

Karakterizacija divljih tipova virusa izoliranih iz zaraženih animalnih tkiva u svrhu proizvodnje virusnih cjepiva

Brezović, Tena

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:670611>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2021.

Tena Brezović
1271/BPI

**KARAKTERIZACIJA DIVLJIH
TIPOVA VIRUSA IZOLIRANIH
IZ ZARAŽENIH ANIMALNIH
TKIVA U SVRHU
PROIZVODNJE VIRUSNIH
CJEPIVA**

Diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za razvoj proizvoda Cjepiva u odjelu Razvoj cjepiva tvrtke Genera d.d. (Dechra Pharmaceuticals PLC), pod neposrednim voditeljstvom dr.sc. Ante Vrdoljaka, znanstvenog suradnika u polju biotehnologije, te pod mentorstvom prof.dr.sc. Jagode Šušković, pročelnice Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem se prof.dr.sc. Jagodi Šušković (Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, Zavod za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu) i dr.sc. Anti Vrdoljaku, znan.sur. u polju biotehnologije (Laboratorij za razvoj proizvoda Cjepiva, odjel Razvoj cjepiva, Genera d.d., Dechra Pharmaceuticals PLC) na ostvarenoj suradnji koja mi je omogućila izradu eksperimentalnog dijela diplomskog rada u Laboratoriju za razvoj proizvoda Cjepiva, Genera d.d..

Posebnu zahvalu želim uputiti svojoj mentorici prof.dr.sc. Jagodi Šušković (Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, Zavod za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu) na pruženim savjetima tijekom izrade diplomskog rada, a ponajviše na motivaciji i interesu za područje kojim se bavi koji je tijekom moga studiranja prenijela i na mene.

Također se zahvaljujem svim djelatnicima u Laboratoriju za razvoj proizvoda Cjepiva i Imunobiološkom laboratoriju, Genera d.d., a posebno svome neposrednom mentoru dr.sc. Anti Vrdoljaku na ugodnoj radnoj atmosferi, trudu i nesebičnom prijenosu znanja prilikom izrade diplomskog rada.

Najveću zahvalu dugujem svojim roditeljima Sanji i Ivanu Zlatku, bratu Borni i mojoj Beti koji su mi bili velika podrška tijekom studiranja, te mom Ivanu na svakodnevnom ohrabrivanju i potpori u ostvarenju svih mojih ciljeva.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

KARAKTERIZACIJA DIVLJIH TIPOVA VIRUSA IZOLIRANIH IZ ZARAŽENIH ANIMALNIH TKIVA U SVRHU PROIZVODNJE VIRUSNIH CJEPIVA

Tena Brezović, 1271/BPI

Sažetak:

Virusne infekcije predstavljaju veliki zdravstveni i ekonomski problem u svijetu, a kako bi se smanjile posljedice takvih infekcija mnoge su farmaceutske tvrtke svoju proizvodnju usmjerile na proizvodnju cjepiva kao jedini način borbe protiv virusa. Međutim, veliki izazov u razvoju budućih generacija virusnih cjepiva predstavljaju brze mutacije virusa i izmjena genetskog materijala. Stoga je u svrhu razvoja i proizvodnje virusnih cjepiva, te stvaranja banke virusa, cilj rada bio iz zaraženih animalnih tkiva izolirati divlji tip virusa *Bovine herpesvirus 1*, *Bovine parainfluenza 3* i *Bovine rotavirus A*, te je qRT-PCR metodom uz primjenu odgovarajućih primera potvrđeno kako su izolirane virusne čestice upravo željeni virusi. Također je proveden Test sterilnosti kojim je dokazano kako banke virusa ne sadrže kontaminante s obzirom da nije došlo do porasta kolonija na TSA hranjivim podlogama, dok je Test na mikoplazme pokazao odsutnost mikoplazmi u bankama virusa.

Ključne riječi: divlji tip virusa, virusna cjepiva, qRT-PCR, mikoplazme, banka virusa

Rad sadrži: 69 stranica, 24 slika, 13 tablice, 70 literaturnih referenci, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: knjižnici

Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof.dr.sc. *Jagoda Šušković*

Neposredni voditelj: dr.sc. *Anto Vrdoljak*, znan.sur.

Pomoć pri izradi: dr.sc. *Katarina Huić Babić*

Stručno povjerenstvo za obranu:

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

Datum obrane: 15. srpnja 2021. godine

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Cultures Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

CHARACTERIZATION OF WILD-TYPES VIRUSES ISOLATED FROM INFECTED ANIMAL TISSUES FOR THE PRODUCTION OF VIRAL VACCINES

Tena Brezović, 1271/BPI

Abstract:

Viral infections are a major health and economic world's problem. In order to reduce the consequences of viral infections, many pharmaceutical companies have focused their production on the production of vaccines as the only way to overcome the virus. However, a major challenge in the development of future generations of viral vaccines is the rapid mutations of viruses and changes in genetic material. Therefore, for the intent of development and production of viral vaccines and creation of a virus bank, the purpose of the study was to isolate wild type of virus *Bovine herpesvirus 1*, *Bovine parainfluenza 3* and *Bovine rotavirus A* from infected animal tissues and it was confirmed by qRT-PCR that the isolated viral particles are the desired viruses. There is also performed a Sterility test which proved that the virus banks did not contain contaminants because there was no colony increase on TSA nutrient media and Mycoplasma test which showed the absence of mycoplasmas in the virus banks.

Keywords: wild-type viruses, viral vaccines, qRT-PCR, mycoplasmas, Virus bank

Thesis contains: 69 pages, 24 figures, 13 tables, 70 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD *Jagoda Šušković*, Full profesor

Principal investigator: PhD *Anto Vrdoljak*, Scientific associate

Technical support and assistance: PhD *Katarina Huić Babić*

Reviewers:

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

Thesis defended: 15th July 2021

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. <i>Bovine herpesvirus 1</i>	2
2.1.1. Karakteristike virusa	2
2.1.2. Infekcija virusom <i>Bovine herpesvirus 1</i>	3
2.1.3. Cjepivo <i>Bovine herpesvirus 1</i>	4
2.1.4. Patogeneza i klinička slika	5
2.2. <i>Bovine parainfluenza 3</i>	6
2.2.1. Karakteristike virusa	6
2.2.2. Inhibicija replikacije <i>Bovine parainfluenza 3</i>	7
2.2.3. Patogeneza i klinička slika	8
2.2.4. Cjepivo <i>Bovine parainfluenza 3</i>	10
2.3. <i>Bovine rotavirus A</i>	10
2.3.1. Karakteristike virusa	10
2.3.2. Replikacija virusa i klinička slika	12
2.3.3. Cjepivo <i>Bovine rotavirus A</i>	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. Materijali	15
3.1.1. Životinjski materijal (tkivo)	15
3.1.2. Kontinuirane stanične linije	16
3.1.3. Mediji i otopine	17
3.1.4. Oprema i uređaji	18
3.2. Metode	19
3.2.1. Uzgoj stanica	19
3.2.1.1. Priprema medija za uzgoj stanica	19
3.2.1.2. Priprema stanica za uzgoj	20
3.2.1.3. Precjepljivanje stanične kulture (pasažiranje)	20
3.2.2. Inokulacija uzoraka virusa na stanične kulture	21
3.2.2.1. Priprema medija za inokulaciju uzoraka virusa na stanične kulture	21
3.2.2.2. Priprema razrjeđenja virusa	22
3.2.2.2.1. Priprema razrjeđenja virusa <i>Bovine rotavirus A</i>	22

3.2.2.2.2. Priprema razrjeđenja virusa <i>Bovine parainfluezna 3</i> i <i>Bovine herpesvirus 1</i>	22
3.2.2.3. Inokulacija uzoraka virusa na stanične kulture	23
3.2.2.3.1. Inokulacija uzoraka virusa <i>Bovine rotavirus A</i> na staničnu kulturu	23
3.2.2.3.2. Inokulacija uzoraka <i>Bovine parainfluezna 3</i> i <i>Bovine herpesvirus 1</i> na staničnu kulturu	24
3.2.3. Žetva virusa kultiviranih u kontinuiranim staničnim linijama	25
3.2.4. Izolacija nukleinske kiseline izoliranih virusa	26
3.2.5. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR)	27
3.2.5.1. Priprema primera za provođenje qRT-PCR	29
3.2.5.2. Provođenje kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR)	30
3.2.6. Priprema banke virusa	33
3.2.6.1. Priprema banke virusa <i>Bovine rotavirus A</i>	33
3.2.6.2. Priprema banke virusa <i>Bovine parainfluezna 3</i>	33
3.2.6.3. Priprema banke virusa <i>Bovine herpesvirus 1</i>	34
3.2.7. Provjera banke virusa qRT-PCR-om	35
3.2.8. Purifikacija - uklanjanje kontaminacije uzorka <i>Bovine herpesvirus 1</i> od virusa <i>Bovine parainfluezna 3</i> (PIV3)	36
3.2.9. Provjera pročišćene banke virusa <i>Bovine herpesvirus 1</i> qRT-PCR-om	37
3.2.10. Test sterilnosti banke virusa	37
3.2.11. Test na mikoplazme	38
3.2.11.1. <i>Mollicutes</i> i <i>Mycoplasma</i>	38
3.2.11.2. Ekstrakcija	39
3.2.11.3. Detekcija mikoplazmi	41
3.2.12. Uklanjanje mikoplazmi iz uzorka <i>Bovine parainfluezna 3</i>	44
3.2.12.1. Priprema stanica za uzgoj i precjepljivanje stanične kulture (pasažiranje)	44
3.2.12.2. Uklanjanje mikoplazmi iz uzorka <i>Bovine parainfluezna 3</i> upotrebom antibiotika plazmocina	45
3.2.12.3. Žetva virusa <i>Bovine parainfluezna 3</i> kultiviranog u kontinuiranoj staničnoj liniji MDBK	46

3.2.13. Test sterilnosti i Test na mikoplazme nakon uklanjanja mikoplazmi iz uzorka <i>Bovine parainfluezna 3</i>	47
4. REZULTATI I RASPRAVA	48
4.1. Žetva virusa kultiviranih u kontinuiranim staničnim linijama	48
4.2. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR)	50
4.3. Provjera banke virusa qRT-PCR-om	56
4.4. Provjera pročišćene banke virusa <i>Bovine herpesvirus 1</i> qRT-PCR-om	58
4.5. Test sterilnosti banke virusa	58
4.6. Test na mikoplazme	59
4.7. Rezultati Testa sterilnosti i Testa na mikoplazme nakon uklanjanja mikoplazmi iz uzorka <i>Bovine parainfluezna 3</i>	61
5. ZAKLJUČCI	63
6. LITERATURA	65

1. UVOD

1. UVOD

Virusne infekcije u svijetu predstavljaju veliki zdravstveni i ekonomski problem, a kako bi se smanjile posljedice takvih infekcija mnoge farmaceutske tvrtke svoju su proizvodnju usmjerile na proizvodnju cjepiva kao jedini način borbe protiv virusa, pri čemu su se cjepiva pokazala izuzetno učinkovita u sprječavanju bolesti uzrokovanih virusima kako kod ljudi, tako i kod životinja. Kako bi se uspješno upravljalo virusnim bolestima ključan je razvoj i široka dostupnost cjepiva, te je u tu svrhu razvijen velik broj cjepiva u obliku živih ili atenuiranih, inaktiviranih, subjediničnih cjepiva (cjepiva na bazi podjedinica virusa), VLP cjepiva (eng. virus-like particles, čestice nalik virusima), te jestiva cjepiva. Međutim, zbog brzih mutacija virusa i međusobne izmjene genetskog materijala ubrzano se razvijaju tipovi virusa za koje ne postoji adekvatno cjepivo što predstavlja gorući problem, ali i veliki izazov u razvoju budućih generacija virusnih cjepiva. Također, jedna od poteškoća u suzbijanju virusnih infekcija predstavlja i neznanje ljudi o virusima, cjepivima, te uzrocima zaraznih bolesti što značajno utječe na njihovo prihvaćanje znanstvenih informacija o samom cjepivu i cijepljenju, a to pokazuje i trenutna situacija s virusom COVID-19, te odbijanje cijepljenja djece protiv zaraznih bolesti koje su se upravo provođenjem sustavnog cijepljenja tijekom predškolskog i školskog razdoblja gotovo iskorijenile u današnjoj populaciji (ospice, zaušnjaci i dr.).

U svrhu razvoja i proizvodnje virusnih cjepiva, u ovome diplomskom radu cilj je bio iz zaraženih animalnih tkiva izolirati divlji tip virusa *Bovine herpesvirus 1*, *Bovine parainfluenza 3* i *Bovine rotavirus A* koji kao patogene virusne čestice uzrokuju značajna oboljenja goveda uzgojenih za ishranu ljudi i time dovode do smanjenja prinosa goveda i značajnih ekonomskih gubitaka. Također, cilj je bio uz primjenu optimalnih uvjeta za umnažanje navedenih virusa napraviti banku virusa, te qRT-PCR metodom potvrditi da su izolirane virusne čestice upravo virusi koje smo željeli izolirati, s obzirom da animalna tkiva mogu biti kontaminiranim drugim virusima kao i različitim drugim mikroorganizmima. Virusi su vrlo osjetljivi i lako gube svoju infektivnost, te su biokemijska i biofizikalna svojstva specifična su za svaki pojedini virus. Stoga je u eksperimentu bilo ključno tijekom procesa umnažanja virusa i stvaranja banke virusa postaviti optimalne vrijednosti za svaki parametar koji utječe na proces kako bi se mogla razviti, te kasnije uspješno industrijski proizvoditi, cjepiva koja su učinkovita i sigurna za primjenu.

2. TEORIJSKI DIO

2. TEORIJSKI DIO

2.1. *Bovine herpesvirus 1*

2.1.1. Karakteristike virusa

Virus *Bovine herpesvirus 1* je patogena zarazna čestica koja uzrokuje nekoliko različitih respiratornih i reproduktivnih bolesti kod goveda na području Europe, Australije, Sjeverne i Južne Amerike, te se prema strukturi genoma i karakteristikama rasta u *in vitro* uvjetima svrstava u rod *Varicellovirus*, porodicu *Herpesviridae* i podporodicu *Alphaherpesvirinae*, unutar koje se nalaze i virusi *Herpes simplex 1*, *Herpes simplex 2*, te *Varicella Zoster Virus*, a za koje je karakteristično da se unutar domaćina repliciraju i šire uz brzo razaranje stanica samog domaćina (Chase i sur., 2017; Kaur i Chandra, 2016; Tikoo i sur., 1995). *Bovine herpesvirus 1* (BHV1) je virus čiji genom čini linearna dvostruka uzvojnica deoksiribonukleinske kiseline (DNK) koja sadrži između 135 i 140 kilobaza, te kodira za oko 75 proteina koji su većinom uključeni u metabolizam nukleinskih kiselina i sintezu DNA, a nalazi se u ikozaedarskoj kapsidi promjera 95 do 110 nm koja se sastoji od 162 kapsomere (Tikoo i sur., 1995; Anonymous 8, 2005; Chase i sur., 2017). Udio GC baza u genomu ovog virusa je između 31 % i 75 %, te on sadrži između 60 i 120 gena koji nisu raspoređeni u operonima i većinom sadrže pojedinačne promotore. BHV1 sadrži oko 33 gena koja kodiraju za strukturne proteine, od kojih je 13 proteina vezano uz ovojnica virusa, dok deset gena kodira za glikoproteine pri čemu su gC, gD, gE, gG, gI, UL49h (slika 1) i geni timidin kinaze uključeni u virulenciju virusa *Bovine herpesvirus 1*, a u *in vivo* i *in vitro* uvjetima nije pronađen dokaz da BHV1 proizvodi toksine. Glikoproteini su značajni kod vezanja i prodiranja virusa *Bovine herpesvirus 1* u stanicu domaćina, te unutar stanica domaćina gdje su zaduženi za neutralizaciju proizvedenih antitijela, dok su na staničnoj i humoralnoj razini glikoproteini glavna "meta" imunološkog odgovora domaćina (Anonymous 8, 2005; Kaur i Chandra, 2016).

zdravim stanicama, protein p53 prisutan je u inaktivnom obliku. Međutim, u slučaju kada je oštećenje DNA uzrok pokretanja apoptoze, ono dovodi do poticanja transkripcijske aktivnosti proteina p53, te njegovog nakupljanja u stanicama, pri čemu će do pokretanja apoptoze stanica doći kada su oštećenja DNA nepopravljiva. Također, nakupljanje proteina p53 može dovesti do zaustavljanja staničnog ciklusa u G1-fazi i popravljanja oštećene DNK ukoliko oštećenje DNK nije veliko, a sposobnost proteina p53 da zaustavi rast stanica njegova je važna tumor-supresijska funkcija (Žlender, 2003).

2.1.3. Cjepivo *Bovine herpesvirus 1*

Imunološki odgovor uključen u sprječavanje širenja infekcije, oporavak domaćina, te stjecanje imuniteta glavna je okosnica razvoja virusnog cjepiva koji poseban naglasak stavlja na glikoproteine koji su, osim u induciranje nastanka antitijela, uključeni i u stimulaciju staničnog imunološkog sustava (CM1), te su glavne mete za citotoksične T-stanice (CTL), antitijela ovisna o citotoksičnosti stanica i druge (Babiuk i sur., 1996). U Europi se najčešće primjenjuju rekombinantna (živa i inaktivirana) cjepiva s deletiranim genom za glikoprotein E (gE) i cjepiva s deletiranim genom za glikoprotein gE i enzim timidin kinazu (gE-tk) u genomu BHV1 jer najuspješnije reduciraju latenciju i ne dovode do abortusa cijepljenih životinja (Chase i sur., 2017).

Kod *Bovine herpesvirus 1* cjepiva razlikujemo inaktivirana (mrtva), atenuirana (živa) i subjedinična cjepiva koja se koriste kako bi se smanjila ozbiljnost bolesti, međutim nije uvijek moguće spriječiti infekciju zbog prirode virusa BHV1, kao i mogućnosti nastanka epidemije ovog virusa (Anonymous 8, 2005).

Živa ili atenuirana cjepiva induciraju humoralni i stanični imunološki odgovor, a najčešće se dobivaju serijom pasažiranja (precjepeljivanja) u staničnoj kulturi pri čemu sadrže oslabljen (atenuiran) BHV1 soj koji se može replicirati unutar stanica domaćina, ali s obzirom da je genetički izmijenjen ne može izazvati bolest.

Genetička izmjena virusnog soja uključuje mutaciju ili deleciju specifičnog gena što većinom dovodi do nemogućnosti ponovne mutacije i povratka virulencije virusnog soja, a najbolje je izvršiti deleciju ili mutaciju gena koji nisu esencijalni za replikaciju virusa. S obzirom da *Bovine herpesvirus 1* pripada skupini velikih DNK virusa, postoji mogućnost delecije ili mutacije velikog broja neesencijalnih gena koji će

dovesti do smanjenja virulencije ovog virusa. U proizvodnji cjepiva BHV1 uočena je mogućnost upotrebe tri vrste mutanata s delecijom, a to su mutanti s deletiranim genima za metabolizam nukleinskih kiselina, mutanti s deletiranim genima za glikoproteine i mutanti s deletiranim genima za tegument (opnu virusa koja se nalazi između vanjske ovojnice i kapside virusa, a sadrži strukturne proteine, proteine koji sudjeluju u sastavljanju/rastavljanju viriona prilikom ulaska virusa u stanicu i proteine koji moduliraju reakciju stanice domaćina na virusnu infekciju). S obzirom da se pokazalo kako više BHV1 gena za glikoproteine nije esencijalno za *in vitro* replikaciju (gC, gE, gI, gG), opsežna istraživanja dovela su do zaključka kako delecija gena za glikoprotein gC (gIII) dovodi do djelomičnog slabljenja virusa BHV1 zbog čega se ovakva modifikacija genoma virusa BHV1 najčešće koristi kod proizvodnje atenuiranih cjepiva (Van Oirschot i sur., 1996; Jones i Chowdhury, 2010; Tikoo i sur., 1995).

Mrtva ili inaktivirana cjepiva dobivaju se uzgojem virusnog soja u staničnoj kulturi do velikog titra virusa, a zatim se provodi inaktivacija kemijskim agensom kao što je formaldehid, beta-propiolakton, alkilirajuća sredstva ili binarni etilenimin. Inaktiviranom virusnom soju zatim se dodaje adjuvant kako bi se poboljšao imunološki odgovor koji izaziva cjepivo, pri čemu su izbor adjuvanta, kemijskog agensa za inaktivaciju i količina antigena kritični faktori kod proizvodnje inaktiviranih cjepiva. Za razliku od živih cjepiva, kod kojih je jednokratna doza cjepiva dovoljna da izazove dugotrajan imunitet i osigura veću količinu antigena koji se u organizmu može umnožavati, upotreba inaktiviranih cjepiva zahtijeva više od jedne doze cjepiva kako bi se postigla dovoljna količina antitijela u stanicama domaćina, te je njegova glavna prednost to što antigen ne može mutirati ili revertirati u oblik koji može dovesti do pojave simptoma bolesti (Van Oirschot i sur., 1996; Jones i Chowdhury, 2010).

2.1.4. Patogeneza i klinička slika

Ozbiljnost bolesti uzrokovane virusom *Bovine herpesvirus 1* ovisi o nekoliko faktora kao što su virulencija soja BHV1, faktori rezistencije domaćina, te posebno starost i moguća prisutnost sekundarne bakterijske infekcije koja uzrokuje puno ozbiljniju kliničku sliku. Infekcija BHV1 virusom kod domaćina uzrokuje respiratorne, reproduktivne, oftalmološke, neurološke, kožne i neonatalne bolesti,

upale mliječnih žlijezdi, viremiju, abortus kod trudnih goveda, te smrt. Kod zdravih goveda infekcija virusom BHV1 neće dovesti do smrti, ali će do uginuća životinja doći kada se virusna infekcija proširi putem krvi kroz cijelo tijelo goveda (viremija). Također, viremija može biti pogubna i za novorođenu telad ukoliko su u majčinom mlijeku odsutna antitijela (Muylkens i sur., 2007; Anonymous 8, 2005; Grgurić, 2018). Virus BHV1 najčešće uzrokuje infektivni govedi rinotraheitis (IBR, eng. Infectious Bovine Rhinotracheitis) koji kao respiratornu bolest uzrokuju sojevi BHV-1.1. i BHV-1.2b i infektivni pustulozni vulvovaginitis (IPV, eng. Infectious pustular vulvovaginitis) kod goveda, odnosno infektivni pustularni balanopostitis (IPB, eng. Infectious pustular balanoposthitis) kod bikova koje kao veneralne bolesti uzrokuje soj BHV-1.1b. Najšire je provedeno proučavanje soja BHV-1.1. koji prevladava na prostoru Europe i Sjeverne Amerike, te uzrokuje ozbiljnu kliničku sliku goveda nakon infekcije virusom. Soj BHV-1.2b (soj V115) jedini je soj virusa *Bovine herpesvirus 1* koji je prisutan u Australiji, te kod goveda uzrokuje blagu kliničku sliku rinitisa (upala nosne sluznice) ili kolpitis (upala rodnične sluznice) s obzirom da se u stanicama domaćina replicira manjom brzinom u odnosu na druge podvrste soja BHV1. Bolesti uzrokovane virusom *Bovine herpesvirus 1* raširene su po čitavom svijetu, te se većinom javljaju na farmama tovni i mliječnih goveda, pri čemu se virus prenosi kihanjem ili kašljanjem oboljelih životinja s obzirom da se najčešće izlučuje nosnim iscjetkom (Anonymous 8, 2005).

