R. CAMPION (2007): Evaluating viral interference between infectious bronchitis virus and Newcastle disease virus vaccine strains using quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Avian. Dis.* 51, 924-934.

32. GUIMARAES, M.C.,L.V. GUILLERMO, M.F.MATTA, S.G. SOARES, R.A. DaMATTA (2011): Macrophages from chickens selected for high antibody response produced more nitric oxide and have greater phagocytic capacity. *Vet Immunol. Immunopathol.* 140, 317-322.
33. HANSON, 1LP., E. CROOK, C.A. BRANDLY (1951): Comparisons of immunogenicity of five strains of Newcastle disease virus as formalinized vaccines. *Vet. Med.* 46, 451-452.
34. HAMMER DK. (1974): The immune system in chickens. *Avian Pathol.* 3(2), 65-78.
35. HITCHNER, S.B. , E.P. JOHANSON (1948): A virus of low virulence for immunizing fowls against Newcastle disease (avian pneumoencephalitis). *Vet. Med.* 43, 525-530.
36. HOERR, F.J. (2010): Clinical aspects of immunosuppression in poultry. *Avian Dis.* 54, 2-15.
37. HOFSTAD, M.S. (1955):. The immune response in chickens following the use of three different types of inactivated Newcastle disease virus vaccine. *Am. J. Vet. Res.* 16, 608-612.
38. ICTV (2019): *Virus Taxonomy*: 2019 Release/EC 51, Berlin, Germany, July 2019; ratification March 2020 (MSL #35) (last accessed on September 19th 2021. : https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=202001591)
39. KAPCZYNSKI, D. R., C. L. AFONSO, P. J. MILLER (2013): Immune responses of poultry to Newcastle disease virus. *Dev. Comp. Immunol.* 41, 447– 453
40. KUMAR, H., T. KAWAI, S. AKIRA (2011): Pathogen recognition by the innate immune system. *Int. Rev. Immunol.* 30, 16–34.
41. KOKATE, L.S., S. KUMAR, A. RAHIM,A.K. DAS (2017): Kinetics of serum antibody response to Newcastle disease vaccine in Aseel, Kadaknath and White Leghorn chicken using ELISA. *Indian Journal of Animal Sciences* 87, 168–70.
42. LAMB, R., G.D. PARKS (2007): Paramyxoviridae: the viruses and their replication. U: *Fields virology*, Vol. 1. (Ur. B. Fields, D.M. Knipe, i P.M. Howley), Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, SAD, 1449-1496
43. LAMBRECHT, B., M. GONZE, G. MEULEMANS, T. P. van den BERG (2004): Assessment of the cell-mediated immune response in chickens by detection of

chicken interferon- γ in response to mitogen and recall Newcastle disease viral antigen stimulation. *Avian Pathol.* 33, 343-350.

44. LOKE, C. F., A. R. OMAR, A. R. RAHA, K. YUSOFF (2005): Improved protection from velogenic Newcastle disease virus challenge following multiple immunizations with plasmid DNA encoding for F and HN genes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 106, 259–267.
45. LOWENTHAL, J.W., M.R. DIGBY, J.J.YORK (1995): Production of interferon-gamma by chicken T cells. *J Interferon Cytokine Res.* 15, 933-38.
46. MAST, J., L. DEMEESTERE (2009): Electron tomography of negatively stained complex viruses: application in their diagnosis. *Diagn Pathol.* 4,1-7.
47. MASTELLER E.L., G.T. PHARR, P.E. FUNK, C.B. THOMPSON (1997): Avian B cell development. *Int. Rev. Immunol.* 15 (3-4),185-206.
48. MAZIJA, H. (2012): Njukaselska bolest. U: Veterinarski priručnik (Ur. Herak-Perković V., Ž. Grabarević, J.Kos.) Medicinska naklada, Zagreb, 1631-1634.
49. MILLER, P.J. (2014) : Newcastle Disease in Poultry. U: Avian pneumoencephalitis, Exotic or velogenic Newcastle disease. (<https://www.msdsvetmanual.com/poultry/newcastle-disease-and-other-paramyxovirus-infections/newcastle-disease-in-poultry>)
50. MILLER P. J., G. KOCH (2013): Newcastle Disease. U: Diseases of poultry 13th ed. (Ur. Swayne, D. E., J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, D. L. Suarez, V. L. Nair, Eds.). Blackwell Publishing Ltd., Ames, Iowa, SAD, 89–130.
51. MEULEMANS, G. (1988): Control by vaccination. U: Newcastle Disease (Ur. D.J. Alexander), Kluwer Academic Publishers, Boston, 318-332
52. MEULEMANS, G., T.P. VAN DEN BERG, M. DECAESSTECKER, i M. BOSCHMANS (2002): Evolution of pigeon Newcastle disease virus strains. *Avian Pathol.* 31, 515-519.
53. MOBINI, B. (2012): Histological and histochemical studies on the Harderian gland in native chickens. *Veterinarni Medicina.* 57(8), 404-40.
54. NAGLIĆ, T., D. HAJSIG (1993.): Veterinarska imunologija. Školska knjiga, Zagreb.

