

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Luka BOLHA

**MOLEKULARNA ANALIZA IMUNSKEGA ODZIVA
OB SOČASNIH OKUŽBAH S PTIČJIM
PARAMIKSOVIRUSOM TIPA 1 IN BAKTERIJO
*Mycoplasma synoviae***

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Luka BOLHA

**MOLEKULARNA ANALIZA IMUNSKEGA ODZIVA OB SOČASNIH
OKUŽBAH S PTIČJIM PARAMIKSOVIRUSOM TIPA 1 IN
BAKTERIJO *Mycoplasma synoviae***

DOKTORSKA DISERTACIJA

**MOLECULAR ANALYSIS OF THE IMMUNE RESPONSE AFTER
SIMULTANEOUS INFECTIONS WITH AVIAN PARAMYXOVIRUS 1
AND BACTERIUM *Mycoplasma synoviae***

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2015

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 13. 6. 2012 je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje biotehnologija.
Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Mojca Narat.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Olga ZORMAN ROJS
 Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Inštitut za zdravstveno varstvo perutnine

Članica: prof. dr. Darja BARLIČ MAGANJA
 Univerza na Primorskem, Fakulteta za vede o zdravju

Član: znan. svet. dr. Dušan BENČINA
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Luka BOLHA

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd
DK UDK 577.27:579(043.3)=163.6
KG imunologija/mikrobiologija/*Mycoplasma synoviae*/ptičji paramiksovirus tipa 1/zaporedna okužba/imunski odziv/zarodek/fibroblasti/makrofagi/kokoši
KK AGRIS L50/6100
AV BOLHA, Luka, univ. dipl. bioteh.
SA NARAT, Mojca (mentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Bioznanosti, področje biotehnologija
LI 2015
IN MOLEKULARNA ANALIZA IMUNSKEGA ODZIVA OB SOČASNIH OKUŽBAH S PTIČJIM PARAMIKSOVIRUSOM TIPA 1 IN BAKTERIJO *Mycoplasma synoviae*
TD Doktorska disertacija
OP XVI, 157 str., 14 pregl., 28 sl., 4 pril., 409 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI V sklopu te doktorske disertacije smo analizirali molekularni odziv kokošjih zarodkov, kokošjih zarodnih celic (CEC-32) in makrofagov (HD11) po zaporedni okužbi z bakterijo *M. synoviae* WVU 1853 (MS) in cepivom, ki vsebuje APMV-1 sev La Sota ter nekatere interakcije med obema patogenoma v pogojih *in vitro*. S qRT-PCR smo analizirali izražanje genov za citokine in kemokine in pokazali imunosupresivno delovanje cepiva La Sota na izražanje večine le-teh, katerih izražanje je stimulirala predhodna okužba z MS v kokošjih zarodkih in obeh celičnih tipih. Znižano prisotnost nitrita, IL-1 β , IL-6, IL-18 in IFN- γ pri sočasno okuženih celicah, v primerjavi s celicami, okuženimi z MS, smo določili v celičnih supernatantih z Griessovim testom in imuno-encimskim testom DIBA. Preživetje CEC-32 in HD11 je bilo nižje po okužbi z MS kot po okužbi s cepivom La Sota. Preživetje obeh celičnih tipov je bilo po zaporedni okužbi nižje kot pri celicah, okuženih le z MS. Določili smo invazivnost MS v CEC-32 in HD11, ki je bila pri HD11 višja ob prisotnosti cepiva La Sota. Pri MS smo identificirali DNA-specifično nukleazno aktivnost (NA), ki so jo imele celice MS, njene membrane, citoplazme in tudi gojišče, v katerem je rasla kultura MS. NA celic MS je bila močnejša ob prisotnosti Ca $^{2+}$ ionov, imela je pH optimum 5,5–6 in je razgradila genomsko DNA CEC-32 24 in 48 h po okužbi z MS. NA celic MS je bila intenzivnejša ob sočasni inkubaciji s cepivom La Sota v pogojih *in vitro*. Z NaDS-PAGE in metodo po Westernu smo pokazali tudi, da je v pogojih *in vitro* MS sposobna s svojimi proteazami razgraditi proteina HN in M seva La Sota. Določili smo nukleotidni zaporedji genov za nukleazi MS53_0110 in MS53_0284, ki najverjetneje določata proteina s predvideno molekulsko maso 26,7 in 50,1 kDa. Pokazali smo, da so se zunajcelične nukleaze sproščale iz celic MS pri temperaturi 37 in 4 °C, imele so molekulsko maso med 30 in > 50 kDa, nahajale so se v hidrofilni frakciji tekočega gojišča,obarjale pa pri 60–80 % amonijevem sulfatu.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 577.27:579(043.3)=163.6
CX immunology/microbiology/*Mycoplasma synoviae*/avian paramyxovirus 1/
consecutive infection/immune response/embryo/fibroblasts/macrophages/
chickens
CC AGRIS L50/6100
AU BOLHA, Luka
AA NARAT, Mojca (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral
Programme in Biosciences, Field: Biotechnology
PY 2015
TI MOLECULAR ANALYSIS OF THE IMMUNE RESPONSE AFTER
SIMULTANEOUS INFECTIONS WITH AVIAN PARAMYXOVIRUS 1 AND
BACTERIUM *Mycoplasma synoviae*
DT Doctoral dissertation
NO XVI, 157 p., 14 tab., 28 fig., 4 ann., 409 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Within this doctoral dissertation we analyzed the molecular response of chicken embryos, chicken embryo cells (CEC-32) and macrophages (HD11) after consecutive infection with *M. synoviae* WVU 1853 (MS) and APMV-1 La Sota vaccine and, also, certain interactions between the two pathogens *in vitro*. Using qRT-PCR, we analyzed gene expressions of chicken cytokines and chemokines and demonstrated immunosuppressive effects of La Sota that could downregulate the expression of MS-induced cytokine and chemokine genes in chicken embryos and both cell types. Reduced levels of nitrite, IL-1 β , IL-6, IL-18 and IFN- γ could also be detected by Griess test and DIBA in cell supernatants after consecutive infection with both pathogens, when compared to MS-infected cells. Viability of CEC-32 and HD11 was lower after MS infection than La Sota infection. Viability of both cell types was lower after consecutive infection with both microorganisms with 6 h delay in pathogen application than in MS-infected cells. Using a gentamicin invasion assay, we determined an increase in MS invasion into HD11, when La Sota was also present, but not into CEC-32. We identified nuclease activity (NA) of MS, which was demonstrated for MS cells, their membranes, cytoplasms and culture medium in which MS culture was grown. NA of MS cells was stronger in the presence of Ca²⁺, had a pH optimum 5.5–6 and degraded genomic DNA of CEC-32 24 and 48 h after infection with MS. *In vitro* NA of MS cells was stronger in the presence of La Sota. With the use of NaDS-PAGE and Western blotting, we determined proteolytic activity of MS cells toward La Sota HN and M proteins after mixed *in vitro* incubation of both pathogens. We sequenced genes for MS nucleases MS53_0110 and MS53_0284 which most likely encode proteins with 26.7 and 50.1 kDa, respectively. We demonstrated that extracellular nucleases were released from MS cells at 37 and 4 °C, had molecular weight between 30 and > 50 kDa, were located in the hydrophilic fraction of the media and were precipitated at 60–80 % ammonium sulphate.

KAZALO VSEBINE

str.

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	IX
KAZALO SLIK.....	X
KAZALO PRILOG	XIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIV
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 IMUNSKI SISTEM KOKOŠI	3
2.1.1 Prirojena imunost.....	4
2.1.1.1 Celice prirojene imunosti.....	6
2.1.1.2 Receptorji prirojene imunosti	8
2.1.2 Pridobljena imunost	9
2.1.3 Citokini in kemokini.....	11
2.2 MIKOPLAZME	14
2.3 PTIČJE MIKOPLAZME.....	18
2.4 <i>Mycoplasma synoviae</i>	18
2.4.1 Morfologija, potrebe za rast in biokemijske lastnosti <i>M. synoviae</i>	19
2.4.2 Virulentni dejavniki <i>M. synoviae</i>	19
2.4.3 Patogeneza <i>M. synoviae</i>	21
2.4.4 Diagnostika <i>M. synoviae</i>	22
2.4.5 Imunski odziv kokoši na okužbo z <i>M. synoviae</i>.....	23
2.5 PARAMIKSOVIRUSI	25
2.6 PTIČJI PARAMIKSOVIRUS TIPA 1	27
2.6.1 Morfologija, kemijska zgradba in biološke lastnosti APMV-1	29
2.6.2 Podvajanje APMV-1.....	32
2.6.3 Patogeneza APMV-1.....	33
2.6.3.1 Vloga proteina F pri patogenezi APMV-1	34
2.6.3.2 Vloga proteina HN pri patogenezi APMV-1	35
2.6.3.3 Vloga proteina V pri patogenezi APMV-1	37

2.6.4 Določanje sevov in diagnostika APMV-1	37
2.6.5 Cepljenje proti AKK	39
2.6.6 Imunski odziv kokoši na okužbo z APMV-1	40
2.6.6.1 Prirojeni imunski odziv na okužbo z APMV-1.....	41
2.6.6.2 Protitelesni imunski odziv na okužbo in cepljenje z APMV-1.....	42
2.6.6.3 Celični imunski odziv na okužbo z APMV-1	42
2.7 MEDSEBOJNI VPLIVI PATOGENIH MIKROORGANIZMOV NA RAZVOJ BOLEZNI PRI PERUTNINI.....	43
2.7.1 Medsebojni vplivi <i>M. synoviae</i> in nekaterih virusov, patogenih za perutnino	44
2.7.2 Medsebojni vplivi APMV-1 in bakterij, ki okužujejo ptice	45
3 NAMEN IN RAZISKOVALNE HIPOTEZE.....	46
4 MATERIALI IN METODE	48
4.1 SEVI BAKTERIJE <i>M. synoviae</i> IN APMV-1	48
4.1.1 Gojenje sevov bakterije <i>M. synoviae</i>	48
4.1.1.1 Določanje kolonijskih enot bakterije <i>M. synoviae</i>	48
4.1.2 Priprava seva APMV-1 La Sota	49
4.1.3 Določanje koncentracije <i>M. synoviae</i> in APMV-1 za okuževanje kokošjih zarodkov in celičnih linij CEC-32 in HD11	49
4.2 KOKOŠJI ZARODKI	49
4.2.1 Okuževanje kokošjih zarodkov in potrjevanje okužbe	50
4.2.2 Vzorčenje organov in osamitev RNA	51
4.3 CELIČNI LINIJI CEC-32 IN HD11	52
4.3.1 Gojenje celic CEC-32 in HD11	52
4.3.2 Okuževanje celic CEC-32 in HD11	52
4.3.3 Določanje preživetja celic CEC-32 in HD11	53
4.3.4 Vzorčenje celičnih supernatantov, celic in osamitev RNA.....	53
4.3.5 Določanje NO v celičnih supernatantih	54
4.3.6 Določanje vnetnih citokinov v celičnih supernatantih	54
4.3.7 Analiza invazivnosti bakterije <i>M. synoviae</i> v celice CEC-32 in HD11 ob prisotnosti APMV-1.....	55
4.4 ANALIZA IZRAŽANJA GENOV S KVANTITATIVNO VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO V REALNEM ČASU (qRT-PCR)	56
4.4.1 Obdelava RNA z DNazo I in obratna transkripcija	56
4.4.2 Načrtovanje oligonukleotidnih začetnikov	56
4.4.3 qRT-PCR	59
4.4.4 Analiza izražanja genov in izračun podatkov	60

4.5 ANALIZA NUKLEAZNE AKTIVNOSTI BAKTERIJE <i>M. synoviae</i>	61
4.5.1 Osamitev DNA za teste nukleazne aktivnosti.....	61
4.5.2 Priprava celičnih frakcij <i>M. synoviae</i> WVU 1853.....	61
4.5.3 Analiza nukleazne aktivnosti <i>M. synoviae</i> WVU 1853	62
4.5.3.1 Analiza zunajcelične nukleazne aktivnosti <i>M. synoviae</i> WVU 1853	63
4.5.4 Določanje in primerjava nukleotidnih zaporedij nukleaz MS53_0110 ter MS53_0284 med sevi bakterije <i>M. synoviae</i> WVU 1853, ULB 9122, ULB 02/T6 in 53	64
4.5.5 Analiza nukleazne aktivnosti <i>M. synoviae</i> WVU 1853 ob prisotnosti APMV-1 La Sota.....	66
4.6 ANALIZA INTERAKCIJ MED BAKTERIJO <i>M. synoviae</i> WVU 1853 IN APMV-1 La Sota V POGOJIH <i>in vitro</i>	66
4.6.1 Analiza razgradnje proteinov APMV-1.....	66
5 REZULTATI	68
5.1 IZRAŽANJE GENOV V ORGANIH KOKOŠJIH ZARODKOV PO POSAMEZNI IN ZAPOREDNI OKUŽBI Z BAKTERIJO <i>M. synoviae</i> WVU 1853 IN APMV-1 La Sota	68
5.1.1 Potrditev okužbe kokošjih zarodkov	68
5.1.2 Izražanje genov za citokine in kemokine v kokošjih zarodkih po okužbi z bakterijo <i>M. synoviae</i> in APMV-1	68
5.1.2.1 Izražanje genov za citokine in kemokine v jetrih	68
5.1.2.2 Izražanje genov za citokine in kemokine v vranici.....	70
5.1.2.3 Izražanje genov za citokine in kemokine v Fabricijevi burzi	71
5.1.2.4 Izražanje genov za citokine in kemokine v timusu	72
5.1.2.5 Razlike v izražanju genov za citokine in kemokine med posamičnim ter zaporednim tipom okužbe	73
5.2 ODZIV CELIČNIH LINIJ CEC-32 IN HD11 NA POSAMEZNE TER ZAPOREDNE OKUŽBE Z BAKTERIJO <i>M. synoviae</i> WVU 1853 IN APMV-1 La Sota	75
5.2.1 Dinamika preživetja celic po okužbi z bakterijo <i>M. synoviae</i> in APMV-1	75
5.2.1.1 Dinamika preživetja celic CEC-32 in HD11 po okužbi z bakterijo <i>M. synoviae</i> , APMV-1 ter zaporedno okužbo z obema patogenoma s 6-urnim zamikom apliciranja	75
5.2.1.2 Dinamika preživetja celic CEC-32 in HD11 po okužbi z bakterijo <i>M. synoviae</i> , APMV-1 ter zaporedno okužbo z obema patogenoma s 24-urnim zamikom apliciranja	77
5.2.2 Izražanje genov za citokine in kemokine po okužbi celic z bakterijo <i>M. synoviae</i> ter APMV-1 in prisotnost vnetnih citokinov v celičnih supernatantih	79

5.2.2.1	Izražanje IL-1 β v celicah CEC-32 in HD11	79
5.2.2.2	Izražanje IL-6 v celicah CEC-32 in HD11	81
5.2.2.3	Izražanje IL-18 v celicah CEC-32 in HD11	83
5.2.2.4	Izražanje IFN- γ v celicah CEC-32 in HD11	85
5.2.2.5	Izražanje genov za IL-12 p40, MIP-1 β (CCL4) in iNOS v celicah CEC-32 in HD11	87
5.2.3	Prisotnost NO v supernatantih celic HD11	91
5.2.4	Invazivnost bakterije <i>M. synoviae</i> v celice CEC-32 in HD11 ob prisotnosti APMV-1	92
5.3	NUKLEAZNA AKTIVNOST BAKTERIJE <i>M. synoviae</i> WVU 1853	93
5.3.1	Značilnosti nukleazne aktivnosti bakterije <i>M. synoviae</i> WVU 1853.....	93
5.3.2	Primerjava nukleotidnih zaporedij nukleaz MS53_0110 in MS53_0284 med sevi bakterije <i>M. synoviae</i> WVU 1853, ULB 9122, ULB 02/T6 in 53.96	96
5.3.3	Zunajcelične nukleaze bakterije <i>M. synoviae</i> WVU 1853	98
5.3.4	Nukleazna aktivnost bakterije <i>M. synoviae</i> WVU 1853 ob prisotnosti APMV-1 La Sota.....	101
5.4	INTERAKCIJE MED BAKTERIJO <i>M. synoviae</i> WVU 1853 IN APMV-1 La Sota V POGOJIH <i>in vitro</i>	102
5.4.1	Razgradnja proteinov APMV-1 ob prisotnosti bakterije <i>M. synoviae</i>	102
6	RAZPRAVA IN SKLEPI	104
6.1	RAZPRAVA	104
6.2	SKLEPI	118
7	POVZETEK (SUMMARY)	119
7.1	POVZETEK	119
7.2	SUMMARY	121
8	VIRI.....	123

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

str.

Preglednica 1: Seznam kokošjih PRR in njihovih ligandov (Brownlie in Allan, 2011; Kaiser, 2010)	9
Preglednica 2: Seznam znanih kokošjih citokinov in kemokinov (Kaiser, 2010).....	12
Preglednica 3: Taksonomska razdelitev redov in družin v razredu <i>Mollicutes</i> ter gostitelji, ki jih pozamezen rod naseljuje (Garrity in sod., 2007; Razin in sod., 1998).	14
Preglednica 4: Rodovi in virusi, uvrščeni v poddružino <i>Paramyxovirinae</i> (Audsley in Moseley, 2013; Miller in Koch, 2013).	25
Preglednica 5: Ptičji paramiksovirusi, njihovi gostitelji in bolezni, ki jih povzročajo pri perutnini (Miller in Koch, 2013).	26
Preglednica 6: Lastnosti strukturnih in nestruktturnih proteinov APMV-1.	31
Preglednica 7: Aminokislinska zaporedja cepnega mesta proteina F ₀ pri različnih sevih APMV-1 (Alexander in Senne, 2008).	35
Preglednica 8: Uporabljeni sevi bakterije <i>M. synoviae</i>	48
Preglednica 9: Poskusne skupine kokošjih zarodkov	50
Preglednica 10: Postopek okuževanja celic CEC-32 in HD11.....	53
Preglednica 11: Značilnosti oligonukleotidnih začetnikov, ki smo jih uporabili za pomnoževanje genov pri analizah qRT-PCR.	58
Preglednica 12: Specifični oligonukleotidni začetniki za pomnoževanje genov predvidenih nukleaz MS53_0110 in MS53_0284 pri <i>M. synoviae</i>	65
Preglednica 13: Primerjava med relativno ravnijo mRNA za citokine in kemokine v organih zaporedno in posamično okuženih kokošjih zarodkih z <i>M. synoviae</i> WVU 1853 in APMV-1 La Sota.	74
Preglednica 14: Velikost genov, predvideno število aminokislinskih ostankov, molekulska masa in pI nukleaz MS53_0110 in MS53_0284 pri tipskem sevu bakterije <i>M. synoviae</i> WVU 1853 in sevih ULB 9122, ULB 02/T6 in 53	98

KAZALO SLIK

str.

Slika 1: Morfologija celic in kolonij bakterije <i>Mycoplasma agalactiae</i> (Citti in Blanchard, 2013).....	15
Slika 2: Slika delca APMV-1 seva Ulster 2C (Alexander in Senne, 2008 (Collins)) in shematski prikaz zgradbe delca APMV-1 (©ViralZone, 2010; Swiss Institute of Bioinformatics).....	30
Slika 3: Shema prileganja oligonukleotidnih začetnikov na gena nukleaz MS53_0110 in MS53_0284 v genomu seva <i>M. synoviae</i> 53 in predvidena velikost PCR produktov	64
Slika 4: Relativne ravni mRNA za citokine in kemokine v jetrih kokošjih zarodkov po okužbi z bakterijo <i>M. synoviae</i> , APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma	69
Slika 5: Relativne ravni mRNA za citokine in kemokine v vranicah kokošjih zarodkov po okužbi z bakterijo <i>M. synoviae</i> , APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma	71
Slika 6: Relativne ravni mRNA za citokine in kemokine v Fabricijevih burzah kokošjih zarodkov po okužbi z bakterijo <i>M. synoviae</i> , APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma.....	72
Slika 7: Relativne ravni mRNA za citokine in kemokine v timusih kokošjih zarodkov po okužbi z bakterijo <i>M. synoviae</i> , APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma	73
Slika 8: Odstotek preživetja celic CEC-32 in HD11 po okužbi z bakterijo <i>M. synoviae</i> , APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma s 6-urnim zamikom apliciranja	76
Slika 9: Odstotek preživetja celic CEC-32 in HD11 po okužbi z bakterijo <i>M. synoviae</i> , APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma s 24-urnim zamikom apliciranja.....	78
Slika 10: Izražanje gena za IL-1 β v celicah CEC-32 in HD11 ter prisotnost IL-1 β v celičnih supernatantih po okužbi z bakterijo <i>M. synoviae</i> , APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma.....	80
Slika 11: Izražanje gena za IL-6 v celicah CEC-32 in prisotnost IL-6 v supernatantih celic CEC-32 ter HD11 po okužbi z bakterijo <i>M. synoviae</i> , APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma	82

Slika 12: Izražanje gena za IL-18 v celicah CEC-32 in HD11 ter prisotnost IL-18 v celičnih supernatantih po okužbi z bakterijo <i>M. synoviae</i> , APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma.....	84
Slika 13: Izražanje gena za IFN- γ v celicah CEC-32 in HD11 ter prisotnost IFN- γ v celičnih supernatantih po okužbi z bakterijo <i>M. synoviae</i> , APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma	86
Slika 14: Izražanje gena za IL-12 p40 v celicah CEC-32 in HD11 po okužbi z bakterijo <i>M. synoviae</i> , APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma.....	88
Slika 15: Izražanje gena za MIP-1 β (CCL4) v celicah CEC-32 in HD11 po okužbi z bakterijo <i>M. synoviae</i> , APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma	89
Slika 16: Izražanje gena za iNOS v celicah HD11 po okužbi z bakterijo <i>M. synoviae</i> , APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma.....	90
Slika 17: Koncentracija nitrita v supernatantih celic HD11 po okužbi z bakterijo <i>M. synoviae</i> , APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma s 6-urnim zamikom apliciranja	91
Slika 18: Koncentracija nitrita v supernatantih celic HD11 po okužbi z bakterijo <i>M. synoviae</i> , APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma s 24-urnim zamikom apliciranja	92
Slika 19: Relativna frekvenca invazivnosti bakterije <i>M. synoviae</i> WVU 1853 v celice CEC-32 in HD11 brez in ob prisotnosti APMV-1 La Sota	93
Slika 20: Nukleazna aktivnost celičnih frakcij in tekočega gojišča, v katerem je bila gojena kultura bakterije <i>M. synoviae</i> WVU 1853	94
Slika 21: Nukleazna aktivnost celic bakterije <i>M. synoviae</i> WVU 1853 ob prisotnosti magnezijevih in kalcijevih ionov.....	95
Slika 22: Nukleazna aktivnost celic bakterije <i>M. synoviae</i> WVU 1853 pri različnih pH-vrednostih nukleaznega pufrja.....	95
Slika 23: Vpliv nukleazne aktivnosti bakterije <i>M. synoviae</i> WVU 1853 na genomsko DNA po okužbi celic CEC-32.....	96

Slika 24: Analiza produktov PCR po agarozni gelski elektroforezi, ki smo jih izolirali iz gela in uporabili za pridobitev nukleotidnega zaporedja genov za nukleazi MS53_0110 in MS53_0284	97
Slika 25: Nukleazna aktivnost in proteinski profil medija z nizko vsebnostjo proteinov, v katerem je rasla bakterijska kultura <i>M. synoviae</i> WVU 1853	99
Slika 26: Nukleazna aktivnost in proteinski profil frakcij medija z nizko vsebnostjo proteinov, v katerem smo gojili kulturo bakterije <i>M. synoviae</i> WVU 1853	101
Slika 27: Nukleazna aktivnost celic bakterije <i>M. synoviae</i> WVU 1853 ob prisotnosti APMV-1 La Sota v pogojih <i>in vitro</i>	102
Slika 28: Analiza proteinskega profila APMV-1 z metodo po Westernu in proteinski profil celic bakterije <i>M. synoviae</i> WVU 1853 in APMV-1 La Sota po skupni inkubaciji v pogojih <i>in vitro</i>	103

KAZALO PRILOG

Priloga A: Lastnosti standardnih krivulj tarčnih in referenčnih genov, ki smo jih uporabili za relativno kvantifikacijo izražanja genov za citokine in kemokine v kokošjih zarodkih in celicah CEC-32 in HD11.

Priloga B: Linearno dinamično območje, meja detekcije (LOD) in meja kvantifikacije (LOQ) pri analiziranih genih.

Priloga C: Poravnavo nukleotidnih zaporedij nukleaz MS53_0110 pri sevih bakterije *M. synoviae* WVU 1853, ULB 9122, ULB 02/T6 in 53.