2.2. Bovine parainfluenza 3

2.2.1. Karakteristike virusa

Virus *Bovine parainfluenza 3* patogena je zarazna čestica koja pripada rodu *Respirovirus* i porodici *Paramyxoviridae*, te uzrokuje značajna respiratorna oboljenja kod životinja zajedno s drugim patogenima kao što su *Bovine herpesvirus 1* (BHV1), *Bovine respiratory syncytial virus* (BRSV) i *Bovine viral diarrhea virus* (BVDV) koji posljedično dovode do velikih ekonomskih gubitaka gotovo epidemijskih razmjera kod uzgoja goveda, koza, ovaca i deva. Genom *Bovine parainfluenza 3* čini nesegmentirana jednolančana ribonukleinska kiselina [(-)RNA] negativne polarnosti koja sadrži oko 15 500 baza, te kodira za šest velikih otvorenih okvira čitanja (eng. open reading frame, ORF). ORF-ovi kodiraju za šest strukturnih proteina uključujući

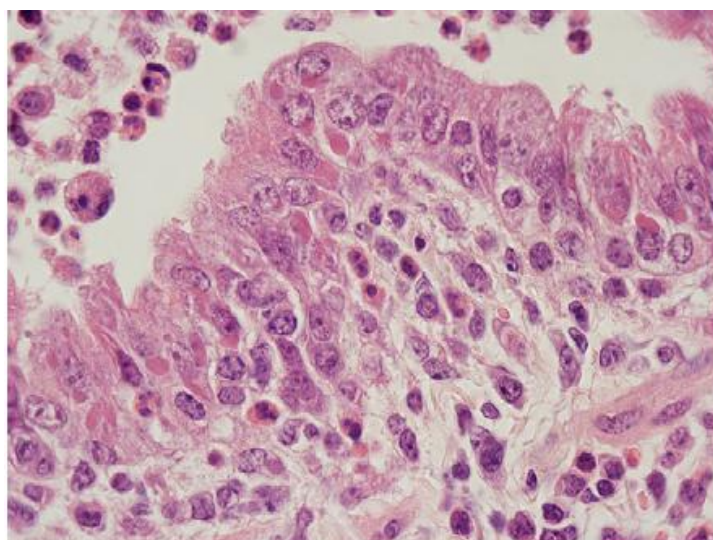
protein nukleokapside (N), fosfoprotein (P), matriks protein (M), hemaglutinin-neuraminidaza protein (HN), fuzijski protein (F) i veliki protein (L), te tri nestrukturna proteina (proteini C, D i V). Provedbom filogenetske analize virusa *Bovine parainfluenza 3* ustanovljeno je postojanje tri genotipa ovog virusa. Genotip A zabilježen je na području Sjeverne Amerike, Kine, Japana i Egipta, te je prvotno bio izoliran u Sjedinjenim Američkim Državama. Genotip B također je utvrđen na području Kine, Japana i Egipta, a prvi put je pronađen u uzorcima u Australiji. Genotip C otkriven je na području Kine, Sjeverne Koreje i Japana, dok su sva tri soja ustanovljena u uzorcima na području Argentine (Timurkan i sur., 2019; Albayrak i sur., 2019).

2.2.2. Inhibicija replikacije virusa *Bovine parainfluenza 3*

Prilikom virusne infekcije stanica domaćina i nakon ulaska dijelova virusnih čestica u stanicu, gRNA (eng. guide RNA) ima ulogu kalupa za sintezu glasničke RNA (mRNA) i antigenomske RNA (cRNA) koja je ujedno kalup za sintezu gRNA. Do sada se malo znalo o regulatornom mehanizmu interakcije virusa PIV3 sa stanicama domaćina, te su Lv i suradnici (2019) u svome radu istražili negativnu ulogu transmembranskog enzima kolesterol-25-hidroksilaze tijekom infekcije virusa *Bovine parainfluenza 3*. Naime, kolesterol-25-hidroksilaza (CH25H) provodi oksidaciju kolesterola, te se kao rezultat njene enzimske aktivnosti dobiva 25-hidroksikolesterol (25HC) koji kao korepresor biosintetskih enzima kolesterola blokira vezanje proteinskih regulatornih elemenata. CH25H inducirana interferonima kontrolira replikaciju PIV3 tako što značajno inhibira sintezu virusne cRNA i gRNA kod uzgoja virusa na MDBK stanicama. Mutant CH25H-M koja nema hidroksilaznu aktivnost, te ne može provoditi oksidaciju kolesterola, također potiskuje PIV3 infekciju, a sam mehanizam antivirusnog efekta CH25H-M i dalje je nepoznat.

Kolesterol-25-hidroksilaza inhibira različite viruse s ovojnicom poput virusa HIV (eng. Human immunodeficiency virus), HSV (eng. Herpes simpleks virus), VSV (eng. Vesicular stomatitis Indiana virus), MHV68 (eng. Murine gammaherpesvirus-68), te Nipah viruse, EBOV (eng. Zaire ebolavirus), RVFV (eng. Rift valley fever virus) i RSSEV (eng. Russian spring and summer encephalitis virus) tako što onemogućava spajanje membrane između virusa i stanice domaćina. Također se pokazalo kako kolesterol-25-hidroksilaza ima široku antivirusnu aktivnost kroz proizvodnju

vezama na glikoproteine i glikolipide stanica domaćina, a to omogućava hemaglutinacijska aktivnost HN glikoproteina pri izvanstaničnoj pH vrijednosti i prisutnosti halogenida koja dovodi do transporta glikoproteina na površinu stanice. Klinički znakovi respiratornih bolesti uzrokovanih PIV3 su različiti i mogu biti vrlo ozbiljni, od asimptomatske produktivne infekcije, rinitisa i traheitisa do teške upale pluća, međutim procjena lezija koje potječu isključivo od virusa *Bovine parainfluenza 3* je komplicirana s obzirom da se uz ovaj virus javljaju i drugi patogeni poput *Mannheimia hemolytica* i *Mycoplasma* spp. Histopatološka analiza lezija pluća povezanih s PIV3, uključujući bronhitis, bronhiolitis i alveolitis, pokazuje kako do umiranja trepetljikavog epitela dišnog sustava dolazi već 24 sata nakon infekcije. Eozinofilna intracitoplazmatska inkluzijska tijela (slika 3), karakteristična za PIV3 infekciju, pojavljuju se najčešće između drugog i sedmog dana infekcije u bronhijalnom, bronhiolarnom i alveolarnom epitelu. Iako "pupanje" virusne infekcije PIV3 prvenstveno započinje s apikalne površine epitelnih stanica respiratornog sustava, uočeno je i "pupanje" bazolateralne površine što omogućava sistemsko širenje virusa. Također, jednom kada se virus PIV3 nađe izvan respiratornog sustava, zbog visoke prisutnosti N-acetilneuraminsku kiselinu koju sadrže molekule receptora i citosolnih enzima koji mogu pocijepati prekursor proteina F (F0), dolazi do sistemske infekcije domaćina (Ellis, 2010).



Slika 3. Eozinofilna intracitoplazmatska inkluzijska tijela kod dvomjesečnog teleta, šest dana nakon izlaganja malim dozama aerosola PIV3 (Ellis, 2010).

2.2.4. Cjepivo *Bovine parainfluenza 3*

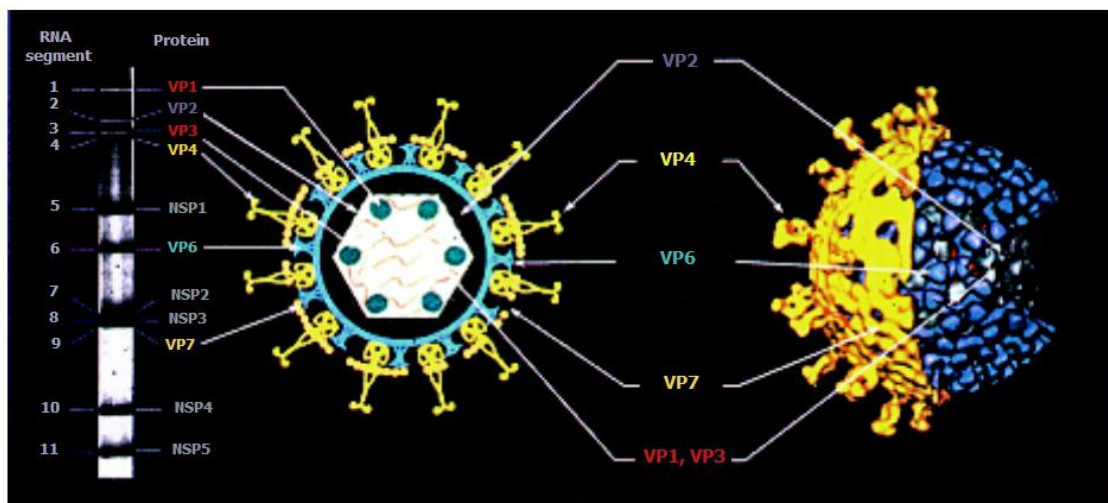
Razvoj cjepiva *Bovine parainfluenza 3* započeo je 1960-ih godina i traje sve do danas, te uključuje razvoj i ispitivanje modificiranih živih cjepiva (MLV), kao i inaktiviranih cjepiva (IV). Današnja modificirana živa cjepiva, uz virus *Bovine parainfluenza 3*, većinom sadrže jedan ili više drugih virusa, te ponekad i bakterije, dok intranazalna cjepiva koriste temperaturno osjetljive mutante čija modifikacija uključuje nemogućnost replikacije u donjim dišnim putevima. Virusna cjepiva većinom su kombinacija inaktiviranih virusa i modificiranih živih virusa, te svako pojedino cjepivo ima svoju ravnotežu između sigurnosti i učinkovitosti. Tako primjerice cjepiva s modificiranim živim virusom PIV3 postižu takozvani sterilizirajući imunitet, dok istovremeno takva cjepiva mogu imati smanjenu sigurnost. S druge strane, tradicionalna modificirana živa cjepiva nisu sigurna za cijepljenje trudnih junica jer imaju sklonost uzrokovati pobačaje kod životinja. Alveolarni makrofagi snažni su fagociti, ali relativno slabe antigen-prezentirajuće stanice kod prezentacije antigena T-limfocitima. Iako još uvijek nije jasno kako oslabljena živa cjepiva mogu doprinijeti oštećenju funkcije alveolarnih makrofaga, to svakako izaziva zabrinutost kod animalnih populacija koje su pod stresom i imunosupresivnih životinja poput teladi, a posebnu zabrinutost kod respiratornih virusa, uključujući i PIV3, izaziva posredovanje oštećenja antimikrobih funkcija kod alveolarnih makrofaga. Međutim, dodatno slabljenje modificiranih živih cjepiva kemijskim promjenama, osjetljivošću na temperaturu i drugim metodama učinila bi cjepiva sigurnijima za trudne životinje, dok bi istovremeno ta cjepiva izgubila sposobnost poticanja takozvanog sterilizirajućeg imuniteta (Ellis, 2010; Haanes i sur., 1997).

2.3. *Bovine rotavirus A*

2.3.1. Karakteristike virusa

Bovine rotavirus A je patogena zarazna čestica koja pripada porodici *Reoviridae*, te uzrokuje gastroenteritis kod novorođenčadi, mladih i odraslih goveda, a klinička slika se manifestira kroz depresiju, proljev, anoreksiju i dehidraciju oboljelih životinja. Genom *Bovine rotavirus A* sastoji se od dvolančane ribonukleinske kiseline (dsRNA) koja kodira za šest strukturnih proteina (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7) i šest

nestrukturnih proteina (NSP1, NSP2, NSP3 (NS34), NSP4, NSP5). Dvolančana RNA molekula zapravo se sastoji od jedanaest segmenata (slika 4), pri čemu svaki segment kodira za jedan protein, osim segmenta 11 koji kodira za proteine NSP5 i NSP6. Nestrukturni proteini NSP1, NSP3, NSP5 i NSP6 su uključeni u replikaciju virusa, a protein NSP4 u morfogenezu, dok su svi nestrukturni proteini, izuzev proteina NSP4, uključeni u interakciju s nukleinskim kiselinama. Također, proteini VP4, VP7, NSP1, NSP2 i NSP4 povezani su s virulencijom BRVA kod pojedinih životinja, dok proteini VP4, VP7, NSP1 i NSP4 ukazuju na heterogenost sekvenci kod stanica domaćina od kojih potječu. Dvostruku uzvojniju RNA okružuje troslojni proteinski omotač pri čemu se unutrašnji sloj omotača uglavnom sastoji od proteina VP2, dok se srednji sloj omotača sastoji od trimera VP6 koji omogućava određivanje skupine kojoj rotavirus pripada. Vanjski sloj virusnog omotača čine proteini VP4 i VP7 koji, kao samostalni neutralizirajući antigeni, omogućavaju klasifikaciju G i P serotipa virusa, te su važni kod binarne nomenklature virusa, pri čemu protein VP7 omogućava klasifikaciju virusa prema glikoproteinima (G serotip), dok protein VP4 omogućava klasifikaciju prema protezama (P serotip). Na temelju imunoreakcije monoklonskih antitijela, do danas je kod rotavirusa određena prisutnost četiri različite podgrupe rotavirusa A. Nestrukturni protein NSP4, kao virusni enterotoksin, sudjeluje u mehanizmu razvoja bolesti uzrokovane rotavirusom. S obzirom da su rotavirusi evoluirali pomoću mehanizama poput genetskog preslagivanja i točkastih mutacija, važno je provesti genetsku karakterizaciju rotavirusa kako bi se definirale dijagnostičke i preventivne mjere, te za uspješan razvoj učinkovitih cjepiva (Yang i sur., 2008; Doan i sur., 2013; Matthijnssens i sur., 2008).



Slika 4. Trodimenzionalna struktura i kodirajući geni virusa *Bovine rotavirus A* (modificirano prema Parashar i sur., 1998).

2.3.2. Replikacija virusa i klinička slika

Rotavirusi su patogene zarazne čestice stabilne u širokom rasponu pH, te se repliciraju u citoplazmi epitelnih stanica resica tankoga crijeva. S obzirom da ovaj virus često inficira mladunčad, stabilan je i u nepovoljnim uvjetima gastrointestinalnog trakta zbog puferskog djelovanja mlijeka u crijevima mladunčadi što omogućava njegovo preživljavanje i daljnje inficiranje epitelnih stanica crijeva. Rotavirusi inficiraju apsorpcijski vilozni epitel u gornjoj trećini tankog crijeva gdje se repliciraju i oslobađaju nove zarazne čestice u lumen crijeva, pri čemu je infekcija domaćina uglavnom ograničena na crijevnu sluznicu. Iako se rotavirusi mogu naći u vezivnom tkivu ispod crijevnog epitela i limfnom sustavu, u tim područjima neće provoditi replikaciju i sistemsko širenje kod imunokompetentnih osoba. Pretpostavka o postojanju rotavirusnih receptora još uvijek nije dokazana, te se pretpostavlja da virusi mogu pinocitozom ili izravnim prodiranjem ući u enterocite, epitelne stanice tankog crijeva čija je glavna funkcija apsorpcija hranjivih tvari i njihov transport u druga tkiva. Također, pretpostavlja se da receptori N-acetilneuraminske kiseline ili galaktoze mogu imati određenu ulogu kod prodiranja rotavirusa u enterocite procesom endocitoze zajedno s koreceptorima poput integrina. Do replikacije virusa dolazi nakon uklanjanja kapside što dovodi do aktivacije RNA-polimeraze (VP1) koja u VP1-VP3 transkripcijskom kompleksu proizvodi [(+)RNK] molekule pozitivne polarnosti, koje imaju ulogu mRNK, te se njihova translacija provodi u citoplazmi ili

služe kao kalup za replikaciju. Kako napreduje umnažanje virusa, zreli enterociti se odvajaju s površine crijevne sluznice, dok nezreli enterociti zauzimaju površinu crijevnih resica što dovodi do nagle promjene omjera u apsorpciji i sekreciji, te uzrokuje nakupljanje tekućine u lumenu crijeva. Nezreli enterociti nemaju funkcionalne aktivnosti poput apsorpcije, transporta natrija i glukoze, te lučenja enzima laktaze što osim gubitka zrelih enterocita dovodi i do osiromašnja gastrointestinalnog sustava domaćina ionima bikarbonata, natrija, kalija, klorida, te vodom. Unos majčinog mlijeka kod novorođenčadi sa smanjenom aktivnošću crijevne laktaze može dodatno pogoršati osmotsku disregulaciju, dok je mikrobiološka fermentacija neprobavljenog mlijeka jedan od ključnih faktora razvoja acidoze. Pojava teške dijareje kod novorođenčadi i mladih životinja posljedica je utjecaja svih prethodno navedenih čimbenika, upalnih promjena u crijevnom epitelu, te izloženosti životinja virusu, onečišćenom mlijeku, vodi i krmivima. Infekcije rotavirusom su raširene u prirodi, pri čemu rotavirusi A skupine čine većinu zaraze kod goveda. Zaražene životinje izlučuju feces koji sadrži visoku koncentraciju virusa, a virus u izlučenom fecesu preživljava i nekoliko mjeseci u stajama i uzgajalištima, te je otporan na mnoge dezinficijense. S obzirom da je koncentracija virusa koja uzrokuje infekciju kod životinja znatno manja od koncentracije virusa u fecesu, čak i minimalno onečišćenje okoliša virusom može dovesti do širenja infekcije kod teladi. Telad izlučuju virus kroz feces do drugog dana infekcije koja prosječno traje 7-8 dana, pri čemu se osjetljiva telad starosti 2-3 tjedna također može zaraziti, dok telad starosti 3 mjeseca obično više nema mogućnost zaraze. Međutim, kod teladi bivola infekcija se može pojaviti kod mladunčadi starosti od šest mjeseci (Dhama i sur., 2009; Parashar i sur., 1998).

2.3.3. Cjepivo *Bovine rotavirus A*

Zaštita od bolesti kod goveda prvenstveno ovisi o prisutnosti specifičnih antitijela u lumenu crijeva, a to je utvrđeno sakupljanjem kolostruma cijepljenih krava, predmlijeka kojeg luče majčine mliječne žlijezde potkraj trudnoće i prva dva do tri dana laktacije. Sakupljenim kolostrumom pet dana uzastopno hranjena su novorođena telad koja su zatim pokazala otpornost na infekcije izazvane rotavirusima. Međutim, pasivni imunitet teladi, stečen pomoću antitijela iz kolostruma, može se smanjiti tijekom teljenja i može biti nedovoljan kod izloženosti teladi visokoj koncentraciji

rotavirusa, ali istovremeno može pasivno zaštititi od proljeva i kontaminiranja okoliša virusom kroz feces. Također, ukoliko se uslijed cijepljenja kod teladi stvori visoka koncentracija specifičnih antitijela, tada bi kolostrum trebao imati dovoljan zaštitni učinak kod novorođenčadi, stoga se kao alternativnu strategiju uz cijepljenje, razmatra i hranjenje goveda umjetnim kolostrumom koji sadrži BRVA antitijela, sirutku i biljna ulja. Jedno od prvih cjepiva *Bovine rotavirus A* koja su razvijena bila su inaktivirana cjepiva koja nisu pokazala dovoljnu sigurnost za primjenu kod životinja, te se stoga pristupilo daljnjem razvoju cjepiva zbog čega su razvijena plazmidna DNK cjepiva, VLP cjepiva (čestice nalik virusima), subjedinična cjepiva i takozvana jestiva cjepiva na biljnoj bazi. Provođenjem imunizacije upotrebom plazmidne DNK koja kodira za VP4 gen, utvrđeno je kako se inducira humoralni i stanični imunološki odgovor, dok plazmidna DNK cjepiva kodiraju za VP6 gen koji inducira anti-VP6 imunoglobulin A (IgA) antitijela. Također, u jednom istraživanju provedena je oralna primjena plazmidne DNK inkapsulirane u polimerne mikročestice što se pokazalo efikasnim kod infekcija izazvanih rotavirusima. Subjedinična cjepiva temeljena na VP4 proteinu rotavirusa pokazala su se uspješnima u razvijanju imuniteta sluznice crijeva kod životinja, te su se djelotvornim pokazala i VLP cjepiva koja su sadržavala proteine kapside rotavirusa koja maksimalnu učinkovitost imaju ukoliko sadrže barem dva proteina različitih serotipa. Upotreba obrnute genetike, idealne metodologije za stvaranje infektivnog klona rotavirusa koji sadrži željeni segment gena, isprobana je kao jedan način razvoja cjepiva unutar kojeg je istraživanje bilo usmjereno na razvoj jestivih cjepiva na biljnoj bazi koja imaju mogućnost eksprimirati antigene rotavirusa kako bi se preveniralo kod pojave proljeva životinja uzrokovanog infekcijom *Bovine rotavirus A*. Trenutno se uz postignuti napredak u razvoju novih cjepiva, te pronalasku novih strategija razvoja cjepiva u kombinaciji s konvencionalnim cjepiva značajno doprinosi održavanju zdrave populacije goveda bez infekcija virusom *Bovine rotavirus A* (Dhama i sur., 2009; Patton, 2012).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Životinjski materijal (tkivo)

U ovome eksperimentalnom radu korištena su goveđa tkiva zaražena virusima koja su prikupljena na farmama na sjeveroistoku Španjolske u pokrajini Aragoniji u gradu Huesca i pokrajini Kataloniji u gradovima Girona i Lleida (slika 5), te su ustupljena od strane Dechra Brasil Pharmaceuticals (Tablica 1).



Slika 5. Geografska karta Španjolske s označenim gradovima u kojima su prikupljeni uzorci životinjskih tkiva koji su korišteni u ovome radu (modifikacija prema Anonymous 1, 2017).