55. OKWOR, E.C., D.C. EZE (2013): Newcastle disease in layers: Preliminary studies on the stress associated with onset of lay and initiation of clinical disease. *African Journal of Microbiology Research* 7(11), 960–5.
56. PALM, N.W., R. MEDZHITOV (2009): Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunological Reviews* 227, 221–233.
57. RATCLIFFE, M.J.H., O. LISILLA, J.R.L. PINK, O. VAINIO (2005): Avian B cell precursors: surface immunoglobulin expression is an early, possibly bursa-independent event. *Eur. J. Immunol.* 16(2), 129-133.
58. RAUTENSCHLEIN, S., C.KRAEMER, E. MONTIEL, J. VANMARCKE, C. HAASE (2007): Bilateral effects of vaccination against infectious bursal disease and Newcastle disease in specific-pathogen free layers and commercial broiler chickens. *Avian Dis.* 51, 14-10.
59. REYNOLDS, D. L., A. D. MARAQA (2000a): Protective immunity against Newcastle disease: The role of cell-mediated immunity. *Avian Dis.* 44, 145-154.
60. REYNOLDS, D. L., A. D. MARAQA (2000b): Protective immunity against Newcastle disease: The role of antibodies specific to Newcastle disease virus polypeptides. *Avian Dis.* 44, 138–144.
61. ROTT, R. (1979): Molecular basis of infectivity and pathogenicity of myxoviruses. *Arch Virol.* 59, 285-298.
62. RUE, C. A., L. SUSTA, I. CORNAX, C. C. BROWN, D. R. KAPCZYNSKI, D. L. SUAREZ, D. J. KING, P. J. MILLER, C. L. AFONSO (2011): Virulent Newcastle disease virus elicits a strong innate immune response in chickens. *J. Gen. Virol.* 92, 931–939.
63. SAWANT, P. M., P. C. VERMA, P. K. SUBUDHI, U. CHATURVEDI, M. SINGH, R. KUMAR, A. K. TIWARI (2011): Immunomodulation of bivalent Newcastle disease DNA vaccine induced immune response by co-delivery of chicken IFN- γ and IL-4 genes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 144, 36–44.
64. SCHOGGINS, J.W., S.J. WILSON, M. PANIS, M.Y. MURPHY, C.T. JONES, P. BIENIASZ, C.M. RICE (2011): A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* 472, 481–485.