Priloga D: Poravnavo nukleotidnih zaporedij nukleaz MS53_0284 pri sevih bakterije *M. synoviae* WVU 1853, ULB 9122, ULB 02/T6 in 53.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Ab	protitelo
AKK	atipična kokošja kuga
ALF	alantoisna tekočina
APC	antigen predstavitevna celica
APMV	ptičji paramiksovirus
BALT	limfoidno tkivo bronhijev (ang. <u>bronchus-associated lymphoid tissue</u>)
bp	bazni par
CALT	limfoidno tkivo očesnih veznic (ang. <u>conjunctiva-associated lymphoid tissue</u>)
CAM	horioalantoisna membrana
CEC-32	celična linija kokošjih zarodnih celic (ang. <u>chicken embryo cells</u>)
CFU	število enot, ki tvorijo kolonije (ang. <u>colony forming units</u>)
CMI	celični imunski odziv
Cq	cikel kvantifikacije (ang. quantification cycle)
CTL	citotoksični limfocit T
DC	dendritična celica
CSF	kolonijsko-stimulirajoči dejavnik
DIBA	indirektni točkovni imuno-encimski test (ang. <u>dot immunobinding assay</u>)
DMEM	gojišče (<u>Dulbecco's Modified Eagle Medium</u>)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
E	učinkovitost pomnoževanja qRT-PCR
EAA	deformacija jajčne lupine na koničastem delu jajca (ang. <u>eggshell apex abnormality</u>)
EID ₅₀	srednji infektivni odmerek za zarodke (ang. <u>embryo infectious dose</u>)
ELISA	encimsko imunski test (ang. <u>enzyme-linked immunosorbent assay</u>)
FBS	fetalni goveji serum
GALT	limfoidno tkivo črevesa (ang. <u>gut-associated lymphoid tissue</u>)
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
HD11	celična linija kokošjih makrofagov
HI	inhibicija hemaglutinacije
HPRT	hipoksantin fosforiboziltransferaza
HRP	hrenova peroksidaza
IB	kužni bronhitis
IBD	Gumborska bolezen (ang. <u>infectious bursal disease</u>)
IBDV	virus Gumborske bolezni (ang. <u>infectious bursal disease virus</u>)
IBV	virus kužnega bronhitisa
ICPI	intracerebralni indeks patogenosti
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IIPA	indirektni imunoperoksidazni test

IL	interlevkin
iNOS	inducibilna sintaza dušikovega oksida
IRF	dejavnik, ki uravnava izražanje interferonov (ang. <u>i</u> nterferon <u>r</u> egulatory <u>f</u> actor)
IVPI	intravenozni indeks patogenosti
kDa	kilodalton
LITAF	z lipopolisaharidi inducirani faktor tumorske nekroze - α faktor
LOD	meja detekcije (ang. <u>l</u> imit <u>o</u> f <u>d</u> etection)
LOQ	meja kvantifikacije (ang. <u>l</u> imit <u>o</u> f <u>q</u> uantification)
LPS	lipopolisaharid
mAb	monoklonsko protitelo
MALT	limfoidno tkivo sluznic (ang. <u>m</u> ucosa- <u>a</u> sso <u>c</u> iated <u>l</u> ymphoid <u>t</u> issue)
MDT	povprečen čas zamiranja (ang. <u>m</u> ean <u>d</u> eath <u>t</u> ime)
MDV	virus Marekove bolezni
MHC	poglavitni histokompatibilnostni kompleks
MIP	makrofagni vnetni protein (ang. <u>m</u> acrophage <u>i</u> nflammatory <u>p</u> rotein)
mM	milimol na liter raztopine
MOI	intenziteta okužbe (ang. <u>m</u> ultiplicity <u>o</u> f <u>i</u> nfection)
mRNA	informacijska RNA (ang. <u>m</u> essenger RNA)
NA	nukleazna aktivnost
NAb	naravno protitelo
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
NaDS	natrijev dodecil sulfat
NALT	limfoidno tkivo nosne sluznice (ang. <u>n</u> asal- <u>a</u> sso <u>c</u> iated <u>l</u> ymphoid <u>t</u> issue)
ND	atypična kokošja kuga (ang. <u>N</u> ewcastle <u>disease)</u>
NDV	virus atypične kokošje kuge (ptičji paramiksovirus tipa 1) (ang. <u>N</u> ewcastle <u>disease <u>v</u>irus)</u>
NEAC	nevraminidazna aktivnost
NK	naravne celice ubijalke
NO	dušikov oksid
NOD	citoplazemski PRR (ang. <u>n</u> ucleotide- <u>b</u> inding <u>o</u> ligomerization <u>domain receptor)</u>
NOS	sintaza dušikovega oksida
NTC	negativna kontrola reakcije qRT-PCR (ang. <u>n</u> o <u>t</u> emplate <u>c</u> ontrol)
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza
PAMP	molekule, značilne za določene patogene mikroorganizme (ang. <u>p</u> athogen- <u>a</u> ssociated <u>m</u> olecular <u>p</u> atterns)
PBS	fosfatni pufer (ang. <u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PRR	receptor, ki prepoznavata specifične molekularne motive mikroorganizmov (ang. <u>p</u> attern <u>r</u> ecognition <u>receptor)</u>

qRT-PCR	kvantitativna PCR v realnem času
RIF	relativna frekvenca invazivnosti (ang. <u>relative invasion frequency</u>)
RNA	ribonukleinska kislina
RPL	ribosomalni protein L
RPMI	gojišče (<u>Roswell Park Memorial Institute</u> medium)
rRNA	ribosomalna RNA
SE	standardna napaka
SPA	test aglutinacije na plošči
SPF	žival, prosta specifičnih patogenih mikroorganizmov (ang. <u>specific-pathogen-free</u>)
TGF	transformirajoči rastni dejavnik
Th	celica T pomagalka
TLR	Tollu podoben receptor (ang. <u>Toll-like receptor</u>)
TNF	dejavnik tumorske nekroze
XTT	tetrazolijeva sol (2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolijev-5-karboksanilid)
YWHAZ	tirozin 3-monooksigenaza/triptofan 5-monooksigenaza aktivirajoči protein

1 UVOD

Med glavne dejavnike, ki povzročajo poškodbe celic in tkiv gostitelja ter s tem patološke procese, poleg neposrednega patogenega delovanja, spadajo predvsem vnetni procesi, ki so posledica burnega imunskega odziva gostitelja na okužbo. Mediatorji teh vnetnih procesov so vnetni citokini in kemokinji. Podatkov o tem, kako poteka imunski odziv na neko okužbo, če je bila žival predhodno okužena z nekim drugim patogenim mikroorganizmom, je relativno malo. Patogeni mikroorganizmi, ki naseljujejo ista tkiva, niso samo v interakciji z gostiteljem, ampak tudi med seboj. Medsebojne interakcije med različnimi mikroorganizmi in gostiteljem pa imajo lahko odločajoč vpliv na potek ter izid bolezni. Učinki na molekularne mehanizme in signalne poti so lahko sinergistični ali antagonistični, zaradi česar so lahko nekateri mehanizmi imunskega odziva potencirani in drugi zavirani. V primerjavi z okužbami s posameznim patogenim mikroorganizmom pa lahko pride tudi do imunosupresije, kjer se lahko poviša patogenost enega ali obeh mikroorganizmov oziroma poveča dovzetnost gostitelja na sekundarne okužbe (Kleven, 1998, 2003b, 2008b; Saif, 2008).

Bakterija *Mycoplasma synoviae* spada med najpomembnejše patogene ptičje mikoplazme, ki okužuje perutnino in najpogosteje povzroča subklinične okužbe zgornjega dela dihal. Okužba se lahko iz epitelijev dihalnega trakta prenese na ostale organe, predvsem na sklepe in jajcevode, kar pogojuje vertikalni prenos okužbe na kokošje zarodke preko valilnih jajc (Bradbury, 2005; Olson, 1984). V določenih primerih lahko okužba postane sistemská in vodi v nastanek kužnega sinovitisa. Med dejavnike patogenosti *M. synoviae* spadajo sposobnost hemaglutinacije, antigenska variacija hemaglutinina VlhA, nevraminidazna aktivnost, proteolitična cepitev kokošjih imunoglobulinov (Ig), vdiranje v kokošje nefagocitirajoče celice, povzročanje apoptoze kokošjih hondrocytov in močna stimulacija izražanja vnetnih citokinov ter kemokinov in drugih vnetnih molekul po okužbi (Benčina, 2002; Benčina in sod., 1999; Berčič in sod., 2008b, 2011; Cizelj in sod., 2011; Dušanić in sod., 2009, 2012; Khiari in Mardassi, 2012; Lavrič in sod., 2007, 2008; Noormohammadi in sod., 1997, 1998; Oven in sod., 2013). Pri piščancih, ki so okuženi z *M. synoviae*, se lahko pojavi zelo hude vnetne reakcije po cepljenju z respiratornimi virusnimi cepivi po kapljični metodi (Bradbury, 1984; Villegas in sod., 1976).

Ptičji paramiksovirus tipa 1 (APMV-1) spada v rod *Avulavirus*. Virulentni sevi APMV-1 povzročajo atipično kokošjo kugo (AKK), kjer je lahko pogin kokoši 90–100 %. Pri kokoših je po okužbi z APMV-1 mogoč razpon med zelo hudimi in subkliničnimi bolezenskimi stanji, ki so odvisna od seva APMV-1 (Alexander in Senne, 2008). Seve APMV-1 lahko glede na klinične znake pri kokoših razdelimo v pet tipov: viscerotropni velogeni, nevrotropni velogeni, mezogeni, lentogeni in asimptomatski tip (Beard in Hanson, 1984). Okužba kokoši z virulentnimi sevi APMV-1 povzroča povišano izražanje genov za interferone tipa I in II, ostalih vnetnih citokinov, kemokinov in protivirusnih

dejavnikov, apoptozo kokošjih limfocitov ter heterofilcev, povišano prisotnost IgM, IgY in IgA. Dokazali so tudi antagonistično delovanje APMV-1 na signalizacijo z interferoni (Ahmed in sod., 2007; Ganar in sod., 2014; Jeurissen in sod., 2000; Kapczynski in sod., 2013; Lam, 1996a, b; Lam in Vasconcelos, 1994; Lam in sod., 1996; Palmer in sod., 1987; Rue in sod., 2011; Sick in sod., 1998, 2000). Med najpogostejše cepne seve za cepljenje perutnine proti atipični kokošji kugi spada lentogeni sev APMV-1 La Sota (Goldhaft, 1980), ki se lahko aplicira intranasalno, intraokularno, s pitno vodo in kapljično (Alexander in Senne, 2008). Po cepljenju piščancev s sevom La Sota s kapljičnimi metodami so opazili večjo dovzetnost za obolenja dihal ob prisotnosti določenih mikroorganizmov, tudi mikoplazem (Alexander in Senne, 2008).

Znano je, da okužba z *M. synoviae* pogosto preide iz subklinične v klinično obliko ob prisotnosti določenih sevov oziroma cepiv proti APMV-1 (Kleven in Ferguson-Noel, 2008). Pri kokoših lahko pride do hujšega vnetja in poškodb zračnih vrečk, ki jih povzroči respiratorna okužba z *M. synoviae* v kombinaciji s cepivi proti APMV-1 (Kleven in Ferguson-Noel, 2008; Kleven in sod., 1972b; Olson in sod., 1964), interakcije med virusi ter mikoplazmami pa lahko vplivajo tudi na učinkovitost cepljenja pri perutnini (Bradbury, 1984; Kleven, 2003b; Silva in sod., 2008). Zaradi relativno slabega poznavanja imunskega odziva kokoši na zaporedne okužbe, ki lahko nastanejo v primeru cepljenj in tudi naravnih okužb z *M. synoviae* in lentogenimi sevi oziroma cepivi proti APMV-1, smo v sklopu raziskav te doktorske disertacije, v pogojih *in vitro* in *in vivo*, analizirali molekularni odziv kokošjih zarodkov, učinek na imunske in neimunske celice in tudi nekatere interakcije med *M. synoviae* in APMV-1, ki lahko spremljajo tovrstne zaporedne okužbe.

2 PREGLED OBJAV

2.1 IMUNSKI SISTEM KOKOŠI

Zdravstveno stanje perutnine je odvisno od spremenljajočih se okoljskih dejavnikov, evolucije patogenih mikroorganizmov, uporabe antibiotikov in drugih zdravil, cepljenj in tudi od sprememb v zakonodaji in trgu, ki narekujejo intenzivno reko perutnine. Za preprečevanje bolezenskih stanj pri perutnini je poznavanje mehanizmov imunskega sistema ptic nujno, predvsem za razvoj ustreznih strategij preprečevanja okužb in cepljenj (Kaiser, 2012). Imunski sistem kokoši je najbolje raziskan imunski sistem ptic. Od imunskega sistema sesalcev se razlikuje v več ključnih dejavnikih, ima pa relativno veliko podobno delujočih mehanizmov. Kokoši imajo različen nabor Tollu podobnih receptorjev (TLR) (Boyd in sod., 2007; Temperley in sod., 2008; Cormican in sod., 2009), defenzinov (Lynn in sod., 2007), citokinov in kemokinov (Hughes in sod., 2007; Kaiser in sod., 2005), protiteles in drugih imunskeih molekul (Kaiser, 2007). Kokoši nimajo funkcionalnih eozinofilcev, ptičji ekvivalent sesalskim nevtrofilcem pa so heterofilci. Ptice nimajo limfnih vozlov, imajo pa specifični primarni limfoidni organ, Fabricijevu burzo, kjer poteka diferenciacija in razvoj limfocitov B (Kaiser, 2010).

Delovanje imunskega odziva na okužbo z določenim patogenim mikroorganizmom omogočajo limfoidna tkiva in celice oziroma molekule, ki jih le-te proizvajajo. Limfoidna tkiva in organi kokoši se delijo na primarna in sekundarna. Med primarna limfoidna organa spada Fabricijeva burza in timus (priželjc), kjer poteka od antigenov neodvisna diferenciacija in proliferacija limfocitov. Sekundarna limfoidna tkiva pri kokoši so vranica, limfoidna tkiva črevesa (GALT; ang. gut-associated lymphoid tissues), bronhijev (BALT; ang. bronchus-associated lymphoid tissues), očesnih veznic (CALT; ang. conjunctiva-associated lymphoid tissues), sluznic (MALT; ang. mucosa-associated lymphoid tissues), nosne sluznice (NALT; ang. nasal-associated lymphoid tissues), češarika in kostni mozek (Davison in sod., 2008a; Oláh in Vervelde, 2008). Limfomieloidna tkiva se razvijejo iz epitelnih (Fabricijeva burza, timus) ali mezenhimalnih (vranica, limfni skupki, kostni mozek) zametkov, ki jih kolonizirajo krvne hematopoetske celice. Pri primarnih limfoidnih organih hematopoetske celice vstopijo v burzalne ali timusne zametke in se razvijejo v imunsko kompetentne celice B in T, ki so posledično ekstrinzičnega izvora. Limfoidni organi so segmentirani, vsak anatomskega predela pa ima specifično celično ureditev limfoidnih in nelimfoidnih celic. Slednje ločujejo območja celic B in T. Skupki populacij celic B v limfoidnih tkivih tvorijo germinalne centre (Oláh in Vervelde, 2008). Kokošji imunski sistem sestavlja mehanizmi prijnjene in pridobljene imunosti (Davison in sod., 2008a).

2.1.1 Prirojena imunost

Prirojeni imunski odziv predstavlja prvi nivo obrambe proti nekemu tujku oziroma mikroorganizmu. Odziv je navadno buren in takojšen ter ščiti gostitelja do razvoja ustrezne specifične imunosti prek limfocitov B in T. Prirojeni imunski odziv ni specifičen za posamezne antigene, temveč se ustrezno odzove na posamezne skupine patogenih mikroorganizmov, ki so jih skupni določeni molekularni motivi. S prepoznavanjem teh motivov prirojena imunost v nadalnjih procesih stimulira mehanizme pridobljene imunosti in posredno omogoči nastanek specifičnega imunskega odziva. Sestavni elementi prirojene imunosti so različna tkiva, celice, receptorji in druge molekule ter njihova aktivnost. Za stimuliranje pridobljene imunosti je pomembna fagocitoza in predstavljanje antigenov z antigen predstavitevimi celicami (makrofagi, dendritične celice) in sinteza ter sproščanje vnetnih molekul (citokinov, kemokinov). Imunski spomin se razvije le pri pridobljeni imunosti (Juul-Madsen in sod., 2008).

Najpomembnejšo vlogo pri preprečevanju vdora tujkov v gostitelja imajo epitelna tkiva (perje, koža, sluznice), ki patogenim mikroorganizmom onemogočijo vstop v notranja tkiva. Kokoši imajo številne protimikrobne molekule, ki pri nastanku vnetja s svojim delovanjem vplivajo na delovanje mikrobnih encimov, zaščito pred oksidativnim stresom, transport ionov in drugih molekul, preprečujejo avtoimunost, delujejo protivnetno, vzdržujejo homeostazo in vplivajo na druge mehanizme (Juul-Madsen in sod., 2008). Med te molekule spadajo (Juul-Madsen in sod., 2008): proteini akutne faze, obrambni proteini akutne faze, inhibitorji serinskih proteaz, transportni proteini z antioksidativno aktivnostjo, C-reaktivni protein, serumski amiloid A, α I-kislinski glikoprotein, haptoglobulin, hemopeksin, fibrinogen, fibronektin, ceruloplazmin, transferin-ovotransferin, kolageni lektini, manan-vezavni lektini, fikolin, surfaktanta SP-A in SP-D ter drugi kolektini. Pri kokoših so opisali dva tipa protimikrobnih peptidov, proteine podobne kathelicidinu in defenzine, ki so najbolje opisani (Juul-Madsen in sod., 2008). Glavna funkcija defenzinov je tvorba por v bakterijskih in glivnih celičnih membranah, kar povzroči propad mikroorganizmov in v nekaterih procesih homeostaze. Delujejo tudi kot kemoatraktanti za efektorske celice prirojenega imunskega odziva. Po kemijski zgradbi so majhni, kationski peptidi (Kagan in sod., 1990; Soruri in sod., 2007). Družina β -defenzinov se pri kokoših primarno izraža v levkocitih in epitelnih celicah. Pomembno vlogo imajo pri heterofilcih, saj imajo ti okrnjene oksidativne mehanizme (Harmon 1998). Defenzini se lahko iz heterofilcev sprostijo takoj ali pa šele po signalizaciji preko receptorjev, ki prepoznavajo specifične molekularne motive (PRR) (Lynn in sod., 2007).

Pomembno vlogo pri mehanizmih prirojene imunosti imajo naravna protitelesa (NAb), ki se lahko povežejo z antigeni v živalih, ki predhodno niso bile cepljene (Davison in sod., 2008b). So široko specifična, z relativno nizko vezavno afiniteto (Casali in Notkins, 1989). Pri sesalcih NAb proizvaja populacija celic B CD5⁺ (Casali in Notkins, 1989), ki se

nahajajo pretežno v trebušni votlini in ob črevesju (Ochsenbein in sod., 1999; Quan in sod., 1997). Med NAb so najpogosteji imunoglobulini (Ig) M, identificirali pa so tudi izotipe IgG in IgA (Quan in sod., 1997). NAb predstavljajo eno izmed prvih linij obrambe pred tujki in imajo pomembno vlogo pri vzpostavljanju ter regulaciji specifičnega protitelesnega imunskega odziva (Lammers in sod., 2004), udeležena so pri vzpostavitvi sistema komplementa (Thornton in sod., 1994), pospešujejo fagocitozo, razgradnjo in predstavljanje antigenov v celicah B in dendritičnih celicah (Davison in sod., 2008b) in omogočajo toleranco proti določenim lastnim antigenom (Avrameas, 1991). Prisotnost NAb pri kokoših naj bi bila povezana s starostjo živali, saj so pri starejših piščancih določili više količine NAb kot pri mlajših piščancih (Parmentier in sod., 2004). Poleg NAb imajo v obdobju embrionalnega razvoja in v relativno kratkem času po izvalitvi pomembno vlogo pri zaščiti piščancev tudi maternalna protitelesa, ki se lahko pasivno prenesejo iz kokoši na potomce in se kopijo v jajcu (Davison in sod., 2008b; Hamal in sod., 2006). Njihova glavna funkcija je omogočanje učinkovite imunske obrambe piščancev do popolnega razvoja mehanizmov pridobljene imunosti (Davison in sod., 2008b), lahko pa tudi zaščitijo zarodek pred okužbo s patogenimi mikroorganizmi, ki se prenašajo vertikalno (Benčina in sod., 2005). Izotip Ig, ki se selektivno izločajo iz krvnega obtoka v rumenjak, so IgY (Patterson in sod., 1962a, b). Absorbcijo IgY preko rumenjakove vrečke v krvni obtok zarodka omogoča receptor FcRY (West in sod., 2004). Zarodek navadno absorbira 10 % IgY, ki se nahaja v rumenjaku, preostalih 90 % pa se proteolitično razgradi, skupaj z ostalo vsebino rumenjaka. Količina IgY v serumu piščancev naraste do najvišje vrednosti približno dva dneva po izvalitvi in začne postopoma upadati do začetka *de novo* sinteze IgY (Kowalczyk in sod., 1985). V jajčnem beljaku sta navadno prisotna izotipa IgM in IgA, ki se v rumenjaku nahajata v majhnih količinah (Rose in Orlans, 1981; Yamamoto, 1975). Med razvojem zarodka se IgM in IgA porazdelijo v rumenjak in amnionsko tekočino (Kaspers in sod., 1991), ne preidejo pa v krvni obtok zarodka (Higgins, 1975).

Sistem komplementa je pomemben mehanizem imunskega odziva, ki povzroči lizo celice mikroorganizma. Sesalski in kokošji sistem komplementa sestavlja približno 25 serumskih proteinov in 10 ali več površinskih receptorjev ter regulatornih proteinov. Pred aktivacijo proteini krožijo v neaktivni obliki, po prepoznavi patogena pa se faktorji serijsko aktivirajo. Delujejo po principu kaskade, kjer vezava predhodnega proteina povzroči vezavo naslednjega. Končni rezultat aktivacije je nastanek pore v membrani mikroorganizma. Sistem komplementa olajša fagocitozo makrofagov preko opsonizacije sproži vnetni odziv s povečanjem aktivnosti limfocitov B in T in ima direkten vpliv na propad tarčne celice (Carroll, 2004). Ključno vlogo v sistemu ima protein C3, ki po proteolitski cepitvi s C3 konvertazo določi biološki odziv sistema (fagocitozo, lizo, sprožitev vnetja). Aktivacija sistema komplementa lahko poteče preko klasične poti (vezava z IgM ali IgG in vzpostavitev kompleksa antigen–protitelo), preko vezave z lektinskimi receptorji (pogosta je interakcija ogljikovih hidratov mikroorganizma z lektini,

ki vežejo manan) ali preko alternativne poti (vezava molekule C3b na površino mikroorganizma in protitelo). Poti se med seboj razlikujejo v načinu aktivacije, vendar vse inducirajo sintezo encima C3 konvertaze. Pri kokoših so potrdili vse tri poti aktivacije komplementa (Juul-Madsen in sod., 2008).

2.1.1.1 Celice prirojene imunosti

Celice prirojene imunosti imajo pomembno vlogo pri uničevanju okvarjenih oziroma okuženih celic, fagocitozi, predstavljanju antigenov celicam pridobljene imunosti in signalizaciji s citokini in kemokini. Med celice prirojene imunosti so uvrščene naravne celice ubijalke (NK), heterofilci, dendritične celice (DC) in makrofagi (Juul-Madsen in sod., 2008).

NK imajo podobne lastnosti kot citotoksični limfociti T, vendar njihova diferenciacija ne poteka v timusu (Bucy in sod., 1989). Izražajo CD8 $\alpha\alpha$ homodimer, levkocitni antigen CD45 in receptor podoben Fc s sposobnostjo vezave Ig. Nimajo površinskih Ig, molekul CD3 in antigenov poglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa (MHC) razreda II (Göbel in sod., 1994, 2001). Izražajo citoplazemske proteine CD3, kar kaže na skupen izvor z limfociti T (Bucy in sod., 1990; Göbel in sod., 1994). Glavna funkcija NK je citotoksična aktivnost za celice, ki na površini ne izražajo lastnih antigenov. Normalne celice namreč na svoji površini konstantno izražajo lastne antigene, ki so po okužbi oziroma nenormalnem delovanju celice utišani. NK lahko prepoznajo okužene celice tudi preko določenih površinskih molekul, značilnih za patogene mikroorganizme (Ljunggren in Karre, 1990).

Heterofilci (ekvivalent sesalskim nevtrofilcem) so polimorfonuklearne celice, ki aktivno fagocitirajo vdirajoče mikroorganizme. So glavne efektorske celice induciranega prirojenega imunskega odziva in se navadno prve pojavi na mestu okužbe. Zelo so odzivne na signalizacijo s kemokini, predvsem pri bakterijskih okužbah. Fagocitirani mikroorganizmi se v nastalem fagosomu uničijo z različnimi mehanizmi, največkrat z oksidativnim izbruhom. Pri oksidativnem izbruhu se nastali superoksid katalizira do vodikovega peroksida in ta naprej do hipoklorove kisline, ki uniči bakterijo. Heterofilci lahko uničijo mikroorganizme tudi s sproščanjem granul proteinov (kathelocidini, katepsini, mieloperoksidaza, defenzini) v fagosom v procesu degranulacije (Kaiser, 2010). Sposobni so sproščati ekstracelularne pasti, s katerimi ujamejo in uničijo patogene mikroorganizme v okolini, neodvisno od fagocitoze (Chuammitri in sod., 2009).

DC predstavljajo glavno povezavo med prirojenim in pridobljenim imunskim odzivom ter vplivajo na moč in specifičnost imunskega odziva na okužbo. DC lahko z večjo učinkovitostjo aktivirajo naivne celice T kot makrofagi in celice B. Znane so kot

profesionalne antigen predstavitevne celice (APC). Ko dozorijo, lahko v primerjavi z drugimi APC hitreje fagocitirajo in procesirajo antigene, izražajo višje količine MHC in kostimulatornih molekul. V perifernih tkivih navadno opravlja imunski nadzor, so nezrele in izražajo relativno nizke količine kostimulatornih molekul za stimulacijo celic T. Po fagocitozi in procesiranju določenega antiga dozorijo in preidejo v stanje predstavljanja antiga. Kokoši nimajo limfnih vozlov, potek predstavljanja antigenov med DC in celicami pridobljene imunosti pa je relativno slabo raziskan. Ugotovili so, da so kokošje DC podobne mieloidnim sesalskim DC, ki izražajo TLR2, TLR4 in po stimulaciji tudi IL-12 (Kaiser, 2010). NK in citotoksični limfociti T lahko uničijo DC, ki predstavlja antigene preko MHC-I (Kaspers in sod., 2008). DC lahko s signalizacijo vplivajo na druge celice prirojenega imunskega odziva (Andrews in sod., 2005; Reschner in sod., 2008).