Tablica 1. Karakteristike životinjskih tkiva zaraženih virusima (Dechra Brasil Pharmaceuticals).

Životinjska vrsta	govedo	govedo	govedo
Uzorak tkiva	stolica (izmet)	pluća	pluća
Dob životinje	< 15 dana	5 mjeseci	tov
Datum uzorkovanja	11.03.2019.	15.05.2019.	31.01.2019.
Lokacija farme	Girona	Huesca	Lleida
Virus	<i>Bovine rotavirus A</i>	<i>Bovine parainfluenza 3</i>	<i>Bovine herpesvirus 1</i>
qPCR Cq	24,79	23,5	23,8
Bolesti koju uzrokuje	probavne	respiratorne	respiratorne
Kontaminacija drugim virusom	-	-	<i>Bovine parainfluenza 3</i>
Cq	-	-	26,1
Stanice na kojima se virus uzgaja	MA-104	MDBK	MDBK

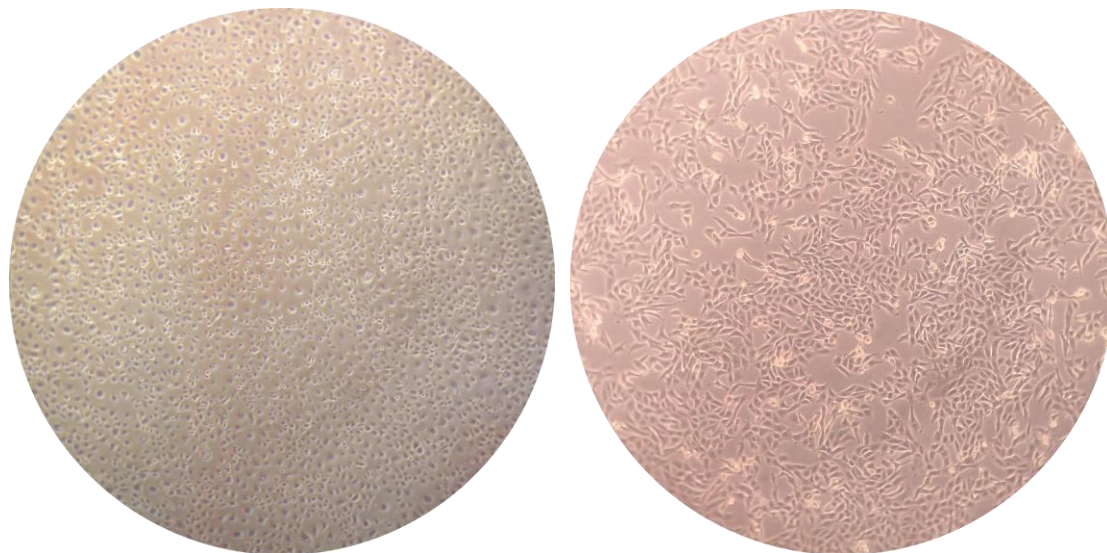
3.1.2. Kontinuirane stanične linije

Prilikom provođenja ovog istraživanja korištene su stanična linija MA-104 (eng. Monkey African Green Kidney Cells) i MDBK (eng. Madin-Darby Bovine Kidney Epithelial Cells) (slika 6) koje su čuvane u tekućem dušiku na oko -160 °C u banci stanica Laboratorija za razvoj proizvoda Cjepiva, odjel Razvoj cjepiva, Genera d.d.. Smrznute stanice MA-104 i MDBK čuvane su u vialicama u mediju DMEM (eng. Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Dulbeccova modifikacija Eagleove hranjive podloge) uz dodatak 10 % DMSO-a (dimetil sulfoksid, C₂H₆OS) i 20 % fetalnog govedeg seruma (eng. Fetal Bovine Serum, FBS).

Stanična linija MDBK uspostavljena je izolacijom stanica iz epitela bubrega goveda (*Bos taurus*) koje kao adherentne stanice rastu i razmnožavaju se prihvaćene na čvrstu površinu posuda u kojima se provodi njihov uzgoj. Morfološke karakteristike ove stanične linije uključuju vretenaste stanice koje imaju veliku ovalnu jezgru smještenu u nepravilno razgranatoj citoplazmi (ATCC, 2016a).

Stanična linija MA-104 uspostavljena je izolacijom stanica iz epitela bubrega afričkog zelenog majmuna (*Cercopithecus aethiops*), te su to također adherentne stanice ili

stanice ovisne o površini za rast. Morfološke karakteristike ove stanične linije uključuju ovalne i vretenaste stanice čija citoplazma s jezgrom nije toliko razgranata kao u slučaju stanične linije MDBK (ATCC, 2016b).



Slika 6. Stanične linije MA-104 i MDBK gledane inverznim transmisijskim svjetlosnim mikroskopom Axiovert 25 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Njemačka), lijeva slika - stanična linija MA-104 (uvećanje 100 x), desna slika - stanična linija MDBK (uvećanje 2 000 x) [vlastite fotografije].

3.1.3. Mediji i otopine

- DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium-low glucose (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- NEAA - Non-Essential Amino Acid Solution (100 x) (Lonza Group, Basel, Švicarska)
- PBS - Phosphate Buffered Saline (1 x Dulbecco's, PanReac AppliChem, AppliChem GmbH, Darmstadt, Njemačka)
- FBS - Fetal Bovine Serum (Cytiva, Global Life Sciences Solutions USA LLC, Marlborough, Sjedinjene Američke Države)
- BSA - Bovine Serum Albumine (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- Neomicin Ph Eur (AppliChem GmbH, Darmstadt, Njemačka)
- Trypsin - EDTA otopina (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)

- TPCK Trypsin (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Sjedinjene Američke Države)
- Penicilin/Streptomycin (10 000 Units mL⁻¹ penicilin, 10 000 µg mL⁻¹ streptomycin) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Sjedinjene Američke Države)
- Komplet “High Pure Viral Nucleic Acid Kit” (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka)
- Liofilizirani primeri (Metabion International AG, Planegg, Njemačka)
- Voda bez RNaza
- MasterMix (BioTool AG, Kirchberg, Švicarska)
- SYBR Green One Step qRT-PCR Kit (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- TSA podloga (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, Francuska)
- Kit za detekciju mikoplazmi “Microsart AMP Mycoplasma” (Minerva Biolabs GmbH, Sartorius AG, Göttingen, Njemačka)
- Kit za izolaciju DNA “Microsart AMP Extraction” (Minerva Biolabs GmbH, Sartorius AG, Göttingen, Njemačka)
- Plazmocin (InvivoGen, Toulouse, Francuska)

3.1.4. Oprema i uređaji

- Inverzni transmisijski svjetlosni mikroskop Axiovert 25 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Njemačka)
- Centrifuga Universal 32 (Hettich GmbH, Tuttlingen, Njemačka)
- Laminar s vertikalnim strujanjem zraka; LF-kabinet (Klima oprema, Samobor, Hrvatska)
- CO₂ inkubator za kulture stanica (Memmert GmbH, Schwabach, Njemačka)
- Microtube homogenizator BeadBug (Benchmark Scientific, New Jersey, Sjedinjene Američke Države)
- Centrifugalni separator CENTRIC 400R (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- Dry block thermostat Bio TDB-100 (BioSan, Riga, Latvija)
- Centrifuga PerfectSpin Mini (PEQLAB Biotechnologie GmbH, VWR, Erlangen, Njemačka)
- Vortex Mikser ZX4 (Velp Scientifica, Usmate Velate, Italija)
- DNA/RNA UV-cleaner box UVC/T-AR (BioSan, Riga, Latvija)

- qPCR LightCycler 480 Instrument II (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka)
- Millex-GP Syringe filter 0,22 μm (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- Automatske pipete (5 - 50 μL , 10 - 100 μL , 20 - 200 μL , 100 - 1 000 μL)
- Standardno sterilno posuđe za rad u laboratoriju s virusima i kulturama stanica

3.2. Metode

3.2.1. Uzgoj stanica

3.2.1.1. Priprema medija za uzgoj stanica

Uzgoj staničnih linija MA-104 i MDBK provodi se u *in vitro* uvjetima u T-bocama na prethodno pripremljenoj hranjivoj podlozi, pri čemu adherentne stanice staničnih linija MA-104 i MDBK rastu pričvršćene na dno T-boce sve dok ne potroše hranjive sastojke iz podloge, ne prerastu dostupnu površinu za rast ili njihov rast ne bude inhibiran nakupljenim toksičnim metabolitima samih stanica. Hranjiva podloga se priprema tako što se u bocu medija DMEM-low glucose volumena 500 mL, koja sadrži 1 000 mg L^{-1} glukoze, L-glutamin i natrijev piruvat, otpipetira 50 mL (10 % v/v) fetalnog goveđeg seruma (eng. Fetal Bovine Serum, FBS), 1 mL neomicina (koncentracije 25 mg mL^{-1}) i 5 mL NEAA (otopina neesencijalnih aminokiselina, eng. Non-Essential Amino Acid Solution) (Tablica 2).

Tablica 2. Sastav otopine neesencijalnih aminokiselina (Anonymous 2, 2020).

Aminokiselina	Molekulska masa (mmol mg^{-1})	Koncentracija (mg L^{-1})	Koncentracija (mM)
Glicin	75,0	750,0	10,0
L-Alanin	89,0	890,0	10,0
L-Asparagin	132,0	1 320,0	10,0
L-Asparaginska kiselina	133,0	1 330,0	10,0
L-Glutaminska kiselina	147,0	1 470,0	10,0
L-Prolin	115,0	1 150,0	10,0
L-Serin	105,0	1 050,0	10,0

3.2.1.2. Priprema stanica za uzgoj

Smrznute stanice MA-104 P-13 (pasaža 13) i MDBK P-148 (pasaža 148) koje su čuvane u vialicama (DMEM + 10 % DMSO + 20 % FBS) odmrzavaju se pod mlazom mlake vode, te se cijeli sadržaj otpipetira u plastičnu epruvetu s konusnim dnom u kojoj je nalazi 9 mL prethodno pripremljenog medija za uzgoj stanica (poglavlje 3.2.1.1.). Zatim se dobivena suspenzija stanica centrifugira (Universal 32, Hettich GmbH, Tuttlingen, Njemačka) na 670 x g kroz 5 minuta, te se supernatant dekantira, a stanice zaostaju u talogu na dnu epruvete. Stanice u talogu je potrebno "razbiti" prije provođenja daljnjeg koraka, nakon čega se u plastičnu epruvetu otpipetira 5 mL prethodno pripremljenog medija za uzgoj stanica (poglavlje 3.2.1.1.). Suspenzija stanica se pipetom resuspendira, a zatim se suspenzija otpipetira u T75 bocu u kojoj se nalazi 8 mL prethodno pripremljenog medija za uzgoj stanica (poglavlje 3.2.1.1.). Uzgoj stanica u T-boci provodi se u inkubatoru za uzgoj stanične kulture (Mettler GmbH, Schwabach, Njemačka) u kojem se održava stalna temperatura zraka na 37 °C, te u atmosferi koja sadrži 95 % zraka i 5 % CO₂.

3.2.1.3. Precjepljivanje stanične kulture (pasažiranje)

Tijekom inkubacije potrebno je pratiti vijabilnost stanica pomoću inverznog transmisijskog svjetlosnog mikroskopa (Axiovert 25, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Njemačka), te se prije precjepljivanja određuje postotak staničnog sjedinjenja, koji treba biti veći od 70 %, kako bi se provelo pasažiranje stanične kulture. Precjepljivanje stanica započinje se uklanjanjem cjelokupnog medija iz T-boce koje je potrebno provesti pažljivo bez dodirivanja dna T-boce kako se ne bi oštetile porasle adherentne stanice. Zatim se provodi ispiranje stanica dodatkom 7 mL PBS pufera (fosfatni pufer, eng. Phosphate-Buffered Saline) koji se dodaje kako bi se uklonio FBS i prisutni inhibitori tripsina. Dodani PBS se ukloni pipetom, te se ispiranje stanica provede još jednom. Zatim se u T-bocu otpipetira 2 mL tripsina koji cijepa veze između stanica i dna posude za uzgoj i tako omogućava njihovo odvajanje. Zaustavljanje enzimske reakcije i otpuštanje monosloja stanica s dna provodi se dodatkom 5 mL medija za uzgoj. Stanična suspenzija resuspendirana u mediju za uzgoj sada se dijeli u dvije nove T-boce tako što se u svaku T75 bocu otpipetira 3,5 ml stanične suspenzije, te se u svaku dodaje i 20-25 mL medija za uzgoj stanica.

Uzgoj stanica u T75 boci provodi se u inkubatoru za uzgoj stanične kulture (Mettler GmbH, Schwabach, Njemačka) u kojem se održava stalna temperatura zraka na 37 °C, te u atmosferi koja sadrži 95 % zraka i 5 % CO₂. Nakon inkubacije i porasta naciepljenih stanica u T75, pasažiranje se provodi u 4 do 6 jažica mikrotitarske ploče (slika 7), te se ponovno provodi inkubacija u inkubatoru za uzgoj stanične kulture.



Slika 7. Mikrotitarske ploče u kojima su uzgojene stanične linije MA-104 i MDBK za inokulaciju uzoraka virusa [vlastita fotografija].

3.2.2. Inokulacija uzoraka virusa na stanične kulture

3.2.2.1. Priprema medija za inokulaciju uzoraka virusa na stanične kulture

Medij za homogenizaciju tkiva i inokulaciju virusa (poglavlje 3.2.2.3.1. i 3.2.2.3.2.) priprema se u plastičnoj krioepreveti od 50 mL u koju se otpipetira 20 mL medija DMEM i 600 µL otopine penicilin/streptomycin (10 000 Units mL⁻¹ penicilin, 10 000 µg mL⁻¹ streptomycin).

Medij za uzgoj virusa *Bovine rotavirus A* priprema se u plastičnoj krioepreveti od 50 ml u koju se otpipetira 50 ml medija DMEM + TPCK Tripsin (50 mg TPCK Tripsina otopiti u 10 mL DMEM 0 %), 1 mL BSA (goveđi serum albumin, eng. Bovine Serum Albumin), 500 µL otopine penicilin/streptomycin (10 000 Units mL⁻¹ penicilin, 10 000 µg mL⁻¹ streptomycin) i 100 µL otopine neomicina (koncentracije 25 mg mL⁻¹).

Medij za uzgoj virusa *Bovine parainfluenza 3* (PIV3) i *Bovine herpesvirus 1* (BHV1) priprema se u plastičnoj krioepruveti od 50 mL u koju se otpipetira prethodno pripremljen medij za uzgoj stanica (poglavlje 3.2.1.1.), te 500 μL otopine penicilin/streptomycin ($10\,000\text{ Units mL}^{-1}$ penicilin, $10\,000\ \mu\text{g mL}^{-1}$ streptomycin).

3.2.2.2. Priprema razrjeđenja virusa

3.2.2.2.1. Priprema razrjeđenja virusa *Bovine rotavirus A*

Tekući uzorak stolice (121426 He) zaražen virusom *Bovine rotavirus A*, nakon odmrzavanja, se homogenizira pomoću vortex miksera ZX4 (Velp Scientifica, Usmate Velate, Italija), te se 50 μL tako homogeniziranog uzorka otpipetira u Eppendorf epruvetu u koju smo prethodno otpipetirali 1 mL medija za homogenizaciju tkiva (poglavlje 3.2.2.1.). U Eppendorf epruvetu dodana je i sterilizirana kuglica za usitnjavanje uzorka, te se pomoću Microtube homogenizatora BeadBug (Benchmark Scientific, New Jersey, Sjedinjene Američke Države) provodi homogenizacija uzorka na 4 000 o/min kroz 30 sekundi. Zatim je potrebno provesti centrifugiranje usitnjenog uzorka stolice u centrifugalnom separatoru CENTRIC 400R (Tehtnica, Železniki, Slovenija) na $670\ \text{x g}$ (ili 2 500 rpm) kroz 3 minute čime se razdvaja supernatant, koji sadrži viruse, od taloga s kuglicom. U sljedećem koraku provodi se razrjeđivanje uzorka pomoću multikanalne pipete tako što se 50 μL izdvojenog supernatanta otpipetira u prvu jažicu na mikrotitarskoj ploči u kojoj se nalazi 400 μL medija za homogenizaciju tkiva, te se uzorak resuspendira pipetom. Na taj način dobiveno je prvo razrjeđenje (10^{-1}) uzorka virusa, te se 100 μL prvog razrjeđenja otpipetira u drugu jažicu na mikrotitarskoj ploči u kojoj se nalazi 400 μL medija za homogenizaciju tkiva kako bi se dobilo drugo razrjeđenje (10^{-2}). Postupak se ponavlja još jednom kako bi se dobilo treće razrjeđenje (10^{-3}) uzorka virusa koje će se koristiti za inokulaciju stanične kulture MA-104.

3.2.2.2.2. Priprema razrjeđenja virusa *Bovine parainfluenza 3* i *Bovine herpesvirus 1*

Uzorak tkiva (goveđa pluća) zaražen virusom (124099 P - *Bovine parainfluenza 3*, odnosno 119479 P - *Bovine herpesvirus 1*) sterilnom pincetom se prenese na sterilnu staklenu Petrijevu zdjelicu, te se skalpelom odreže mali uzorak tkiva (dimenzija 4 x 4

mm) koji se pincetom prenese u Eppendorf epruvetu s kuglicom, te se otpipetira 1 mL medija za homogenizaciju tkiva (poglavlje 3.2.2.1.). Homogenizacija tkiva provodi se pomoću Microtube homogenizatora BeadBug (Benchmark Scientific, New Jersey, Sjedinjene Američke Države) na 4 000 o/min kroz 30 sekundi. Zatim je potrebno provesti centrifugiranje usitnjenog tkiva u centrifugalnom separatoru CENTRIC 400R (Tehtnica, Železniki, Slovenija) na 670 x g (ili 2 500 rpm) kroz 3 minute čime se razdvaja supernatant koji sadrži viruse, od taloga s kuglicom (slika 8). U sljedećem koraku provodi se razrjeđivanje uzorka pomoću multikanalne pipete tako što se 50 µL izdvojenog supernatanta otpipetira u prvu jažicu na mikrotitarskoj ploči u kojoj se nalazi 400 µL medija za homogenizaciju tkiva, te se uzorak resuspendira pipetom. Na taj način dobiveno je prvo razrjeđenje (10^{-1}) uzorka virusa, te se 100 µL prvog razrjeđenja otpipetira u drugu jažicu na mikrotitarskoj ploči u kojoj se nalazi 400 µL medija za homogenizaciju tkiva kako bi se dobilo drugo razrjeđenje (10^{-2}). Postupak se ponavlja sve dok se ne dobije peto razrjeđenje (10^{-5}) uzorka virusa koje će se koristiti za inokulaciju stanične kulture MDBK.



Slika 8. Usitnjavanje tkiva na centrifugalnom separatoru CENTRIC 400R (Tehtnica, Železniki, Slovenija) [vlastita fotografija].

3.2.2.3. Inokulacija uzoraka virusa na stanične kulture

3.2.2.3.1. Inokulacija uzoraka virusa *Bovine rotavirus A* na staničnu kulturu

Pomoću inverznog transmisijskog svjetlosnog mikroskopa (Axiovert 25, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Njemačka) potrebno je pratiti stanično sjedinjenje

stanične linije MA-104, te kada je ono veće od 90 % uklanja se sav medij iz jažica u kojima je proveden uzgoj stanica. Zatim se provodi ispiranje stanica s 4 mL PBS pufera uz kružno miješanje kojim se uklanja prisutan FBS (fetalni goveđi serum, eng. Fetal Bovine Serum) adsorbiran na površini stanica koji sadrži inhibitore tripsina. Dodani PBS (fosfatni pufer, eng. Phosphate-Buffered Saline) se ukloni pipetom, te se otpipetira 3 ml novog PBS-a i ponovno se provodi kružno miješanje i uklanjanje PBS-a pipetom. Na mikrotitarskoj pločici sa šest jažica, u kojima se nalaze isprane adherentne stanice MA-104, provodi se naciepljivanje prethodno pripremljenih razrjeđenja (3.2.2.2.1.) tako što se 300 μ L razrjeđenja ($10^{-1} = 5$ x razrjeđenje, $10^{-2} = 25$ x razrjeđenje, $10^{-3} = 125$ x razrjeđenje, K= negativna kontrola - samo medij) pažljivo otpipetira u tankom sloju kako bi se virus adsorbirao u stanice, a da se adherentne stanice ne uklone s dna jažica. Mikrotitarska pločica naciepljena s uzorcima virusa se inkubira u inkubatoru za uzgoj stanične kulture (Memmert GmbH, Schwabach, Njemačka) u kojem se održava stalna temperatura zraka na 37 °C, te u atmosferi koja sadrži 95 % zraka i 5 % CO₂ kroz 90 minuta uz povremeno lagano miješanje, kako zbog površinske napetosti naciepljene suspenzije, dio stanica u sredini jažica ne bi ostao bez inokuliranog razrijeđenog uzorka virusa. Nakon inkubacije, pipetom se ukloni inokulum iz svake jažice, te se otpipetira 3 mL medija za uzgoj virusa *Bovine rotavirus A* (poglavlje 3.2.1.1.) i mikrotitarska pločica s jažicama se ponovno inkubira na 37 °C kroz 72 sata.

3.2.2.3.2. Inokulacija uzoraka virusa *Bovine parainfluenza 3* i *Bovine herpesvirus 1* na staničnu kulturu

Pomoću inverznog transmisijskog svjetlosnog mikroskopa (Axiovert 25, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Njemačka) potrebno je pratiti stanično sjedinjenje stanične linije MDBK, te kada je ono veće od 90 % uklanja se sav medij iz jažica u kojima je proveden uzgoj stanica. Kod ove vrste stanica nije potrebno provodi ispiranje s PBS puferom kao što je slučaj kod stanica MA-104. Na mikrotitarskoj pločici sa šest jažica, u kojima se nalaze porasle adherentne stanice MDBK, provodi se naciepljivanje prethodno pripremljenih razrjeđenja (3.2.2.2.2.) tako što se 300 μ L razrjeđenja ($10^{-1} = 5$ x razrjeđenje, $10^{-2} = 25$ x razrjeđenje, $10^{-3} = 125$ x razrjeđenje, $10^{-4} = 525$ x razrjeđenje, $10^{-5} = 2\ 625$ x razrjeđenje, K= negativna kontrola - samo medij) pažljivo otpipetira u tankom sloju kako bi se virus adsorbirao u stanice, a da se

stanice ne uklone s dna jažica. Mikrotitarska pločica naci jepljena s uzorcima virusa se inkubira u inkubatoru za uzgoj stanične kulture (Memmert GmbH, Schwabach, Njemačka) u kojem se održava stalna temperatura zraka na 37 °C, te u atmosferi koja sadrži 95 % zraka i 5 % CO₂ kroz 90 minuta uz povremeno lagano miješanje kako zbog površinske napetosti naci jepljene suspenzije dio stanica u sredini jažica ne bi ostao bez inokuliranog razrijeđenog uzorka. Nakon inkubacije, pipetom se ukloni inokulum iz svake jažice, te se otpipetira 3 mL medija za uzgoj virusa *Bovine parainfluenza 3* (PIV3), odnosno *Bovine herpesvirus 1* (BHV1) (poglavlje 3.2.2.1.), te se mikrotitarska pločica s jažicama ponovno inkubira na 37 °C kroz 72 sata (slika 9).