65. SENNE, D. A., D. J. KING, D. R. KAPCZYNSKI (2004): Control of Newcastle disease by vaccination. *Dev. Biol. (Basel)*. 119, 165-170.
66. SHARMA, J. M., S. RAUTENSCHLEIN (2013): Host factors for disease resistance 13th ed.. U: Diseases of poultry. (Ur. Swayne, D. E., Editor-in-chief; J. R. Glisson, L. R. McDougald, V. Nair, L. K. Nolan, D. Suarez)., Blackwell Publishing Ltd., Ames, Iowa, SAD, 61-80.
67. SCHRODER, K., P. J. HERTZOG, T. RAVASI, D. A. HUME (2004): Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 75, 163-189.
68. SUSTA, L., I. CORNAX, D. G. DIEL, S. C. GARCIA, P. J. MILLER, X. LIU, S. HU, C. C. BROWN, C. L. AFONSO (2013): Expression of interferon gamma by a highly virulent strain of Newcastle disease virus decreases its pathogenicity. *Microb Pathog.* 61-62, 73-78.
69. TABIDI, M. H., A. MAKKAWI, E. MAHASIN, A. S. ALI (2004): Comparative Evaluation of Haemagglutination Inhibition Test and Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Detection of Antibodies Against Newcastle Disease Vaccine in Broiler Chicks. *International Journal of Poultry Science* 3(10), 668–70.
70. TAYLOR, J., C. EDBAUER, A. REY-SENELONGE, J. F. BOUQUET, E. NORTON, S. GOEBEL, P. DESMETTRE, E. PAOLETTI (1990): Newcastle disease virus fusion protein expressed in a fowlpox virus recombinant confers protection in chickens. *J. Virol.* 64, 1441–1450.
71. VAN BOVEN, M., A. BOUMA, T. H. FABRI, E. KATSMA, L. HARTOG, G. KOCH (2008): Herd immunity to Newcastle disease virus in poultry by vaccination. *Avian Pathol.* 37, 1-5.
72. WANG Z., F. T. VREEDE, J. O. MITCHELL, G. J. VILJOEN (2001): Rapid detection and differentiation of Newcastle disease virus isolates by a triple one-step RT-PCR, *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, vol. 68, no. 2, pp. 131–134
73. WESTBURY, H. A., G. PARSON, W. H. ALLAN (1984): Duration of excretion of virulent Newcastle disease virus following challenge of chickens with different titres of serum antibody to the virus. *Austrian veterinary journal* 61(2), 44-46.

74. WINTERFIELD, R.W. (1984): Vaccination of chickens with Newcastle disease and infectious bronchitis vaccines administered singly and in combination. *Poult.sci.* 63, 182-184.
75. ZEKARIAS B., A. A. TER HUURNE, W. J. LANDMAN, J. M. REBEL, J. M. POL, E. GRUYS (2002): Immunological basis of differences in disease resistance in the chicken. *Vet. Res.* 33, 109-125.

7. SAŽETAK

Newcastleska bolest je jedna od najznačajnijih bolesti u peradarskoj industriji. Provođenjem specifične imunoprofilakse peradi pokušava se potaknuti dovoljna količina protutijela za virus newcastleske bolesti i time adekvatna zaštita koja sprječava izbijanje epizootija. Zbog različitih načina primjene cjepiva i različitog učinka

cjepiva na imunosni odgovor važno je pratiti titar specifičnih protutijela u cijepljene peradi kako bi se dobio što bolji uvid u zaštićenost cijepljenih jata.

Svrha ovog diplomskog rada je analiza rezultata ELISA titra specifičnih protutijela na virus newcastleske bolesti u nekoliko jata longitudinalno na dvije farme kokoši nesilica kako bi dobili prikaz dinamike titra.

Imunoprofilaksa newcastleske bolesti kokoši nesilica na praćenim farmama sastoji se od višekratne primjene živog atenuiranog cjepiva, prvo primijenjenog postupkom raspršivanja pilićima u valionici, a potom u dva navrata putem pitke vode, najčešće koristeći soj La Sota. Nakon toga, a neposredno prije preseljenja u proizvodne objekte, koristi se viševaljano inaktivirano cjepivo koje se primjenjuje i.m. ili s.c.

Za dokaz titra specifičnih protutijela na virus newcastleske bolesti korišten je komercijalni ND ELISA kit (Biochek, Nizozemska) prema uputama proizvođača.