Makrofagi predstavljajo heterogeno skupino celic, ki imajo pomembno vlogo pri zagotavljanju tkivne homeostaze, prepoznavajo in uničujejo patogene mikroorganizme, sodelujejo v procesih prirojene in pridobljene imunosti ter vnetju (Gordon, 2003). Migracijo makrofagov na mesto poškodbe oziroma vdora mikroorganizmov določajo kemotaktični signali, ki jih izločajo imunske in neimunske celice v prizadetem tkivu. Pri sesalcih na fagocitozo mikroorganizmov ali delcev vplivajo specifični celični receptorji (scavenger receptorji, receptorji komplementa, Fc receptorji, lektini tipa C, manozni receptorji), ki se nahajajo na površini makrofagov (Taylor in sod., 2005). Predvidevajo, da so pri kokošjih makrofagih prisotni vsaj nekateri izmed zgoraj naštetih. Fagocitozo makrofagov pri kokošjih zarodkih so opazili 12. dan (jetra) in 16. dan embrionalnega razvoja (vranica), kar kaže na funkcionalno delovanje prirojene imunosti piščancev ob izvalitvi (Jeurissen in Janse, 1989). Podobno kot heterofilci lahko tudi makrofagi uničujejo fagocitirane mikroorganizme z oksidativnim izbruhom. Makrofagi lahko ob prisotnosti določenih molekul mikrobnega izvora (predvsem lipopolisaharidov, LPS) sintetizirajo in izločajo dušikov oksid (NO), ki ima številne pleiotropne funkcije ter igra pomembno vlogo pri imunski obrambi. Signal za začetek sinteze gre največkrat preko receptorja TLR4. NO lahko deluje kot prosti radikal ali signalna molekula. Sinteza NO katalizirajo sintaze dušikovega oksida (NOS), ki so lahko inducibilno ali konstantno izražene. Pri imunski obrambi so pomembne predvsem inducibilne NOS, ki L-arginin katalizirajo do L-citrulina. Stranski proizvod reakcije je NO, ki ga lahko v fizioloških raztopinah detektiramo kot NO₂ oziroma NO₃ z Griessovim testom. Določanje koncentracije NO po okužbi je pogosta metoda za merjenje odziva makrofagov na okužbo oziroma stimulacijo z določenimi spojinami (Ding in sod., 1988; Hibbs in sod., 1987). Makrofagi lahko po stiku z različnimi patogenimi mikroorganizmi sintetizirajo in izločajo veliko število vnetnih molekul (citokinov, kemokinov). Pomembno vlogo pri aktivaciji vnetnih procesov imata predvsem IL-1 (Gyorfy in sod., 2003; Weining in sod., 1998) in IL-6 (Rath in sod., 2003; Schneider in sod., 2001; Smith in sod., 2005). Gena, ki bi bil homologen dejavniku tumorske nekroze α (TNF-α) pri kokoših še niso identificirali, potrdili pa so aktivnost, ki je značilna za TNF-α (Kaiser in sod., 2005). V različnih študijah okuževanja makrofagov so določili povišano

izražanje mRNA za protivnetni citokin IL-10 (Rothwell in sod., 2004), IL-8 podobnih kemokinov 9E3/CEF4 in K60 (CXCLi1) (Smith in sod., 2005), kemokina CCLi2 in CXCLi1 ter citokin IL-18 (Wigley in sod., 2006).

2.1.1.2 Receptorji prirojene imunosti

Receptorji prirojene imunosti, ki prepoznavajo specifične molekularne motive mikroorganizmov (ang. pattern recognition receptors, PRR), lahko prepoznavajo zunajcelične in znotrajcelične antigene. PRR prepoznavajo določene molekule, ki so značilne za patogene mikroorganizme (ang. pathogen-associated molecular patterns, PAMP). Med PAMP spadajo molekule, ki se nahajajo na površini patogenih mikroorganizmov (LPS, lipoproteini, lipoteihoična kislina, flagelin, peptidoglikani), in nukleinske kisline (ssRNA, dsRNA, CpG DNA). PRR lahko razdelimo glede na njihovo funkcijo (signalni in endocitni) ali lokacijo (membranski in citoplazemski). Najbolje okarakterizirana družina PRR so membransko vezani, Tollu podobni receptorji (TLR). Površinsko izraženi TLR prepoznavajo zunajcelične PAMP, TLR primarno izraženi na znotrajceličnih veziklih pa nukleinske kisline mikroorganizmov. Vezava TLR s specifično PAMP povzroči indukcijo več signalnih poti (preko NF- κ B, mitogen-aktivirane protein kinaze ali interferona (IFN) tipa I). Aktivacija signalnih poti sproži proizvodnjo vnetnih citokinov in kemokinov, IFN tipa I in drugih kostimulatornih molekul ter omogoči aktivacijo celic prirojenega in pridobljenega imunskega odziva (Kaiser, 2010). Kokoši nimajo gena za TLR9, ki pri sesalcih prepoznavata motive CpG DNA (Vleugels in sod., 2002), imajo pa dva TLR, ki jih sesalci nimajo in sicer TLR15 in TLR21 (Higgs in sod., 2006; Roach in sod., 2005). Kokošji TLR21 prepoznavata motive CpG DNA podobno kot sesalski TLR9 (Brownlie in sod., 2009). TLR15 ima v zunajcelični domeni veliko levcinskih ponovitev in predvidoma prepoznavata površinske PAMP mikroorganizmov (Kaiser, 2010). V nedavni študiji so pokazali, da se lahko pri kokošjih makrofagih in hondroцитih izražanje TLR15 sproži po okužbi z bakterijo *Mycoplasma synoviae* in njenim diaciliranim lipopeptidom (Oven in sod., 2013). Med najbolj raziskane citoplazemske PRR spadajo NOD-u (ang. nucleotide-binding oligomerization domain) podobni receptorji (NLR), ki regulirajo vnetni odziv in procese apoptoze. NLR po prepoznavi liganda oligomerizirajo in aktivirajo vnetne kaspaze, predvsem kaspazo-1. Aktivacija sproži izražanje vnetnih citokinov (IL-1 β , IL-18) in signalizacijo z NF- κ B. Med PRR spadajo tudi RNA helikaze, od katerih je pri kokoših prisotna le MDA5. Endocitni PRR prepoznavajo ogljikove hidrate, ki se nahajajo na površini mikroorganizmov. Omogočajo učinkovitejše delovanje fagocitirajočih celic, vendar ne stimulirajo znotrajceličnih signalnih poti (Kaiser, 2010). Znani kokošji PRR in njihovi ligandi (PAMP) so predstavljeni v preglednici 1.

Preglednica 1: Seznam kokošjih PRR in njihovih ligandov (Brownlie in Allan, 2011; Kaiser, 2010)

Table 1: List of chicken PRRs and their ligands (Brownlie and Allan, 2011; Kaiser, 2010)

Skupina PRR	PRR	Ligand (PAMP)
Membransko vezani		
TLR (signalni; prepoznavava površinskih PAMP)	TLR1LA in TLR1LB TLR2A in TLR2B TLR4 TLR5 TLR15 ¹	Lipoprotein Peptidoglikan LPS Flagelin Diacilirani lipopeptidi ²
TLR (signalni; prepoznavava nukleinskih kislin)	TLR3 TLR7 TLR8 (psevdogen) TLR21	dsRNA ssRNA, imikvimod / CpG DNA
Endocitni	Manozni receptor Glukanski receptorji Scavenger receptorji	Ogljikovi hidrati Ogljikovi hidrati Ogljikovi hidrati
Citoplazemski		
NLR		
NOD	NOD1	Peptidoglikan G- bakterij
RNA helikaze	MDA5	Virusna dsRNA ali ssRNA

¹ Predvidoma prepoznavava površinske PAMP.

² Po stimulaciji makrofagov z diaciliranim lipopeptidom bakterije *M. synoviae* so določili povišano količino TLR15 (Oven in sod., 2013).

2.1.2 Pridobljena imunost

Mehanizmi pridobljene imunosti se aktivirajo, če prirojeni imunski odziv ne zmore preprečiti okužbe. Pridobljena imunost je specifična in razvije imunski spomin proti določenemu antigenu po naravnih okužbah ali cepljenjih. Pri aktivaciji pridobljene imunosti imajo pomembno vlogo APC in stimulacija s citokinami in kemokini. Pridobljena imunost se aktivira različno pri znotrajceličnih (virusi, znotrajcelične bakterije in praživali) in zunajceličnih (bakterije, praživali, paraziti) patogenih organizmih. Okužba z znotrajceličnimi patogeni stimulira celično pridobljeno imunost preko aktivacije limfocitov T, okužba z zunajceličnimi patogenimi organizmi pa protitelesno (humoralno) pridobljeno imunost preko aktivacije limfocitov B (Kaiser, 2010, 2012). Pri pticah nastajajo limfociti B v Fabricijevi burzi, limfociti T pa v timusu. Pomen timusa in Fabricijkeve burze pri vzpostavitvi celične ter protitelesne pridobljene imunosti so dokazali v več študijah (Kaiser, 2010, 2012). Pri sesalcih omogoči celični in protitelesni odziv signalizacija z dvema različnima skupinama citokinov, ki jih izločajo Th1 in Th2 CD4⁺ T celice pomagalke. Na specifični odziv vplivajo tudi različni izotipi Ig, CD8⁺ T celice, DC in drugi faktorji (Mosmann in sod., 1986; Mosmann in Coffman, 1989). Pri kokoših je predvidoma prisotnih več podtipov CD4⁺ T celic, ki so lahko efektorske ali regulatorne. Glede na svojo funkcijo izločajo ustrezne citokine, ki stimulirajo ali zavrejo imunske procese. CD4⁺ T celice (Th1) stimulirajo citotoksične limfocite T, NK, makrofage in ostale

efektorske celice celičnega imunskega odziva ali pa limfocite B (Th2). CD8⁺ so citotoksične in direktno uničijo okužene celice. Stimulacija aktivacije in proliferacije CD4⁺ ali CD8⁺ limfocitov T je odvisna od predstavitev antigenov preko molekul poglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa (ang. major histocompatibility complex, MHC) razreda I ali II (Kaiser, 2010, 2012).

Predstavljanje antigenov je mehanizem, s katerim celice prirojene imunosti predstavijo procesirane antogene celicam pridobljene imunosti (limfocitom B in T). Limfociti B in T lahko predstavljen antigen tolerirajo, lahko pa se aktivirajo in razvijejo specifično obrambo proti predstavljenemu antigenu. Antigen je lahko podvržen endogenemu ali eksogenemu procesiranju, nastali peptidi pa se predstavijo na površini APC z MHC-I ali MHC-II. Kateri razred MHC bo udeležen pri predstavitev antigena, je odvisno od narave antigena in določa tip imunskega odziva na antigen (protitelesni, celični). Večina celic izraža na svoji površini heterodimerne MHC-I, s katerimi predstavljajo peptide znotrajceličnih antigenov. Pri endogenem procesiranju lahko gostiteljska celica razgradi lastne proteine (v primeru tumorskih antigenov) ali proteine patogenega mikroorganizma (navadno virusa), če se le-ta podvaja znotraj celice. Pri procesiranju eksogenih antigenov APC (DC, makrofagi, celice B) fagocitirajo patogeni mikroorganizem oziroma antigen. V nastalem fagolizosому se eksogeni antigen razgradi na enostavne peptide, ki se vklopijo v MHC-II. Nastali kompleks peptid-MHC-II se transportira na površino membrane APC, kjer ga prepozna T-celični receptor CD4⁺ celice T, ki nato aktivira ostale efektorske celice imunskega sistema. Celice B, ki predstavljajo antigen z MHC-II, se po stiku z enako specifičnimi celicami CD4⁺ Th2 aktivirajo in začnejo izločati protitelesa, specifična za predstavljen antigen. Podobno lahko makrofagi, ki vsebujejo fagocitirane bakterije, sprožijo samouničenje z interakcijo s celicami Th1 (Kaspers in sod., 2008). Pridobljeni imunski odziv se aktivira le po predstavitev antigenov preko MHC. MHC-I se izražajo v večini celic, MHC-II pa le na površini APC. Območje v sesalskem genomu, ki kodira MHC, je visoko polimorfno in vsebuje približno 300 genov. Kokošji nabor genov za MHC je bistveno manjši (Kaufman in sod., 1999). Kokošji minimalni esencialni MHC vsebuje dva razreda genov I in dva razreda genov IIβ, kjer se le en izraža dominantno (Kaufman, 2000). Zaradi okrnjenega nabora MHC so lahko pri kokoših določene, predvsem virusne, okužbe problematične. Zaradi majhnega števila genov je kokošji MHC-I specifičen za omejeno število virusnih antigenov. Uspešnost aktivacije celic pridobljene imunosti je pogosto odvisna od števila virusnih proteinov, ki morajo biti po strukturi takšni, da se bodo vezali z MHC-I. Če specifične vezave ni, celice pridobljene imunosti okužbe ne zaznajo. Pri okužbi z večjimi virusi, ki vsebujejo več proteinov, obstaja večja verjetnost vezave virusnih antigenov z MHC-I in predstavitevijo le-teh na površini APC. Pri manjših virusih je verjetnost uspešne vezave manjša (Hofmann in sod., 2003; Kaiser, 2012; Kaufman, 2000, 2008).

Imunoglobulini (Ig) so glikoproteini s protitelesno aktivnostjo. Prisotni so v krvi, limfi in prekravavljenih tkivih (Litman in sod., 1993; Marchalonis in sod., 1977). Sintetizirajo jih

limfociti B po predstavitev antigena preko MHC-II. Sestavljeni so iz dveh težkih (H) in dveh lahkih (L) polipeptidnih verig, ki tvorijo monomerno enoto H_2L_2 . Funkcionalno terciarno strukturo Ig omogočajo inter-verižne disulfidne povezave, med domenami z visoko ohranjenimi ostanki cisteina in triptofana, ki povezujejo verige H in L. Na N-terminalnem koncu verig se nahajajo visoko variabilne domene (V). Povezane domene V_H in V_L skupaj tvorijo vezavno mesto za antigene, ki je visoko specifično in pogojuje protitelesno aktivnost Ig. Monomerne enote Ig imajo dve vezavni mesti za antigene in tipično obliko Y. Pri ostalih izotipih Ig je lahko povezanih več monomernih enot kar omogoča višjo valenco. Biološko funkcijo Ig določa konstantna regija (Fc), ki vpliva na transport preko membrane, vezavo na membrano, razpolovno dobo, nastanek komplementa in opsonizacije. Ig so lahko vezani na membrano in delujejo kot specifični receptor ali pa so prosti v telesnih tekočinah (Davison in sod., 2008b). Pri kokoših so določili tri izotipe Ig: IgM, IgA in IgY, ki je ekvivalent sesalskemu IgG. Homolognih genov za IgD in IgE pri kokoših niso identificirali. IgM je predominantni izotip Ig, ki ga sintetizirajo limfociti B takoj po okužbi oziroma izpostavitev novemu antigenu in niso ozko specifični. Med embrionalnim razvojem so prvi izotip Ig, ki se sintetizira (Davison in sod., 2008b; Higgins, 1975; Leslie in Clem, 1969). Kokošji IgY in sesalski IgG se razlikujejo v daljši verigi H, ki jo imajo IgY. Največje količine IgY se nahajajo v serumu in nastanejo po odzivu primarnih protiteles, predvsem IgM. So glavni izotip Ig sekundarnega protitelesnega odziva, z visoko specifiko in afiniteto proti določenemu antigenu (Davison in sod., 2008b). Pridobivanje protitelesnega repertoarja omogoča pri kokoših proces konverzije genov, ki vključuje naključno rekombinacijo med zaporedji psevdogenov in funkcionalnih genov segmentov V in J. Kombiniranje teh segmentov, ki določajo lastnosti vezavnega mesta protiteles, vodi v nastanek širokega spektra različno specifičnih Ig (Kaiser, 2012).

2.1.3 Citokini in kemokini

Citokini so regulatorni peptidi, ki delujejo kot zunajcelične signalne molekule. Stimulirajo in koordinirajo celice imunskega sistema, regulirajo ter uravnavaajo prirojeni in pridobljeni imunski odziv, razvoj ter homeostazo. Molekulska masa citokinov je redko večja od 30 kDa, proizvajajo pa jih praktično vsi tipi celic. Podobno vlogo imajo tudi kemokini, ki so po zgradbi enostavni peptidi, njihova glavna funkcija pa je usmerjanje migracije imunskih celic. Kemokini so lahko homeostazni (konstantno izraženi) ali vnetni (inducibilno izraženi). Naloga homeostaznih kemokinov je fiziološko usmerjanje levkocitov v določena tkiva, vnetnih pa usmerjanje imunskih celic na mesto okužbe. Njihovo delovanje se pogosto prepleta. Citokine in kemokine lahko razdelimo v poddružine na podlagi strukture, funkcije, specifičnosti za receptorje in drugih dejavnikov. Družine citokinov imajo pri kokoših manj predstavnikov kot pri sesalcih (Kaiser, 2010, 2012; Kaiser in Stäheli, 2008). Glede na razmik med dvema ohranjenima cisteinskima ostankoma na N-terminalnem koncu delimo kemokine po zgradbi na skupine -XC, CC, CXC in CX3C. Ligande se

označuje z L, receptorje pa z R (Kaiser in Stäheli, 2008). Citokine pri kokoših delimo na interlevkine (IL), interferone (IFN), družino transformirajočih rastnih dejavnikov-β (TGF-β), dejavnike tumorske nekroze (TNF) v super-družini TNF (TNFSF) in kolonijsko-stimulirajoče dejavnike (CSF). Poleg uvrščamo tudi kemokin (Kaiser in Stäheli, 2008). Družine kokošjih citokinov in kemokinov ter njihovi predstavniki so prikazani v preglednici 2.

Preglednica 2: Seznam znanih kokošjih citokinov in kemokinov (Kaiser, 2010)

Table 2: Repertoire of known chicken cytokines and chemokines (Kaiser, 2010)

Skupina citokinov	Citokini
Interferoni	
Tip I	IFN-α, IFN-β, IFN-κ, IFN-ω
Tip II	IFN-γ
Tip III	IFN-λ
Interlevkini	
Družina IL-1	IL-1β, IL-1RN, IL-18, IL-1F5
Družina IL-10	IL-10, IL-19, IL-22, IL-26
Družina IL-12	IL-12, IL-23
Družina IL-17	IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17F
Proliferativni za celice T	IL-2, IL-15, IL-21
Družina Th2	IL-4, IL-5, IL-13
Ostali	IL-3, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-34
Transformirajoči rastni dejavniki	3 predstavniki
Dejavniki tumorske nekroze	11 predstavnikov
Kolonijsko-stimulirajoči dejavniki	3 predstavniki
Kemokinji	
XCL	1 predstavnik
CCL	14 predstavnikov
CXCL	8 predstavnikov
CX3CL	1 predstavnik

Epitelne celice sproščajo med vnetjem veliko število različnih citokinov in kemokinov, ki omogočajo prehajanje celic prirojene imunosti na mesto okužbe. Te z izločanjem drugih citokinov vplivajo na aktivacijo celic Th in na razvoj pridobljene imunosti, celične (Th1) ali humoralne (Th2). Med citokine, ki imajo pomembno vlogo pri regulaciji vnetnih procesov, spadajo IL-1β, IL-18, IL-6, citokini iz družine TNFSF in kemokinji IL-8, MIP-1β (CCL4) in IL-16 (Wigley in Kaiser, 2003). IL-1β nastaja v številnih celicah po stimulaciji z mikroorganizmi oziroma njihovimi antigeni, predvsem pri bakterijskih okužbah. Je vnetni citokin, ki povzroča aktivacijo imunskega sistema v akutni fazni imunskega odgovora. IL-1β lahko aktivira mnogo celic, predvsem makrofage in limfocite T, in sproži nadaljnjo signalizacijo preko drugih citokinov. Povišano izražanje IL-1β v gostitelju navadno povzroči vročino (Wigley in Kaiser, 2003). IL-6 spada med prve okarakterizirane IL pri kokoših (Schneider in sod., 2001). Je multifunkcijski protein, ki lahko aktivira

limfocite B in T, regulira hematopoezo in sproži produkcijo makrofagov. Pri aktivaciji imunskega sistema ima podobno vlogo kot IL-1 β . Koncentracije IL-6 so pogosto povišane ob bakterijskih okužbah (Hirano, 1998; Wigley in Kaiser, 2003). Pri sesalcih je TNF- α primarni regulator imunskega odziva, vnetja in aktivacije endotelija (Zhang in Tracey, 1998). Izločajo ga makrofagi, NK in celice T. Pri povišanih koncentracijah TNF- α lahko pride do vročine in tudi septičnega šoka. TNF- α pri kokoših še niso identificirali, so pa določili aktivnost, ki je bila podobna delovanju TNF- α po okužbi s praživaljo *Eimeria*. Predvidevajo, da bi bili lahko za to aktivnost odgovorni nekateri pripadniki kokošje TNFSF (Kaiser in Stäheli, 2008; Zhang in sod., 1995). Kemokini IL-8, IL-16 in MIP-1 β (CCL4) omogočajo usmerjanje limfocitov in monocitov na mesto okužbe (Kaiser in Stäheli, 2008; Min in Lillehoj, 2004; Wigley in Kaiser, 2003). IL-18 nastaja v visokih koncentracijah v makrofagih in stimulira sintezo ter sproščanje IFN- γ . S signalizacijo omogoči nastanek celičnega imunskega odziva preko aktivacije celic Th1 (Kaiser in Stäheli, 2008; Wigley in Kaiser, 2003). CD4 $^+$ Th1 in Th2 celice se razlikujejo predvsem po citokinah, ki jih proizvajajo. Celice Th1 proizvajajo citokine, ki regulirajo in omogočijo nastanek celične imunosti proti znotrajceličnim patogenim mikroorganizmom. Med ključne citokine Th1 signalizacije spadata IL-12 (IL-12 α (p35) ali IL-12 β (p40)) in IFN- γ . Pomembno vlogo imajo tudi IL-2, IL-15 in IL-21, ki stimulirajo proliferacijo limfocitov T (Balu in Kaiser, 2003; Degen in sod., 2004; Digby in Lowenthal, 1995; Kaiser in Stäheli, 2008; Kaiser in sod., 2005; Lillehoj in sod., 2001; Sundick in Gill-Dixon, 1997). Pri virusnih okužbah je zelo pomemben vpliv IFN tipa I (α/β), ki imajo značilno protivirusno delovanje. IFN tipa I lahko povečajo izražanje MHC-I, protivirusnih encimov, proteinov Mx, aktivirajo makrofage in druge dejavnike (Sekellick in sod., 1994; Sick in sod., 1996). Celice Th2 proizvajajo citokine, ki omogočijo nastanek humoralne imunosti proti zunajceličnim patogenom ali parazitom, kot so gliste in praživali. Po aktivaciji Th2 navadno izražajo povišane koncentracije IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 in IL-19, ki stimulirajo nastajanje protiteles (Kaiser in Stäheli, 2008). Pokazali so, da se IL-5 pri okužbah z zunajceličnimi patogenimi mikroorganizmi ne izraža (Powell in sod., 2009). Pri kokoših so določili tudi populacijo CD4 $^+$ Th17 celic, ki proizvajajo IL-17A, IL-17F, IL-21 in IL-22. Glavna naloga teh celic je stimulacija imunske obrambe proti zunajceličnim patogenim mikroorganizmom, predvsem glivam in nekaterim bakterijam (Kaiser in Stäheli, 2008). Med glavna regulatorna citokina pri kokoših spadata IL-10, ki znižuje učinke IFN- γ (Rothwell in sod., 2004), in različne oblike proteina TGF- β (predvsem oblika TGF- β 4), ki ima značilne protivnetne lastnosti (Kogut in sod., 2003).

2.2 MIKOPLAZME

Z izrazom mikoplazma splošno poimenujemo posamezne predstavnike bakterij uvrščene v razred *Mollicutes* (*mollis*, lat. mehak; *cutis*, lat. koža), ki ga sestavlja več kot 200 vrst mikoplazem (Stakenborg in sod., 2005). Taksonomska razdelitev razreda *Mollicutes* na redove, družine in rodove skupaj z gostitelji, ki jih posamezen rod naseljuje, je prikazana v preglednici 3.

Preglednica 3: Taksonomska razdelitev redov in družin v razredu *Mollicutes* ter gostitelji, ki jih pozamezen rod naseljuje (Garrity in sod., 2007; Razin in sod., 1998).

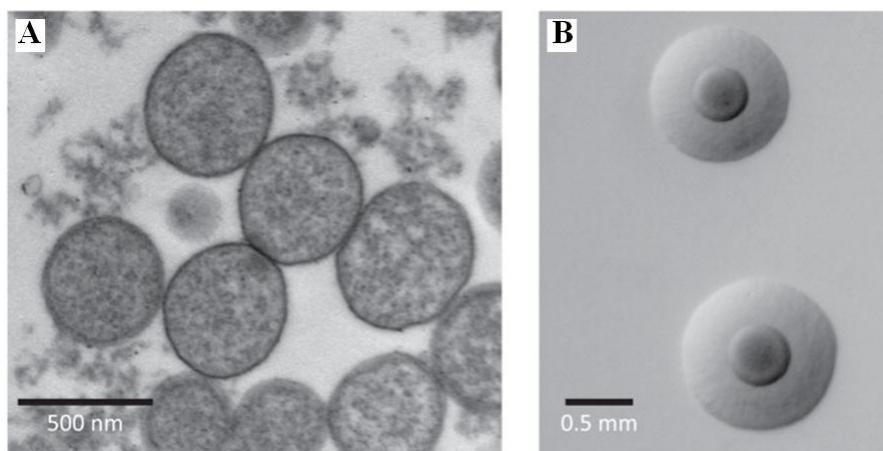
Table 3: Taxonomic distribution of orders and families in the class *Mollicutes* and hosts that each genus colonizes (Garrity et al., 2007; Razin et al., 1998).