Slika 9. Inkubacija mikrotitarskih pločica sa šest jažica nakon inokulacije s uzorcima virusa [vlastita fotografija].

3.2.3. Žetva virusa kultiviranih u kontinuiranim staničnim linijama

Tijekom i nakon inkubacije u trajanju od 72 sata pomoću inverznog transmisijskog svjetlosnog mikroskopa (Axiovert 25, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Njemačka) određuje se prisutnost citopatskog učinka stanica (eng. cytopathic effect, CPE ili ECP), te kada je citopatski učinak veći od 80 % provodi se žetva (sakupljanje) virusa. Citopatski učinak manifestira se kod infekcije stanica domaćina virusom. Tijekom umnažanja nekih virusa dolazi do nastanka promjena unutar inficiranih stanica, te se formiraju uklopine ili inkluzijska tjelešca koja su vidljiva svjetlosnim mikroskopom

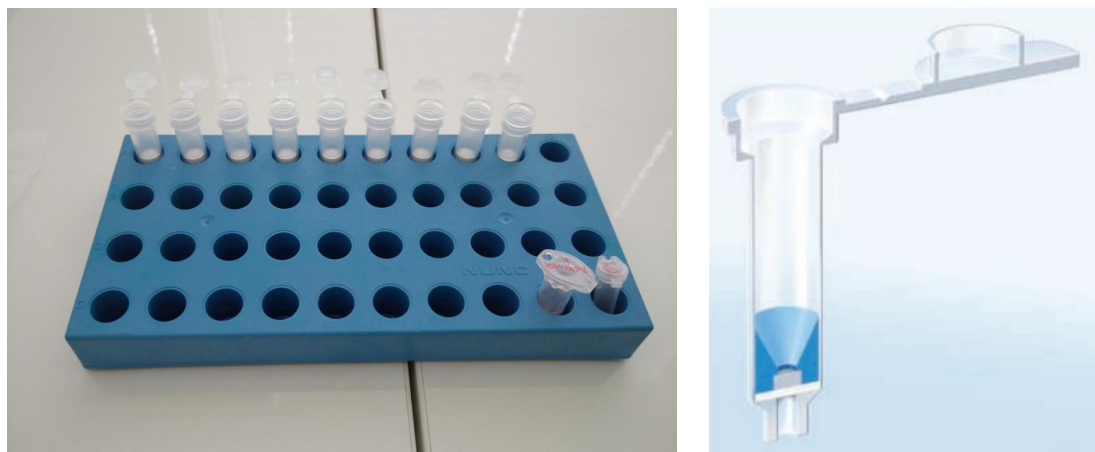
kao kuglaste, zrnate ili nepravilne tvorbe unutar samih inficiranih stanica domaćina (Anonymous 9, 2017). Ukoliko se CPE nije dogodio, potrebno je pričekati još jedan ciklus od 72 h, a ako se CPE ne dogodi niti tada potrebno je ponovno provesti infekciju odnosno inokulaciju uzoraka virusa. Žetva virusa provodi se tako što se protrese mikrotitarska pločica s jažicama kako bi se pospješilo otpuštanje virusa adsorbiranih na površinu adherentnih stanica, a volumeni tekućine koji sadrže viruse se prikupljaju pipetom i otpipetiraju u sterilne Eppendorf epruvete.

3.2.4. Izolacija nukleinske kiseline izoliranih virusa

S obzirom da imamo devet uzoraka koje čine uzorci *Bovine rotavirus A* (SN=supernatant, žetva 1:5, žetva 1:25), *Bovine parainfluenza 3* (SN=supernatant, žetva 1:5), *Bovine herpesvirus 1* (SN=supernatant, žetva 1:125, žetva 1:2 625) i stanične linije MDBK, pripremu Binding pufera provodimo prema protokolu za deset uzoraka tako što u Eppendorf epruvetu otpipetiramo 2 100 μ L Binding pufera i 41,7 μ L Poly(A).

Postupak izolacije virusne nukleinske kiseline započinje se tako što se u Eppendorf epruvetu otpipetira 200 μ L uzorka (uzorak supernatanta pripremi se tako što se volumenu od 100 μ L sačuvanog supernatanta (poglavlje 3.2.2.2.), otpipetira još 100 μ L PBS-a, dok uzorci žetve već imaju potreban volumen), 200 μ L prethodno pripremljenog Binding pufera i 50 μ L Proteinaze K, te se sve resuspendira pipetom. Dobivena suspenzija se inkubira 10 minuta na 72 °C kako bi se postigla optimalna temperatura za aktivnost enzima Proteinaze K, koja provodi uklanjanje proteina s nukleinske kiseline, te se nakon inkubacije otpipetira još 100 μ L Binding pufera. U sljedećem koraku koriste se High Pure Spin Filter Tubes koje sadrže nosač od silikagela, te se one stave u High Pure Collection Pure Tubes (slika 10) i provede se centrifugiranje suspenzije na centrifugalnom separatoru CENTRIC 400R (Tehnica, Železniki, Slovenija) kroz 1 minutu na 8 000 x g što omogućava vezanje virusne nukleinske kiseline na nosač od silikagela, dok soli, proteini, nukleotidi, te druge nečistoće prolaze kroz nosač i sakupljaju se u High Pure Collection Pure Tubes. Zatim se ukloni High Pure Collection Pure Tube sa sakupljenim volumenom, te se stavi nova High Pure Collection Pure Tube (taj korak provodi se nakon svakog centrifugiranja u ovom protokolu). U epruvetu se zatim otpipetira 500 μ L Pufera za uklanjanje inhibitora (eng. Inhibitor Removal Buffer) koji sadrži gvanidin HCl koji je

uključen u disocijaciju nukleoproteina, inhibiciju RNaza i denaturaciju proteina vezanih na nukleinsku kiselinu virusa. Ponovno se provodi centrifugiranje centrifugalnim separatorom kroz 1 minutu na 8 000 x g, te se zatim otpipetira 450 μ L Pufera za ispiranje (eng. Wash Buffer) koji sadrži etanol i omogućuje uklanjanje ostatka nečistoća. Nakon toga se provodi centrifugiranje centrifugalnim separatorom kroz 1 minutu na 8 000 x g, te se ponovno otpipetira 450 μ L Pufera za ispiranje. Centrifugiranje se provodi 90 sekundi na 8 000 x g, a pred kraj postupka se brzina centrifugiranja poveća na oko 17 500 x g kako bi se s nosača uklonili ostaci otapala. Na kraju se u epruvetu otpipetira 50 μ L Pufera za eluciju (eng. Elution Buffer) i provede centrifugiranje na 8 000 x g kako bi se virusna nukleinska kiselina eluirala s nosača od silikagela u High Pure Collection Pure Tube.



Slika 10. Lijeva slika - priprema devet uzoraka za izolaciju nukleinske kiseline [vlastita fotografija]; desna slika - High Pure Spin Filter Tube, koji sadrži nosač od silikagela, stavljen u High Pure Collection Pure Tube (Roche Diagnostics GmbH, 2010).

3.2.5. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR)

Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (eng. quantitative real-time PCR) je metoda koja omogućava umnažanje točno određenog i relativno kratkog dijela DNA molekule u velik broj identičnih kopija, a odvija se na principu standardne PCR reakcije (eng. Polymerase Chain Reaction). Ključan

preduvjet za uspješno odvijanje RT-PCR reakcije uključuje dobro odabrane primere (početnice ili klice) koji se kao kratke oligonukleotidne sekvence komplementarno sparuju s “lijeve” i “desne” strane dijela DNA koji želimo umnožiti tako da su njihovi 3'-krajevi orijentirani jedan prema drugome. Sintezu komplementarnog lanca prema kalupu jednog lanca DNA provodi termostabilna DNA polimeraza ($T_{opt.} = 72\text{ }^{\circ}\text{C}$), pri čemu kao produkt nastaje DNA molekula čija dužina odgovara dužini dijela DNA koju omeđuju primeri. Nastajanje produkta pritom se prati pomoću sustava za detekciju koji može uključivati upotrebu kemijskog spoja (najčešće SYBR Green) koji se ugrađuje u dvostruku uzvojniju DNA molekule između nukleotida što dovodi do emitiranja fluorescencije, upotrebu primera koji su obilježeni fluorescentnim spojevima ili standardnih primera i specijalnih proba koje su komplementarne dijelu DNA koji želimo umnožiti, a obilježene su različitim kombinacijama spojeva koji emitiraju svjetlosnu energiju i spojeva koji onemogućavaju emitiranje. PCR reakcija započinje denaturiranjem DNA molekule ($T = 95\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 2\text{-}5\text{ min}$) pri čemu se komplementarni lanci DNA odmotavaju i razdvajaju, te služe kao kalupi za amplifikaciju. U sljedećem koraku dolazi do komplementarnog vezanja primera na kalupe DNA molekule (eng. annealing), pri čemu temperatura ovog koraka ovisi o primerima koji se koriste, te je ona stoga u intervalu od $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($t = 30\text{-}60\text{ s}$). Zatim se odvija sinteza (elongacija) komplementarnog lanca molekule DNA pomoću DNA (Taq)-polimeraze ($T_{opt.} = 72\text{ }^{\circ}\text{C}$), a pritom trajanje ove faze ovisi o duljini dijela DNA koji želimo umnožiti ($t = 30\text{-}120\text{ s}$, $v = 1\text{ min/1 kb}$). Tijekom ovog koraka dolazi do povećanja broja novonastalih molekula DNA geometrijskom progresijom, te se većinom provodi 30 do 40 ciklusa nakon čega zbog potrošenih reaktanata ili inhibicije nastalih pirofosfata, denaturiranih nukleotida ili rehibridiziranog PCR produkta dolazi do smanjenja efikasnosti reakcije (tzv. Plato efekt).

U slučaju kada je genetski materijal koji želimo umnožiti RNA molekula, standardnoj PCR reakciji prethodi korak u kojem enzim reverzna transkriptaza prepisuje RNA u komplementarnu DNA koja se zatim može koristiti kao kalup tijekom amplifikacije RNA molekule. Taj korak je potrebno provesti s obzirom da molekula RNA jednolančana nukleinska kiselina i u svojoj strukturi umjesto tiamina sadrži uracil pa se ne može direktno umnožavati pomoću enzima DNA-polimeraze (Grahovac, 2009; Life Technologies Corporation, 2012).

3.2.5.1. Priprema primera za provođenje qRT-PCR

Liofilizirani primeri (Tablica 3) se kratko centrifugiraju na centrifugi PerfectSpin Mini (PEQLAB Biotechnologie GmbH, VWR, Erlangen, Njemačka), te im se dodaje voda bez RNaza kako bi ih otopili, pri čemu se otpipetira 100 puta veći volumen vode od njihove množine [n (*Bovine rotavirus A*)= 23,9 nmol, n (*Bovine parainfluenza 3*)= 22,4 nmol, n (*Bovine herpesvirus 1*)= 22,8 nmol]. Zatim se provede vorteksiranje pomoću Vortex Mikser ZX4 (Velp Scientifica, Usmate Velate, Italija), te centrifugiranje na centrifugi PerfectSpin Mini čime se postiže taloženje primera na dno epruvete od 1,5 mL. Otopljene primere razrjeđujemo deset puta tako što u Eppendorf epruvetu otpipetiramo 10 µL otopljenog primera i 90 µL vode bez RNaza, te se dobivena otopina vorteksira i centrifugira kako bi se primeri mogli koristiti kod metode qRT-PCR.

Tablica 3. Primeri korišteni u qRT-PCR metodi (Kishimoto i sur., 2017; Anamul i sur., 2015).

Ciljani patogeni mikroorganizam	Primeri (sekvenca 5'-3')	Veličina produkta (bp)	NK	Ciljani gen
<i>Bovine parainfluenza 3</i>	F TGTCTTCCACTAGATAGAGGGATAAAATT R GCAATGATAACAATGCCATGGA	90	ssRNA	Matrix protein
<i>Bovine herpesvirus 1</i>	F CAATAACAGCGTAGACCTGGTC R GCTGTAGTCCCAAGCTTCCAC	85	dsDNA	gen gE
<i>Bovine rotavirus A</i>	F TGGCGAAATAGACATGAC R CGACGGCAGC TCAACCTCTTA	130	dsRNA	-

3.2.5.2. Provođenje kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR)

Tablica 4. Sastav reakcijske smjese.

	1 uzorak (μL)
2 x qRT-PCR Master Mix (MM)	7,50
SYBR Enzimski Mix	0,75
Low Rox Referentna Boja	0,30
Početnica Forward 10 uM	0,30
Početnica Reverse 10 uM	0,30
Voda bez RNaza	3,60
RNA	2,25

Priprema reakcijske smjese provodi se u DNA/RNA UV-cleaner box UVC/T-AR (BioSan, Riga, Latvija) (slika 12) u Eppendorf epruveti tako što se prvo otpipetira 3,6 μL vode bez RNaza, a zatim se dodaju sve ostale komponente navedene u Tablici 4 zajedno sa SYBR Green sustavom detekcije. Reakcijska smjesa se vorteksira pomoću Vortex Mikser ZX4 (Velp Scientifica, Usmate Velate, Italija) i centrifugira pomoću centrifuge PerfectSpin Mini (PEQLAB Biotechnologie GmbH, VWR, Erlangen, Njemačka) kako bi se uklonili mjehurići zraka nastali tijekom pipetiranja.

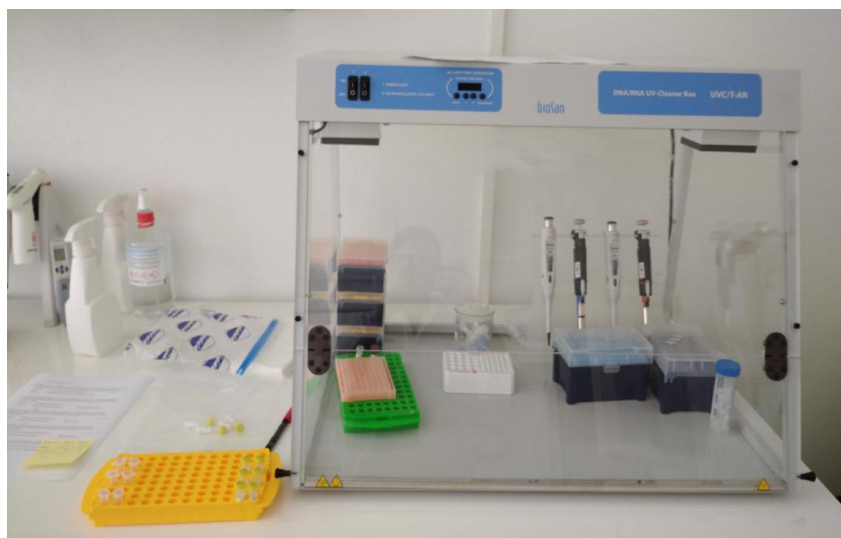


Slika 11. Termostatiranje uzoraka za qRT-PCR pomoću Dry block thermostat Bio TDB-100 (BioSan, Riga, Latvija) [vlastita fotografija].

Tijekom provođenja metode qRT-PCR koristi se mikrotitarska pločica s 96 jažica tako što se u jažice otpipetira 12,75 μ L pripremljene reakcijske smjese i 2,25 μ L uzorka koji je prethodno termostatiran pomoću Dry block thermostat Bio TDB-100 (BioSan, Riga, Latvija) na 72 °C kroz 30 sekundi (slika 11), te se na pločicu stavi prozirna folija, a zatim se ona kratko centrifugira u centrifugalnom separatoru CENTRIC 400R (Tehtnica, Železniki, Slovenija) kako bi se sadržaj spustio na dno jažica, te se pripremljena mikrotitarska pločica (slika 13) stavi u uređaj qPCR LightCycler 480 Instrument II (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka) na devedeset minuta pri čemu se PCR reakcija odvija u fazama navedenim u Tablici 5.

Tablica 5. Uvjeti provođenja metode qRT-PCR.

Faze metode qRT-PCR	Temperatura (°C)	Vrijeme	Broj ciklusa
Reverzna transkripcija (eng. Reverse transcription)	50	15 min	1 x
Početna denaturacija (eng. Initial denaturation)	95	5 min	1 x
Amplifikacija (eng. Amplification)	95	10 s	40 x
	60	30 s	40 x
Krivulja denaturacije (eng. Melting Curve)	95	1 min	1 x
	60	1 min	1 x
	95	-	1 x
Hlađenje (eng. Cooling)	40	30 s	1 x



Slika 12. DNA/RNA UV-cleaner box UVC/T-AR (BioSan, Riga, Latvija) za pripremu komponenti potrebnih za provođenje qRT-PCR [vlastita fotografija].

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	2	2	3	3	N.K. (Rota)	N.K. (Rota)				
B	4	4	5	5	N.K. (PIV3)	N.K. (PIV3)	6	6	7	7	8	8
C	9	9										
D	6	6	7	7	8	8	N.K. (BHV1)	N.K. (BHV1)	9	9		
E												
F												
G												
H												

Copyright © 2009 Edita Aksamitiene

Slika 13. Mikrotitarska pločica s 96 jažica za qRT-PCR (modificirano prema Anonymous 3, 2012).

Uzorak 1 - *Bovine rotavirus A* SN= supernatant; uzorak 2 - *Bovine rotavirus A* žetva 1:5; uzorak 3 - *Bovine rotavirus A* žetva 1:25; uzorak N.K.(BRVA) - primeri za *Bovine rotavirus A*; uzorak 4 - *Bovine parainfluenza 3* SN= supernatant; uzorak 5 - *Bovine parainfluenza 3* žetva 1:5; uzorak N.K. (PIV3) - primeri za *Bovine parainfluenza 3*; uzorak 6 - *Bovine herpesvirus 1* SN= supernatant; uzorak 7 - *Bovine herpesvirus 1* žetva 1:125; uzorak 8 - *Bovine herpesvirus 1* žetva 1:2 625; uzorak 9 - stanična linija MDBK; uzorak N.K. (BHV1) - primeri za *Bovine herpesvirus 1*.

3.2.6. Priprema banke virusa

3.2.6.1. Priprema banke virusa *Bovine rotavirus A*

Uzgoj stanica MA-104 provodi se u T75 bocama koje sadržavaju medij DMEM-low glucose (10 % glukoze). Tijekom uzgoja stanične linije prati se vijabilnost stanica pomoću inverznog transmisijskog svjetlosnog mikroskopa (Axiovert 25, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Njemačka), pri čemu se uzgoj provodi sve dok stanice MA-104 ne budu gotovo sjedinjene (~ 90 %). Uzgojene stanice se zatim ispiru s 10 mL PBS-a (fosfatni pufer, eng. Phosphate-Buffered Saline), PBS se zatim ukloni pipetom, te se postupak ispiranja provode još dva puta. Razrjeđenje uzorka (125 x) virusa *Bovine rotavirus A* se odmrzava pod mlazom mlake vode, te se provodi priprema inokuluma tako što se 0,1 mL uzorka virusa (supernatanta) otpipetira u Eppendorf epruvetu u koju smo prethodno otpipetirali 1,9 mL medija za uzgoj virusa *Bovine rotavirus A* (poglavlje 3.2.2.1.). Pripremljeni inokulum se inokulira u T75 bocu sa staničnom linijom MA-104 i inkubira se u inkubatoru za uzgoj stanične kulture (Memmert GmbH, Schwabach, Njemačka) u kojem se održava stalna temperatura zraka na 37 °C, te u atmosferi koja sadrži 95 % zraka i 5 % CO₂ kroz 90 minuta. Nakon inkubacije u T75 bocu dodaje se 10 mL medija za uzgoj virusa *Bovine rotavirus A*, te se ponovno provodi inkubacija u inkubatoru za uzgoj stanične kulture tijekom 3 dana. Nakon inkubacije od 70 sati, pomoću inverznog transmisijskog svjetlosnog mikroskopa određuje se prisutnost citopatskog učinka stanica (eng. cytopathic effect, CPE ili ECP), te s obzirom da je citopatski učinak veći od 80 %, odnosno većina stanica se odvojila od dna T-boce, provodi se žetva virusa. Žetva virusa provodi se vorteksiranjem kako bi se pospješilo otpuštanje virusa adsorbiranih na površinu adherentnih stanica, nakon čega se provodi centrifugiranje na centrifugalnom separatoru CENTRIC 400R (Tehtnica, Železniki, Slovenija) kroz 4 minute na 670 x g. Supernatant koji sadrži viruse se prikuplja pipetom i po 1 mL se otpipetira u deset sterilnih Eppendorf epruveta koje se zatim zamrzavaju na -80 °C čime je pripremljena banka virusa *Bovine rotavirus A*.

3.2.6.2. Priprema banke virusa *Bovine parainfluenza 3*

Uzgoj stanica MDBK provodi se u T75 bocama koje sadržavaju medij DMEM-low glucose (10 % glukoze). Tijekom uzgoja stanične linije prati se

vijabilnost stanica pomoću inverznog transmisijskog svjetlosnog mikroskopa (Axiovert 25, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Njemačka), pri čemu se uzgoj provodi sve dok stanice MDBK ne postignu oko 90 % sjedinjenja.

Razrjeđenje uzorka (5 x) virusa *Bovine parainfluenza 3*, kod kojeg se još nije javio CPE, zajedno se sa stanicama sakupi (žetva), vorteksira nekoliko minuta kako bi se pospješilo otpuštanje virusa adsorbiranih na površinu adherentnih stanica, nakon čega se provodi centrifugiranje na centrifugalnom separatoru CENTRIC 400R (Tehtnica, Železniki, Slovenija) kroz 3 minute na 670 x g.