U našem istraživanju 36% (7) od ukupno pretraženih jata (19) ima zadovoljavajući titar protutijela sukladno preporukama proizvođača dijagnostičkog kita odnosno 41 % na farmi 1 i 27% na farmi 2. Od sveukupno 168 kokoši 65 ima adekvatan zaštitni titar prema navedenim preporukama, odnosno 38% . Također 26% jata (5 od 19) ima adekvatan %CV, a 31% (6 od 19) ima adekvatan VI indeks. Veću varijabilnost i niže titreve treba očekivati kod jata dobi ispod 20 tjedana, no u starijoj dobi uočava se niža razina titreva i veća varijabilnost, koja je moguće posljedica neadekvatno provedenog programa imunoprofilakse kao i malog broja uzorka po jatu. Sukladno navedenom potrebno je provesti kontrolu primjene cjepiva na farmama, kao i postupke uzimanja i čuvanja uzoraka, te uzeti potreban broj uzoraka.

Ključne riječi: newcastleska bolest, kokoši nesilice, cijepljenje, titar protutijela, ELISA

8. SUMMARY

Longitudinal monitoring of antibody titer against Newcastle disease virus in serum of laying hens after vaccination program

Newcastle disease is one of the most significant diseases in the poultry industry. By induction of specific immunoprotection of poultry, an aim is to induce a sufficient amount of antibodies to the Newcastle disease virus and thus adequate protection to prevent the outbreak of epizootics. Due to the different routes of administration of the vaccine and the different effect of the vaccine on the immune response, it is important to monitor antibody titers of vaccinated poultry in order to obtain a better view of the acquired protection.

The purpose of this thesis is to analyze the results of ELISA titers of specific antibodies to Newcastle disease in several flocks of layer hens longitudinally on two farms to acquire the dynamics of gained titers.

Immunoprophylaxis of Newcastle disease in layers on monitored farms consists of repeated administration of a live attenuated vaccine, first administered by spraying chickens in a hatchery and then twice by drinking water, most commonly using the La Sota strain. After that, and immediately before the transfer to the production facilities, a polyvalent inactivated vaccine is used which is applied i.m. or s.c.

A commercial ND ELISA kit (Biochek, The Netherlands) according to the manufacturer's instructions was used to detect the titer of specific antibodies to Newcastle disease virus. In our study, 36% (7) of the total tested flocks (19) have a satisfactory antibody titer according to manufacturer's reference values, 41% and 27% on farm 1 and farm 2, respectively. Out of a total of 168 hens, 65 have an adequate protective titer according to reference values, or 38 %. Also 26% of flocks (5 of 19) have adequate %CV and 31% (6 of 19) have adequate VI. Higher variability and lower titers should be expected in younger flocks, below 20 weeks of age, while in older flock we detected lower titers and higher variability, what could be result of improper vaccination program as well as lower number of samples per flock. According to that

it is important to control the vaccination protocol as well as blood sampling and sample storing, and to take proper number of samples.

Keywords: Newcastle disease, layer hen, vaccination, antibody titre, ELISA

9. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 10.11.1989. u Zagrebu gdje sam pohađala osnovnu školu Ivana Cankara te 13. Gimnaziju. Tijekom osnovne škole bila sam član plesne grupe svoje škole te član prve pomoći. U srednjoj školi su me zanimali predmeti prirodnih znanosti te mi je tema maturalnog rada bila "Imunosni sustav". Maturirala sam 2009. te iste godine upisala dodiplomski studij na Veterinarskom fakultetu sveučilišta u Zagrebu. Na 5. godini studija opredijelila sam se za usmjerenje Higijena animalnih namirnica i javno zdravstvo. Tokom studija na Veterinarskom fakultetu sam radila brojne studentske poslove uključujući posao trgovca u dućanima "Zvijerinjak" ,"Egzotika" i "H&M", promotivne poslove u dućanu "Pet Centar" te u "Večernjem Listu". Tijekom 2016.-te godine sam aktivno sudjelovala i na projektu „LIFE DinAlp Bear“, na Zavodu za biologiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu. Služim se MS-office-om, imam izvrsno znanje engleskog jezika i osnovno znanje njemačkog i bugarskog jezika.