Red	Družina	Rod	Gostitelj
<i>Mycoplasmatales</i>	<i>Mycoplasmataceae</i>	<i>Mycoplasma</i>	Človek, živali
		<i>Allobaculum</i>	Človek, živali
		<i>Ureaplasma</i>	Človek, živali
<i>Entomoplasmatales</i>	<i>Entomoplasmataceae</i>	<i>Entomoplasma</i>	Žuželke, rastline
		<i>Mesoplasma</i>	Žuželke, rastline
	<i>Spiroplasmataceae</i>	<i>Spiroplasma</i>	Žuželke, rastline
<i>Acholeplasmatales</i>	<i>Acholeplasmataceae</i>	<i>Acholeplasma</i>	Živali, nekatere rastline, žuželke
		<i>Phytoplasma</i>	Žuželke, rastline
<i>Anaeroplasmatales</i>	<i>Anaeroplasmataceae</i>	<i>Anaeroplasma</i>	Goveji/ovčji vamp
		<i>Asteroplasma</i>	Goveji/ovčji vamp
<i>Incertae sedis</i>	<i>Erysipelotrichaceae</i>	<i>Erysipelothrix</i>	Človek, živali
		<i>Bulleidia</i>	Človek, živali
		<i>Holdemania</i>	Človek, živali
		<i>Solobacterium</i>	Človek, živali

Rod *Mycoplasma* sestavlja več kot 123 vrst in je največji rod v razredu *Mollicutes*. Predstavniki rodu *Mycoplasma* imajo odstotek G + C v genomske DNA 20–40 %, velikost genomov med 580 in 1380 kbp, za rast potrebujejo holesterol in temperaturo okolja 37 °C (Johansson in Pettersson, 2002; Kleven, 2008a; Razin in sod., 1998). S filogenetskimi analizami 16S rRNA so predstavnike razreda *Mollicutes* razdelili v pet filogenetskih skupin: *Anaeroplasma*, *Asteroplasma*, *Hominis*, *Spiroplasma* in *Pneumoniae* (Johansson in Pettersson, 2002).

Mikoplazme so najmanjši organizmi zmožni samostojnega podvojevanja. Mikoplazemske celice ne vsebujejo celične stene, obdane so s trilaminarno membrano, v citoplazmi pa vsebujejo ribosome in krožno dvostransko molekulo DNA. Po Gramu se barvajo negativno. Velikost mikoplazemskih celic je med 0,2 in 0,5 µm, oblika pa se med posameznimi

mikoplazmami razlikuje (lahko so okrogle, hruškaste oziroma stekleničaste ali filamentozne). Kolonije mikoplazem so velike 0,1–1 mm in so največkrat gladke, krožne, z vraščenim centrom in spominjajo na ocvrto jajce. Tipičen primer morfologije celic in kolonij mikoplazem ima *Mycoplasma agalactiae* (Slika 1). Mikoplazme so zaradi odsotnosti celične stene občutljive na ozmotski šok in detergente ter odporne na antibiotike, ki vplivajo na sintezo celične stene (Bradbury, 2005; Kleven, 2008a). Mikoplazme so v naravi splošno razširjene in naseljujejo širok nabor gostiteljev. So paraziti ljudi, sesalcev, ptic, plazilcev, rib, členonožcev in rastlin. Navadno so gostiteljsko in tkivno specifične, predvsem zaradi svojega obligatnega parazitizma. Potrjeni so tudi primeri, kjer so bile mikoplazme prisotne v organizmih in tkivih, ki niso predstavljali njihovega normalnega življenjskega okolja (Razin, 1992). Človeške in živalske mikoplazme navadno naseljujejo površine sluznic dihalnega in urogenitalnega trakta, oči, prebavnega trakta, mlečne žlezne in skelepe. Mikoplazme so tudi pogost in zelo problematičen kontaminant celičnih kultur (Razin in sod., 1998).



Slika 1: Morfologija celic (A) in kolonij (B) bakterije *Mycoplasma agalactiae* (Citti in Blanchard, 2013)
Figure 1: Morphology of *Mycoplasma agalactiae* cells (A) and colonies (B) (Citti and Blanchard, 2013)

Predstavniki razreda *Mollicutes* so se predvidoma razvili z reduktivno evolucijo iz Gram pozitivnih bakterij pred približno 600 milijoni leti (Maniloff, 2002; Razin in sod., 1998). Genomi pripadnikov rodu *Mycoplasma* so bistveno manjši kot genomi ostalih prokariontov in znašajo med 580 kbp (*M. genitalium*) in 1380 kbp (*M. mycoides* subsp. *mycoides* LC). Velikost genomov je različna tako med posameznimi rodovi v razredu *Mollicutes* kot tudi znotraj posamezne vrste, predvsem zaradi ponavljajočih elementov oziroma vstavitvenih zaporedij (Carle in sod., 1995; Huang in sod., 1995; Ladefoged in Christiansen, 1991; Robertson in Meyer, 1992). Genomi mikoplazem imajo značilno nizko vsebnost G + C (24–40 %), ki je neenakomerno porazdeljena po genomu. Mnogo medgenskih regij vsebuje višji odstotek A + T (80–90 %) kot kodirajoča zaporedja (Razin in sod., 1998). UGA

kodon, ki pri ostalih organizmih kodira univerzalni stop kodon, pri mikoplazmah določa aminokislino triptofan, kar je zelo verjetno posledica visoke vsebnosti A + T v mikoplazemskem genomu (Bradbury, 2005; Razin in sod., 1998). Mikoplazme vsebujejo bistveno manjše število metabolnih poti kot ostali prokarioti, zaradi česar so močno odvisne od svojih gostiteljev. So obligatni paraziti oziroma komenzali. Mikoplazme ne vsebujejo genov za biosintezo aminokislin, omejeno število genov je povezanih z biosintezo nukleotidov, kofaktorjev in vitaminov. Sinteza maščobnih kislin in holesterola pri večini mikoplazem ne poteka (Pollack, 2002). Pri *M. synoviae* manjka tudi gen za sintezo NAD (Razin in sod., 1998). Pot orotske kisline za sintezo pirimidinov in encimskih poti za *de novo* sintezo purinskih baz pri mikoplazmah ne poteka. Za rast nujno potrebujejo uracil, timin in gvanin, ki jih pridobivajo iz okolja (Razin, 1978). Metabolizem mikoplazem je pretežno usmerjen v pridobivanje energije in ne v sintezo substratov za sintezo. Pri mikoplazmah Krebsov cikel ne poteka, ne vsebujejo kinonov in citokromov, zaradi česar pri njih ne poteka oksidativna fosforilacija kot način pridobivanja molekul ATP. Načeloma nastajajo v metabolizmu nizke količine molekul ATP. V metabolizmu navadno nastaja relativno velika količina končnih metabolnih produktov, kar pogosto povzroči izčrpanje specifičnih substratov v gostiteljevih tkivih (Pollack in sod., 1997; Razin in sod., 1998). Mikoplazme delimo na fermentativne in nefermentativne, glede na sposobnost metaboliziranja ogljikovih hidratov. Fermentativne mikoplazme v procesu glikolize proizvajajo ATP in kisline, nastali piruvat pa se z laktatno dehidrogenazo metabolizira do laktata oziroma s piruvat dehidrogenazno potjo do acetil koencima A (Fraser in sod., 1995; Himmelreich in sod., 1996). Večina nefermentativnih in nekatere fermentativne mikoplazme vsebujejo arginin dihidrolazno pot, kjer nastane ornitin, ATP, CO₂ in amoniak. Razgradnjo arginina spremlja nastanek ekvimolarnih količin molekul ATP (Ruepp in Soppa, 1996). Nekatere mikoplazme ne metabolizirajo sladkorjev in arginina, temveč oksidirajo organske kisline (laktat, piruvat) do acetata in CO₂ (Miles, 1992; Taylor in sod., 1994). Ker mikoplazme prekurzorje za izgradnjo makromolekul prevzemajo od gostitelja, lahko to vpliva na normalno delovanje gostiteljskih celic. Mikoplazme lahko postopoma izčrpajo zaloge hranil v svoji okolini, kar lahko pri gostitelju sčasoma vpliva na sintezo proteinov in ostalih makromolekul, rast, celično delitev ter tudi na kromosomske poškodbe (Barile in Rottem, 1993; McGarrity in sod., 1992; Pollack in sod., 1997; Razin in sod., 1998).

Mikoplazemska membrana vsebuje veliko število proteinov, ki predstavljajo dve tretjini mase membrane. Preostalo tretjino predstavljajo fosfolipidi, glikolipidi in nevtralni lipidi. Za mikoplazemske membrane je značilno, da vsebujejo veliko število membranskih lipoproteinov, kar je najverjetnejše posledica pomanjkanja celične stene in periplazemskega prostora. Lipoproteini pripadnikov rodu *Mycoplasma* spadajo med najbolj dominantne in variabilno izražane antigene v razredu *Mollicutes* (Razin in sod., 1998).

Zaradi omejenih metabolnih poti je večina mikoplazem parazitov, z visoko stopnjo gostiteljske in tkivne specifičnosti (Rottem, 2003). Okužbe s patogenimi mikoplazmami so največkrat kronične in dolgotrajne ter v določenih primerih akutne. Smrt zaradi okužbe z mikoplazmami je redka (Razin in sod., 1998). Okužba se lahko prenaša z aerosoli, hrano, vodo, prahom, žuželkami, direktnim stikom med gostitelji, z materinim mlekom in pri pticah preko valilnih jajc. Z okužbo mikoplazme povzročijo nastanek specifičnih protiteles, stimulirajo opsonizacijo in fagocitozo, aktivirajo komplement in limfocite T ali B (Razin in sod., 1998). Pomembna faza pri okužbi, ki omogoči nadaljnjo kolonizacijo, je pritrdirjev mikoplazem na površino gostiteljskih celic, največkrat dihalnega ali urogenitalnega trakta. Pritrditev mikoplazme na celično membrano gostitelja omogočijo membranski proteini adhezini skupaj s pomožnimi proteinimi. Najbolje raziskani mikoplazemski adhezini in mehanizma pritrjevanja sta pri vrstah *M. pneumoniae* in *M. genitalium* (Razin in sod., 1998; Rottem, 2003). Pritrjene mikoplazme lahko ovirajo dostop do membranskih receptorjev, motijo signalizacijo, sprožijo izražanje citokinov in vplivajo na številne biološke procese. Nekateri sevi *M. synoviae* povzročajo izgubo ciliarne aktivnosti v dihalnem traktu in s tem omogočijo nadaljnjo kolonizacijo tkiv (Bradbury, 2005). Celična membrana gostiteljske celice pa s tem postane izpostavljena toksičnim produktom metabolizma mikoplazem (peroksid in superoksidni radikali) in citolitičnim encimom, predvsem fosfolipazam (Almagor in sod., 1986; Borovsky in sod., 1998; Razin in sod., 1998; Shibata in sod., 1995). Identificirani membranski receptorji, na katere se lahko mikoplazme pritrdirijo s svojimi adhezini, so sulfatizirani glikolipidi in receptorji, ki vsebujejo ostanke sialične kisline (Razin in sod., 1998). Nekatere mikoplazme so sposobne prehajati v gostiteljske celice in se s tem izogniti gostiteljevemu imunkemu sistemu in delovanju antibiotikov (Rottem, 2003). Po vstopu v celico lahko mikoplazma preživi in se deli v citoplazmi in perinuklearnem prostoru oziroma v veziklih gostiteljskih celic (Jensen in sod., 1993; Lo in sod., 1993; Stadtlander in sod., 1993; Taylor-Robinson in sod., 1991). Sposobnost prehajanja v nefagocitirajoče celice je bila dokazana za več mikoplazemskih vrst, med drugim tudi za vrsti *Mycoplasma gallisepticum* (Winner in sod., 2000) in *M. synoviae* (Dušanić in sod., 2009). Zaradi odsotnosti celične stene lahko pride pod določenimi pogoji do zlitja mikoplazemske in gostiteljske celice (Rottem, 2003). S tem se lahko številni mikoplazemski hidrolitični encimi (proteaze, nukleaze, nevraminidaze, hemolizin, hialuronidaza itn.) sprostijo v citoplazmo in vplivajo na celične procese (Brown in sod., 2004; Paddenberg in sod., 1996, 1998). Deli zlite mikoplazemske membrane lahko vplivajo na prepoznavna receptorska mesta gostiteljske celice kar lahko vpliva na signalizacijo v okuženem tkivu (Rottem, 2003). Mikoplazme se imunkemu sistemu gostitelja izmikajo z molekularno mimikrijo in s fenotipsko oziroma z antigensko variabilnostjo (Rottem, 2003). Molekularna mimikrija, z antigenskimi epitopi, ki so skupni nekaterim mikoplazmam in gostiteljskim celicam, mikoplazmam omogoči zakasnitev imunskega odziva gostitelja po okužbi. Ko imunski sistem odgovori na te epitope oziroma antogene, lahko pride do nastanka avtoimunskih protiteles, ki navzkrižno reagirajo tudi z antigenskimi determinantami, ki so lastne gostitelju (Cahill in sod., 1971; Rottem, 2003).

Antigenško variabilnost mikoplazem omogoča hitro spreminjanje membranskih lipoproteinov. Ti lipoproteini, ki jih kodirajo številni med mikoplazmami sorodni geni, imajo lahko pomembno vlogo tudi pri pritrjevanju mikoplazme na gostiteljsko celico. Takšen primer je lipoprotein VlhA pri *M. synoviae* (Noormohammadi in sod., 1998; Rottem, 2003). Spreminjanje antigenškega repertoarja in posledično imunogenosti mikoplazmam omogoča uspešno izmikanje imunskemu sistemu gostitelja (Citti in sod., 2005).

2.3 PTIČJE MIKOPLAZME

Trenutno je identificiranih 23 priznanih vrst mikoplazem in predstavnika rodov *Acholeplasma* ter *Ureaplasma*, ki naseljujejo oziroma okužujejo ptice. Mednje spadajo *A. laidlawii*, *Mycoplasma anatis*, *M. anseris*, *M. buteonis*, *M. cloacale*, *M. columbinasale*, *M. columbinum*, *M. columborale*, *M. corogypsi*, *M. falconis*, *M. gallinarum*, *M. gallinaceum*, *M. gallisepticum*, *M. gallopavonis*, *M. glycophilum*, *M. gypis*, *M. imitans*, *M. iners*, *M. iowae*, *M. lipofaciens*, *M. meleagridis*, *M. pullorum*, *M. sturni*, *M. synoviae* in *U. gallorale* (Kleven, 2008a). Med pomembnejše patogene mikoplazme, ki okužujejo perutnino, spadajo *M. gallisepticum*, *M. iowae*, *M. meleagridis* in *M. synoviae* (Bradbury, 2005). Okužba s patogenimi mikoplazmami lahko povzroči pri perutnini klinična obolenja dihal, gibal, zmanjšuje nesnost in povzroča slabši prirast. Širjenje okužbe med jatami se največkrat prepreči z zakolom okuženih živali. Največji strošek pri omejevanju okužbe s patogenimi mikoplazmami v perutninski reji predstavlja redni laboratorijski diagnostični testi, cepljenja in zdravljenja z antibiotiki (Bradbury, 2005).

2.4 *Mycoplasma synoviae*

Bakterija *Mycoplasma synoviae* spada med štiri ekonomsko najpomembnejše ptičje patogene mikoplazme, ki okužujejo perutnino. Okužba lahko povzroči različna boleznska stanja pri kokoših in vpliva na rast, konverzijo krme in proizvodnjo jajc (Kleven, 2003a). Najpogostejše okužbe, ki jih povzroča *M. synoviae*, so subklinične okužbe zgornjega dela dihal. V določenih pogojih lahko okužba postane sistemski in vodi v nastanek kužnega sinovitisa, akutne oziroma kronične bolezni kokoši in puranov, kjer so najbolj prizadete sinovialne membrane sklepov in kit. Pri tem pride do nastanka eksudativnega sinovitisa in tendovaginitisa. Okužba jajčnikov in jajcevodov lahko vodi do vertikalnega prenosa okužbe preko valilnih jajc (Kleven in Ferguson-Noel, 2008). Tovrstna okužba lahko povzroči tudi simptom EAA (ang. eggshell apex abnormalities), kjer pride do deformacije jajčne lupine na koničastem delu jajca (Feberwee in sod., 2009). *M. synoviae* spada v filogenetsko skupino Hominis (Benčina, 2002). Velikost genoma *M. synoviae* znaša med 800 in 900 kbp (Vasconcelos in sod., 2005).

2.4.1 Morfologija, potrebe za rast in biokemijske lastnosti *M. synoviae*

Celice *M. synoviae* so navadno okrogle oziroma hruškaste oblike s premerom med 300 in 500 nm. Vsebujejo veliko število ribosomov, nimajo celične stene in so obdane le s celično membrano. Kolonije *M. synoviae* so okrogle, rahlo zamrežene, z ali brez izrazitih centrov. Morfologija kolonij največkrat spominja na obliko ocvrtega jajca. Razpon premera kolonij je od < 1 do 3 mm in je odvisen od števila kolonij, rastnega medija in starosti kulture. Rast kolonij je navadno opazna po 3–5 dneh (Kleven in Ferguson-Noel, 2008).

Gojišče za gojenje *M. synoviae* navadno sestavlja Freyev medij, ki vsebuje glukozo, prašičji serum, nikotinamid adenin dinukleotid (NAD), cistein hidroklorid, fenol rdeče, talijev acetat in ustrezni antibiotik, največkrat penicilin (Bradbury, 1977; Frey in sod., 1968). Optimalna temperatura gojenja kulture *M. synoviae* je 37 °C. Kulturo se navadno goji do spremembe rdeče barve indikatorja v rumeno, ki nakazuje padec pH vrednosti v kislo območje. *M. synoviae* v ustrezno dopolnjenem gojišču fermentira glukozo in maltozo, s čimer nastajajo kisline, vendar ni zmožna fermentirati laktoze, dulcitola, salicina in trehaloze. *M. synoviae* nima fosfatazne aktivnosti in ima zelo omejeno zmožnost redukcije tetrazolijevih soli (Jordan in sod., 1982; Kleven in Ferguson-Noel, 2008).

Večina izolatov *M. synoviae* lahko aglutinira kokošje in puranje eritrocite. *M. synoviae* je občutljiva na kisel pH (6,8 ali manj) in temperature višje od 39 °C. Celice preživijo zamrzovanje, vendar se viabilnost živih celic zmanjša. *M. synoviae* lahko preživi v rumenjaku vsaj 7 let pri –63 °C in dve leti pri –20 °C. Kulture, zamrznjene v gojišču pri –70 °C, in liofilizirane kulture, skladiščene pri 4 °C, preživijo več let (Kleven in Ferguson-Noel, 2008). Zunaj gostitelja lahko *M. synoviae* preživi do tri dni na perju, prahu, v pitni vodi, izločkih, iztrebkih in nosni sluznici ljudi (Christensen in sod., 1994; Marois in sod., 2000).

2.4.2 Virulentni dejavniki *M. synoviae*

Med dejavnike, ki pogojujejo uspešno okuževanje *M. synoviae* in kolonizacijo gostiteljskih tkiv, spadajo vstop v gostitelja, doseganje tarčnih tkiv, pritrjevanje na gostiteljske celice, vdiranje v tkivo oziroma celice, razmnoževanje, izmikanje imunskemu sistemu gostitelja in izstopanje iz gostitelja ter prenos okužbe na nove gostitelje (Bradbury, 2005; Christensen in sod., 1994). Najpogostejši način vstopanja *M. synoviae* v gostitelja je preko dihalnega trakta. Tarča *M. synoviae* so površine epitelijev, od koder se lahko okužba prenese na ostale organe, predvsem na sklepne in jajcevode. Slednje pogojuje vertikalni prenos okužbe. Do okužbe jajcevodov lahko pride tudi pri osemenjevanju (Bradbury, 2005; Olson, 1984).

Celice *M. synoviae* se pritrdijo na gostiteljske epitelije z adhezini, ki spadajo med glavne imunodominantne proteine. Podvrženi so visoki stopnji antigenske variacije. Te aglutinine oziroma hemaglutinine predstavljajo proteini velikosti 45–50 kDa, ki se vežejo na specifične receptorje z vezano sialično kislino. Skupino hemaglutininov kodira gen *vlhA*, ki se po translaciji cepi v N-terminalni del MSPB in MSPA. Oba povezujemo s hemadsorbcojo, ki je med sevi *M. synoviae* variabilna (Benčina, 2002; Benčina in sod., 1999; Noormohammadi in sod., 1997, 1998; Khiari in Mardassi, 2012). Gen tipa *vlhA* se je iz genoma *M. synoviae* prenesel v genom *M. gallisepticum* in je del multigenske družine aglutininov. Ima pomembno vlogo pri antigenski raznolikosti, fazni variaciji in antigenskem preklapljanju hemaglutininov *M. synoviae* in omogoča izmikanje imunskemu sistemu med kronično okužbo (Bradbury, 2005). Variabilnost in izražanje gena *vlhA* nadzirajo procesi homologne rekombinacije s psevdogeni, ki se nahajajo na drugih lokacijah genoma *M. synoviae* (Allen in sod., 2005; Benčina in sod., 2001; Jeffery in sod., 2006; Noormohammadi in sod., 2000; Slavec in sod., 2011). Kulture *M. synoviae* s hemaglutinacijsko negativnim fenotipom izražajo skrajšane različice hemaglutinina MSPB in so manj patogene kot hemaglutinacijsko pozitivne kulture (Narat in sod., 1998).

Zmožnost vdiranja *M. synoviae* v nefagocitirajoče piščančje celice je bila dokazana tudi pri tipskem sevu WVU 1853. Dokazali so vdiranje *M. synoviae* v kokošje eritrocite, primarno kulturo kokošjih hondrocytov in celično linijo kokošjih zarodnih celic CEC-32 (Dušanić in sod., 2009). *M. synoviae* vsebuje encime, ki pripomorejo k virulenci in s svojo aktivnostjo sodelujejo pri patogenezi. Nevraminidazna aktivnost (NEAC) je bila identificirana pri več sevih *M. synoviae* (Berčič in sod., 2008b). Glavna funkcija nevraminidaz je odstranjevanje terminalne sialične kisline iz površine membranskih receptorjev in drugih glikoproteinov gostiteljskih celic. S tem se omogoči učinkovitejša in dolgotrajnejša kolonizacija okuženih tkiv. Močnejša NEAC sevov *M. synoviae* navadnosov pada s povišano patogenostjo in zmožnostjo vdiranja v gostiteljske celice (Berčič in sod., 2008b). Pri tipskem sevu WVU 1853 so identificirali nevraminidazo NanH, ki je zmožna desializirati IgY in glikoproteine sluznice dihalnih poti (Berčič in sod., 2011). Več sevov *M. synoviae* vsebuje cisteinsko proteazo CysP, ki v pogojih *in vitro* cepi IgY na Fc in Fab fragmente po cepnem vzorcu papaina. Z neimunsko vezavo Fc regije IgY (Lauerman in sod., 1993) in naknadno proteazno aktivnostjo CysP lahko *M. synoviae* prezivi v gostitelju kljub protitelesnemu odgovoru gostitelja (Cizelj in sod., 2011). V genomu *M. synoviae* so identificirali gena *MS53_0110* in *MS53_0284*, ki določata domnevni nukleazi *MS53_0110* ter *MS53_0284* (Vasconcelos in sod., 2005). Mikoplazemske nukleaze so lahko udeležene v procesu pridobivanja prekurzorjev za sintezo mikoplazemskih nukleinskih kislin, podvojevanju DNA, pri popravljanju napak, ki nastajajo pri sintezi DNA, v restrikcijsko-modifikacijskem sistemu, ki omogoča obrambo pred vgraditvijo tuje DNA v mikoplazemski genom, in tudi pri različnih procesih patogeneze. Lahko se nahajajo na celični membrani, v citoplazmi ali pa se sproščajo v okolje. Med mikoplazemskimi vrstami se razlikujejo v velikosti in reakcijskih pogojih (Brocchi in sod., 2007; Carvalho in sod.,

2005; Dybvig in sod., 1998; Minion in sod., 1993; Schmidt in sod., 2007). Dokazano je, da nekatere mikoplazemske nukleaze pri okuženih celicah povzročajo internukleosomalno fragmentacijo kromatina in imajo podobne karakteristike kot evkariotske apoptotske nukleaze. Inducirajo lahko apoptozi podobne znake, vendar povezava med izražanjem mikoplazemskih nukleaz in indukcijo apoptoze pri okuženih celicah še ni pojasnjena (Bendjennat in sod., 1999; Paddenberg in sod., 1996, 1998; Sokolova in sod., 1998). Proteini, ki omogočajo nukleazno aktivnost *M. synoviae*, še niso preučeni.