Inokulum se priprema tako što se 0,2 mL uzorka virusa (supernatant) otpipetira u Eppendorf epruvetu u koju smo prethodno otpipetirali 1,8 mL medija DMEM-low glucose (10 % glukoze). Pripremljeni inokulum se inokulira u T75 bocu sa staničnom linijom MDBK i inkubira se u inkubatoru za uzgoj stanične kulture (Mettler GmbH, Schwabach, Njemačka) u kojem se održava stalna temperatura zraka na 37 °C, te u atmosferi koja sadrži 95 % zraka i 5 % CO₂ kroz 90 minuta. Nakon inkubacije u T75 bocu dodaje se 10 mL medija DMEM-low glucose (10 % glukoze), te se ponovno provodi inkubacija u inkubatoru za uzgoj stanične kulture tijekom 3 dana. Nakon inkubacije od 70 sati, pomoću inverznog transmisijskog svjetlosnog mikroskopa određuje se prisutnost citopatskog učinka stanica (eng. cytopathic effect, CPE ili ECP), te s obzirom da je citopatski učinak veći od 80 %, provodi se žetva virusa. Žetva virusa provodi se vorteksiranjem kako bi se pospješilo otpuštanje virusa adsorbiranih na površinu adherentnih stanica, nakon čega se provodi centrifugiranje na centrifugalnom separatoru CENTRIC 400R (Tehtnica, Železniki, Slovenija) kroz 4 minute na 670 x g. Supernatant koji sadrži viruse se prikuplja pipetom i po 1 mL se otpipetira u deset sterilnih Eppendorf epruveta koje se zatim zamrzavaju na -80 °C čime je pripremljena banka virusa *Bovine parainfluenza 3*.

3.2.6.3. Priprema banke virusa *Bovine herpesvirus 1*

Uzgoj stanica MDBK provodi se u T75 bocama koje sadržavaju medij DMEM-low glucose (10 % glukoze). Tijekom uzgoja stanične linije prati se vijabilnost stanica pomoću inverznog transmisijskog svjetlosnog mikroskopa (Axiovert 25, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Njemačka), pri čemu se uzgoj provodi sve dok stanice MDBK ne postignu oko 90 % sjedinjenja.

Inokulum se priprema tako što se 0,01 mL razrijeđenja uzorka (2 625 x) virusa *Bovine Herpesvirus 1* otpipetira u Eppendorf epruvetu u koju smo prethodno otpipetirali 2 ml medija DMEM-low glucose (10 % glukoze). Pripremljeni inokulum se inokulira u T75 bocu sa staničnom linijom MDBK i inkubira se u inkubatoru za uzgoj stanične kulture (Membert GmbH, Schwabach, Njemačka) u kojem se održava stalna temperatura zraka na 37 °C, te u atmosferi koja sadrži 95 % zraka i 5 % CO₂ kroz 90 minuta. Nakon inkubacije u T75 bocu dodaje se 10 mL medija DMEM-low glucose (10 % glukoze), te se ponovno provodi inkubacija u inkubatoru za uzgoj stanične kulture. Nakon inkubacije u trajanju od 20 sati, pomoću inverznog transmisivskog svjetlosnog mikroskopa određuje se prisutnost citopatskog učinka stanica (eng. cytopathic effect, CPE ili ECP), te s obzirom da je citopatski učinak veći od 80 %, provodi se žetva virusa. Inkubacija virusa *Bovine herpesvirus 1* trajala je vrlo kratko, u odnosu na inkubaciju virusa BRVA i PIV3, ali nije vidljiva bakterijska kontaminacija uzorka. Nakon 24 sata, T-boca je smrznuta na -80 °C, zatim odmrznuta stavljanjem u inkubator na temperaturu 37 °C, nakon čega je supernatant koji sadrži viruse prikupljen pipetom i provedeno je centrifugiranje na centrifugalnom separatoru CENTRIC 400R (Tehtnica, Železniki, Slovenija) kroz 5 minuta na 670 x g. Supernatant se zatim u volumenu od 1 mL otpipetira u deset sterilnih Eppendorf epruveta koje se zatim zamrzavaju na -80 °C čime je pripremljena banka virusa *Bovine herpesvirus 1*.

3.2.7. Provjera banke virusa qRT-PCR-om

Pripremljene banke virusa *Bovine rotavirus A*, *Bovine parainfluenza 3* i *Bovine herpesvirus 1* analiziraju se provođenjem kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu u uvjetima koji su opisani u poglavlju 3.2.5.2.. Provođenjem qRT-PCR potrebno je utvrditi sadrže li umnožene banke virusa kontaminaciju drugim virusom ili nekim mikroorganizmom, te ukoliko je kontaminacija prisutna potrebno je provesti purifikaciju banke virusa kako bi u konačnici dobili čistu kulturu banke virusa.

Kao rezultat provedene qRT-PCR reakcije dobije se Ct vrijednost (Tablica 6) ili granični ciklus (eng. the threshold cycle, Ct) koja označava točku na krivulji u kojoj dolazi do naglog povećanja intenziteta fluorescencije, što se obično događa nekoliko

standardnih devijacija iznad bazne linije (eng. baseline) koja obuhvaća razinu signala tijekom početnih ciklusa PCR-a u kojima se malo mijenja fluorescencijski signal.

Tablica 6. Interpretacija rezultata qRT-PCR reakcije (Anonymous 6, 2013).

Ct vrijednost	Rezultat
Ct < 29	Snažna pozitivna reakcija (prisutna obilna ciljna nukleinska kiselina, NK u uzorku)
Ct = 30 - 37	Pozitivna reakcija (umjerena količina ciljne NK u uzorku)
Ct = 38 - 40	Slaba reakcija (minimalna količina ciljne NK u uzorku, mogućnost infekcije ili kontaminacije)

3.2.8. Purifikacija - uklanjanje kontaminacije *Bovine parainfluenza 3 (PIV3)* iz uzorka virusa *Bovine herpesvirus 1*

Koriste se tri T25 boce inokulirane s MDBK staničnom linijom ($1,5 \times 10^6$ stanica), te je promatranjem pomoću inverznog transmisijskog svjetlosnog mikroskopa vidljivo kako su stanice 60 - 70 % sjedinjene (konfluentne).

Potrebno je napraviti razrjeđenja medija DMEM-low glucose (10 % glukoze) u omjeru 1:2 000, 1:20 000 i 1:200 000, te se pripremljena razrjeđenja medija otpipetiraju u po jednu T25 bocu s MDBK staničnom linijom. Prije inokulacije, medij se ukloni pipetom, a stanice se inokuliraju s 0,5 mL prethodno pripremljenog inokuluma [0,01 mL razrjeđenja uzorka (2×10^6) virusa *Bovine herpesvirus 1* + 2 mL medija DMEM-low glucose, poglavlje 3.2.6.3.] i T-boce se inkubiraju u inkubatoru za uzgoj stanične kulture (Mettler GmbH, Schwabach, Njemačka) u kojem se održava stalna temperatura zraka na 37 °C, te u atmosferi koja sadrži 95 % zraka i 5 % CO₂ kroz 60 minuta. Nakon inkubacije, pipetom se ponovno uklanja medij, te se u T-boce otpipetira 5 mL medija DMEM-low glucose (10 % glukoze) tako da se prekrije površina stanica na dnu boce. Provodi se inkubacija T25 boca u inkubatoru za uzgoj stanične kulture uz svakodnevno praćenje citopatskog učinka stanica (eng. cytopathic effect, CPE ili ECP). Nakon inkubacije u trajanju od 24 sata, CPE je već vidljiv i to najviše kod nižih razrjeđenja medija DMEM, te kod tri-četiri veća razrjeđenja medija, nakon čega se T25 boce smrzavaju na -80 °C.

Koristi se T75 boca s MDBK staničnom linijom kod koje su stanice gotovo sjedinjene, te se otpipetira 1 mL 0,25 % - tneg tripsina koji cijepa veze između stanica i dna posude za uzgoj i tako omogućava njihovo odvajanje. Nakon tripsinizacije, pola volumena T-boce se ukloni pipetom. T25 boca s medijem razrijeđenim u omjeru 1:200 000 se odmrzava stavljanjem u inkubator na temperaturu 37 °C, centrifugira se na centrifugalnom separatoru CENTRIC 400R (Tehtnica, Železniki, Slovenija) kroz 5 minute na 670 x g. 100 µL izdvojenog supernatanta otpipetira u 3 mL MDBK suspenzije u T75 bocu i provede se inkubacija u inkubatoru za uzgoj stanične kulture kroz 30 minuta. Nakon provedene inkubacije, u T-bocu se otpipetira 7 mL medija DMEM-low glucose (10 % glukoze) i provede se inkubacija tijekom noći. 24 sata nakon provedene infekcije MDBK stanica, citopatski učinak stanica je vidljiv, te se provodi žetva tako što se pipetom sakuplja supernatant i otpipetira u volumenu od 1 mL u deset sterilnih Eppendorf epruveta koje se zatim zamrzavaju na -80 °C.

3.2.9. Provjera pročišćene banke virusa *Bovine herpesvirus 1* qRT-PCR-om

Pročišćena banka virusa *Bovine herpesvirus 1* analizira se provođenjem kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu u uvjetima prema kojima je provedena qRT-PCR u poglavlju 3.2.5.2.. Na taj način želi se odrediti je li purifikacijom uklonjena kontaminacija iz banke virusa *Bovine herpesvirus 1*, te je li dobivena čista kultura banke virusa.

3.2.10. Test sterilnosti banke virusa

Test sterilnosti proveden je kako bi se utvrdila prisutnost bakterija u uzgojenim bankama virusa *Bovine rotavirus A*, *Bovine parainfluenza 3* i *Bovine herpesvirus 1*. U ovoj metodi korištena je TSA podloga (Tryptoza sojin agar, eng. Trypticase soy agar) (slika 14) koja je čvrsti i neselektivni medij koji sadrži dovoljnu količinu hranjivih sastojaka koja omogućava rast širokog spektra bakterija i drugih mikroorganizama. Kao medij opće namjene, TSA podloga je često osnovni medij drugih vrsta hranjivih podloga, te se većinom obogaćuje krvlju životinja (npr. defibriniranom ovčjom krvlju) kako bi se omogućio izraženiji rast prisutnih kontaminanata u uzgojenim kulturama mikroorganizama (Anonymous 4, 2020).

U Testu sterilnosti korištena TSA podloga (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, Francuska) koja u volumenu od 1 litre sadrži 15 g triptoze (eng. Tryptone, izvor aminokiselina), 5 g soje (eng. soytone, izvor vitamina i ugljikohidrata), 5 g natrijevog klorida (održava osmotsku ravnotežu) i 15 g agara. Na TSA podlogu nanesen je homogenizirani uzorak uzgojenih banki virusa u volumenu od 1 mL, te je razmazan i provedena je inkubacija u CO₂ inkubatoru za kulture stanica (Memmert GmbH, Schwabach, Njemačka) na 32,5 °C tijekom 4-5 dana, pri čemu su podloge provjeravane nakon 96 i 120 sati kako bi se odredio stupanj rasta i veličina kolonija.



Slika 14. Test sterilnosti (Anonymous 5, 2020).

3.2.11. Test na mikoplazme

Test za određivanje moguće prisutnosti mikoplazmi u uzorcima je metoda koja se temelji na izolaciji DNA i provođenju lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (eng. Real-Time Polymerase Chain Reaction, RT-PCR).

3.2.11.1. *Mollicutes* i *Mycoplasma*

Intracelularni parazitski mikroorganizmi iz roda *Mollicutes* pripadaju carstvu *Bacteria* kao i rod bakterija *Mycoplasma*, te su karakteristični zbog odsutstva stanične stijenke koju su “izgubili” tijekom evolucije, kao i gene koji kodiraju za nju, međutim većinom sadrže sterole koji staničnu membranu čine čvršćom. Sličnosti u slijedu

nukleotida rRNA i niski udio GC baza (oko 35 %) pokazuju kako su mikroorganizmi roda *Mollicutes* slični rodovima *Bacillus* i *Clostridium* zbog čega se često navedeni rodovi bakterija svrstavaju u koljeno *Firmicutes* kojem pripadaju i Gram pozitivne bakterije. Kod translacije mRNA u proteine, univerzalni stop kodon triplet UGA bakterije roda *Mollicutes* ne koriste za zaustavljanje procesa translacije, nego taj kodon kodira za aminokiselinu triptofan. Ta modifikacija kod roda *Mollicutes* rezultat je niskog udjela baza GC zbog čega je kodon UGG, koji normalno kodira za triptofan, “zamijenjen” s UGA, pa je ove mikroorganizme relativno lako detektirati u ljudskom tkivu pomoću PCR metode. *Mollicutes* su veličine oko 0,2 µm i imaju mali genom čija je veličina manja od 1 000 kb (kilobaza). U prirodi rod *Mollicutes* nikada nije pronađen kao slobodni živući organizam, nego kao parazit zahtijeva domaćina poput čovjeka (*Mycoplasma*, *Ureaplasma*), te biljaka i insekata (*Spiroplasma*, *Phytoplasma*) (Berman, 2012).

Mikroorganizmi roda *Mycoplasma* su brzorastući organizmi koji se uzgajaju u laboratorijskim uvjetima, te pritom zahtijevaju kompleksnu hranjivu podlogu za rast i razmnožavanje. Često ih je teško uzgojiti i identificirati iz kliničkih uzoraka s obzirom da su uzorci kontaminirani gljivicama ili drugim bakterijama. Rod *Mycoplasma* većinom uzrokuje subkliničke, suptilne kronične ili sporo progresivne bolesti, te rijetko uzrokuju upale koje dovode do smrti zaraženog organizma. Oko 60-ak vrsta bakterija *Mycoplasma* ima sposobnost formiranja biofilma koji im omogućuje preživljavanje nepovoljnih uvjeta kao što su toplina, isušivanje i dezinficijensi zbog čega su vrlo značajni kontaminanti koje je teško ukloniti iz okoliša. Također, mogućnost stvaranja biofilma u nepovoljnim uvjetima predstavlja jedan mehanizam “obrane” koji im omogućava preživljavanje unutar domaćina kojeg su inficirali jer ih biofilm može zaštititi i od antibiotika (Citti i Blanchard, 2013).

3.2.11.2. Ekstrakcija

Test ekstrakcije sastoji se od četiri faze koje uključuju liziranje stanica, selektivno vezanje DNA molekule na filter u epruveti/tubici, uklanjanje ostataka kontaminanata i inhibitora, te ispiranje izolirane i pročišćene DNA.

Tablica 7. Sastav kita za izolaciju DNA “Microsart AMP Extraction” (Sartorius Stedim Biotech GmbH, 2016a).

Sadržaj kita	Priprema komponenti kita
Pufer A1	-
Pufer A2	-
Pufer B	U bočicu Pufera B otpipetirati 15 mL 96 % -tnog etanola.
Pufer C	U bočicu Pufera C otpipetirati 48 mL 96 % -tnog etanola.
Pufer D	-
Proteinaza K	4 mg Proteinaze K + 1 mL vode za injekcije (PCR voda).

Ekstrakcija započinje pripremom staničnog materijala tako što se 200 μ L uzorka otpipetira u epruvetu od 1,5 mL (pri čemu materijal/uzorak može sadržavati do 10^6 stanica), te se dodaje 12 μ L Interne kontrole i 200 μ L Pufera A1 (Tablica 7). Sadržaj se kratko homogenizira pomoću vortex miješalice, te se otpipetira 10 μ L Proteinaze K (materijal sadrži visoku koncentraciju proteina, $> 10 \text{ mg mL}^{-1}$) i inkubira u termobloku na 70 °C kroz 10 minuta uz povremeno miješanje sadržaja epruvete. Nakon provedene inkubacije, uzorak se ostavi na sobnoj temperaturi tijekom 2 minute, te se zatim provede kratko centrifugiranje kako bi se uklonili ostaci tekućine sa stijenke epruvete. U epruvetu se otpipetira 400 μ L Pufera A2, te se sadržaj epruvete homogenizira pomoću vortex miješalice. Sav sadržaj se iz epruvete prenese u kolonu s filterom koja se nalazi u epruveti za sakupljanje filtrata, te se provede centrifugiranje pomoću centrifuge na 10 000 x g tijekom 1 minute. Nakon centrifugiranja, izdvojeni filtrat se uklanja iz epruvete za sakupljanje, te se u kolonu s filterom otpipetira 500 μ L Pufera B i ponovno se provede centrifugiranje na 10 000 x g tijekom 1 minute. Epruveta sa sakupljenim filtratom se uklanja, te se kolona s filterom stavi u novu epruvetu za sakupljanje filtrata i otpipetira se 500 μ L Pufera C. Ponovno se provede centrifugiranje pomoću centrifuge na 10 000 x g tijekom 1 minute, te se epruveta sa sakupljenim filtratom uklanja, a kolona s filterom se stavi u novu epruvetu za sakupljanje filtrata i provede se centrifugiranje pri maksimalnoj brzini kako bi se uklonili ostaci Pufera C. Kolona s filterom se stavi u epruvetu za pohranu izolata DNA, te se otpipetira 60 μ L Pufera D, koji je prethodno zagrijan na 70 °C u termobloku, na sredinu filtera (silikatne membrane). Kolona s filterom se inkubira na sobnoj temperaturi tijekom 2 minute, a zatim se pomoću centrifuge centrifugira na

8 000 x g čime se DNA izdvaja s membrane u epruvetu, te se dobiveni izolat DNA može koristiti za PCR reakciju.

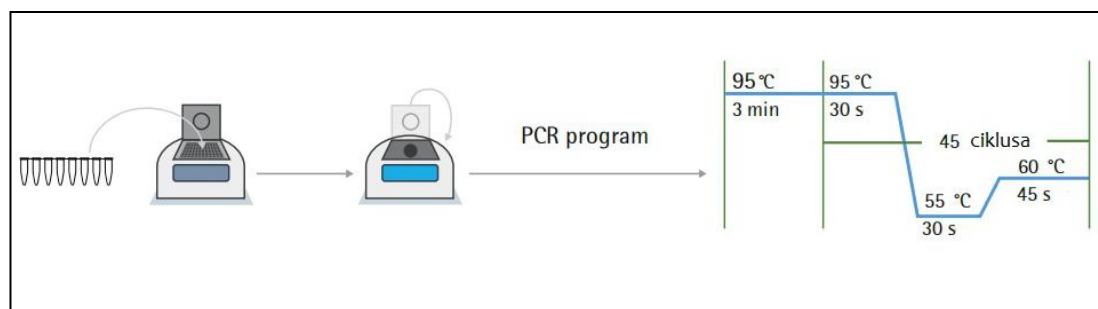
3.2.11.3. Detekcija mikoplazmi

Priprema Mycoplasma Mixa provodi se u UV kabinetu (DNA/RNA UV-cleaner box), dok se Pozitivna kontrola priprema u prostoru za izolaciju DNA.

Postupak se provodi u mikrotitarskoj pločici s 96 jažica tako što se u sve jažice koje će se koristiti otpipetira 50 μ L Mycoplasma Mixa. U dvije jažice, koje sadrže Mycoplasma Mix, se otpipetira 50 μ L Negativne kontrole, a zatim se u sljedeće jažice otpipetira 50 μ L izolata DNA (poglavlje 3.2.11.2.), te se u dvije jažice otpipetira 50 μ L Pozitivne kontrole. Prilikom dodavanja pojedinih komponenti Kita za detekciju mikoplazmi potrebno je paziti da ne dođe do križne kontaminacije. Mikrotitarska ploča se kratko centrifugira pomoću centrifugalnog separatora kako bi se sadržaj spustio na dno jažica, te se pripremljena mikrotitarska pločica stavi u PCR uređaj (slika 15) gdje se reakcija odvija prema uvjetima u Tablici 8.

Tablica 8. Uvjeti provođenja qRT-PCR-a (Sartorius Stedim Biotech GmbH, 2016b).

Segment	Temperaturni profil		
	Vrijeme	Temperatura (°C)	Broj ciklusa
1	Odmotavanje uzvojnice (eng. Pre-Melt)		
	3 min	95	1 x
2	Amplifikacija (eng. Amplification)		
	Denaturacija (eng. Denaturing)		
	30 s	95	45 x
	Komplementarno sparivanje primera (eng. Annealing)		
	Produljivanje (eng. Extension)		
	45 s	60	



Slika 15. Shema provođenja qRT-PCR metode (modifikacija prema Sartorius Stedim Biotech GmbH, 2016b).

Tablica 9. Sastav kita za detekciju mikoplazmi “Microsart AMP Mycoplasma” (Sartorius Stedim Biotech GmbH, 2016b).

Priprema komponenti kita	
Mycoplasma Mix	Centrifugirati epruvetu s liofiliziranim sadržajem 5 sekundi na maksimalnoj brzini, a zatim otpipetirati 1275 μ L Pufera za rehidraciju.
Pufer za rehidraciju (eng. Rehydration Buffer)	Sadržaj inkubirati 5 minuta na sobnoj temperaturi, te ga zatim homogenizirati miješanjem i centrifugiranjem.
Pozitivna kontrola	Centrifugirati epruvetu s liofiliziranim sadržajem 5 sekundi na maksimalnoj brzini, a zatim otpipetirati 300 μ L PCR vode. Sadržaj inkubirati 5 minuta na sobnoj temperaturi, te ga zatim homogenizirati miješanjem i centrifugiranjem.
Interna kontrola	Centrifugirati epruvetu s liofiliziranim sadržajem 5 sekundi na maksimalnoj brzini, a zatim otpipetirati 300 μ L PCR vode. Sadržaj inkubirati 5 minuta na sobnoj temperaturi, te ga zatim homogenizirati miješanjem i centrifugiranjem.
PCR voda	Koristi se za pripremu Interne i Pozitivne kontrole.

Prisutnost *Mollicutes* očituje se povećanjem fluorescencijskog signala u FAMTM kanalu tijekom PCR metode, dok se uspješno provedena reakcija bez inhibicije očituje povećanjem fluorescencijskog signala u kanalu Interne kontrole (ROXTM kanal).

Deoksiribonukleinska kiselina (DNA) *Mollicutes*-a i DNA Interne kontrole tijekom PCR reakcije pokazuju različitu jačinu signala u pripadajućim kanalima koja ovisi o njihovoj koncentraciji, pa se kod vrlo niske koncentracije Interne kontrole u PCR Mixu jačina signala u ROXTM kanalu smanjuje s povećanjem koncentracije DNA *Mollicutes* u uzorku.

Kit za detekciju mikoplazmi “Microsart AMP Mycoplasma” (Tablica 9) ima mogućnost prepoznati bakterije *Staphylococcus epidermis* i *Bacillus subtilis* subsp. *Spizizenii* kao mikoplazme što može dati lažno negativan rezultat Testa na mikoplazme. Kod pozitivnog Testa na mikoplazme potrebno je uzorak testirati na prisutnost tih dviju bakterija kako bi se eliminirao lažno pozitivan rezultat testa. Međutim, pozitivan rezultat Testa na mikoplazme ne mora značiti da su u uzorku prisutne žive mikoplazme s obzirom da se qRT-PCR metodom provodi umnažanje nukleinske kiseline koja ne mora nužno potjecati od živih mikoplazmi (Tablica 10) (Sartorius Stedim Biotech GmbH, 2016b).