2.4.3 Patogeneza *M. synoviae*

Glavni naravni gostitelji *M. synoviae* so kokoši in purani, okužijo pa se lahko tudi race, gosi, pegatke, golobi, japonske prepelice, fazani in jerebice (Kleven in Ferguson-Noel, 2008). Naravna okužba z *M. synoviae* je lahko opazna že pri teden dni starih piščancih, pogosteje pa je akutna oblika bolezni pri živalih, starih 4–16 tednov. Akutna oblika bolezni se lahko občasno pojavi tudi pri odraslih kokoših, ki ji sledi kronična oblika. Živali so kužne skozi celotno življenje. Kronična bolezen lahko nastane brez predhodne akutne oblike. Horizontalni prenos okužbe z *M. synoviae* se največkrat zgodi preko izločkov iz dihal ob direktnem stiku z okuženo oziroma okuženimi živalmi. Navadno se okužijo vse živali v reji, le pri redkih pa se razvijejo obolenja sklepov (Kleven in Ferguson-Noel, 2008). Naravna okužba odraslih kokoši največkrat ne vpliva na produkcijo in kvaliteto jajc, čeprav so bile opažene nekatere izjeme pri konzumnih nesnicah (Feberwee in sod., 2009; Mohammed in sod., 1987; Opitz, 1983). Vertikalni prenos preko valilnih jajc se lahko pojavi pri naravnih in eksperimentalnih okužbah živali (Kleven in Ferguson-Noel, 2008) in ima pomembno vlogo pri razširjanju okužbe pri kokoših in puranah. Stopnja vertikalnega prenosa pri kokoših je najvišja v prvih 4–6 tednih po okužbi, nato pa začne postopoma upadati, kar pa ne vpliva na stopnjo horizontalnega prenosa okužbe (Vardaman, 1976). Inkubacijska doba po okužbi je navadno 11–21 dni, vendar je krajsa pri vertikalno okuženih živalih. Nanjo vplivajo starost živali, mesto vnosa, število celic *M. synoviae* in patogenost izolata oziroma seva *M. synoviae*. Pred nastankom klinične oblike bolezni lahko, v redkih primerih, v serumu okužene živali določimo specifična protitelesa proti proteinom *M. synoviae* (Kleven in Ferguson-Noel, 2008). Primeri okužbe perutnine z *M. synoviae* naj bi bili v nekaterih državah bolj pogosti kot okužbe z *M. gallisepticum*, ki so se v preteklosti pojavljale pogosteje (Landman, 2014). Sinovitis se lahko pojavi pri 2–75 %, najpogosteje pa pri 5–15 % okuženih živalih. Okužbe dihal so navadno asimptomatične, okuži pa se lahko 90–100 % živali. Pogin po naravni okužbi znaša med < 1–10 %, po eksperimentalni okužbi pa 0–100 % (Kleven in Ferguson-Noel, 2008). Virulenca sevov oziroma izolatov *M. synoviae* se med seboj zelo razlikuje glede na zmožnost povzročanja bolezni pri kokoših (Kleven in sod., 1975). Dejavniki, ki omogočajo sistemsko okužbo in selektivni tropizem sevov za membrane epitelijev spodnjega dela dihal, sklepov in ovojnici tetiv, so pri *M. synoviae* še relativno neznani (Hinz in sod., 2003). Sevi *M. synoviae* so

različno patogeni tudi za kokošje zarodke, kar pa največkrat ni v korelaciiji z njihovo virulenco pri kokoših (Lockaby in sod., 1999). Gojenje *M. synoviae* v kokošjih zarodkih, tkivnih in celičnih kulturah ter tekočem gojišču zmanjša patogenost izolatov. Razmnoževanje in presajevanje v zarodkih ima manjši vpliv na zmanjšanje patogenosti kot gojenje v tekoči kulturi (Kleven in Ferguson-Noel, 2008). Preživetje okuženih zarodkov je odvisno od mesta inokulacije in števila inokuliranih celic *M. synoviae*. Čas zamiranja zarodkov po apliciraju 0,25 ml kulture *M. synoviae*, redčene v razmerju 1 : 10, na različna mesta je: 6,7 dni (rumenjak); 8,6 dni (amnionska vrečka); 12 dni (horioalantoisna membrana, CAM) in 12,9 dni (alantoisna vrečka). Zarodki, ki odmrejo 4–10 dni po okužbi, imajo poškodovana številna tkiva in povečana jetra, vranico ter ledvica (Olson, 1984).

2.4.4 Diagnostika *M. synoviae*

Identifikacija okužbe in določitev sevov *M. synoviae* pri potencialno okuženih živalih je ključnega pomena za preprečevanje širjenja okužbe, izolacijo jat od ostale populacije in načrtovanje nadaljnjega postopka zdravljenja oziroma sanacije okužbe. Pri akutnih okužbah se *M. synoviae* največkrat izolira iz poškodovanega tkiva, pri kroničnih okužbah pa je najbolj zanesljiva izolacija iz zgornjega dela dihal. Identifikacijo odtisov oziroma celih kolonij se največkrat izvede s tehnikami, ki zajemajo fluorescentno ali encimsko označena protitelesa (Benčina in Bradbury, 1992; Kleven in Ferguson-Noel, 2008; Talkington in Kleven, 1983). Pogosto se uporablja tudi direktna identifikacija DNA *M. synoviae* v celicah in tkivih z uporabo DNA-sond. Še pogostejša pa je identifikacija z metodama PCR in nukleotidnim sekvenciranjem, ki sta po občutljivosti primerljivi z identifikacijo kolonij s protitelesi (García in sod., 1995; Hammond in sod., 2009; Hong in sod., 2004; Kleven in Ferguson-Noel, 2008; Lauerman in sod., 1993). Protitelesa proti *M. synoviae* se razvijejo 2–4 tedne po okužbi (Olson in sod., 1963). Detekcija specifičnih protiteles v serumu okuženih živali se izvaja s serološkimi tehnikami. Najpogosteje se uporablja aglutinacija na plošči (SPA), test inhibicije hemaglutinacije (HI), indirektni imunoperoksidazni test (IIPA) in encimsko-imunski test (ELISA), ki pa se lahko med seboj razlikujejo po občutljivosti in specifičnosti (Benčina in Bradbury, 1991; Benčina in sod., 1991a, b; Higgins in Whithear, 1986; Opitz in sod., 1983; Patten in sod., 1984). Za zanesljivo identifikacijo sevov *M. synoviae*, predvsem zaradi lažne pozitivnosti, je priporočljiva uporaba več različnih seroloških testov oziroma naknadna potrditev prisotnosti okužbe s PCR (Fiorentin in sod., 2003). Sum na okužbo je mogoče postaviti glede na klinične znake, kot so bleda barva rože, šepanje, hiranje, otekline blazinic nog ali podkolenskih sklepov, spremembe na lupini jajc, vendar jo je potrebno potrditi z laboratorijskimi diagnostičnimi metodami (Kleven in Ferguson-Noel, 2008).

2.4.5 Imunski odziv kokoši na okužbo z *M. synoviae*

Interakcije med mikoplazmami in imunskim odzivom gostitelja so kompleksne in zajemajo nespecifični in specifični imunski odziv. Poškodbe tkiva po okužbi so velkokrat posledica delovanja gostiteljevega imunskega odziva in vnetnih procesov in ne direktnega učinka samih mikoplazem. Specifični imunski odziv pogosto povzroči poškodbe tkiva, napredovanje bolezni in proliferacijo ter aktivacijo limfoidnih celic (Bradbury, 2005; Simecka in sod., 1992). Nekatere mikoplazme lahko vplivajo na aktivnost celic imunskega sistema (Razin in sod., 1998). Okužba lahko povzroči znižanje ali povišanje aktivacije limfocitov B in T, vpliva na proizvodnjo citokinov in kemokinov, poveča citotoksične učinke makrofagov, NK in celic T ter aktivira nastanek komplementa. Nekateri mikoplazemski proteini so lahko superantigeni (Bradbury, 2005; Razin in sod., 1998).

Identificiranih je bilo mnogo imunogenih proteinov *M. synoviae*, ki sprožijo nastanek protitelesnega odgovora, med katere spadajo številni encimi in lipoproteini (Berčič in sod., 2008a; Gurevich in sod., 1995). Mednje spadajo tudi hemaglutinin VlhA, nevraminidaza NanH in cisteinska proteaza CysP (Benčina, 2002; Berčič in sod., 2011; Cizelj in sod., 2013). Pri kokošjih makrofagih je MSPB, lipoproteinska podenota VlhA *M. synoviae* WVU 1853, sprožila sintezo vnetnih citokinov, predvsem IL-6 in IL-1 β , ter NO, ki poleg številnih fizioloških funkcij, uravnava tudi mnoge vnetne procese (Lavrič in sod., 2007). Spremembe v izražanju imunskih genov pri makrofagih HD11 in MDM ob okužbi z *M. synoviae* WVU 1853 so pokazali z uporabo cDNA mikromrež (Lavrič in sod., 2008). Povišano izražanje gena za IL-1 β so določili eno uro po okužbi, po 24 urah pa povišano izražanje genov za iNOS, avidin, IL-1 receptor tipa 2 in kemokin CXCL1, CCL5, in CCL4L1 (MIP-1 β). Povišano je bilo še izražanje genov nekaterih encimov, proteinov oksidativnega stresa, receptorjev, signalnih in transportnih proteinov ter ostalih genov. S kvantitativnim PCR v realnem času (qRT-PCR) so nato dodatno potrdili povišano izražanje gena komponente komplementa C3, IL-6, CTSL in iNOS ter IL-1 β , ki sta imela povišano izražanje. Zaprto je bilo izražanje genov nekaterih antibakterijskih proteinov, encimov, signalnih in transportnih proteinov (Lavrič in sod., 2008). Dokazali so, da N-terminalni acilirani lipopeptid (MDLP), ki predstavlja N-terminalni del hemaglutinina VlhA, inducira izražanje TLR15 v kokošjih makrofagih in hondroцитih. Po stimulaciji celic z *M. synoviae* in MDLP so zaznali tudi povišano izražanje transkripcijskega faktorja NF- κ B in izločanje NO. To kaže na to, da gre mehanizem stimulacije prirojenega imunskega odziva kokoši po okužbi z *M. synoviae* preko signalizacije s TLR15 (Oven in sod., 2013). Poškodbe tkiv, pri okužbah sklepov z *M. synoviae*, povzroči pretežno infiltracija in proliferacija imunskih celic (heterofilcev, limfocitov in makrofagov) na mestu okužbe. Po okužbi piščancev z odstranjениmi timusi poškodbe sklepnih tkiv niso bile opazne, kar kaže na to, da so za razvoj bolezni potrebni limfociti timusa, predvsem limfociti T (Kleven, 2003a; Kume in sod., 1977). Proučevanje interakcij med *M. synoviae* WVU 1853 in kokošjimi hondrocyti je pokazalo, da se po okužbi zmanjša respiracija hondrocytov, poviša

izražanje več proapoptotskih genov in poviša koncentracija NO v celičnih supernatantih. Nastale morfološke poškodbe so bile podobne tistim, ki navadno nastanejo pri apoptozi. S tem so dokazali, da okužba z *M. synoviae* povzroči odmiranje kokošjih hondrocytov z apoptozo preko produkcije NO, kaspaze 3 in mitohondrijske inaktivacije ter s tem prispeva k uničenju tkiva in razvoju artritisa pri kokoših (Dušanić in sod., 2012). Pri kokošjih hondrocytih so v pogojih *in vitro* z uporabo fenotipskih mikromrež dokazali tudi vpliv na spremembe metabolne aktivnosti, ki spremljajo okužbo z *M. synoviae* in povzročijo povišan vnos ionov, povišano občutljivost na več hormonov, imunomediatorjev in citotoksičnih snovi (Dušanić in sod., 2014).

2.5 PARAMIKSOVIRUSI

V red *Mononegavirales* spadajo virusi, katerih genom je sestavljen iz enoverižne, nesegmentirane in negativno polarne RNA molekule, ki ima skupaj s kapsidnimi proteinimi strukturo simetrične vijačnice. Vanj uvrščamo družine *Paramyxoviridae*, *Filoviridae*, *Bornaviridae* in *Rhabdoviridae*. Družino *Paramyxoviridae* sestavlja poddružini *Pneumovirinae* in *Paramyxovirinae*, slednjo pa rodovi *Rubulavirus*, *Respirovirus*, *Morbillivirus*, *Henipavirus* ter *Avulavirus* (Miller in Koch, 2013). Virusi, ki spadajo v omenjene robove, so našteti v preglednici 4.

Preglednica 4: Rodovi in virusi, uvrščeni v poddružino *Paramyxovirinae* (Audsley in Moseley, 2013; Miller in Koch, 2013).

Table 4: Genera and viruses classified in the subfamily *Paramyxovirinae* (Audsley and Moseley, 2013; Miller and Koch, 2013).

Rod	Virus	Gostitelj
<i>Rubulavirus</i>	Virus mumpsa	Človek
	Virus parainfluence 5 (prej simian virus 5)	Človek
	Virus človeške parainfluence 2, 4a in 4b	Človek
	Virus mapuera	Netopirji
	Prašičji rubulavirus	Prašiči
<i>Respirovirus</i>	Virus Sendai	Glodalci
	Virus človeške parainfluence 1, 3	Človek
	Virus goveje parainfluence 3	Govedo
<i>Morbillivirus</i>	Virus ošpic	Človek
	Virus pasje kuge (distemper)	Psi
	Goveji virus Rinderpest	Govedo
	Kozji virus Rinderpest	Koze
	Virus tjujnje kuge (distemper)	Tjulnji
	Kitji morbillivirus	Kiti
<i>Henipavirus</i>	Virus Hendra	Netopirji
		Konji
		Človek
	Virus Nipah	Netopirji
		Prašiči
<i>Avulavirus</i>	Virus Cedar	Človek
		Netopirji
	Ptičji paramiksovirus tipa 1	Ptice
	Ptičji paramiksovirusi tipa 2–11	Ptice

V rod *Avulavirus* uvrščamo ptičje paramiksovirus (APMV) enajstih seroloških skupin (APMV-1 do APMV-11), med katerimi je APMV-1 z ekonomskega in zdravstvenega vidika najpomembnejši APMV, ki okužuje kokoši. Poleg APMV-1 povzročajo bolezni pri perutnini tudi APMV-2, APMV-3, APMV-6 in APMV-7, vendar v bistveno milejši,

največkrat subklinični, obliki. Preglednica 5 prikazuje podatke o gostiteljih in boleznih, ki jo povzročajo APMV pri perutnini. Zaradi filogenetskih razlik med sevi APMV-1 se serotip, kamor uvrščamo APMV-1, deli na razreda I in II, razred II pa na 16 genotipov (Diel in sod., 2012). V razred I so uvrščeni nizko virulentni sevi, izolirani iz prostoživečih ptic, z izjemo izolata kokoš/Irska/1990 (Alexander in sod., 1992). V razred II, genotip I so uvrščeni nizko virulentni sevi, z izjemo virulentnega izolata, ki je leta 1998 v Avstraliji povzročil izbruh atipične kokošje kuge (Gould in sod., 2001). Razred II, genotip II vsebuje nizko virulentne seve APMV-1 (B1, La Sota, VG/GA se uporablajo kot cepiva) in virulentne seve, ki se jih navadno redko izolira (Miller in sod., 2010). V razred II, genotipe III–IX in X–XVI uvrščamo virulentne seve APMV-1 (Courtney in sod., 2012; Diel in sod., 2012). Izolati razreda II, genotipa X so nizko virulentni in pogosto okužijo divje ptice, identificirali pa so jih tudi pri nekaterih vrstah perutnine (Diel in sod., 2012; Miller in sod., 2011).

Preglednica 5: Ptičji paramiksovirusi, njihovi gostitelji in bolezni, ki jih povzročajo pri perutnini (Miller in Koch, 2013).

Table 5: Avian paramyxoviruses, their host range and diseases they cause in poultry (Miller and Koch, 2013).

Prototip virusnega seva	Običajni naravni gostitelj	Bolezni pri perutnini
APMV-1	Okužba je bila potrjena pri 241 vrstah ptic	Razpon med zelo hudimi in subkliničnimi bolezenskimi stanji, v odvisnosti od seva in gostitelja
APMV-2/kokoš/California/Yucalpa/56	Purani, ptice pevke; lahko tudi kokoši, papige in mokoži	Blage okužbe dihal in nižja nesnost, ki so hujši ob napredovanju bolezni
APMV-3 ¹ /puran/Wisconsin/68	Purani	Blage okužbe dihal in nižja nesnost, na katere vplivajo okolje in prisotnost ostalih mikroorganizmov
APMV-3 ¹ /papiga/Netherlands/449/75	Papige, ptice pevke	Niso znani
APMV-4/raca/Hong Kong/D3/75	Race; lahko tudi gosi	Niso znani
APMV-5/skobčevka/Japan/Kunitachi/75	Skobčevke	Ni poročil o okužbah perutnine
APMV-6/raca/Hong Kong/199/77	Race; lahko tudi gosi, mokoži in purani	Blage okužbe dihal in nekoliko večji pogin pri puranah; bolezenskih znakov pri racah in goseh ni
APMV-7/grlica/Tennessee/4/75	Golobi, grlice; lahko tudi purani in noji	Blaga obolenja dihal pri puranih
APMV-8/gos/Delaware/1053/76	Race, gosi	Ni poročil o okužbah perutnine
APMV-9/domača raca/New York/22/78	Race	Nezaznavne okužbe pri domačih racah
APMV-10/pingvin/Falkland Islands/324/2007	Rock Hopper pingvin	Ni poročil o okužbah perutnine
APMV-11/kozica/France/10021272010	Kozica	Ni poročil o okužbah perutnine

¹Serološki testi se lahko razlikujejo med izolati virusov, ki okužujejo purane in papige.

2.6 PTIČJI PARAMIKSOVIRUS TIPA 1

Okužbo z APMV-1 so potrdili pri 241 vrstah ptic iz 27. ptičjih redov, najbolj dovetni pa so perutnina (kokoši, purani, race, gosi, pegatke, jerebice, fazani), golobi, tekači, druge prostoživeče in okrasne ptice (Alexander in Senne, 2008). Bolezni, ki jo povzročajo različni sevi oziroma izolati APMV-1, se lahko močno razlikujejo v bolezenskih stanjih pri perutnini (McFerran in McCracken, 1988; Alexander in Senne, 2008). Seve lahko glede na klinične znake pri kokoših razdelimo v pet tipov (Miller in Koch, 2013):

1. Viscerotropni velogeni APMV-1 (Doyleov tip): Akutna in smrtonosna oblika okužbe kokoši vseh starosti. Bolezen se pojavi nenačoma in se hitro razširi na vse živali v jati, ki lahko poginejo brez kliničnih znakov. Običajni klinični znaki, ki spremljajo okužbo, so oteženo dihanje, apatičnost, depresija, onemoglost, zelena driska s primesmi krvi in izčrpanost. Pojavi se lahko edem v okolini oči in glave. Pred poginom se pojavi trzanje mišic ali krči, tortikolis in paraliza nog ter kril. Okužbo pogosto spremljajo krvavitve na organih prebavnega trakta in nekroza limfoidnega tkiva. Pegin je zelo visok in lahko doseže 100 % (Alexander in Senne, 2008; Miller in Koch, 2013).
2. Nevrotropni velogeni APMV-1 (Beachov tip): Okužbo spremljajo akutne dihalne motnje, ki jim v enem do dveh dneh sledijo živčni znaki. Opazen je visok padec nesnosti. Navadno se okuži cela jata. Obolelost lahko doseže 100 %. Pegin je višji pri mlajših živalih (do 90 %), pri starejših pa je nižji (do 50 %) (Alexander in Senne, 2008; Miller in Koch, 2013).
3. Mezogeni APMV-1 (Beaudetteov tip): Različica manj patogenega Beachovega tipa okužbe. Okužbe z mezogenimi sevi povzročajo blažje klinične znake. Okužene ptice so neješče, kihajo, nesnost se jim zniža. Živčni znaki so redki. Pegin je navadno nizek, pojavi pa se pretežno pri mladih živalih. V nekaterih državah mezogene seve še vedno uporabljajo za pripravo živih cepiv (Alexander in Senne, 2008; Miller in Koch, 2013).
4. Lentogeni APMV-1 (Hitchnerjev tip): Okužba povzroči blaga ali subklinična obolenja dihalnih poti in padec nesnosti, ki se po preboleli bolezni vrne v prvotno stanje. Okužene ptice so neješče in občasno rahlo kihajo. Lentogeni virusni sevi se pogosto uporabljajo za pripravo živih cepiv. Po cepljenju piščancev z lentogenim sevom La Sota so opazili hujša obolenja dihal, če so bili v piščancih prisotni tudi drugi patogeni mikroorganizmi (Alexander in Senne, 2008; Miller in Koch, 2013).

5. Asimptomatski APMV-1: Tkvni tropizem asimptomatskih sevov APMV-1 so epiteliji prebavnega trakta. Ti sevi ne povzročajo kliničnih oblik bolezni in se pogosto uporabljajo kot živa cepiva (Miller in Koch, 2013).

APMV-1 povzroča pri številnih pticah kužno bolezen, atipično kokošjo kugo (AKK, ang. Newcastle disease). AKK je definirana kot bolezen perutnine, ki jo povzročajo okužbe z virulentnimi sevi APMV-1, ki imajo (Miller in Koch, 2013; OIE, 2012):

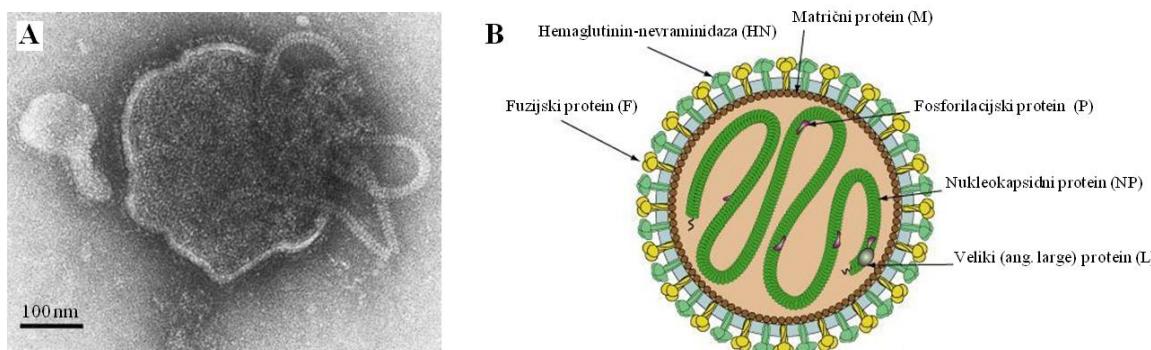
- intracerebralni indeks patogenosti (ICPI) pri dan starih piščancih (*Gallus gallus*) višji od 0,7 oziroma
- več bazičnih aminokislin, ki jih neposredno ali posredno dokažemo na C-terminalnem koncu virusnega proteina F₂, in aminokislino fenilalanin na mestu 117 prekurzorskega fuzijskega protein (F₀), ki predstavlja N-terminalni del proteina F₁. Več bazičnih aminokislin predstavljajo vsaj trije aminokislinski ostanki arginina ali lizina na mestih od 113 do 116 F₀. V kolikor aminokislinskega zaporedja ni mogoče določiti, je potrebno izvesti ICPI.

Zaradi različne patogenosti sevov APMV-1 se navadno z NDV (ang. Newcastle disease virus) poimenuje virulentne seve, ki povzročajo AKK. AKK predstavlja tretjo najpomembnejšo virusno bolezen perutnine glede na ekonomske izgube, takoj za aviarno influenco in kužnim bronhitisom (Kapczynski in sod., 2013; OIE, 2012). Zaradi razširjenosti ima AKK velik globalno-ekonomski pomen in ocenjujejo, da naj bi NDV predstavljal enega najpomembnejših živalskih virusov na svetovni ravni. V državah z dobro razvito perutninsko revo predstavljajo največji strošek izpadi proizvodnje mesa in jajc, sanacija škode in redni kontrolni ukrepi, med katere spadajo redna testiranja in tudi cepljenja (Leslie, 2000). Bolezen je najhujša pri kokoših, kjer je lahko pogin 90–100 % (Alexander in Senne, 2008). Prvi dokumentirani izbruhi bolezni pri kokoših so se zgodili leta 1926 na Javi, Indoneziji in Angliji v mestu Newcastle-upon-Tyne, po katerem je bila bolezen tudi poimenovana. Okužbe z NDV se najpogosteje širijo s premiki ptic, z ljudmi in delovno opremo, s perutninskimi proizvodi (predvsem mesom in jajci), z okuženo krmo in vodo, preko drugih živalskih vrst, z vetrom in ob napačnih strategijah cepljenja. Perutnina se najpogosteje okuži z vdihanjem kontaminiranega zraka ali zaužitjem kontaminirane krme ali vode. Med boleznijo izločajo velike količine virusa z izločki in iztrebki. Nadaljnji prenos okužbe med perutnino je odvisen od količine in patogenosti virusa. Okužba se lahko širi tudi v primeru kontaminacije jajčne lupine in jajčne vsebine. Okužene živali lahko širijo virus pred pojavom kliničnih znakov bolezni, virus pa lahko izločajo tudi cepljene živali, ki se okužijo, vendar klinično ne zbolijo. Inkubacijska doba za AKK po naravni okužbi je 2–15 dni, najpogosteje pa traja 5–6 dni. Odvisna je od patogenosti virusa, vrste in starosti gostitelja, zdravstvenega stanja gostitelja, okužbe z drugimi patogenimi organizmi, okoljskih dejavnikov, stresa, količine virusa in načina okužbe

(Alexander in Senne, 2008). Pri eksperimentalnih okužbah lahko APMV-1 okuži številne ptičje in tudi druge živalske vrste. Pri ljudeh lahko pride, v redkih primerih, do okužbe z APMV-1 pri nepazljivem rokovaju z okuženimi pticami, izločki, trupli, alantoisnimi tekočinami ter cepivi; lahko se ji izognemo z uporabo osnovnih higienskih postopkov in zaščite. Najpogostejše so okužbe oči. Ljudi lahko okužijo sevi APMV-1, ki so za perutnino virulentni ali lentogeni (Alexander in Senne, 2008; Chang, 1981).

2.6.1 Morfologija, kemijska zgradba in biološke lastnosti APMV-1

Delci APMV-1 so navadno okrogle oblike s premerom 100–500 nm, pojavljajo pa se lahko tudi kot različno dolge filamentozne strukture debeline 100 nm. Delci vsebujejo približno 20–25 % lipidov in približno 6 % ogljikovih hidratov. V virusne delce je vgrajen tudi aktin gostiteljske celice. Celokupna molekulska masa povprečnega virusnega delca znaša približno 500×10^3 kDa. Ti se po gradientnem centrifugiraju nahajajo v saharoznem mediju z gostoto 1,18–1,20 g/ml (Alexander in Senne, 2008). APMV-1 ima značilno enoverižno negativno polarno RNA z molekulsko maso 5×10^3 kDa, ki predstavlja 0,5 % mase virusnega delca (Kolakofsky in sod., 1974). Velikost genoma večine sevov je 15.186 nukleotidov (Phillips in sod., 1998), obstajajo pa tudi sevi z genomom s 15.192 (Huang in sod., 2004a) in 15.198 nukleotidi (Czeglédi in sod., 2006). Delci APMV-1 so zaradi zgradbe membrane občutljivi na vsa lipidna topila, eter, detergente, formalin, visoko temperaturo, žarčenje, oksidacijske procese, nizko in visoko vrednost pH. Pri nizkih temperaturah ohrani APMV-1 infektivnost več tednov, več let pa lahko preživi v zamrznjenem mesu (Alexander in Senne, 2008). Slika in shema zgradbe delca APMV-1 sta prikazani na sliki 2.



Slika 2: Slika delca APMV-1 seva Ulster 2C posneta z negativno kontrastno elektronosko mikroskopijo pri 202.000-kratni povečavi (Alexander in Senne, 2008 (Collins)) (A) in shematski prikaz zgradbe delca APMV-1, ki je prirejen po shemi s portalja ©ViralZone, 2010; Swiss Institute of Bioinformatics (B).

Figure 2: Picture of negative contrast electron micrograph of APMV-1 strain Ulster 2C particle at 202.000 × magnification (Alexander and Senne, 2008 (Collins)) (A) and schematic representation of the APMV-1 particle, adapted from ©ViralZone, 2010; Swiss Institute of Bioinformatics (B).

Genomska RNA APMV-1 je sestavljena iz šestih genov, ki kodirajo šest strukturnih proteinov (veliki protein, ki je po funkciji RNA-usmerjena RNA polimeraza (L), hemaglutinin-neuraminidaza (HN), fuzijski protein (F), matrični protein (M), fosforilacijski protein (P) in nukleokapsidni protein (NP)) ter nestrukturna proteina V in W (Lamb in Parks, 2007), ki se sintetizirajo v celicah gostitelja. Proteina V in W se sintetizirata z različnim urejanjem prepisovanja mRNA gena P (McGinnes in sod., 1988; Steward in sod., 1993), z vstavitvijo 1 (protein V) oziroma 2 (protein W) nukleotidov G na nukleotidnem položaju 484. Ocena razmerja sinteze proteinov v okuženih celicah je P : V : W = 7 : 3: 1 (Locke in sod., 2000; Steward in sod., 1993). V genomu si geni virusnih proteinov sledijo v vrstnem redu 3'-NP-P-M-F-HN-L-5' (Alexander in Senne, 2008). Gene ločujejo medgenske regije dolžine 1–47 nukleotidov, ki so najverjetneje udeležene pri prekinitvi prepisovanja mRNA predhodnega gena pred začetkom prepisovanja naslednjega gena (Ishada in sod., 1986; Millar in sod., 1986; Phillips in sod., 1998; Yusoff in sod., 1987). Genomska RNA vsebuje na 3' in 5' koncu vodilno in končno zaporedje, ki sta dolgi 55 in 114 nukleotidov (Kurilla in sod., 1985; Peeters in sod., 2000; Yusoff in sod., 1987). Zaporedji naj bi bili udeleženi pri regulaciji podvojevanja APMV-1, prepisovanja in enkapsulacije genomske RNA (Lamb in Kolakofsky, 1996).

APMV-1 je obdan z membrano iz dvojnega lipidnega sloja, ki izvira iz celične membrane gostiteljske celice. Vanj sta vgrajeni dve vrsti glikoproteinov, HN in F, ki sta opazni kot strukturi na zunanjji površini membrane s približno dolžino 8 nm (Alexander in Senne, 2008; Yusoff in Tan, 2001). Proteini HN in F vplivajo na virulenco in infektivnost APMV-1 (Stone-Huslander in Morrison, 1997). Pod membrano APMV-1 se nahaja sloj relativno hidrofobnih neglikoziliranih proteinov M, ki so povezani z notranjim slojem membrane in z N-terminalnim delom HN proteinov, vendar ne vsebujejo membranskih domen (Garcia-

Sastre in sod., 1989; Peeples in Bratt, 1984). Zaradi pozitivnega neto naboja so proteini M v interakciji z nukleokapsido, ki jo sestavlja več tisoč tesno povezanih proteinov NP in ima obliko simetrične viačnice s širino 18 nm in dolžino 1 µm (Alexander in Senne, 2008; Peeples in Bratt, 1984). Virusna genomska RNA se nahaja znotraj votle nukleokapside, ki v tesni povezavi s proteini P in proteini L tvorita prepisovalni kompleks APMV-1 (ang. ribonucleoprotein complex, RNP) (Yusoff in Tan, 2001). Lastnosti posameznih proteinov APMV-1 so prikazane v preglednici 6.

Preglednica 6: Lastnosti strukturnih in nestruktturnih proteinov APMV-1.

Table 6: Characteristics of structural and non-structural APMV-1 proteins.

Protein	Masa [kDa] ³	Dolžina [ak] ⁴	Funkcija	Viri
F ¹	66	553	<ul style="list-style-type: none"> - Omogoča zlitje gostiteljske in virusne membrane in s tem vstop APMV-1 v gostiteljsko celico. - Pomembna vloga pri virulenci APMV-1. Cepitev proteina F₀ na F₁ in F₂ podenoti z gostiteljskimi proteazami pogojuje virulenco APMV-1. - Površinski glikoprotein, vezan na membrano s C-terminalnim delom (tip integralnega proteina I). Tvorji homotrimere. 	Chambers in sod., 1986a Panda in sod., 2004a Salih in sod., 2000 Samal in sod., 2011
HN ¹	74	571–616	<ul style="list-style-type: none"> - Hemaglutinacijsko in nevraminidazno aktivnost omogoča globularna glava HN. - Interakcija s proteini F, ki omogočajo fuzijo APMV-1 s specifično membrano gostitelja. - Omogoča sproščanje novo nastalih virusnih delcev iz gostiteljske celice. - Določa tropizem, omogoča okužbo in patogenezo APMV-1. - Prepoznavata gostiteljskih površinskih receptorjev z vezano sialično kislino in pritrjevanje APMV-1 na gostiteljsko celico. - Odstranjevanje receptorjev za preprečitev sprijemanja delcev APMV-1. - Površinski glikoprotein, vezan na membrano z N-terminalnim delom (tip integralnega proteina II). Tvorji homotetramere. 	Alexander in Senne, 2008 Ganar in sod., 2014 Lamb in Parks, 2007 Sergel in sod., 1993 Scheid in Choppin, 1974 Schuy in sod., 1984
L ¹	250	2204	<ul style="list-style-type: none"> - Predstavlja največji protein APMV-1, ki je prisoten v najmanj kopijah. - Sinteza virusne mRNA in podvojevanje genomske RNA. - Sinteza kape na 5' koncu in poli-A polimerazna aktivnost na novo sintetizirani mRNA. - Kompleks proteinov P-L tvori aktivno RNA-usmerjeno RNA polimerazo APMV-1. - Posredni vpliv na virulenco APMV-1 s povišanjem stopnje sinteze virusne RNA med podvojevanjem. 	Dortmans in sod., 2010 Hamaguchi in sod., 1983 Lamb in Parks, 2007 Rout in Samal, 2008 Yusoff in sod., 1987
M ¹	40	364	<ul style="list-style-type: none"> - Kontrolira sintezo virusne RNA. - Omogoča sestavljanje delcev APMV-1 na celični membrani gostitelja. Povezuje se z nukleokapsido, lipidnim dvoslojem, aktinom in s površinskimi glikoproteini HN na notranji strani membrane APMV-1. - Sodeluje pri izbočenju membrane pred sprostivijo novonastalega virusnega delca. - Vzdrževal naj bi krožno obliko delca APMV-1. 	Chambers in sod., 1986b Mebatsion in sod., 1999 Peeples in Bratt, 1984 Seal in sod., 2000 Yusoff in sod., 1987

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 6. Lastnosti strukturnih in nestrukturnih proteinov APMV-1

Protein	Masa [kDa] ³	Dolžina [ak] ⁴	Funkcija	Viri
P ¹	50–55 ⁵	395	<ul style="list-style-type: none"> - Je del prepisovalnega kompleksa APMV-1. - Ključna vloga pri podvojevanju APMV-1 in prepisovanju virusne RNA. Stabilizira protein L v kompleksu P-L, ki deluje kot RNA-usmerjena RNA polimeraza. - V tetramerni obliki in v kombinaciji s proteinom L in kompleksom RNA-NP deluje kot šaperon in preprečuje naključno enkapsulacijo ne-virusne RNA. - Tvori kompleks s posameznimi proteini NP in regulira prehod med prepisovanjem virusne RNA in razmnoževanjem virusne RNA. 	Dortmans in sod., 2010 Ganar in sod., 2014 Lamb in Kolakofsky, 1996 Errington in Emmerson, 1997
V ²	36	239	<ul style="list-style-type: none"> - Pomemben virulentni dejavnik APMV-1. - Z domeno na C-terminalnem delu inhibira odziv interferonov (IFN) α in β. Inhibira signalizacijo IFN z delovanjem na STAT1 in s tem povzroči njegovo razgradnjo. Lahko tudi inhibira odziv IFN-β z delovanjem na MDA5. - Vloga pri podvojevanju virusne RNA, kjer reagira s proteinom NP v gostiteljski celici. 	Ganar in sod., 2014 Horikami in sod., 1996 Lamb in Parks, 2007 Park in sod., 2003
W ²	Ni podatka	Ni podatka	<ul style="list-style-type: none"> - V celicah okuženih z APMV-1 so odkrili le mRNA proteina W. Proteina W v okuženih celicah še niso odkrili. - Točna funkcija pri podvojevanju APMV-1 še ni znana. 	Ganar in sod., 2014 Yusoff in Tan, 2001
NP ¹	53	489	<ul style="list-style-type: none"> - Več tisoč podenot NP tvori nukleokapsido APMV-1, ki obdaja virusno genomsko RNA in jo ščiti pred nukleazami. - Je del prepisovalnega kompleksa APMV-1. - Je najštevilčnejši protein APMV-1. - N-terminalni del NP tvori povezavo z virusno RNA in proteinom P in določa strukturo nukleokapside. 	Dortmans in sod., 2010 Errington in Emmerson, 1997 Ganar in sod., 2014 Kho in sod., 2003

L: veliki protein (RNA-usmerjena RNA polimeraza; ang. large protein); HN: hemaglutinin-nevraminidaza; F: fuzijski protein; M: matrični protein; P: fosforilacijski protein (V, W: mRNA, ki kodira protein P, se lahko po prepisu ustrezno preoblikuje in povzroči sintezo proteina V oziroma W); NP: nukleokapsidni protein.

¹ Strukturni protein; ² nestruktturni protein; ³ molekulska masa podana v kDa.

⁴ Število aminokislinskih ostankov, ki sestavljajo protein, glede na nukleotidno zaporedje.

⁵ Masa proteina P je med sevi različna zaradi različnih oblik fosforilacije (Dortmans in sod., 2010).

2.6.2 Podvajanje APMV-1

Postopek podvajanja APMV-1 se začne s pritrditvijo virusa na celične receptorje z vezano sialično kislino. Navadno se APMV-1 s proteinom HN pritrdi na celice sluznic dihal, ki vsebujejo receptorje kot so gangliozidi in N-glikoproteinski receptorji. Po pritrditvi pride protein F v neposredni stik s celično membrano, spremeni obliko in povzroči zlitje virusne in celične membrane. Skozi poro, ki nastane po zlitu membran, nukleokapsidni kompleks APMV-1 (genomska RNA obdana s proteini NP, P in L) vstopi v gostiteljsko celico. Znotrajcelično podvajanje APMV-1, ki sledi vstopu nukleokapsidnega kompleksa, poteka izključno v citoplazmi. APMV-1 ima negativno polarno genomsko RNA, zato virusna RNA-usmerjena RNA polimeraza v prvi fazi sintetizira komplementarne pozitivno polarne

transkripte genoma, ki jih mehanizmi gostiteljeve celice uporabijo v procesih prevajanja virusnih proteinov in prepisovanja v virusne negativno polarne RNA genome. Prepisovanje virusnih genov se začne na zaporedju skrajnega 3' konca genoma APMV-1, sintetizirajo pa se mRNA od začetka do konca posamezne genske sekvene. Ponovni začetki prepisovanja genov proti 5' koncu niso enotni, kar vodi v nastanek gradiента populacij mRNA, katerih število se zmanjšuje z oddaljevanjem od 3' konca genoma. Sinteza proteinov HN in F poteka v zrnatem endoplazemskem retikulumu; sta edina proteina APMV-1, ki se po prevajanju modificirata z glikozilacijo, vzpostavljivo disulfidnih mostičkov in cepitvijo s celičnimi proteazami. Protein F se sintetizira kot nefunkcionalni protein F₀, ki potrebuje za vzpostavitev funkcionalnosti cepitev z gostiteljskimi proteazami na F₁ in F₂ podenoti, ki sta povezani z disulfidnim mostičkom. Protein HN se pri določenih sevih APMV-1 po prevajanju prav tako cepi z gostiteljskimi proteazami. Po ustreznih modifikacijih se virusni proteini F in HN iz Golgijskega aparata transportirajo na celično membrano in se na določenem mestu vgradijo v lipidni dvosloj. Na mestu vgradnje se z njimi na notranji strani celične membrane povežejo proteini M. Po enkapsulaciji negativno polarne genomske RNA s proteini NP se nukleokapsidni kompleks, skupaj s proteini P in L, pritrdi na proteine M znotraj modificirane celične membrane. V zaključni fazи podvajanja APMV-1 se virusni delci z naraščajočim izbočenjem odcepijo iz celične membrane gostitelja (Alexander in Senne, 2008; Ganar in sod., 2014; Yusoff in Tan, 2001).

2.6.3 Patogeneza APMV-1

Pri kokoših je patogeneza APMV-1 pogojena predvsem z virusnim sevom, vpliv pa imajo tudi količina virusa, mesto vnosa okužbe, starost kokoši in okoljski pogoji. Na splošno velja, mlajša, kot je žival, hujša je oblika bolezni. Po okužbi z virulentnimi sevi APMV-1 piščanci navadno nenadno poginejo brez očitnih kliničnih znakov, pri starejših pa je lahko bolezen dolgotrajnejša z značilnimi kliničnimi znaki (Alexander in Senne, 2008). Pasma in genetsko poreklo živali nimata očitnega vpliva pri dovzetnosti kokoši na bolezen (Cole in Hutt, 1961). Naravne poti okužbe z APMV-1, kot so nazalna, oralna in okularna, naj bi v večji meri povzročale respiratorno obliko bolezni (Beard in Easterday, 1967), intramuskularne, intravenozne in intracerebralne poti pri načrtni okužbi pa živčno obliko AKK (Beard in Hanson, 1984). Virulenta sevov APMV-1 se navadno zelo razlikuje glede na gostitelja. Za kokoši visoko virulentni sevi lahko povzročajo pri racah blage klinične znake oziroma jih ne, četudi pride do okužbe s sevi, ki so smrtni za kokoši (Higgins, 1971). Patogenezo in virulenco APMV-1 določata struktturna površinska proteina HN in F, ki omogočata pritrjevanje delcev APMV-1 na receptorje, in vstop nukleokapsidnega kompleksa v gostiteljsko celico in protein V, ki vpliva na imunski odziv gostitelja na okužbo (Ganar in sod., 2014).

2.6.3.1 Vloga proteina F pri patogenezi APMV-1

Cepitev proteina F med posttranslacijskim modificiranjem v gostiteljski celici predstavlja eno izmed glavnih determinant patogenosti, saj lahko le proteolitično cepljeni protein F povzroči zlitje membran gostitelja in APMV-1 (Ganar in sod., 2014). Med podvajanjem APMV-1 se funkcionalno pomembni fuzijski protein F sintetizira kot protein F₀ (66 kDa), ki se proteolitično cepi na daljšo podenoto F₁ (55 kDa) in kraje F₂ (12,5 kDa), ki ostaneta povezani z disulfidnim mostičkom (Nagai in sod., 1989). Podenota F₁ vsebuje transmembransko domeno, ki se nahaja blizu C-terminalnega konca proteina, domena na N-terminalnem koncu F₁ pa naj bi bila direktno vpletena pri procesu zlitja membran. V kolikor do cepitve proteina F₀ ne pride, novo nastali virusni delci ne postanejo infektivni. Proteolitično cepitev F₀ povzročijo gostiteljske proteaze na peptidni vezi med aminokislinsama na mestu 116 in 117 od N-terminalnega konca F₀ (Nagai in sod., 1976a; Rott in Klenk, 1988; Yusoff in Tan., 2001). Specifiko cepitve določa aminokislinsko zaporedje, ki se nahaja na cepnem mestu F₀ in se med sevi APMV-1 razlikuje (Glickman in sod., 1988; Toyoda in sod., 1987). Proteaza, ki je zmožna katalizirati cepitev proteina F₀ pri vseh sevih APMV-1, je tripsin. Za kokoši visoko virulentni sevi APMV-1 se lahko podvajajo v širokem naboru celičnih tipov v pogojih *in vitro* z ali brez dodanega tripsina, nizko virulentni sevi pa le ob prisotnosti dodanega tripsina in le v določenih celičnih tipih (Alexander in Senne, 2008). Tretiranje ne-infektivnih sevov s tripsinom v pogojih *in vitro* povzroči obnovitev virusne infektivnosti in nastanek plakov na celičnih kulturah (Nagai in sod., 1976b). Vsi sevi APMV-1 se lahko podvajajo v alantoisni votlini oplojenih kokošjih jajc (Alexander in Senne, 2008). Določitev aminokislinskih zaporedij cepnih mest proteinov F₀, ki so jih pridobili na podlagi nukleotidnih zaporedij z nukleotidnim sekvenciranjem, je omogočila primerjavo in ločevanje med velogenimi, mezogenimi, lentogenimi in asimptomatskimi sevi APMV-1 (Alexander in Senne, 2008; Collins in sod., 1994; Miller in Koch, 2013). Prisotnost dodatne bazične aminokisline pri virulentnih sevih določa cepitev F₀ s proteazo oziroma proteazami, ki so prisotne v številnih gostiteljskih celičnih tipih, tkivih in organih. Proteolitični encim oziroma encimi še niso popolnoma identificirani, zelo verjetno pa spadajo med znotrajcelične proprotein-procesirajoče, subtilizinu-sorodne endoproteaze. Domneva se, da cepitev F₀ pri virulentnih sevih APMV-1 povzroča furin (Fijii in sod., 1999; Stieneke-Gröber in sod., 1992). Po okužbi z virulentnimi sevi APMV-1 poteka cepitev F₀ v gostiteljski celici kot modifikacija po prevajanju. Posledično se proizvedejo virusni delci s proteinom F v obliki F₁-F₂, ki lahko povzročijo zlitje membrane virusa z membrano vsake celice, na katero se novo nastali virus pritrdi s proteinom HN. Zaradi tega okužba z virulentnimi sevi APMV-1 vodi v sistemsko okužbo, ki se navadno konča s poginom okužene živali. Pri lentogenih sevih APMV-1 lahko cepitev F₀ opravijo le tripsinu podobne proteaze. Za razliko od cepitve pri virulentnih sevih APMV-1 cepitve F₀ pri lentogenih sevih ne opravijo znotrajcelične proteaze v procesu modifikacije po prevajanju, ampak specifične zunajcelične proteaze (Ganar in sod., 2014). Posledično se lahko lentogeni sevi APMV-1 podvajajo le v celičnih

tipih, kot so respiratorni in črevesni epiteliji, vendar ne pride do sistemske okužbe (Alexander in Senne, 2008). Dokumentirana aminokislinska zaporedja cepnega mesta prekurzorskega proteina F₀ pri različnih sevih APMV-1 so prikazana v preglednici 7.

Preglednica 7: Aminokislinska zaporedja cepnega mesta proteina F₀ pri različnih sevih APMV-1 (Alexander in Senne, 2008).

Table 7: Amino acid sequences of the F₀ protein cleavage site in different APMV-1 strains (Alexander and Senne, 2008).

Sev APMV-1	Virulenta za kokoši	Cepno mesto proteina F ₀ (aminokisline 111–117)	Vir
Herts 33	Visoka	-G-R-R-Q-R-R*F-	Toyoda in sod., 1989
Essex '70	Visoka	-G-R-R-Q-K-R*F-	Collins in sod., 1993
135/93	Visoka	-V-R-R-K-K-R*F-	Oberdörfer in Werner, 1998
617/83	Visoka	-G-G-R-Q-K-R*F-	Collins in sod., 1994
34/90	Visoka	-G-K-R-Q-K-R*F-	Collins in sod., 1993
Beaudette C	Visoka	-G-R-R-Q-K-R*F-	Collins in sod., 1993
La Sota	Nizka	-G-G-R-Q-G-R*L-	Collins in sod., 1993
D26	Nizka	-G-G-K-Q-G-R*L-	Toyoda in sod., 1989
MC110	Nizka	-G-E-R-Q-E-R*L-	Collins in sod., 1993
1154/98	Nizka	-G-R-R-Q-G-R*L-	Alexander, 2001
<i>Avstralski izolati</i>			
Peats Ridge	Nizka	-G-R-R-Q-G-R*L-	Westbury, 2001
NSW 12/86	Nizka	-G-K-R-Q-G-R*L-	Westbury, 2001
Dean Park	Visoka	-G-R-R-Q-R-R*F-	Westbury, 2001
Somersby 98	Nizka	-G-R-R-Q-R-R*F-	Westbury, 2001
PR-32	Nizka	-G-R-R-Q-G-R*F-	Westbury, 2001
MP-2000	Nizka	-G-R-R-Q-K-R*L-	Westbury, 2001

* označuje cepno mesto

Poleg aminokislinskega zaporedja cepnega mesta F₀ ima pomembno vlogo pri patogenezi APMV-1 tudi glikozilacija proteina F. Protein F vsebuje eno N-glikozilacijsko mesto na podenoti F₂ in pet N-glikozilacijskih mest na podenoti F₁. S spremenjanjem glikozilacije proteina F se lahko virulenta in patogeneza APMV-1 bistveno povečata (Samal in sod., 2012). Dokazano je tudi, da lahko določene mutacije v citoplazemski domeni na N-terminalnem koncu proteina F vplivajo na podvajanje APMV-1 in povišano patogenezo pri kokoših (Samal in sod., 2013).

2.6.3.2 Vloga proteina HN pri patogenezi APMV-1

Protein HN ima več funkcij in deluje kot hemaglutinin in nevraminidaza. Posamezen funkcionalni homotetramer sestavlja z disulfidnimi mostički povezan dimer proteinov HN. Protein HN s svojo aktivnostjo določa tkivni tropizem in je poleg proteina F najpomembnejši dejavnik patogeneze APMV-1 (de Leeuw in sod., 2005; Ganar in sod.,

2014; Huang in sod., 2004b). Protein HN omogoča s prepoznavanjem in z vezavo na specifične celične receptorje, ki vsebujejo sialično kislino, pritrjevanje delcev APMV-1 na gostiteljsko celico, kar je začetni korak pri podvajaju virusa. Nevraminidaza (ang. mucopolysaccharide *N*-acetyl neuraminyd hydrolase EC 3.2.1.18) APMV-1 hidrolizira glikozidno vez med terminalno sialično kislino in sladkornim ostankom na celičnih receptorjih in s tem omogoči približanje membran virusa in celice. Po približanju se vzpostavi stik gostiteljske celične membrane s proteinom F, ki nato povzroči zlitje membran celice in APMV-1 (Alexander in Senne, 2008; Ganar in sod., 2014; Yusoff in Tan, 2001). Virulenco in patogenezo APMV-1 omogočata proteina HN in F skupaj, po vzpostavitvi kompleksa s svojima podmembranskima domenama. Po pritrditvi APMV-1 na specifični celični receptor sledijo določene konformacijske spremembe obeh proteinov, ki vodijo v zlitje membran celice in virusa (Ganar in sod., 2014). Zlitje membran virusa in gostitelja lahko povzroči združitev dveh ali več celic. Pri tem nastane sincicij. Hemoliza pogosto nastane, ko pride do zlitja med delci APMV-1 in eritrociti, saj eritrocitna celična membrana zaradi svoje togosti navadno lizira po fuziji z membrano APMV-1 (Alexander in Senne, 2008). Ugotovili so, da zamenjava aminokislinskih ostankov F220, S222 in L224 na membranskem začetnem delu dimerne interfaze globularne domene proteina HN oslabi vezavo HN s celičnimi receptorji in s tem vpliva na stik domen proteinov F in HN (Corey in sod., 2003). Mutacije v heptadnih ponovitvah proteina HN onemogočijo zlitje membran APMV-1 in gostitelja ter destabilizirajo tetramerne strukture HN, kar vpliva na biološko aktivnost APMV-1 (Ganar in sod., 2014).

Nevraminidazna aktivnost proteina HN omogoči sproščanje virusnih delcev s celičnih receptorjev gostiteljske celice, ki vsebujejo sialično kislino, in odstrani sialično kislino iz novo nastalih virusnih delcev. S tem onemogoči sprijemanje oziroma kopiranje delcev APMV-1 po sprostitvi iz gostiteljske celice (Alexander in sod., 2006; Yusoff in Tan, 2001). Aglutinacijsko in nevraminidazno aktivnost proteina HN opravlja isto aktivno mesto, ki se pred preklapljanjem aktivnosti konformacijsko spremeni, preklop aktivnosti pa je odvisen od okoljskih pogojev (Crennell in sod., 2000; Ganar in sod., 2014; Yusoff in Tan, 2001). Dokazali so, da vezava specifičnih monoklonskih protiteles (mAb) na globularno domeno, ki vsebuje aktivno mesto HN, inhibira hemaglutinacijsko in nevraminidazno aktivnost (Iorio in sod., 1989). Virulenco in tkivni tropizem določa aminokislinsko zaporedje proteina HN, ki se med sevi APMV-1 razlikuje (Huang in sod., 2004b). Vlogo proteina HN pri virulenci APMV-1 so dokazali z uporabo tehnik reverzne genetike (Huang in sod., 2004b; Römer-Oberdörfer in sod., 2006). Dolžina proteina HN lahko pri APMV-1 znaša 571, 577, 581 ali 616 aminokislinskih ostankov. Protein HN₆₁₆, ki ga imajo pretežno lentogeni sevi, se pretvorji v biološko aktiven HN-protein s cepitvijo 45 aminokislinskih ostankov dolgega peptida na C-terminalnem koncu proteina HN₀. Proteini HN₅₇₁, HN₅₇₇ in HN₅₈₁ so biološko aktivni takoj po sintezi in jih navadno vsebujejo bolj virulentni sevi APMV-1 (Gorman in sod., 1988; Yusoff in sod., 1997). Pri virulentnem Indonezijskem izolatu APMV-1 je podaljšanje aminokislinskega zaporedja na

C-terminalnem koncu proteina HN iz 571 na 577 oziroma 616 aminokislin zmanjšalo patogenost virusa v dan starih in tri tedne starih piščancih (Kim in sod., 2014). Protein HN ima šest predvidenih N-glikozilacijskih mest, ki imajo pomembno vlogo pri aktivnosti proteina in virulenci APMV-1. Odstranitev kateregakoli glikozilacijskega mesta ima lahko velik vpliv na znižanje virulence virusa (Panda in sod., 2004b).