Tablica 10. Interpretacija rezultata Testa na mikoplazme (Sartorius Stedim Biotech GmbH, 2016b).

Detekcija <i>Mollicutes</i> u FAMTM kanalu	Interna kontrola u ROXTM kanalu	Interpretacija rezultata
Pozitivno (Ct < 40)	Nije značajno	Pozitivno, prisutnost <i>Mollicutes</i> (mikoplazmi)
Negativno (no Ct)	Negativno (no Ct)	PCR inhibicija
Negativno (no Ct)	Pozitivno (Ct < 40)	Negativno
Granična linija (Ct > 40)	Pozitivno (Ct < 40)	Rezultat nije valjan, potrebno je ponoviti postupak, uključujući i DNA izolaciju
Granična linija (Ct > 40)	Negativno (no Ct)	PCR inhibicija

3.2.12. Uklanjanje mikoplazmi iz uzorka *Bovine parainfluenza 3*

Uklanjanje kontaminacije mikoplazmom predstavlja izazov s obzirom da je pročišćavanje kontaminiranog uzorka potrebno provesti bez gubitka zaraznosti virusnog materijala, te korištenjem jednostavne i isplative metode koja mora biti primjenjiva i učinkovita za veliki broj različitih virusa. Baronti i sur. (2013) su u svojem eksperimentu primijenili antibiotik plazmociin koji se pokazao učinkovit u uklanjanju mikoplazmi iz dvadesetak uzoraka virusa, bez ponovnog pojavljivanja mikoplazmi nakon petnaest provedenih precjepljivanja (pasažiranja). Također, plazmociin je relativno jeftin način uklanjanja mikoplazmi pri čemu količina antibiotika plazmociina potrebna za jednu reakciju ili postupak iznosi manje od jednog dolara.

3.2.12.1. Priprema stanica za uzgoj i precjepljivanje stanične kulture (pasažiranje)

Smrznute stanice iz stanične linije MDBK P-147 (pasaža 147) koje su čuvane u vialici (DMEM + 10 % DMSO + 20 % FBS) odmrzavaju se pod mlazom mlake vode, te se cijeli sadržaj otpipetira u plastičnu epruvetu s konusnim dnom u kojoj je nalazi 9 mL prethodno pripremljenog medija za uzgoj stanica (poglavlje 3.2.1.1.). Zatim se dobivena suspenzija stanica centrifugira (Universal 32, Hettich GmbH, Tuttlingen, Njemačka) na 670 x g kroz 5 minuta, te se supernatant dekantira, a stanice zaostaju u talogu na dnu epruvete. Stanice u talogu je potrebno "razbiti" prije provođenja daljnjeg koraka, nakon čega se u plastičnu epruvetu otpipetira 5 mL prethodno pripremljenog medija za uzgoj stanica. Suspenzija stanica se pipetom resuspendira, a zatim se suspenzija otpipetira u T75 bocu u kojoj se nalazi 8 mL prethodno pripremljenog medija za uzgoj stanica. Uzgoj stanica u T-boci provodi se u inkubatoru za uzgoj stanične kulture (Memmert GmbH, Schwabach, Njemačka) u kojem se održava stalna temperatura zraka na 37 °C, te u atmosferi koja sadrži 95 % zraka i 5 % CO₂.

Precjepljivanje stanica započinje se uklanjanjem cjelokupnog medija iz T-boce koje je potrebno provesti pažljivo bez dodirivanja dna T-boce kako se ne bi oštetile porasle adherentne stanice. Zatim se provodi ispiranje stanica dodatkom 7 mL PBS pufera (fosfatni pufer, eng. Phosphate-Buffered Saline) koji se dodaje kako bi se

uklonio FBS i prisutni inhibitori tripsina. Dodani PBS se ukloni pipetom, te se ispiranje stanica provede još jednom. Zatim se u T-bocu otpipetira 2 mL tripsina koji cijepa veze između stanica i dna posude za uzgoj i tako omogućava njihovo odvajanje. Zaustavljanje enzimske reakcije i otpuštanje monosloja stanica s dna provodi se dodatkom 5 mL medija za uzgoj. Stanična suspenzija resuspendirana u mediju za uzgoj sada se dijeli u dvije nove T-boce tako što se u svaku T75 bocu otpipetira 3,5 mL stanične suspenzije, te se u svaku dodaje i 20-25 mL medija za uzgoj stanica. Uzgoj stanica u T75 boci provodi se u inkubatoru za uzgoj stanične kulture (Memmert GmbH, Schwabach, Njemačka) u kojem se održava stalna temperatura zraka na 37 °C, te u atmosferi koja sadrži 95 % zraka i 5 % CO₂. Nakon inkubacije i porasta nacijepjenih stanica u T75, pasažiranje se provodi u dvije mikrotitarske ploče sa šest jažica, te se ponovno provodi inkubacija u inkubatoru za uzgoj stanične kulture.

3.2.12.2. Uklanjanje mikoplazmi iz uzorka *Bovine parainfluenza 3* upotrebom antibiotika plazmocina

Iz banke virusa, koja se čuva u Laboratoriju za razvoj proizvoda Cjepiva, Genera d.d., uzete su dvije zamrznute Eppendorf epruvete koje sadrže po 1 mL supernatanta virusa *Bovine parainfluenza 3*, te su odmrznute pod mlazom mlake vode. Suspenzija virusa PIV3 se centrifugira (Universal 32, Hettich GmbH, Tuttlingen, Njemačka) na 670 x g kroz 5 minuta, pri čemu se izdvaja talog, dok virusi zaostaju u supernatantu. Dobiveni supernatant se filtrira pomoću Millex-GP Syringe filter 0,22 µm (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka). U sljedećem koraku provodi se razrjeđivanje filtriranog supernatanta (prvo razrjeđenje, 10⁻¹) pomoću hranjive podloge koja se priprema tako što se u bocu medija DMEM-low glucose (10 % glukoze) volumena 50 mL, koja sadrži 100 mg L⁻¹ glukoze, L-glutamin i natrijev piruvat, otpipetira 50 µL plazmocina (25 µg mL⁻¹) koji se prethodno čuva na -20 °C.

Iz dvije mikrotitarske ploče sa šest jažica, u kojem su prethodno uzgojene stanice MDBK (poglavlje 3.2.12.1.), uklonjen je medij, te su jažice nacijepjene s 0,5 mL prvog razrjeđenja filtriranog supernatanta. Nakon toga mikrotitarske ploče ostavljene su 15 minuta kako bi se virusi adsorbirali na površinu adherentnih stanica, a zatim je u jažice pažljivo otpipetirano 2 mL prethodno pripremljenog medija (10 % DMEM + plazmocin). Mikrotitarske pločice nacijepjene s uzorcima virusa se inkubiraju u inkubatoru za uzgoj stanične kulture (Memmert GmbH, Schwabach, Njemačka) u

kojem se održava stalna temperatura zraka na 37 °C, te u atmosferi koja sadrži 95 % zraka i 5 % CO₂ tijekom 24 sata.

3.2.12.3. Žetva virusa *Bovine parainfluenza 3* kultiviranog u kontinuiranoj staničnoj linij MDBK

Nakon inkubacije u trajanju od 24 sata pomoću inverznog transmisijskog svjetlosnog mikroskopa (Axiovert 25, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Njemačka) određuje se prisutnost citopatskog učinka stanica (eng. cytopathic effect, CPE ili ECP), te je citopatski učinak stanica prisutan samo u prvoj jažici mikrotitarske ploče, zbog čega je ploča ostavljena u inkubatoru na još jedan ciklus od 24 sata. Nakon inkubacije u trajanju od 48 sati, CPE je prisutan u prvih sedam jažica, te se ploča ostavlja u inkubatoru na još jedan ciklus od 24 sata. Nakon inkubacije u trajanju od 72 sata, CPE je prisutan u jažicama do razrjeđenja od 10⁻⁷, te je supernatant (10⁻⁷) iz jažice sakupljen pipetom, kratko centrifugiran, a zatim je provedena filtracija sakupljenog supernatanta pomoću Millex-GP Syringe filter 0,22 µm (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka).

U sljedećem koraku provodi se razrjeđivanje filtriranog supernatanta, tako što se filtrirani supernatant otpipetira u 12 mL DMEM- low glucose (10 % glukoze) + plazmociin (25 µg mL⁻¹), a zatim se 100 µL razrijeđenog filtriranog supernatanta najepljuje u T75 bocu u kojoj postotak staničnog sjedinjenja MDBK stanične linije iznosi 90 %. Inokulirana T75 boca se inkubira u inkubatoru za uzgoj stanične kulture (Memmert GmbH, Schwabach, Njemačka) u kojem se održava stalna temperatura zraka na 37 °C, te u atmosferi koja sadrži 95 % zraka i 5 % CO₂ tijekom 48 sati.

Nakon provedene inkubacije u trajanju od 48 sati, u T75 boci prisutan je citopatski učinak stanica (CPE) kod oko 50 % stanica, te je provedena žetva virusa. Prikupljeni supernatant koji sadrži viruse zatim je vorteksiran kroz 5 minuta, nakon čega je provedeno centrifugiranje (Universal 32, Hettich GmbH, Tuttlingen, Njemačka) na 670 x g kroz 5 minuta, pri čemu je došlo do izdvajanja taloga dok se u supernatantu nalaze virusi. Dobiveni supernatant se filtrira pomoću Millex-GP Syringe filter 0,45 µm (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka), te se alikvoti od 1 mL otpipetiraju u sterilne Eppendorf epruvete kako bi se mogle provesti daljnje analize (Test sterilnosti, Test na mikoplazme).

3.2.13. Test sterilnosti i Test na mikoplazme nakon uklanjanja mikoplazmi iz uzorka *Bovine parainfluenza 3*

Nakon što je provedena žetva virusa *Bovine parainfluenza 3*, nakon provedenog tretmana antibiotikom plazmociinom, potrebno je provesti Test sterilnosti i Test na mikoplazme kako bi se utvrdilo uspješno uklanjanje mikoplazmi iz uzorka PIV3. Test sterilnosti provodi se prema protokolu opisanim u poglavlju 3.2.10., dok se Test na mikoplazme provodi prema protokolu opisanim u poglavljima 3.2.11.2. i 3.2.11.3..

4. REZULTATI i RASPRAVA

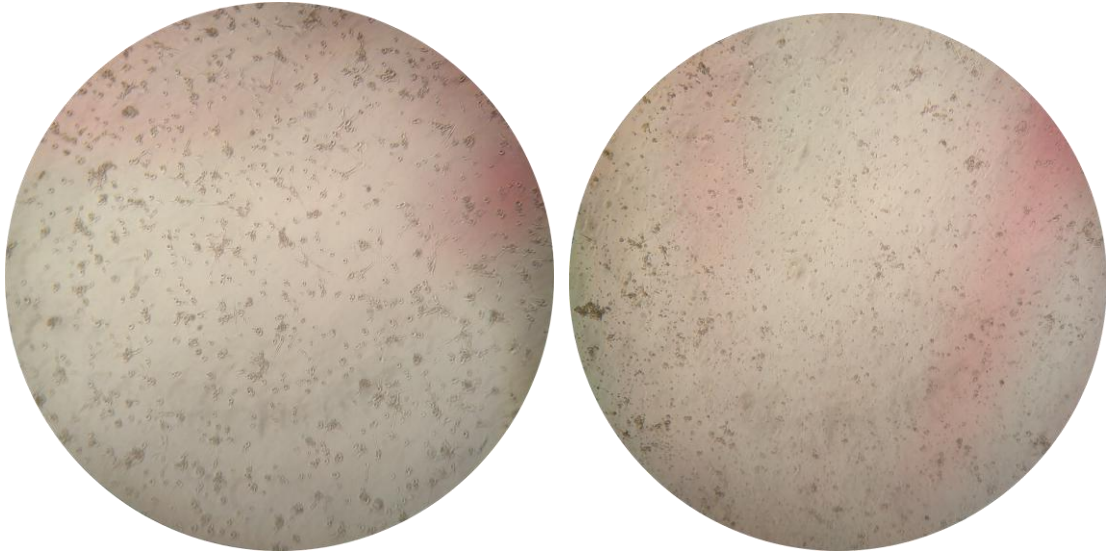
4. REZULTATI i RASPRAVA

4.1. Žetva virusa kultiviranih u kontinuiranim staničnim linijama

Na mikrotitarskoj ploči inokuliranoj virusom *Bovine rotavirus A* gotovo sve stanice MA-104 su se odvojile od površine jažica zbog dodatka tripsina što nije poželjna pojava, zbog čega se u sljedećem provođenju ovog eksperimenta preporučuje korištenje manje količine enzima tripsina. Prva jažica s razrjeđenjem 1:5 (10^{-1}), promatranjem pod inverzijskim transmisijskim svjetlosnim mikroskopom, pokazuje vrlo mali citopatski učinak, dok su ostale jažice slične negativnoj kontroli. Žetva virusa *Bovine rotavirus A* provedena je u negativnoj kontroli (u kojoj se nalazio samo medij), te u razrjeđenju 1:5 i 1:25. Nakon inkubacije od 96 sati provedena je žetva i razrjeđenja 1:125 gdje su stanice sada bili odvojene od dna jažice i razlikovale su se od stanica u negativnoj kontroli (slika 16).

Žetva virusa *Bovine parainfluenza 3* provedena je samo u negativnoj kontroli jer citopatski učinak nije bio vidljiv, pa je mikrotitarska pločica ostavljena u inkubatoru na daljnjoj inkubaciji.

Na mikrotitarskoj pločici inokuliranoj virusom *Bovine herpesvirus 1* (slika 17) u svim jažicama vidljiv je citopatski učinak, pri čemu su kod manjih razrjeđenja stanice pokretne, a u zadnja dva razrjeđenja stanice su zaobljene, ali još uvijek vezane za površinu. Žetva virusa *Bovine herpesvirus 1* provedena je u negativnoj kontroli, te razrjeđenjima 1:125 (10^{-3}) i 1:2 625 (10^{-5}) pri čemu u ovim uzorcima uz BHV1 može biti prisutan i *Bovine parainfluenza 3* s obzirom da je uzorak goveđeg tkiva zaražen s oba virusa.



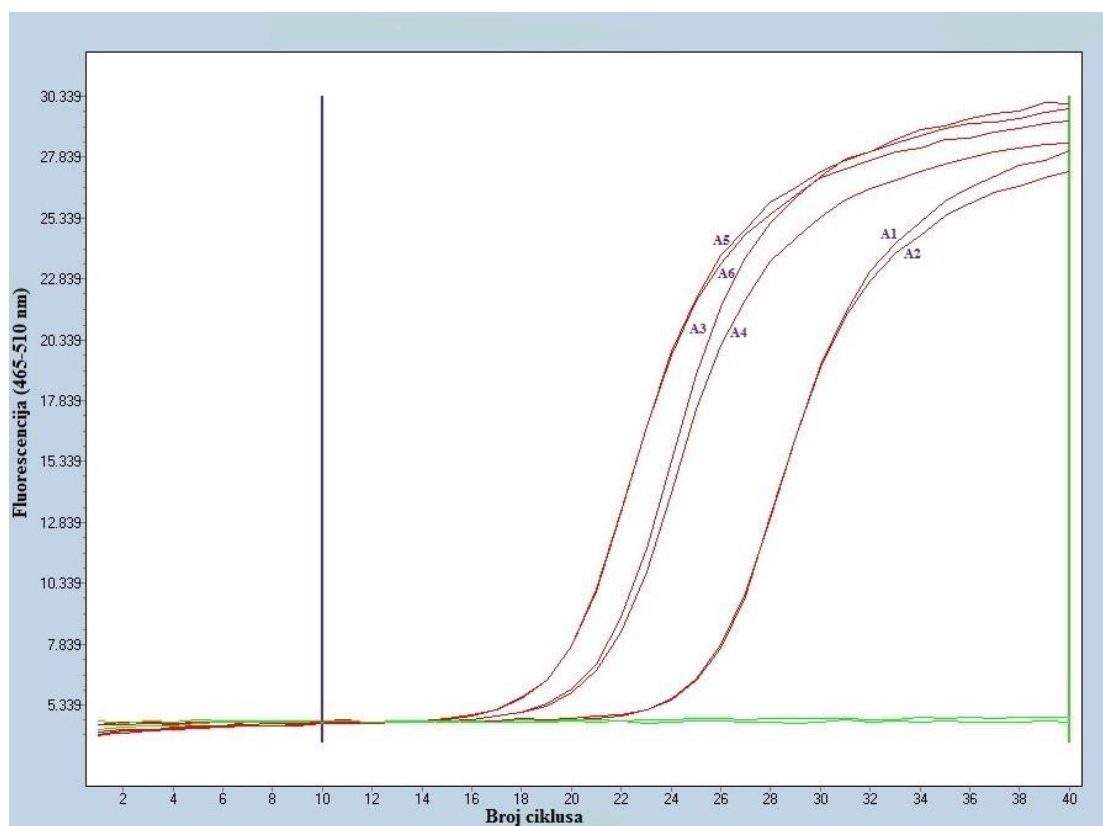
Slika 16. Citopatogeni učinak virusa *Bovine rotavirus A* na MA-104 staničnoj liniji (uvećanje 100 x), lijeva slika - negativna kontrola, desna slika - razrjeđenje 1:5 (10^{-1}) [vlastite fotografije].



Slika 17. Citopatogeni učinak virusa *Bovine herpesvirus 1* na MA-104 staničnoj liniji (uvećanje 100 x), lijeva slika - negativna kontrola, desna slika - razrjeđenje 1:125 (10^{-3}) [vlastite fotografije].

4.2. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR)

Nakon provedenog uzgoja virusa *Bovine rotavirus A*, *Bovine parainfluenza 3* i *Bovine herpesvirus 1* (poglavlje 3.2.2. i 3.2.3.), potrebno je odrediti je li riječ o čistoj kulturi ili je prisutna kontaminacija drugim virusom ili nekim mikroorganizmom. Stoga su nakon provedene qRT-PCR metode prema poglavlju 3.2.5.2., a dobiveni Ct rezultati uspoređeni s rezultatima qRT-PCR reakcije provedene na početku eksperimenta, te podacima ustupljenima od strane Dechra Brasil Pharmaceuticals.

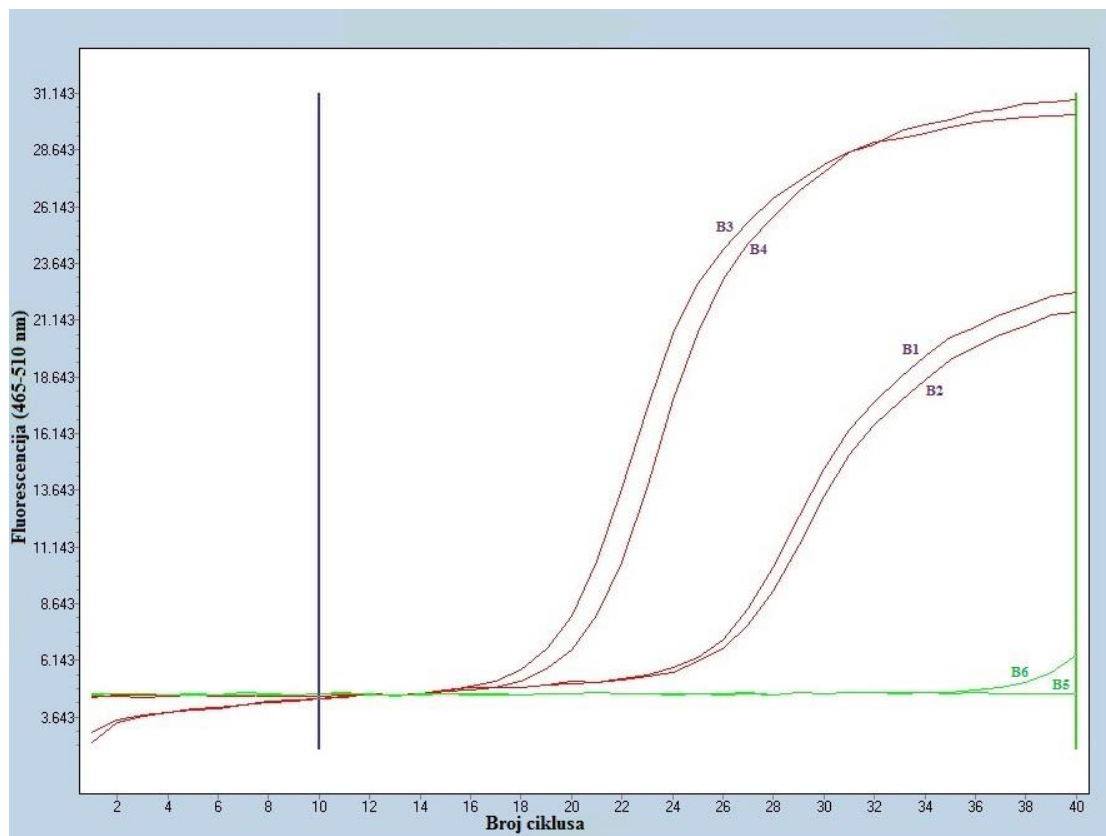


Slika 18. Rezultati PCR reakcije za jažice A1-A8.

Krivulje analiziranih uzoraka virusa *Bovine rotavirus A* prikazane su na grafu (slika 18) na kojem je vidljivo kako prvo izlaze krivulje uzorka 3 (žetva 1:25, jažice A5 i A6), zatim krivulje uzorka 2 (žetva 1:5, jažice A3 i A4), te na kraju krivulje uzorka 1 (supernatant, jažice A1 i A2). Prema dobivenom grafu i Ct vrijednostima (Tablica 11) može se ustvrditi da što je krivulja na grafu “više nalijevo” to znači da uzorak sadrži veću koncentraciju nukleinske kiseline (DNK, RNK) od krivulje koja se na grafu

nalazi “više nadesno”. Tako se krivulje uzorka 3 i 2 na grafu nalaze s lijeve strane krivulje supernatanta (uzorak 1) što znači da je koncentracija RNK u tim uzorcima veća od koncentracije RNK u inokulumu (supernatantu) iz čega se može zaključiti kako je virus tijekom inkubacije porastao. Tu teoriju potvrđuju i Ct vrijednosti uzoraka 2 (Ct= 20,54 i 20,68) i uzorka 3 (Ct= 18,97) jer su te vrijednosti manje od Ct vrijednosti uzorka 1 (Ct= 24,96 i 24,90), odnosno Ct vrijednost će biti veća što je veća fluorescencija uzorka jer on sadrži manju koncentraciju nukleinskih kiselina.