2.6.3.3 Vloga proteina V pri patogenezi APMV-1

Glavna vloga proteina V pri virulenci in patogenezi APMV-1 je inhibitorno in antagonistično delovanje na signalizacijo IFN tipa I (IFN- α/β) in tipa II (IFN- γ). Antagonistično delovanje omogoča C-terminalni del proteina V, ki vpliva na signalizacijo imunskega odziva na več načinov, na različnih stopnjah signalizacijske kaskade IFN (Ganar in sod., 2014). Tarče delovanja proteina V so predvsem proteini STAT1 (transaktivatorji signalizacije obeh tipov IFN), ki se po vezavi naknadno vežejo z ubikvitinom in razgradijo s proteasomi. Dokazali so, da imajo rekombinantni APMV-1, ki ne izražajo proteina V bistveno nižjo virulenco v pogojih *in vivo*. Vpliv na signalizacijo IFN je odvisen od seva oziroma izolata APMV-1, ki je manjši pri nižje virulentnih sevih (Alamares in sod., 2010; Huang in sod., 2003; Park in sod., 2003). Protein V se lahko veže na signalno molekulo MDA5 in IFN-inducibilno RNA helikazo ter povzroči inhibicijo aktivacije promotorja IFN- β in nadaljnje signalizacije (Andrejeva in sod., 2004; Park in sod., 2003). Protein V lahko vpliva tudi na vezavo ubikvitina na IRF-3. Zaščitni mehanizem je kovalentna vezava IRF-3 z IFN stimulirajočim proteinom ISG15, ki z vzpostavitvijo kompleksa prepreči proteolitično razgradnjo IRF-3 (Bowie in Unterholzner, 2008; Lu in sod., 2006).

2.6.4 Določanje sevov in diagnostika APMV-1

Določanje sevov APMV-1 je ključnega pomena za razvrščanje virusnih izolatov s podobnimi lastnostmi in za identifikacijo okuženih živali. Karakterizacija posameznega virusnega izolata je pomembna za ločevanje med visoko in nizko virulentnimi virusi za kokoši ter tudi med virusi, ki povzročajo epizootije (Alexander in Senne, 2008). Vzorci, v katerih se navadno določa prisotnost APMV-1, lahko izvirajo iz poginjenih (vzorci pljuč, ledvic, črevesja z vsebino, žleze slepih čreves, vranic, možganov, jeter in srca) ali živih ptic (trahealni ali kloakalni brisi). Po izolaciji se APMV-1 goji do ustreznih titrov v določenih celičnih kulturah oziroma v oplojenih kokošjih jajcih (OIE, 2012). Seve APMV-1 se najpogosteje določa oziroma klasificira z analizo površinskih antigenov, s serološkimi testi, s testi patogenosti in z genetsko karakterizacijo z molekularnimi metodami (Alexander in Senne, 2008).

Za določanje sevov oziroma izolatov APMV-1 glede na njihove površinske antigene in za prikazovanje antigenske variacije med njimi se pogosto uporablja specifična monoklonska protitelesa (mAb) (Abenes in sod., 1986; Alexander in sod., 1985, 1987; Erdei in sod., 1987; Hoshi in sod., 1983; Ishida in sod., 1985; Lana in sod., 1988; Meulemans in sod., 1987; Nishikawa in sod., 1983; Russel in Alexander, 1983; Srinivasappa in sod., 1986). Z uporabo mAb se lahko zazna zelo majhne razlike v antigenosti, kot je npr. sprememba posamezne aminokisline v epitopu, ki je specifičen za dano mAb, kar omogoča ločevanje med posameznimi virusnimi sevi in tudi virusnimi podpopulacijami (Hanson, 1988). Razvrstitev sevov in izolatov APMV-1 v skupine na osnovi reagiranja z različnimi mAb je pokazala, da imajo virusi, ki so reagirali z enakimi mAb enake biološke in epizootiološke lastnosti (Alexander in sod., 1985, 1986, 1987, 1997; Russell in Alexander, 1983). Obstaja tudi podobnost med skupinami virusov s podobnimi genetskimi karakteristikami in virusi s podobnimi lastnostmi antigenov, ki so jih določili z uporabo mAb (Russell in sod., 1990). Med serološke teste, s katerimi najpogosteje identificiramo prisotnost specifičnih protiteles proti APMV-1 v krvi okuženih živali, spadajo hemaglutinacijski test (HA), test HI in ELISA. Najpogosteje rutinsko uporabljeni test je HI (OIE, 2012). Hemaglutinacijo omogoča vezava proteina HN na celične receptorje na površini eritrocitov. Z izkoriščanjem te lastnosti se lahko s testi HA in HI s specifičnimi antiserumi določi prisotnost Ab proti APMV-1. Navadno se pri testih hemaglutinacije uporabljo kokošji eritrociti. APMV-1 aglutinira tudi eritrocite dvoživk, plazilcev, človeka, miši, morskih prašičkov in drugih ptic. Aglutinacija eritrocitov goveda, koz, ovc, prašičev in konjev je odvisna od sevov oziroma izolatov APMV-1. Načeloma lahko APMV-1 poleg eritrocitov aglutinira tudi druge celice, v kolikor vsebujejo na svoji površini ustrezne receptorje z vezano sialično kislino (Alexander in Senne, 2008).

Pri testih patogenosti se uporablja sistem točkovanja posameznih patoloških znakov in sistem določitve vrednosti (indeksa), s katerimi se določi stopnja patogenosti testiranega virusnega izolata. Za določanje patogenosti APMV-1 se uporablja intracerebralni indeks patogenosti (ICPI), intravenozni indeks patogenosti (IVPI) in povprečen čas zamiranja zarodkov (ang. mean death time, MDT). Visoko virulentni sevi imajo ICPI blizu maksimalne vrednosti 2, lentogeni sevi pa vrednosti 0. Sevi APMV-1 so virulentni, v kolikor je ICPI enak ali večji kot 0,7. ICPI uporablja Svetovna organizacija za zdravje živali (OIE) za določanje virulence izolatov APMV-1 v pogojih *in vivo* (Alexander, 1998; Alexander in Senne, 2008; OIE, 2012). Lentogeni in nekateri mezogeni sevi imajo vrednost IVPI enako 0, virulentni sevi pa se približajo vrednosti 3 (Alexander, 1998). Z uporabo MDT se izolate APMV-1 klasificira med velogene (zamiranje zarodkov povzročijo v manj kot 60 h), mezogene (zamiranje povzročijo med 60 in 90 h) in lentogene (smrt povzročijo v več kot 90 h) (Alexander, 1998).

Genetska karakterizacija izolatov APMV-1 je postala z razvojem izboljšanih metod sekvenciranja nukleotidnih zaporedij, dostopnostjo sekvenčnih podatkov v podatkovnih

bazah in dejstvom, da lahko že z relativno kratkimi sekvencami dosežemo dobre rezultate pri filogenetskih analizah, ena izmed glavnih metod za razvrščanje izolatov APMV-1 (Alexander in Senne, 2008). Z molekularnimi tehnikami so opazili veliko genetsko raznolikost med posameznimi izolati APMV-1, ki jih lahko s tovrstnimi metodami z veliko natančnostjo razvrstimo v posamezne linije oziroma skupine. Genotipizacijo izolatov APMV-1 so predlagali kot del rutinske diagnostične karakterizacije za referenčne laboratorije, kjer se pridobljene sekvene primerja z ostalimi virusnimi izolati in virusnimi predstavniki znanih genetskih linij in podlinij (Aldous in sod., 2003). Največji poudarek pri genetski karakterizaciji izolatov APMV-1 je na sekvenciranju genov, ki kodirata protein F in protein HN, ki spadata med glavne virulentne dejavnike APMV-1 (Alexander in Senne, 2008). Najpogosteje uporabljeni metodi pri molekularni diagnozi APMV-1 sta RT-PCR (obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo) in qRT-PCR (kvantitativni PCR v realnem času), ki omogočata zanesljivo in hitro identifikacijo virusa v okuženih vzorcih (OIE, 2012).

2.6.5 Cepljenje proti AKK

Za cepljenje perutnine proti AKK se najpogosteje uporablajo živa in inaktivirana cepiva. Cepljenje navadno zagotovi zaščito pred kliničnimi znaki, vendar imunost ni popolna, saj se lahko APMV-1 še vedno podvaja in izloča, vendar v nižjih količinah (Alexander in sod., 1999; Guittet in sod., 1993; Parede in Young, 1990; Utterback in Schwartz, 1973). Po priporočilih OIE morajo imeti virusi, ki se uporablajo kot živa cepiva, vrednost intracerebralnega indeksa patogenosti (ICPI) nižjo od 0,4; virusi, ki se uporablajo kot inaktivirana cepiva, pa ICPI nižjo od 0,7 (OIE, 2012). Dejavniki, ki vplivajo na program cepljenj, so dostopnost cepiv, maternalna imunost, uporaba drugih cepiv, prisotnost drugih mikroorganizmov, velikost jate, predviden čas pitanja, število osebja, klimatski pogoji, zgodovina cepljenj in stroški. Uspešnost imunizacije v jati se navadno potrdi z dokazom protiteles v testih HI (Alexander in Senne, 2008). Za živa cepiva se uporablja lentogene in asimptomatske seve APMV-1 (Miller in Koch, 2013). Cepljenje z živimi cepivi stimulira celično in humoralno imunost v relativno kratkem času po apliciranju (Alexander in Senne, 2008). Perutnini se lahko živa cepiva aplicira individualno (intranasalno, intraokularno) ali masovno (pitna voda, kapljično). Pogosta ugodna posledica cepljenja je vzpostavitev imunosti v jati, ki nudi delno zaščito manjšemu številu neučinkovito cepljenih živali. Masovna aplikacija zaščiti približno 53 % živali v jati po cepljenju s kapljičnimi metodami in približno 60 % živali po aplikaciji cepiva s pitno vodo (Degefa in sod., 2004; Kapczynski in sod., 2013; Marangon in Busani, 2006). Cepljenje s kapljičnimi metodami je odvisno od situacije AKK v regiji in se navadno uporablja, ko pride do izbruha AKK v neposredni bližini farme (OIE, 2012). Pridobivanje živih cepiv je relativno poceni, primerna so za masovno apliciranje in omogočijo razširjanje cepnega virusa na neuspešno cepljene živali. Redki stranski učinki, ki lahko spremljajo cepljenja z živimi cepivi, so

blage dihalne motnje, slabša ješčnost in padec nesnosti. Hujše vnetne reakcije po cepljenju lahko nastanejo v slabših okoljskih razmerah in prisotnosti drugih patogenih mikroorganizmov (Alexander in Senne, 2008). Med najpogosteje uporabljenega in široko razširjena živa cepiva za cepljenje perutnine spada lentogeni sev APMV-1 La Sota (Goldhaft, 1980), ki je nastal iz terenskega izolata (Alexander in Senne, 2008). Sev La Sota se uporablja kot živo primarno cepivo, ima vrednost ICPI manjšo od 0,4 in se lahko aplicira intranazalno, intraokularno, s pitno vodo in kapljično (Alexander in Senne, 2008). Inaktivirana cepiva se pridobivajo iz različnih kemijsko inaktiviranih sevov APMV-1, ki se jim doda ustrezni adjuvant. Najpogostejša oblika inaktiviranih cepiv so oljne emulzije, ki lahko vsebujejo enega ali več različnih virusov oziroma antigenov. Takšna cepiva so bivalentna oziroma polivalentna (Meulemans, 1988). Inaktivirana cepiva se navadno uporablja po predhodni imunizaciji z živimi virusi ali pa istočasno. Apliciramo jih z injiciranjem intramuskularno ali subkutano. S tem dosežemo dolgotrajen imunski odgovor pri večini živali v jati (Alexander in Senne, 2008).

2.6.6 Imunski odziv kokoši na okužbo z APMV-1

Trenutno razumevanje imunskega odziva kokoši proti okužbam z APMV-1 se nanaša predvsem na poznavanje, produkcijo in identifikacijo gostiteljevih protiteles proti virusnim površinskim proteinom, ki se jih določa s serološkimi testi. Poznavanje molekularnih mehanizmov, ki potekajo po naravnih okužbah ali cepljenjih je relativno omejeno in raziskano le pri določenih sevih APMV-1. Navadno virulentni sevi povzročijo močnejšo aktivacijo izražanja imunskeih genov kot lentogeni sevi. Vloga celične imunosti v zaščiti proti okužbam z APMV-1 je v veliki meri neznana (Kapczynski in sod., 2013). Nivo apoptoze limfoidnega tkiva po okužbi je pogosto v korelaciji s stopnjo bolezni, ki jo povzročajo določeni sevi APMV-1 (Harrison in sod., 2011). Imunost perutnine proti APMV-1 je v veliki meri pogojena z vrsto, pasmo in genetskim poreklom živali. Analiz imunskega odziva v pogojih *in vivo*, ki so pomembnejše za razumevanje virusne patogeneze, je manj (Kapczynski in sod., 2013). Pri analizi izražanja genskih prepisov 36 ur po okužbi kokoši z APMV-1 so izpostavili 140 značilno spremenjenih označevalcev izraženih zaporedij (ang. expressed sequence tag, EST) in identificirali 58 ustreznih genov kokoši, ki so imeli po okužbi spremenjen nivo prepisovanja in so udeleženi v procesih signalizacije, regulacije prepisovanja, celične molekularne dinamike, funkcijah citoskeleta, odgovora na stres, imunskega odgovora, metabolizma, oksidacijsko-redukcijskih reakcij in nekaterih drugih procesih (Lan in sod., 2010).

2.6.6.1 Prirojeni imunski odziv na okužbo z APMV-1

Prirojeni imunski odziv na okužbo z APMV-1 je takojšen in vpliva na inhibicijo in omejitev razširjanja virusa. S svojim delovanjem mogoči razvoj virusno-specifičnega imunskega odgovora z aktivacijo mehanizmov pridobljene imunosti. Po okužbi virus prepozna gostiteljevi PRR (TLR, NOD), kar povzroči signalizacijsko kaskado in transkripcijo faktorjev aktivacije. Ti omogočijo sintezo IFN in citokinov, ki s svojim delovanjem omejijo podvojevanje virusa (Kapczynski in sod., 2013). Na celičnem nivoju so v pogojih *in vitro* dokazali, da povzroča okužba z APMV-1 povečano sintezo NO v kokošjih heterofilcih in perifernih krvnih mononuklearnih celicah, ki ima lahko v višjih količinah toksične učinke na gostitelja. Okužba kokošjih makrofagov je povzročila povišano izražanje mRNA IFN- α , IFN- β in IFN- γ (Ahmed in sod., 2007; Palmer in sod., 1987; Sick in sod., 1998, 2000). APMV-1 se lahko podvaja v kokošjih makrofagih (Lam, 1996a) in povzroča apoptozo kokošjih perifernih krvnih limfocitov (Lam, 1996b; Lam in Vasconcelos, 1994) ter heterofilcev (Lam in sod., 1996). Z uporabo Cdna-mikromrež so analizirali izražanje genov po okužbi kokošjih embrionalnih celic z virulentnim sevom APMV-1 Texas GB. Okužba je v zgodnjih fazah povzročila znižano izražanje genov stimuliranih s strani interferonov, ki je bilo povišano šele v poznejši fazi okužbe. Okužba naj bi v zgodnji fazi vplivala na signalizacijo IFN z inhibitornim vplivom na proteine STAT1. Po 36 urah so opazili povišano izražanje genov za IFN- α in IFN- β . Poleg povišanih IFN so določili tudi povišano izražanje genov, ki jih stimulirajo INF (tetratrikopeptidne ponovitve 4, retinojsko kislino, RI58, IFI-56K, P27-H in STAT1 α/β). Znižano izražanje gena za tioredoksin, ki deluje kot antioksidant, so predpostavili kot možnen mediator apoptoze pri okužbi z APMV-1 (Munir in sod., 2005). V pogojih *in vitro* so z okuževanjem vraničnih levkocitov primerjali stimulacijo imunskega genov med virulentnim sevom APMV-1 CA02 in lentogenim sevom La Sota. Sev CA02 je povzročil hitro in močno povišanje v izražanju genov za IFN- α , IFN- γ , IL-1 β , in IL-6, ki so ključni pri vnetnem odgovoru in nadaljnjem razvoju imunosti. Izražanje istih genov je bilo po okužbi s sevom La Sota bistveno nižje ozziroma do povišanega izražanja ni prišlo (Rue in sod., 2011). Odziv kokoši na okužbo s sevom APMV-1 CA02 so analizirali z uporabo mikromrež. V vranicah so 24 ozziroma 48 ur po okužbi določili povišano izražanje genov za IFN- α , IFN- γ , IL-6, MIP-3 α , Mx, lizocim, interferon-inducirajoči protein s tetratrikopeptidno ponovitvijo 5, ISG12-2, MDA5, IL-1 β , IL-18, MIP-1 β , IL-8, iNOS in ostale citokine, kemokine in nekatere signalne proteine (Rue in sod., 2011). Okužba kokoši s patogenim sevom Herts 33/56 je po 24 urah povzročila povišano sintezo mRNA IFN- γ v vraniči in tkivu tankega črevesja, ki ga je spremljala znižana sinteza mRNA IL-4 in IL-13 (Degen in sod., 2005).

2.6.6.2 Protitelesni imunski odziv na okužbo in cepljenje z APMV-1

Okužba ali cepljenje dovzetnih živali z APMV-1 sproži sintezo specifičnih protiteles v gostiteljskih limfocitih B. Protitelesa, ki nastajo pri kokoši po okužbi z APMV-1 so IgM, IgY in IgA (Jeurissen in sod., 2000). Protitelesa lahko določimo v krvi v šestih dneh po okužbi ali cepljenju z živimi cepivi APMV-1. Najvišja količina protiteles v okuženi živali je prisotna 21–28 dni po okužbi. Glavna funkcija protiteles v gostitelju je nevtralizacija APMV-1, saj se z vezavo protiteles na virus prepreči pritrditev APMV-1 na površino gostiteljske celice (Al-Garib in sod., 2003a). Približno 30 % protiteles tipa IgY in 1 % protiteles tipa IgM ter IgA, ki so prisotni v krvni plazmi kokoši, se lahko pasivno prenese na potomce. Če so količine teh protiteles iz rumenjaka in beljaka dovolj visoke, lahko piščancu nudijo zaščito pred poginom v prvih dneh starosti, vendar redko pred okužbo z virulentnimi sevi APMV-1 (Hamal in sod., 2006). Maternalna protitelesa lahko z nevtralizacijo virusov po aplikaciji živih cepiv znižajo učinkovitost cepljenja (Giambrone in Closser, 1990; Westbury in sod., 1984).

2.6.6.3 Celični imunski odziv na okužbo z APMV-1

Celični imunski odziv (CMI) je specifični mehanizem pridobljene imunosti, ki ga opravljajo limfociti T ($CD4^+$ T celice pomagalke, $CD8^+$ citotoksični limfociti T) in je pomemben dejavnik pri nastanku imunske zaščite pri okuženih oziroma cepljenih piščancih. Limfociti T so navadno prisotni pri odstranjevanju virusa iz gostitelja, z uničenjem okuženih celic (Cannon in Russell, 1986; Ghumman in sod., 1976; Marino in Hanson, 1987; Merz in sod., 1981; Perey in sod., 1975; Sharma, 1999). Testi za proučevanje CMI vključujejo indukcijo IFN- γ v stimuliranih limfocitih, analizo proliferacije limfocitov T, pretočno citometrijo in analizo citotoksičnosti APMV-1-specifičnih $CD8^+$ celic T za celice okužene z APMV-1 (Kapczynski in sod., 2013). CMI se pri kokoših pojavi 2–3 dni po okužbi ali cepljenju z APMV-1 (Ghumman in sod., 1976; Reynolds in Maraqa, 2000). Čeprav so protitelesa ključnega pomena za vzpostavitev imunske zaščite, ima CMI velik vpliv na zmanjšanje sproščanja APMV-1 in je pomemben tudi pri vzpostavljanju imunske zaščite cepljenih živalih po naknadni okužbi z virulentnimi sevi APMV-1 (Kapczynski in sod., 2013; Russell in sod., 1997). Razlike v CMI so bile opažene pri kokoših, ki so bile cepljene z živimi in inaktiviranimi cepivi APMV-1. Okužba z živimi cepivi je povzročila močnejšo in hitrejšo stimulacijo CMI, predvsem zaradi predstavljanja antigenov preko obeh razredov MHC, I ($CD8^+$) in II ($CD4^+$). Po cepljenju z inaktiviranimi cepivi se je CMI v piščancih razvijal dalj časa in bil stimuliran pretežno preko limfocitov $CD4^+$ in MHC-II ter omogočil preko signalizacije s citokini nastanek specifičnih protiteles (Lambrecht in sod., 2004). Virulenta APMV-1 ima vpliv na stimulacijo CMI, ki je daljši in močnejši po okužbi z visoko virulentnimi sevi (Rauw in

sod., 2009). Vpliv na stimulacijo CMI ima lahko tudi sestava adjuvantov v inaktiviranih cepivih (Koppard in sod., 2011) in prisotnost vitamina A (Lessard in sod., 1997).

2.7 MEDSEBOJNI VPLIVI PATOGENIH MIKROORGANIZMOV NA RAZVOJ BOLEZNI PRI PERUTNINI

V jatah perutnine so izbruhi komplikiranih oblik bolezni, največkrat respiratornih, posledica delovanja več dejavnikov, med katere spadajo tudi sočasne okužbe z različnimi patogenimi mikroorganizmi, pogosto z mikoplazmami in virusi. Na razvoj bolezni vplivajo tudi časovna izpostavljenost patogenim mikroorganizmom, neugodni okoljski in zoohigienski pogoji, imunosupresivni dejavniki in cepljenja, ki lahko v določenih razmerah povzročijo hude vnetne reakcije. Enostavne bolezni, ki jih povzroča prisotnost le enega dejavnika oziroma mikroorganizma, so v praksi redke (Kleven, 2008b). Med sočasne okužbe uvrščamo hkratne okužbe, kjer različne vrste patogenov v gostitelja vstopijo istočasno, in zaporedne okužbe, kjer je v gostitelju najprej prisotna ena vrsta mikroorganizma, ki mu po določenem času sledi okužba z drugo vrsto. Slednje so najpogosteje, podobna situacija pa lahko nastane ob cepljenjih. Učinkovitost cepljenja je pogosto pogojena s tem, ali so živali predhodno okužene, največkrat subklinično, z drugim patogenom in tudi, če se sočasno izvaja cepljenje proti drugim mikroorganizmom. Perutnina je praktično konstantno izpostavljena različnim mikroorganizmom in ima stalno aktivno imunsko obrambo, zato vsak patogen vstopa v nek že deluječ sistem imunske obrambe. Predhodne okužbe lahko tako bistveno vplivajo na potek obrambnih mehanizmov proti novi okužbi. Dodatno na potek imunske obrambe gostitelja vplivajo še interakcije med mikroorganizmi, njihovimi encimi in imunogenimi molekulami, ki so kompleksne, njihov skupen učinek na gostitelja pa je dokaj slabo proučen (Kleven, 1998, 2003b; Saif, 2008). Podatkov o tem, kaj okužbe s posameznimi mikroorganizmi povzročajo na molekularnem nivoju v posameznih celičnih tipih, tkivih in organih je relativno veliko, manjka pa vpogled v molekularno dogajanje ob sočasnih okužbah. Raziskave načeloma potrjujejo, da so medsebojni učinki patogenih mikroorganizmov značilni za posamezne mikrobne pare, rezultati interakcij med mikroorganizmi in imunskim odzivom gostitelja pa odvisni od mnogo dejavnikov in so v veliki meri nepoznani. Znano je, da lahko interakcije med *M. synoviae* in virusi ter ptičjimi mikoplazmami in APMV-1 vplivajo na potek in nastanek bolezni oziroma na učinkovitost cepljenja pri perutnini. Enako velja za nekatere primere sočasnih okužb z *M. synoviae* in APMV-1 (Bradbury, 1984; Kleven, 2003b). Kljub temu manjkajo ključni podatki o molekularnem dogajanju pri vnetnih procesih med sočasno okužbo z *M. synoviae* in APMV-1 v pogojih *in vivo* ali *in vitro*.