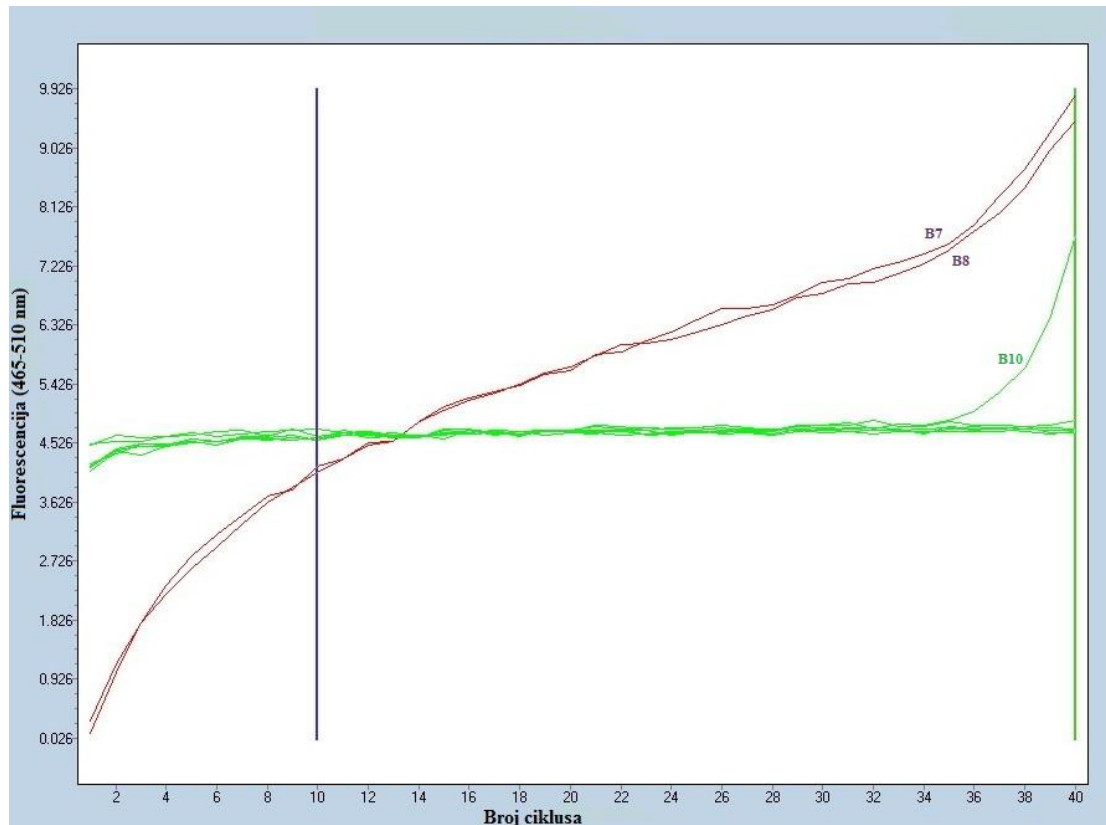
Zaključno, uzorci žetve 1:25 i 1:5 (uzorak 3 i uzorak 2) su pozitivni s niskim Ct vrijednostima, dok je supernatant (uzorak 1) pozitivan, ali uz veću Ct vrijednost, te se za daljnji uzgoj u tikvicama koristi uzorak žetve 1:25.



Slika 19. Rezultati PCR reakcije za jažice B1-B6.

Krivulje analiziranih uzoraka virusa *Bovine parainfluenza 3* prikazane su na grafu (slika 19) na kojem je vidljivo kako prvo izlaze krivulje uzorka 5 (žetva 1:5, jažice B3 i B4) koje se nalaze nalijevo od krivulje uzorka 4 (supernatant, jažice B1 i B2) jer je koncentracija RNK u tim uzorcima veća od koncentracije RNK u inokulumu

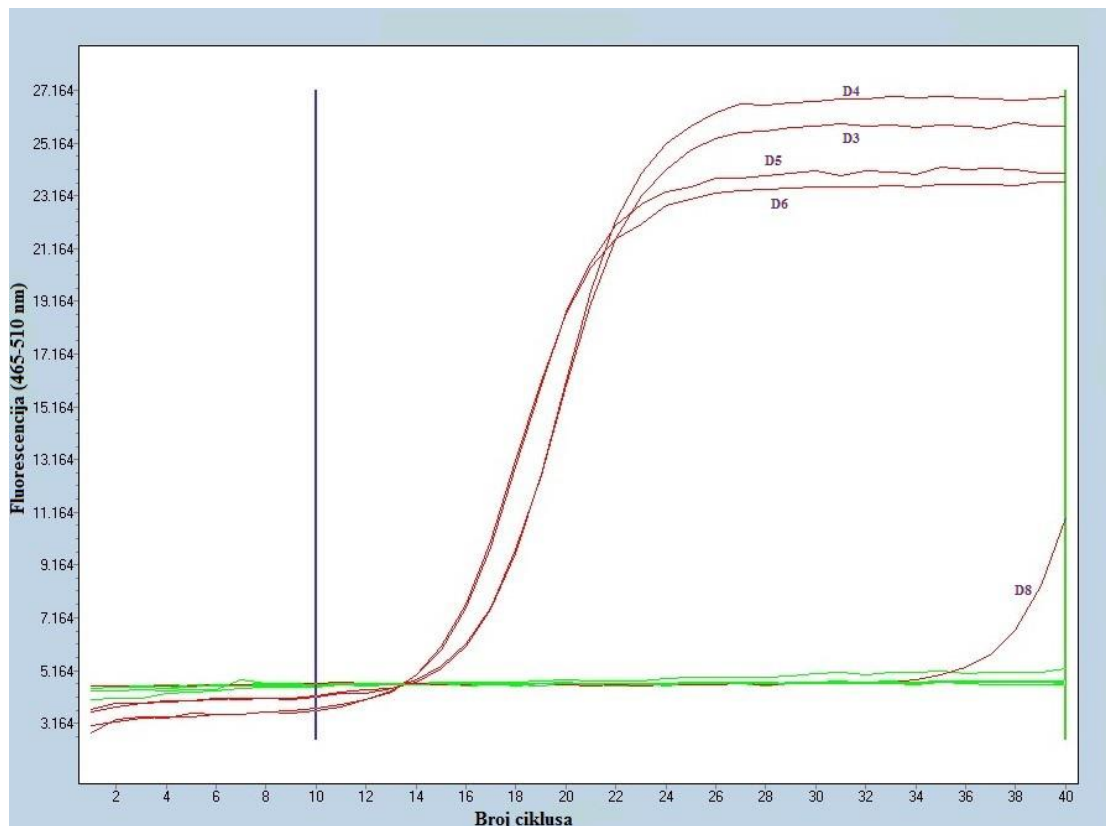
(supernatantu) iz čega se može zaključiti kako je virus tijekom inkubacije porastao. Taj zaključak potvrđuju i Ct vrijednosti uzorka 5 ($C_t = 18,71$ i $19,77$) kod kojeg su te vrijednosti manje od Ct vrijednosti uzorka 4 ($C_t = 25,35$ i $25,63$). Zaključno, uzorak žetva 1:5 (uzorak 5) je pozitivan, unatoč činjenici da je CPE bio vidljiv na stanicama, a inokulum (supernatant, uzorak 4) je pozitivan uz veću Ct vrijednost, te uzorak virusa *Bovine parainfluenza 3* pokazuje dobar porast.



Slika 20. Rezultati PCR reakcije za jažice B7-B12, C1-C2.

Krivulje analiziranih uzoraka virusa *Bovine herpesvirus 1*, kada su korišteni primeri za virus *Bovine parainfluenza 3*, prikazane su na grafu (slika 20) na kojem je vidljivo kako prvo izlazi krivulja uzorka 6 (supernatant/inokulum, jažice B7 i B8) te se ovaj uzorak smatra pozitivnim jer ima visoku Ct vrijednost ($25,07$), dok se krivulja uzorka 7 (žetva 1:125, jažice B9 i B10) smatra negativnom s obzirom da ova krivulja izlazi nakon 35-og ciklusa. Ovaj rezultat PCR reakcije pokazuje kako nema reakcije prilikom primjene primera za virus *Bovine parainfluenza 3*, te kako je došlo do

porasta virusa *Bovine Herpesvirus 1* i vjerojatno nema kontaminacije s PIV3, međutim uzorak 7 je sumnjiv s obzirom na njegovu krivulju na grafu PCR reakcije.



Slika 21. Rezultati PCR reakcije za jažice D1-D10.

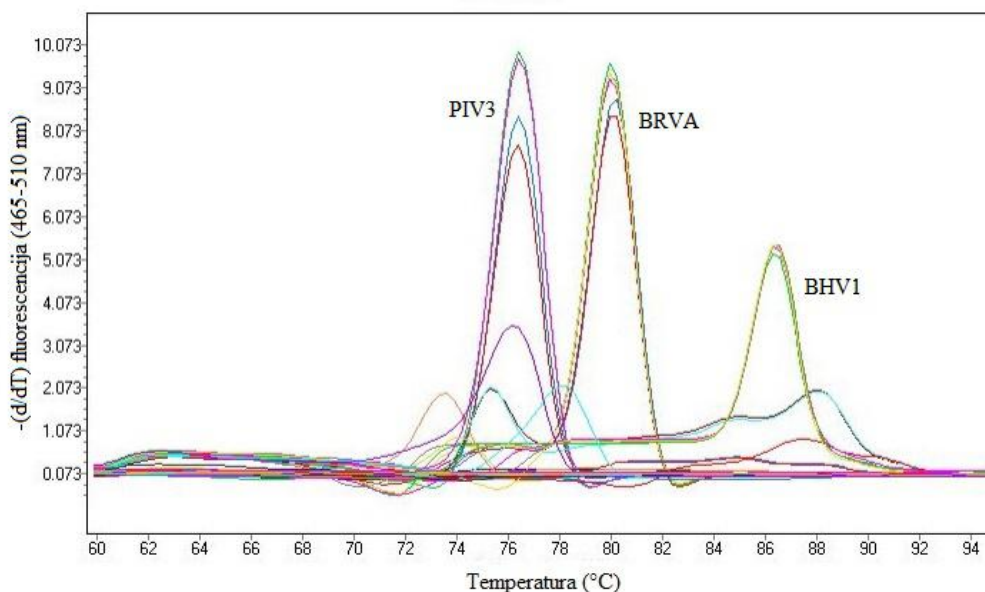
Krivulje analiziranih uzoraka virusa *Bovine herpesvirus 1*, kada su korišteni primeri za virus *Bovine herpesvirus 1*, prikazane su na grafu (slika 21) na kojem je vidljivo kako prvo izlaze krivulje uzorka 8 (žetva 1:1 625, jažice D5 i D6) koje se nalaze nalijevo od krivulja uzorka 7 (žetva 1:125, jažice D3 i D4) jer je koncentracija DNK u tim uzorcima veća od koncentracije DNK u uzorku 7 iz čega se može zaključiti kako je virus tijekom inkubacije porastao, te se dobivene krivulje smatraju pozitivnima uz visoke Ct vrijednosti. Krivulja uzorka NK (jažice D7 i D8) izlazi nakon 35-og ciklusa PCR-a, te se smatra negativnom.

Tablica 11. Rezultati PCR metode.

Uzorak	Jažica	Ct	T _m (°C)	Površina krivulje	Širina krivulje	Visina krivulje
1	A1	24,96	80,10	18,86	2,12	8,91
1	A2	24,90	80,04	18,21	2,11	8,64
2	A3	20,54	79,98	21,20	2,15	9,87
2	A4	20,68	79,98	20,59	2,17	9,50
3	A5	18,97	79,98	20,80	2,16	9,62
3	A6	18,97	79,99	20,75	2,15	9,64
N.K. BRVA	A7	-	-	-	-	-
N.K. BRVA	A8	-	67,01	0,43	8,85	0,05
4	B1	25,35	76,40	17,31	2,02	8,55
4	B2	25,63	76,27	14,47	1,88	7,72
5	B3	18,71	76,43	22,06	2,52	8,77
5	B4	19,77	76,39	22,79	2,28	10,00
N.K. PIV3	B5	-	66,36	0,41	7,78	0,05
N.K. PIV3	B6	-	74,11	1,92	2,10	0,91
6	B7	24,42	75,58	2,59	1,21	2,15
6	B8	25,72	75,50	2,62	1,23	2,12
7	B9	-	-	-	-	-
7	B10	-	73,49	4,14	2,24	1,85
8	B11	-	-	-	-	-
8	B12	-	-	-	-	-
9	C1	-	-	-	-	-
9	C2	-	-	-	-	-
6	D1	-	-	-	-	-
6	D2	-	87,81	3,84	5,21	0,74
7	D3	15,26	86,32	11,27	2,18	5,18
7	D4	15,34	86,34	11,82	2,24	5,29
8	D5	16,32	86,37	12,28	2,28	5,39
8	D6	16,28	86,35	12,11	2,30	5,27
N.K. BHV1	D7	-	-	-	-	-

N.K. BHV1	D8	37,71	77,97	6,12	2,86	2,14
9	D9	-	-	-	-	-
9	D10	-	-	-	-	-

* objašnjenje kratica vidjeti uz Sliku 13.



Slika 22. Krivulja denaturacije nukleinskih kiselina virusa *Bovine Rotavirus A* (BRVA), *Bovine Parainfluenza 3* (PIV3) i *Bovine Herpesvirus 1* (BHV1).

Temperatura taljenja (eng. melting temperature, T_m) predstavlja temperaturu kod koje je 50 % dvolančane uzvojnice DNK u jednolančanom obliku, te njezina vrijednost ovisi o otapalu, ionskoj jakosti i pH vrijednosti otopine, duljini DNK i udjelu GC parova baza u DNK molekuli. Kada je udio GC parova baza 50 % tada temperatura taljenja iznosi 69 °C, a porastom udjela GC parova baza na 68 %, temperatura taljenja se povećava na 76 °C.

Iz dobivenih krivulja denaturacije (slika 22) uzoraka virusa *Bovine rotavirus A*, *Bovine parainfluenza 3* i *Bovine herpesvirus 1* vidljivo je kako uzorak *Bovine parainfluenza 3* ima vrijednost temperature taljenja oko 76 °C što znači da jednolančana RNK molekula ovog virusa (PIV3) sadrži oko 68 % GC parova baza. Uzorak *Bovine rotavirus A* ima vrijednost temperature taljenja oko 80 °C što znači da dvolančana molekula RNK ovog virusa (BRVA) sadrži veći udio GC parova baza od virusa PIV3, te sadrži manji udio GC parova baza od dvolančane DNK molekule virusa *Bovine herpesvirus 1* (BHV1) koji ima vrijednost temperature taljenja oko 87 °C.

Prema Kaur i Chandra (2016) u genomu virusa *Bovine herpesvirus 1*, koji sadrži 139 kilobaza i između 60 i 120 gena, udio GC baza iznosi između 31 % i 75 %, dok prema Muylkens i sur. (2007) genom BHV1 sadrži visok udio GC baza od 72 %. Iz dobivenih rezultata stoga je moguće zaključiti kako virus *Bovine herpesvirus 1* sadrži između 72 % i 75 % GC baza u svom genomu, dok genom virusa *Bovine rotavirus A* sadrži između 68 % i 72 % GC baza.

4.3. Provjera banke virusa qRT-PCR-om

Tablica 12. Rezultati qRT-PCR metode.

Uzorci	Primeri (Ct vrijednosti)		
	<i>Bovine rotavirus A</i>	<i>Bovine parainfluenza 3</i>	<i>Bovine herpesvirus 1</i>
<i>Bovine rotavirus A</i>	22,57	-	-
	22,49	-	-
<i>Bovine parainfluenza 3</i>	-	15,13	-
	-	14,99	-
<i>Bovine herpesvirus 1</i>	-	-	17,60
	-	-	17,76
voda	-	-	-
Srednja vrijednost Ct	22,53	15,06	17,68

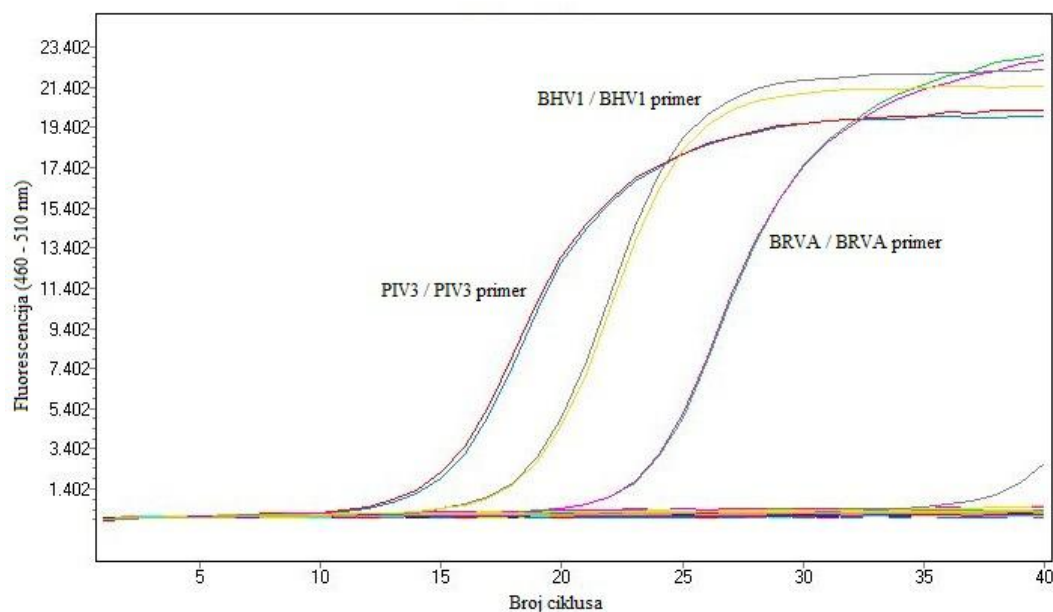
Nakon provedenog umnažanja virusa *Bovine rotavirus A*, *Bovine parainfluenza 3* i *Bovine herpesvirus 1* u svrhu dobivanja banke virusa (poglavlje 3.2.6.), potrebno je odrediti je li riječ o čistoj kulturi ili je prisutna kontaminacija virusom ili nekim drugim mikroorganizmom. Stoga su nakon provedene qRT-PCR metode, u uvjetima prema poglavlju 3.2.5.2., dobiveni Ct rezultati uspoređeni s rezultatima qRT-PCR reakcije provedene na početku eksperimenta, te podacima ustupljenima od strane Dechra Brasil Pharmaceuticals.

Srednja vrijednost graničnog ciklusa (Ct) za banku virusa *Bovine rotavirus A* iznosi 22,53, te kako dobivena Ct vrijednost nije jako niska to pokazuje da uzorak ima snažnu pozitivnu reakciju tijekom qRT-PCR reakcije jer je u njemu prisutna visoka koncentracija ciljne nukleinske kiseline ovog virusa. Međutim, s obzirom da je Ct

blizu granične vrijednosti ($C_t < 29$) prilikom sljedećeg provođenja eksperimenta potrebno je produžiti vrijeme inkubacije kako bi se omogućilo produljenje vremena tijekom kojeg se virus može umnažati. Dobiveni rezultat qRT-PCR-a pokazuje kako je banka virusa *Bovine rotavirus A* dobra i ne sadrži kontaminante.

Srednja vrijednost graničnog ciklusa (C_t) za banku virusa *Bovine parainfluenza 3* iznosi 15,06, te s obzirom da se radi o vrlo niskoj C_t vrijednosti ($C_t < 29$) i u ovom uzorku se nalazi vrlo visoka koncentracija ciljne nukleinske kiseline virusa PIV3 koja tijekom qRT-PCR reakcije daje snažnu pozitivnu reakciju. Dobiveni rezultat qRT-PCR-a pokazuje kako je banka virusa *Bovine parainfluenza 3* dobra i ne sadrži kontaminante.

Srednja vrijednost graničnog ciklusa (C_t) za banku virusa *Bovine herpesvirus 1* iznosi 17,68 i također daje snažnu pozitivnu reakciju ($C_t < 29$) tijekom qRT-PCR-a jer uzorak sadrži visoku koncentraciju ciljne nukleinske kiseline BHV1 (Tablica 12, Slika 23). Međutim, uzorak virusa *Bovine herpesvirus 1* pokazuje i vrlo slabi signal za PIV3 kada su tijekom odvijanja qRT-PCR-a primijenjeni *Bovine parainfluenza 3* primeri, te je na krivulji denaturacije vidljivo kako je uzorak doista kontaminiran s virusom PIV3. Stoga će se uzorak pokušati pročistiti razrjeđivanjem inokuluma 10, 100 i 1 000 puta, nakon čega će se žetva provesti čim se uoči citopatogeni efekt, te će se na taj način iz uzorka ukloniti kontaminacija s *Bovine parainfluenza 3*.



Slika 23. Rezultati PCR metode.

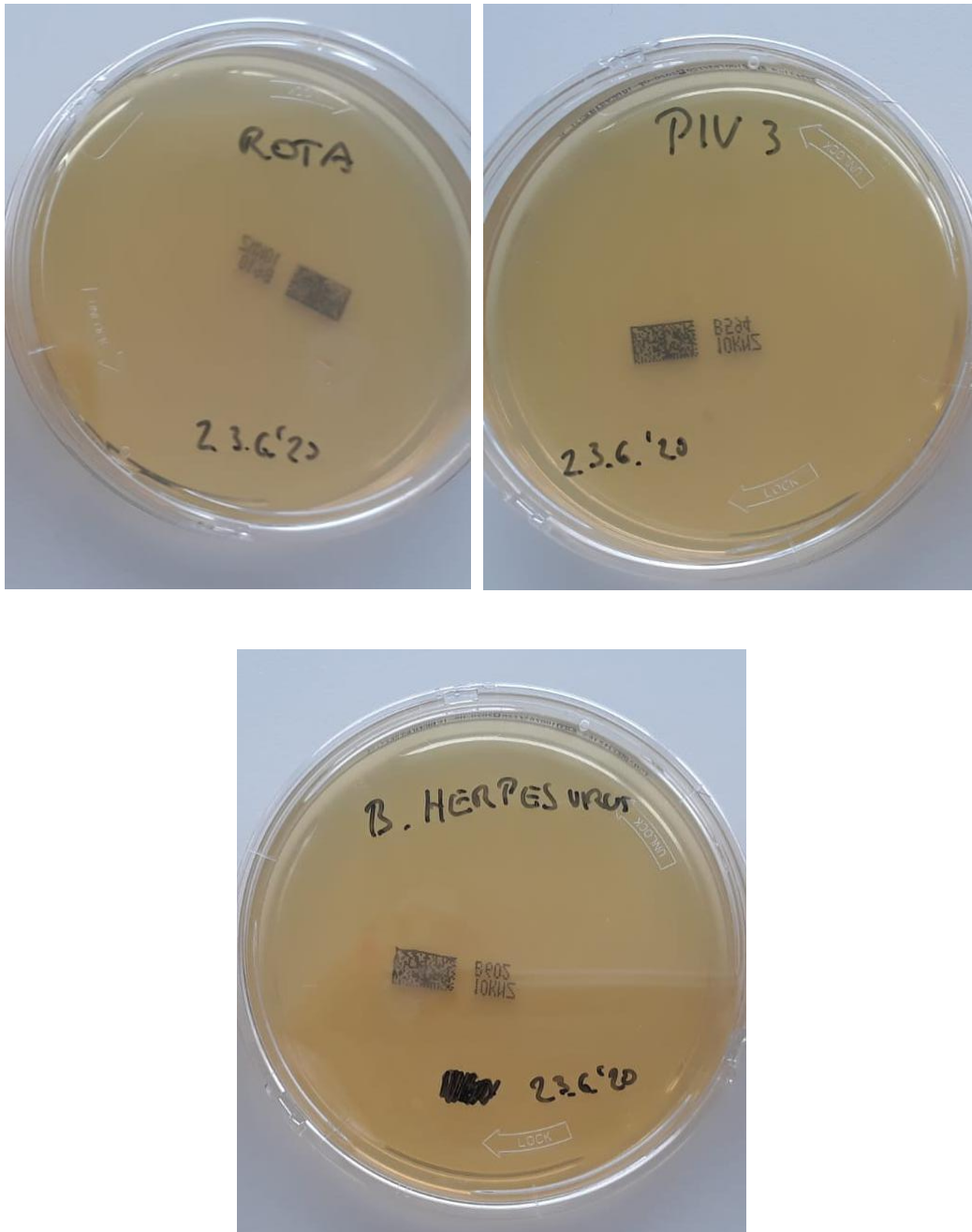
Anamul i sur. (2015) proveli su eksperiment kojim su opisali razvoj i primjenu PCR metode sa SYBR Green sustavom detekcije, uz prethodnu provedbu reverzne transkripcije, na osamdeset kliničkih uzoraka zaraženih virusom *Bovine rotavirus A*. Analizom dobivenih krivulja osamdeset uzoraka, zaključili su kako 46,25 % uzoraka (37 uzoraka) ima Ct vrijednost manju od 35 jer uzorci pokazuju pozitivnu reakciju tijekom qRT-PCR reakcije, s obzirom da sadrže visoku koncentraciju ciljne nukleinske kiseline BRVA virusa, te je temperatura taljenja, T_m analiziranih uzoraka oko 78,35 °C ($\pm 1,0$ °C). Usporedbom dobivenih rezultata s rezultatima eksperimenta u Generi prema kojima je Ct vrijednost BRVA virusa iznosila 22,53, a T_m oko 80 °C, može se zaključiti kako su dobiveni rezultati zadovoljavajući zbog sličnih dobivenih vrijednosti.

4.4. Provjera pročišćene banke virusa *Bovine herpesvirus 1* qRT-PCR-om

Nakon provedene purifikacije uzorka *Bovine herpesvirus 1* ponovno je provedena qRT-PCR reakcija, te je dobivena srednja vrijednost graničnog ciklusa (Ct) iznosila 18,86 što označava snažnu pozitivnu reakciju (Ct < 29) jer uzorak i dalje sadrži visoku koncentraciju ciljne nukleinske kiseline virusa BHV1. Uzorak nakon pročišćavanja više ne sadrži kontaminaciju u obliku virusa *Bovine parainfluenza 3*, te nema prisutnog signala na krivulji denaturacije.

4.5. Test sterilnosti banke virusa

Nakon provedene inkubacije u trajanju od 4-5 dana na 32,5 °C u CO₂ inkubatoru za kulture stanica, na TSA hranjivim podlogama (slika 24) nije bilo poraslih kolonija niti na jednom od tri inkubirana uzorka (*Bovine rotavirus A*, *Bovine parainfluenza 3* i *Bovine herpesvirus 1*). Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako uzgojene banke virusa ne sadrže bakterije niti druge kontaminante, te kako bi se sačuvala njihova željena svojstva u kulturi za buduće istraživačke i/ili proizvodne svrhe, virusi se mogu stabilizirati krioprezervacijom čime se izbjegava postupak kontinuiranog pasažiranja koje je zahtjevno i skupo, te se znatno smanjuje rizik od mikrobne kontaminacije i spontanih genskih promjena.



Slika 24. Rezultati Testa sterilnosti za banke virusa *Bovine rotavirus A*, *Bovine parainfluenza 3* i *Bovine herpesvirus 1* [vlastite fotografije].

4.6. Test na mikoplazme

Nakon provede izolacije DNA i lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu, iz dobivenih rezultata vidljivo je kako je uzorak 1 (*Bovine rotavirus A*) negativan na prisustvo mikoplazmi s obzirom da Interna kontrola u ROX™ kanalu pokazuje Ct vrijednost manju od 40 (28,51), dok detekcija *Mollicutes* u FAM™

kanalu pokazuje negativan rezultat. Uzorak 3 (*Bovine herpesvirus 1*) također je negativan na prisustvo mikoplazmi s obzirom da Interna kontrola u ROX™ kanalu pokazuje Ct vrijednost manju od 40 (28,75), a detekcija *Mollicutes* u FAM™ kanalu pokazuje negativan rezultat. Uzorak 2 (*Bovine parainfluenza 3*) je pozitivan na prisustvo mikoplazmi te Interna kontrola u ROX™ kanalu pokazuje Ct vrijednost koja nije značajna, dok detekcija *Mollicutes* u FAM™ kanalu pokazuje pozitivan rezultat jer je Ct vrijednost manja od 40 (13,48).

S obzirom da se uzorak 2 *Bovine parainfluenza 3* pokazao pozitivan na prisustvo mikoplazmi, analiza tog uzorka provedena je još jednom, u obliku uzorka 2A i 2B, kako bi se potvrdio pozitivan rezultat ili da se uz obrazloženje postojanja križne kontaminacije odbaci prvotni pozitivan rezultat, ukoliko se u drugoj analizi dobije negativan rezultat na mikoplazme. Nakon provedbe PCR reakcije s uzorcima 2A i 2B (*Bovine parainfluenza 3*), rezultat se pokazao ponovno pozitivnim na mikoplazme s obzirom da je Interna kontrola u ROX™ kanalu pokazala Ct vrijednost koja nije značajna, dok detekcija *Mollicutes* u FAM™ kanalu pokazuje pozitivan rezultat jer je Ct vrijednost manja od 40 (17,39 i 17,91) (Tablica 13).

Tablica 13. Rezultati Testa na mikoplazme uzoraka *Bovine rotavirus A*, *Bovine parainfluenza 3* i *Bovine herpesvirus 1*.

Uzorak	Jažica	Boja / kanal	Granična vrijednost	Ct
1	D3	ROX	345,230	28,51
1	D3	FAM	34,003	No Ct
2	D4	ROX	345,230	No Ct
2	D4	FAM	34,003	13,48
3	D5	ROX	345,230	28,75
3	D5	FAM	34,003	No Ct
NK	D7	ROX	345,230	No Ct
NK	D7	FAM	34,003	No Ct
NK	D8	ROX	345,230	No Ct
NK	D8	FAM	34,003	23,71
PK	D9	ROX	345,230	No Ct
PK	D9	FAM	34,003	21,12

PK	D10	ROX	345,230	No Ct
PK	D10	FAM	34,003	21,07
2A	B2	ROX	352,762	No Ct
2A	B2	FAM	3 188,068	17,39
2B	B3	ROX	352,762	No Ct
2B	B3	FAM	3 188,068	17,91
NK	B5	ROX	352,762	No Ct
NK	B5	FAM	3 188,068	No Ct
NK	B6	ROX	352,762	No Ct
NK	B6	FAM	3 188,068	No Ct
PK	B8	ROX	352,762	No Ct
PK	B8	FAM	3 188,068	25,43
PK	B9	ROX	352,762	No Ct
PK	B9	FAM	3 188,068	25,32

4.7. Rezultati Testa sterilnosti i Testa na mikoplazme nakon uklanjanja mikoplazmi iz uzorka *Bovine parainfluenza 3*

Nakon provedenog Testa sterilnosti prema protokolu opisanog u poglavlju 3.2.10., uzorak *Bovine parainfluenza 3* inkubiran je u CO₂ inkubatoru za kulture stanica u trajanju od 4-5 dana na 32,5 °C, te nakon inkubacije na TSA hranjivoj podlozi nije bilo poraslih kolonija iz čega se može zaključiti kako uzorak ne sadrži bakterije i/ili druge kontaminante.

Nakon provede izolacije DNA i lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (poglavlje 3.2.11.2. i 3.2.11.3.), iz dobivenih rezultata vidljivo je kako je uzorak *Bovine parainfluenza 3* negativan na prisutstvo mikoplazmi s obzirom da Interna kontrola u ROXTM kanalu pokazuje Ct vrijednost manju od 40, dok detekcija *Mollicutes* u FAMTM kanalu pokazuje negativan rezultat.

Postupak uklanjanja mikoplazmi iz uzoraka proveden je prema eksperimentu koji su proveli Baronti i sur. (2013). Oni su supernatant dobiven nakon pete žetve virusa analizirali provođenjem qPCR reakcije kako bi utvrdili prisutnost mikoplazmi u uzorcima. Rezultati su pokazali da supernatanti dvanaest virusa “s omotačem”, te supernatanti osam virusa “bez omotača” ne sadrže kontaminacije mikoplazmama.

Time su dokazali kako se ova metoda može koristiti i za viruse “s omotačem”, a to su potvrdili i rezultati dobiveni provođenjem eksperimenta u Generi, s obzirom da se metoda uklanjanja mikoplazmi antibiotikom plazmociinom nije koristila kod takvih virusa zbog sumnje u značajno smanjenje virusne zaraznosti.

Usporedba rezultata dobivenih ovim eksperimentalnim istraživanjem s rezultatima prijašnjih istraživanja koja su navedena u ovome radu, pokazala je opravdanu nadu da će ovo, kao i nastavna istraživanja, pomoći u razvoju cjepiva koja su učinkovita i sigurna za upotrebu, te kako će *scale up*-om proizvodnje ovih virusnih cjepiva ona postati lako dostupna i pomoći u suzbijanju virusnih animalnih bolesti.

5. ZAKLJUČCI

5. ZAKLJUČCI

I. Provedbom inkubacije stanične linije MA-104 inficirane s virusom *Bovine rotavirus A*, te staničnih linija MDBK inficiranih s virusima *Bovine parainfluenza 3* i *Bovine herpesvirus 1*, kod stanica je vidljiva pojava inkluzijskih tjelešaca, odnosno zapažen je citopatski učinak kao rezultat uspješno provedene infekcije stanica s divljim tipom animalnih virusa.

II. Uspješnost umnažanja virusa *Bovine parainfluenza 3*, *Bovine rotavirus A* i *Bovine herpesvirus 1* određena je provedbom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu gdje su Ct vrijednosti uzoraka žetvi virusa bile manje u odnosu na Ct vrijednosti supernatanta, što znači da je koncentracija nukleinske kiseline u uzorcima žetve virusa veća nego kod uzoraka supernatanta, te da je tijekom inkubacije došlo do porasta broja virusa.

III. Dobivene krivulje denaturacije nukleinskih kiselina virusa PIV3, BRVA i BHV1 pokazuju kako je temperatura taljenja (T_m) virusa *Bovine parainfluenza 3* oko 76 °C što znači da ssRNK tog virusa sadrži oko 68 % GC parova baza. T_m virusa *Bovine rotavirus A* je oko 80 °C iz čega proizlazi da dsRNK virusa sadrži između 68 % i 72 % GC parova baza, dok T_m virusa *Bovine herpesvirus 1* iznosi oko 87 °C što znači da dsDNK sadrži između 72 % i 75 % GC parova baza.

IV. Uspješnost izrade banke virusa *Bovine parainfluenza 3*, *Bovine rotavirus A* i *Bovine herpesvirus 1* određena je provedbom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu, te je ustanovljeno kako banke virusa BRVA i PIV3 imaju niske Ct vrijednosti ($Ct < 29$) i sadrže visoku koncentraciju nukleinskih kiselina, dok je kod virusa BHV1 detektiran slabi signal virusa *Bovine parainfluenza 3* kada su korišteni primeri za PIV3 tijekom qRT-PCR-a. Međutim, nakon pročišćavanja kontaminacija banke virusa BHV1 više nije bila prisutna.

V. Uspješnost izrade banke virusa *Bovine parainfluenza 3*, *Bovine rotavirus A* i *Bovine herpesvirus 1* određena je provedbom Testa sterilnosti pri čemu kod sva tri uzorka nije došlo do porasta kolonija na TSA hranjivim podlogama čime je dokazano kako banke virusa ne sadrže kontaminacije.

VI. Uspješnost izrade banke virusa *Bovine parainfluenza 3*, *Bovine rotavirus A* i *Bovine herpesvirus 1* određena je provedbom Testa na mikoplazme tijekom kojeg banke virusa BRVA i BHV1 pokazuju negativan rezultat na prisutnost mikoplazmi, dok je banka virusa PIV3 pokazala prisutnost mikoplazmi.

VII. Uklanjanje mikoplazmi iz uzorka virusa *Bovine parainfluenza 3* uspješno je provedeno antibiotikom plazmocienom, nakon čega je Testom na mikoplazme potvrđena odsutnost mikoplazmi.

6. LITERATURA

6. LITERATURA

Anamul, H.A., Sharma, K., Malik, Y.S., Dhama, K., Gupta, K. (2015) Development of real-time PCR assay for detection of rotavirus infection in diarrheic bovine calves. *Adv. Anim. Vet. Sci.* **3**, 321-324.

Albayrak, H., Yazici, Z., Ozan, E., Tamer, C., El Wahed, A.A., Wehner, S., Ulrich, K., Weidmann, M. (2019) Characterisation of the First Bovine Parainfluenza Virus 3 Isolate Detected in Cattle in Turkey. *Vet. Sci.* **56**, 1-6.

Anonymous 1 (2017) Map of Spain, <<http://pinotglobal.com>>. Pristupljeno 26. lipnja 2020.

Anonymous 2 (2020) MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100x), <<https://www.thermofisher.com>>. Pristupljeno 29. lipnja 2020.

Anonymous 3 (2012) Multi-well tissue culture plates, <<https://www.cellsignet.com>>. Pristupljeno 26. srpnja 2020.

Anonymous 4 (2020) Trypticase soy agar, <<https://en.wikipedia.org>>. Pristupljeno 01. kolovoza 2020.

Anonymous 5 (2020) Trypcase Soy Agar (TSA), <<http://www.biomerieux-culturemedia.com>>. Pristupljeno 01. kolovoza 2020.

Anonymous 6 (2013) Real Time PCR Ct Values, <<https://www.wvdl.wisc.edu>>. Pristupljeno 12. listopada 2020.

Anonymous 7 (2021) Citomegalovirus, <<https://zci-cervirvac.hr>>. Pristupljeno 31. siječnja 2021.

Anonymous 8 (2005) The biology of herpesvirus 1, <<http://www.ogtr.gov.au>>. Pristupljeno 31. siječnja 2021.

Anonymous 9 (2017) Medicinska virologija, <<https://www.slideshare.net/kobas>>. Pristupljeno 08. travnja 2021.

ATCC (2016a) MDBK (NBL-1). ATCC- American Type Culture Collection, <<https://www.lgcstandards-atcc.org>>. Pristupljeno 26. lipnja 2020.

ATCC (2016b) MA-104 Clone 1. ATCC- American Type Culture Collection, <<https://www.lgcstandards-atcc.org>>. Pristupljeno 26. lipnja 2020.

Babiuk, L.A., van Drunen Littel-van den Hurk, S., Tikoo, SK. (1996) Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Vet. Microbiol.* **53**, 31-42.

Baronti, C., Pastorino, B., Charrel, R., de Lamballerie, X. (2013) Mycoplasma removal: Simple curative methods for viral supernatants, *J.Virol.Methods* **187**, 234-237.

Berman, J. J. (2012) Taxonomic Guide to Infectious Diseases: Understanding the Biologic Classes of Pathogenic Organisms, Academic Press, Cambridge, str. 61–63.

Chase, C.L.C., Fulton, R.W., O'Toole, D., Gillette, B., Daly, R.F., Perry, G., Clement, T. (2017) Bovine herpesvirus 1 modified live virus vaccines for cattle reproduction: Balancing protection with undesired effects. *Vet. Microbiol.* **206**, 1-9.

Chen, Y., Wang, S., Yi, Z., Tian, H., Aliyari, R., Li, Y., Chen, G., Liu, P., Zhong, J., Chen, X., Du, P., Su, L., Xiao-Feng Qin, F., Deng, H., Cheng, G. (2014) Interferon-Inducible Cholesterol-25-Hydroxylase Inhibits Hepatitis C Virus Replication via Distinct Mechanisms. *Sci. Rep.* **4**, 1-8.

Citti, C., Blanchard, A. (2013) Mycoplasmas and their host: emerging and re-emerging minimal pathogens. *Trends Microbiol.* **21**, 196-203.

Development of a one-run real-time PCR detection system for pathogens associated with bovine respiratory disease complex. *J. Vet. Med. Sci.* **79**, 517–523.

Dhama, K., Chauhan, R.S., Mahendran, M., Malik, S.V.S. (2009) Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. *Vet. Res. Commun.* **33**, 1-23.

Doan, Y.H., Nakagomi, T., Aboudy, Y., Silberstein, I., Behar-Novat, E., Nakagomi, O., Shulman, L.M. (2013) Identification by Full-Genome Analysis of a Bovine Rotavirus Transmitted Directly to and Causing Diarrhea in a Human Child. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 182-189.

Ellis, J.A. (2010) Bovine parainfluenza-3 virus. *Vet. Clin. North Am. Food Pract.* **26**, 575-593.

Grahovac, B. (2009) Molekularno-biološke metode u patologiji (skripta), Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci, Rijeka.

Grgurić, T. (2018) Histološka analiza utjecaja nedostatka interferonskih receptora alfa i beta na knock-out miševima inficiranim citomegalovirusom (diplomski rad), Medicinski fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.

Haanes, E.J., Guimond, P., Wardley, R. (1997) The bovine parainfluenza type-3 (BPIV-3) hemagglutinin / neuraminidase glycoprotein expressed in baculovirus protects calves against experimental BPIV-3 challenge. *Vaccine* **15**, 730-738.

Jones, C. (2003) Herpes Simplex Virus Type 1 and Bovine Herpesvirus 1 Latency. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 79-97.

Jones, C., Chowdhury, S. (2010) Bovine Herpesvirus Type 1 (BHV-1) is an Important Cofactor in the Bovine Respiratory Disease Complex. *Vet. Clin. Food Anim.* **26**, 303–321.

Kaur, G., Chandra, M. (2016) Herpesvirus in Bovines: Importance of Bovine Herpesvirus Type 1. U: Herpesviridae (Ongrádi, J., ured.), IntechOpen Limited, London, str. 219-235.

Kishimoto, M., Tsuchiaka, S., Rahpaya, S.S., Hasebe, A., Otsu, K., Sugimura, S., Kobayashi, S., Komatsu, N., Nagai, M., Omatsu, T., Naoi, Y., Sano, K., Okazaki-Terashima, S., Oba, M., Katayama, Y., Sato, R., Asai, T., Mizutani, T. (2017)

Lv, L., Zhao, G., Wang, H., He, H. (2019) Cholesterol 25-Hydroxylase inhibits bovine parainfluenza virus type 3 replication through enzyme activity-dependent and -independent ways. *Vet. Microbiol.* **239**, 1-29.

Matthijnssens, J., Ciarlet, M., Heiman, E., Arijs, I., Delbeke, T., McDonald, S.M., Palombo, E.A., Iturriza-Gomara, M., Maes, P., Patton, J.T., Rahman, M., Van Ranst, M. (2008) Full Genome-Based Classification of Rotaviruses Reveals a Common Origin between Human Wa-Like and Porcine Rotavirus Strains and Human DS-1-Like and Bovine Rotavirus Strains. *J. Virol.* **82**, 3204-3219.

Muylkens, B., Thiry, J., Kirten, P., Schynts, F., Thiry, E. (2007) Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Res.* **38**, 181-209.

Parashar, U.D., Bresee, J.S., Gentsch, J.R., Glass, R.I. (1998) Rotavirus. *Emerg. Infect. Dis.* **4**, 561-570.

Patton, J.T. (2012) Rotavirus Diversity and Evolution in the Post-Vaccine World. *Discov. Med.* **13**, 85-97.

Roche Diagnostics GmbH (2010) Nucleic Acid Isolation and Purification Product Selection Guide. <<https://www.lifescience.roche.com>>. Pristupljeno 20.07.2020.

Sartorius Stedim Biotech GmbH (2016a) Instructions for Use Microsart® AMP Extraction. <<https://www.sartorius.hr>>. Pristupljeno 01.08.2020.

Sartorius Stedim Biotech GmbH (2016b) Instructions for Use Microsart® AMP Mycoplasma. <<https://www.sartorius.hr>>. Pristupljeno 01.08.2020.

Thermo Fisher Scientific (2012) Real-time PCR handbook. <<https://www.thermofisher.com>>. Pristupljeno 03.03.2020.

Tikoo, S.K., Campos, M., Babiuk, L.A. (1995) Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): Biology, pathogenesis and control. *Adv. Virus Res.* **45**, 191-223.

Timurkan, M.O., Aydin, H., Sait, A. (2019) Identification and molecular characterisation of bovine parainfluenza virus-3 and bovine respiratory syncytial virus- first report from Turkey. *J. Vet. Res.* **63**, 167-173.

Van Oirschot, J.T., Kaashoek, M.J., Rijsewijk, F.A.M. (1996) Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. *Vet. Microbiol.* **53**, 43-54.

Yang, D.K., han Kim, B., Lee, K.W., Kim, Y.H., Song, J.Y., Park, J.W., Son, S.W. (2008) Genetic characterization of bovine rotavirus isolated in Korea. *Korean J. Vet. Res.* **48**, 423-429.

Žlender, V. (2003) Apoptoza - programirana smrt stanice. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **54**, 267-274.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski radi izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Brezović Teva