2.7.1 Medsebojni vplivi *M. synoviae* in nekaterih virusov, patogenih za perutnino

Opisani so bili številni učinki sočasnih okužb z *M. synoviae* ali z drugimi ptičjimi mikoplazmami ter virusi na razvoj bolezenskih stanj pri perutnini, tako ob okužbah kot ob cepljenjih (Kleven, 1998). Virulenza virusov, ki okužujejo dihalne poti, lahko vpliva na okužbo z *M. synoviae*. Patogenost *M. synoviae* je navadno večja ob prisotnosti virusov z višjo virulenco. Pri piščancih, ki so jih eksperimentalno okužili z *M. synoviae*, so se pojavile hujše vnetne reakcije po cepljenju s cepivi proti določenim virusom s kapljično metodo (Bradbury, 1984; Villegas in sod., 1976). V več študijah se je pri cepljenih piščancih pojavila hujša oblika vnetja zračnih vrečk šele po zaporedni okužbi z *M. synoviae* (Vardaman in sod., 1973; Kleven in sod., 1975). Piščanci, cepljeni z živim cepivom proti virusu kužnega bronhitisa (IBV), so imeli po naknadni okužbi z *M. synoviae* šibkejšo obliko bolezni dihal kot piščanci okuženi s terenskim izolatom IBV (Hopkins in Yoder, 1982). Cepivo z živim IBV, ki so ga presajevali v kokoših, pa je povzročilo hujšo obliko vnetja zračnih vrečk kot originalno cepivo, ko so bile kokoši naknadno okužene z *M. synoviae* (Hopkins in Yoder, 1984). Povišano patogenost *M. synoviae* so opazili po okužbi piščancev, ki so bili cepljeni s kombiniranim cepivom proti APMV-1/IBV (Vardaman in sod., 1973). Število piščancev z artritisom se je povečalo, če so bili po predhodni okužbi z *M. synoviae* naknadno okuženi z IBV. Pogostost nastanka artritisa je bila odvisna od seva IBV (Landman in Feberwee, 2004). Sočasna okužba piščancev, cepljenih z živimi cepivi proti APMV-1 in/ali IBV še z mikoplazmami (*M. gallisepticum* ali *M. synoviae*) in *E. coli*, je povzročila hujše oblike respiratornih motenj kot le okužba s posameznimi pari mikroorganizmov (Nakamura in sod., 1994; Springer in sod., 1974). Okužba piščancev z virusom Gumborske bolezni (ang. infectious bursal disease virus; IBDV), ki ima znane imunosupresivne učinke pri mladih piščancih, negativno vpliva na protitelesni odgovor in zmanjša odpornost proti okužbam z APMV-1 in *M. synoviae* (Farrager in sod., 1974; Giambrone in sod., 1976, 1977; Hirai in sod., 1974). Pri sočasnem okuževanju kokoši z *M. synoviae* in APMV-1 sevom La Sota je bil opazen nižji in kratkotrajnejši protitelesni odgovor proti APMV-1 kot pri tistih, ki so bile le cepljene. Določili so tudi nižjo serološko reakcijo proti *M. synoviae* v primerjavi s kokošmi, okuženimi le z *M. synoviae* (Silva in sod., 2008). Piščanci okuženi z virusom Marekove bolezni so se serološko odzvali slabše na naknadno okužbo z *M. synoviae* kot neokuženi piščanci (Kleven in sod., 1972a). Yoder in sod. (1977) so prikazali vpliv nizke temperature okolja na razvoj bolezni dihal in vnetja zračnih vrečk pri piščancih. Piščanci okuženi z *M. synoviae* in IBV so imeli hujšo obliko vnetja ter hujše poškodbe zračnih vrečk pri nižjih temperaturah (7–10 °C) kot pri temperaturah 24–29 °C ali 31–32 °C (Yoder in sod., 1977).

2.7.2 Medsebojni vplivi APMV-1 in bakterij, ki okužujejo ptice

Cepljenje s kapljičnimi metodami proti APMV-1 ima ob prisotnosti mikoplazem in tudi drugih bakterij velik vpliv na razvoj bolezni pri perutnini. V večini primerov je prisotnost APMV-1 povzročila povišanje patogenosti bakterij pri različnih gostiteljih. *Mycoplasma gallinarum* je navadno nepatogena za perutnino, vendar je pri piščancih broilerjih, ki so bili sočasno cepljeni proti APMV-1 in IBV povzročila vnetje zračnih vrečk (Kleven in sod., 1978). V podobni študiji je sočasna okužba piščancev z *M. gallinarum* in APMV-1 sevom F v zgodnji fazи povzročila poškodbe trahealnega epitela, ki sedmi dan po okužbi niso bile več opazne. Okužba z *M. gallinarum* sedem dni po cepljenju z istim sevom APMV-1 ni povzročila vidnih patoloških sprememb (Shah-Majid, 1996). Opravljenih je bilo več študij, kjer so pokazali vpliv APMV-1 na zmanjšanje imunske obrambe gostitelja proti različnim bakterijam. Purani, cepljeni z APMV-1 sevom La Sota, so bili bolj dovetzni na okužbo z *E. coli* (Ficken in sod., 1987a), piščanci pa na okužbo z bakterijo *Salmonella Enteritidis* (Lam in sod., 1996). Okužba puranov z APMV-1 je vplivala na baktericidno aktivnost in sposobnost uničevanja bakterij z respiratornimi makrofagi in omogočila razširjanje okužbe z bakterijo *Pasteurella anatipestifer* (Charles in sod., 1993). V močno kontaminirani valilnici z *E. coli*, so piščanci razvili hujše oblike bolezni dihal po cepljenju z živimi cepivi proti APMV-1 ali IBV (Kleven, 2008b). Hujšo obliko AKK so ugotovili pri piščancih ob prisotnosti bakterije *Ornithobacterium rhinotracheale* (Travers, 1996). Kokoši in purani, ki so bili konstantno izpostavljeni 20 ppm amoniaka, so imeli vidne histološke poškodbe dihal po šestih tednih izpostavitve. Izpostavljene kokoši so bile bolj občutljive na okužbo z APMV-1 (Anderson in sod., 1964). Opisan je bil tudi vpliv imunosupresivnih virusov na nastanek protitelesnega odgovora po cepljenju z živimi cepivi APMV-1. Nastajanje protiteles po cepljenju z APMV-1 je bilo znižano zaradi okužbe z virusom aviarne anemije in njegovega imunosupresivnega delovanja (Ragland in sod., 1998).

3 NAMEN IN RAZISKOVALNE HIPOTEZE

Pri okuževanju kokoši z *M. synoviae* in cepivi APMV-1 je bilo opisanih več izidov sočasnih oziroma zaporednih okužb z obema mikroorganizmoma, ki so navadno povzročile povišano patogenost *M. synoviae*, znižan odziv gostitelja na bakterijske okužbe in so tudi vplivale na povišano dovzetnost gostitelja na sekundarne okužbe z drugimi patogenimi mikroorganizmi. Molekularni odziv kokoši na tovrstne okužbe v teh študijah ni bil opisan. Namen raziskav v sklopu te doktorske disertacije je analiza molekularnega odziva kokoši, v pogojih *in vivo* in *in vitro*, pri zaporednih okužbah z *M. synoviae* in cepnim sevom APMV-1 La Sota, ki se rutinsko uporablja za cepljenje perutnine. Naša glavna predpostavka je, da lahko sočasna prisotnost *M. synoviae* in cepiva proti APMV-1 vodi v znižan imunski odziv kokoši proti mikoplazemski oziroma bakterijski okužbi. V sklopu doktorske disertacije smo analizirali tudi nekatere interakcije med obema patogenoma v pogojih *in vitro*, ki bi lahko vodile v povišano patogenost *M. synoviae* oziroma vplivale na učinkovitost cepljenja proti APMV-1. Kot model za analize smo izbrali kokošje zarodke, tip neimunskih (celična linija zarodnih celic CEC-32) in tip imunskih (celična linija makrofagov HD11) kokošjih celic, ki smo jih zaporedno okužili z *M. synoviae* WVU 1853 in cepivom APMV-1 La Sota. V sklopu raziskave smo analizirali izražanje genov za citokine in kemokine v posameznih organih kokošjih zarodkov; analizirali učinek okužbe na preživetje kokošjih celic, invazivnost *M. synoviae* v kokošje celice, izražanje genov za vnetne citokine in kemokine, prisotnost citokinov in kemokinov ter dušikovega oksida v celičnih supernatantih; analizirali nukleazno aktivnost *M. synoviae*, vpliv skupne prisotnosti *M. synoviae* in APMV-1 na nukleazno aktivnost *M. synoviae* in vpliv proteaz *M. synoviae* na razgradnjo proteinov APMV-1.

V okviru raziskave smo želeli preveriti naslednje hipoteze:

1. Predvidevamo, da bo zaporedna okužba kokošjih zarodkov z *M. synoviae* WVU 1853 in APMV-1 sevom La Sota povzročila, da bodo geni, povezani z imunskim odzivom, izraženi drugače kot pri posamičnih okužbah. Pričakujemo tudi, da bodo profili izražanja teh genov različni v posameznih limfoidnih organih zarodkov.
2. Predvidevamo, da bo zaporedna okužba kokošjih celičnih linij makrofagov HD11 in zarodnih celic CEC-32 z *M. synoviae* WVU 1853 in APMV-1 La Sota povzročila, da bodo geni, povezani z imunskim odzivom, izraženi drugače kot pri posamičnih okužbah in da bomo poleg genov določili tudi povišane oziroma znižane količine ustreznih proteinov oziroma drugih molekul v celičnih supernatantih.
3. Predvidevamo, da bo dinamika preživetja celičnih linij HD11 in CEC-32 po zaporedni okužbi z *M. synoviae* WVU 1853 in APMV-1 La Sota drugačna, predvidoma manjša kot pri posamičnih okužbah.
4. Predvidevamo, da ima *M. synoviae* WVU 1853 nukleazno aktivnost, ki je zmožna razgraditi gostiteljsko DNA. Pričakujemo, da bo nukleazna aktivnost *M. synoviae* WVU 1853 ob prisotnosti APMV-1 La Sota še intenzivnejša.
5. Predvidevamo, da je *M. synoviae* WVU 1853 sposobna s svojimi proteazami cepiti nekatere proteine APMV-1 La Sota.

4 MATERIALI IN METODE

4.1 SEVI BAKTERIJE *M. synoviae* IN APMV-1

4.1.1 Gojenje sevov bakterije *M. synoviae*

V poskusih smo uporabili tri seve bakterije *M. synoviae*, ki so predstavljeni v preglednici 8. Tipski sev WVU 1853 smo uporabili pri analizi molekularnega odziva kokošjih zarodkov in celic CEC-32 in HD11 na posamične in zaporedne okužbe ter analize medsebojnih interakcij med *M. synoviae* in APMV-1, seva ULB 02/T6 in ULB 9122 pa pri določanju in primerjavi nukleotidnih zaporedij nukleaz MS53_0110 in MS53_0284. Za gojenje *M. synoviae* smo uporabljali tekoče dopolnjeno Freyevo gojišče, ki je vsebovalo gojišče Bacto PPLO Broth Base (Difco, ZDA), 12-odstotni svinjski serum, BME vitaminsko mešanico (oboje Gibco, ZDA), glukozo; 0,1 g/l raztopine NAD in cistein hidroklorida (vse tri Sigma-Aldrich, Nemčija), 400000 IE Penicilina (Pliva, Hrvaška) in raztopino fenol rdeče (Dušanić in sod., 2009). Pred sterilizacijo s filtracijo smo pH umerili na 7,8 z NaOH. Za pripravo gojišča brez proteinov z večjo molekulsko maso smo Freyevo tekoče gojišče ultracentrifugirali z napravo Amicon Stirred Cell Model 8200 (Millipore, ZDA) skozi membrano, ki je odstranila proteine z molekulsko maso večjo od 10 kDa. Filtrat s proteinimi molekulskimi mase 10 kDa in manj smo sterilizirali s filtracijo. Pred uporabo v poskusih smo kulture *M. synoviae* inkubirali pri 37–38 °C do pozne logaritemske faze rasti.

Preglednica 8: Uporabljeni sevi bakterije *M. synoviae*

Table 8: *M. synoviae* strains used in our study

Sev	Gostitelj	Vir
WVU 1853	Kokoš	Berčič in sod., 2008b
ULB 9122	Kokoš	Benčina in sod., 2005
ULB 02/T6	Kokoš	Berčič in sod., 2008a

4.1.1.1 Določanje kolonijskih enot bakterije *M. synoviae*

Število kolonijskih enot *M. synoviae* (ang. colony forming units, CFU) smo določili po standardnem postopku, ki sta ga opisala Rodwell in Whitcomb (1983). Agarska gojišča, ki smo jih uporabili pri določanju CFU na ploščah, so vsebovala Bacto PPLO Broth Agar, Noble Agar (oboje Difco, ZDA), 12-odstotni svinjski serum, BME vitaminsko mešanico (oboje Gibco, ZDA), glukozo; 0,1 g/l raztopine NAD in cistein hidroklorida (vse tri Sigma-Aldrich, Nemčija) in 100000 IE Penicilina (Genera, Hrvaška).

4.1.2 Priprava seva APMV-1 La Sota

APMV-1, ki smo ga uporabili v poskusih, je bil cepni lentogeni sev APMV-1 La Sota (Pestikal®La Sota SPF, Genera, Hrvaška) z odmerkom, ki povzroči okužbo pri 50 % inokuliranih zarodkih $\geq 10^6$ (ang. embryo infectious dose, EID₅₀). Inokulat virusa smo pripravili iz cepiva. APMV-1 La Sota smo za poskuse okuževanja kokošjih zarodkov pripravili v gojišču MEM (Minimum Essential Medium Eagle, Gibco, ZDA), za poskuse okuževanja celic CEC-32, HD11 in ostale poskuse pa v sterilni fiziološki raztopini (miliQ voda z 0,9 % NaCl; pH 7,4). Pripravke virusnega cepiva smo hranili pri temperaturi -70°C do uporabe v poskusih.

4.1.3 Določanje koncentracije *M. synoviae* in APMV-1 za okuževanje kokošjih zarodkov in celičnih linij CEC-32 in HD11

Pred izvedbo poskusov, v katerih smo okuževali kokošje zarodke z *M. synoviae* WVU 1853 in APMV-1 La Sota, smo morali določiti optimalne koncentracije inokuluma obeh patogenih mikroorganizmov, ki so omogočile preživetje zarodkov do vzorčenja in obenem sprožile izražanje genov za citokine ter kemokine v tarčnih organih. V preliminarnih poskusih smo 10–17 dni stare kokošje zarodke okužili z različnimi koncentracijami *M. synoviae*, APMV-1 in s kombinacijo obeh. Za APMV-1 La Sota smo pripravili serijske redčitve izhodnega cepiva v gojišču MEM z 10^5 do 10^{-1} EID₅₀, za *M. synoviae* pa 4 redčitve v dopolnjenem Freyevem gojišču, ki so vsebovale približno 10^7 , 10^8 , 10^9 in 10^{10} CFU/0,1 ml. V alantoidne votline kokošjih zarodkov smo injicirali po 0,1 ml suspenzije posameznega patogena in s spremljanjem preživetja zarodkov določili primerno starost in optimalno število CFU *M. synoviae* in redčitev APMV-1 za poskuse okuževanja (Preglednica 9).

Za zagotavljanje primerljivih eksperimentalnih pogojev pri poskusih okuževanja smo podobno število CFU *M. synoviae* in redčino APMV-1 uporabili tudi za okuževanje celic CEC-32 in HD11. Za okuževanje celic smo uporabili 10^7 – 10^8 CFU *M. synoviae* WVU 1853, kjer je bila intenziteta okužbe (ang. multiplicity of infection, MOI) 10–100 mikoplazemskih celic na eno evkariontsko celico, in 10^3 EID₅₀ (10^{-3} cepne doze) APMV-1 La Sota na 5×10^5 celic (Preglednica 10).

4.2 KOKOŠJI ZARODKI

Oplojena kokošja jajca prosta specifičnih patogenov (ang. Specific-pathogen-free, SPF) smo naročili pri podjetju Valo BioMedia GmbH (Nemčija) in jih po začetku inkubacije gojili pri temperaturi 37°C . Med inkubacijo smo jajca dvakrat dnevno presvetlili za

določanje preživelosti zarodkov. Zamrle kokošje zarodke smo odstranili, preživele pa smo razdelili v ustrezone poskusne skupine pred začetkom izvajanja poskusov okuževanja. Razporeditev kokošjih zarodkov v poskusne skupine je prikazana v preglednici 9.

4.2.1 Okuževanje kokošjih zarodkov in potrjevanje okužbe

Za analizo molekularnega odziva kokošjih zarodkov na posamični in zaporedni tip okužbe z *M. synoviae* WVU 1853 in APMV-1 La Sota smo SPF kokošje zarodke 10. dan inkubacije okužili z *M. synoviae*, 17. dan inkubacije pa z APMV-1. Kokošjim zarodkom smo pripravke *M. synoviae* in APMV-1 injicirali v alantoisno vrečko po protokolu, ki ga je opisal Senne (2006). Skupine kokošjih zarodkov, starost zarodkov in količina posameznega injiciranega patogena so predstavljeni v preglednici 9. V posamezni kokošji zarodek smo injicirali 0,1 ml pripravka posameznega mikroorganizma oziroma ustrezone kontrolne raztopine. Na 19. dan inkubacije smo zarodke usmrtili in kirurško odstranili jetra, vranice, Fabricijeve burze in timuse 27 zarodkom, ki smo jih okužili z *M. synoviae*; 18 zarodkom, ki smo jih okužili z APMV-1; 18 zarodkom, ki smo jih zaporedno okužili z *M. synoviae* in APMV-1 in 9 zarodkom iz posamezne kontrolne skupine (Preglednica 9). Tarčne organe (jetra, vranica, Fabricijeva burza, timus), iz katerih smo osamili RNA za analize izražanja genov z metodo qRT-PCR, smo izbrali na osnovi dovezetnosti in patoloških poškodb med okužbo z *M. synoviae* ter tudi APMV-1 pri kokoših (Beard in Hanson, 1984; Olson, 1984).

Preglednica 9: Poskusne skupine kokošjih zarodkov

Table 9: Experimental chicken embryo groups

Skupina	Mikroorganizem ¹	Odmerek ²	Kokošji zarodki ³		Starost ⁴	Vzorčenje ⁶
			Okuženi	Kontrola		
MS	<i>M. synoviae</i> WVU 1853	10 ⁸ CFU	27	9	10	19
APMV-1	APMV-1 La Sota	10 ³ EID ₅₀	18	9	17	19
MS + APMV-1	Oba	Obe	18	9	10, 17 ⁵	19

¹ Injiciran patogeni mikroorganizem.

² Količina injiciranega mikroorganizma v posamezen kokošji zarodek. V vsak zarodek smo injicirali 0,1 ml suspenzije posameznega mikroorganizma. Pri kontrolnih skupinah smo v zarodke injicirali 0,1 ml a) dopolnjenega Freyevega gojišča (MS); b) gojišča MEM (ang. Minimum Essential Medium Eagle) (APMV-1); ali c) 0,1 ml obeh (MS + APMV-1).

³ Število živih kokošjih zarodkov po injiciranju, iz katerih smo osamili organe in RNA.

⁴ Starost kokošjih zarodkov [dnevi] ob injiciranju posameznega mikroorganizma.

⁵ Zarodke v skupini MS + APMV-1 smo na 10. dan okužili z bakterijo *M. synoviae* in na 17. dan z APMV-1.

⁶ Starost zarodkov [dnevi] ob usmrtnosti in odstranitvi organov.

Okužbo z *M. synoviae* smo potrjevali z njenou ponovno izolacijo iz vzorcev alantoisnih tekočin (ALF) in horioalantoisnih membran (CAM) usmrčenih zarodkov. Po nacepitvi na agarske plošče smo kolonije *M. synoviae* identificirali z imuno-peroksidaznim testom (IIPA) po protokolu, ki sta ga opisala Benčina in Bradbury (1992), in z indirektnim točkovnim imuno-encimskim testom (ang. dot immunobinding assay, DIBA) po podobnem protokolu, kot so ga opisali Benčina in sod. (2005). Okužbo z APMV-1 smo v vzorcih ALF in CAM potrdili s testi DIBA in qRT-PCR po postopku, ki so ga opisali Wise in sod. (2004). Potrditev okužbe z APMV-1 s qRT-PCR smo opravili na Inštitutu za zdravstveno varstvo perutnine (Ljubljana, Slovenija).

4.2.2 Vzorčenje organov in osamitev RNA

Pred odstranitvijo kokošjih zarodkov iz jajčne lupine smo v sterilnih pogojih posameznemu zarodku odvzeli vzorec ALF, po odstranitvi zarodka iz jajca pa tudi vzorec CAM, ki smo ju uporabili za potrjevanje okužbe z *M. synoviae* in APMV-1. Kokošje zarodke smo nato usmrtili in jim kirurško odstranili jetra, vranico, Fabricijevu burzo in priželjc. Organe smo prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirke, ki so vsebovale po 1 ml reagenta Trizol (Invitrogen, ZDA) in jih na ledu mehansko homogenizirali z batom. Ves material, ki je prišel v stik s tkivom, je bil sterilen in ni bil kontaminiran s snovmi, ki bi lahko povzročile razpad RNA v tkivu. Homogenizirane vzorce organov smo do postopkov osamitve RNA hranili pri temperaturi –70 °C.

Celokupno RNA smo iz vzorcev organov osamili s komercialnim kompletom TRIzol Reagent with the PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, ZDA), skladno z navodili proizvajalca. Koncentracije RNA smo določili na podlagi meritev pri valovni dolžini 260 nm in čistost RNA določili z razmerjem 260 : 280 nm z napravo NanoVue (GE Healthcare, VB). Vzorce RNA iz posameznega organa smo združevali v trojnikih za vsako poskusno skupino posebej in jih s qRT-PCR analizirali v dveh tehničnih ponovitvah ($n = 6$). Vzorce RNA smo do nadaljnje uporabe hranili pri temperaturi –70 °C.

4.3 CELIČNI LINIJI CEC-32 IN HD11

4.3.1 Gojenje celic CEC-32 in HD11

Celični liniji CEC-32 (Kaaden in sod., 1982) in HD11 (Beug in sod., 1979), ki smo jih uporabili v poskusih, je prispeval prof. Bernd Kaspers (Institut za animalno fiziologijo, München, Nemčija). Transformirano celično linijo kokošjih makrofagov HD11 smo gojili v gojišču Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640) z dodanim 8 % fetalnim govejim serumom (FBS), 2-odstotnim kokošjim serumom (vse Sigma-Aldrich, Nemčija) in 0,1-odstotnim gentamicinom (Krka, Slovenija). Celično linijo kokošjih embrionalnih celic CEC-32 smo gojili v gojišču Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) z dodanim 8 % FBS, 2-odstotnim kokošjim serumom (vse Sigma-Aldrich, Nemčija) in 0,1-odstotnim gentamicinom (Krka, Slovenija). Za vse poskuse smo uporabili celice v 3–6 pasaži gojenja in jih gojili v CO₂ inkubatorju pri temperaturi 37 °C v atmosferi s 5 % CO₂.

4.3.2 Okuževanje celic CEC-32 in HD11

Odziv celičnih linij CEC-32 in HD11 na okužbo z *M. synoviae* WVU 1853 in APMV-1 La Sota smo analizirali v dveh ločenih poskusih, z različnim časovnim intervalom okuževanja. Pri prvem tipu okuževanja smo celice pred začetkom inkubacije okužili z *M. synoviae* in jih po 6 h inkubacije okužili z APMV-1. Pri drugem tipu okuževanja smo celice pred začetkom inkubacije okužili z *M. synoviae* in jih po 24 h inkubacije okužili z APMV-1. Vzorčenje smo opravili 6, 12, 24 in 48 h po okužbi celic z APMV-1 v vseh poskusnih skupinah pri obeh načinih okuževanja. Postopek okuževanja celic CEC-32 in HD11 z *M. synoviae* in APMV-1 je predstavljen v preglednici 10.

Pri poskusih, kjer smo v celicah analizirali izražanje genov in v celičnih supernatantih določali koncentracijo NO in prisotnost citokinov, smo celice CEC-32 in HD11 nasadili v gojitvene posode dva dni pred okuževanjem in jih inkubirali pri temperaturi 37 °C v atmosferi s 5 % CO₂. Pred okuževanjem smo celicam izrabljeno gojišče zamenjali s svežim, brez dodanega gentamicina. Celice smo okužili z 10⁷–10⁸ CFU *M. synoviae*, pri čemer je bila MOI 10–100 mikoplazemskih celic na eno evkariotsko celico. Količina virusa, s katerim smo okužili celice, je bila 10³ EID₅₀ (0,001 cepna doza) APMV-1 La Sota na 5 × 10⁵ celic. Pri poskusih določanja preživetja celic CEC-32 in HD11 smo celice nasadili v 96-lukenske plošče (10⁵ celic na posamezno luknjo) skupaj z ustreznimi kontrolami in jih okužili po enakem postopku. Celice v vsaki časovni točki določene poskusne skupine smo nasadili v treh ponovitvah.

Preglednica 10: Postopek okuževanja celic CEC-32 in HD11

Table 10: Infection procedure for CEC-32 and HD11 cells

Skupina	Mikroorganizem	Odmerek ¹	Okužba ob času inkubacije	
			1. tip okužbe	2. tip okužbe
MS	<i>M. synoviae</i> WVU 1853	10^7 – 10^8 CFU	0 h	0 h
APMV-1	APMV-1 La Sota	10^3 EID ₅₀	6 h	24 h
MS + APMV-1	Oba ²	Obe ²	0, 6 h	0, 24 h
Vzorčenje ³			6, 12, 24, 48 h	6, 12, 24, 48 h

¹ Količina mikroorganizma, s katerim smo okužili celice CEC-32 in HD11. MOI bakterije *M. synoviae*, je bila 10–100 mikoplazemskih celic na eno evkariontsko celico; količina APMV-1 je bila 10^3 EID₅₀ (0,001 cepna doza) na 5×10^5 celic. Pri kontrolnih skupinah smo celicam dodali ustrezni volumen a) dopolnjenega Freyevega gojišča (MS); b) fiziološke raztopine (APMV-1); ali c) obeh (MS + APMV-1).

² Celice v skupini MS + APMV-1 smo pred začetkom inkubacije okužili z *M. synoviae* in jih po 6 oziroma 24 h inkubacije okužili z APMV-1.

³ Čas vzorčenja se šteje od aplikiranja APMV-1 za vse skupine (MS, APMV-1 in MS + APMV-1).

4.3.3 Določanje preživetja celic CEC-32 in HD11

Odstotek preživetja celic CEC-32 in HD11 po okužbi z *M. synoviae* WVU 1853 in APMV-1 La Sota smo določali spektrofotometrično s komercialnim testom TOX2 (In Vitro Toxicology Assay Kit, XTT based; Sigma-Aldrich, Nemčija) po navodilih proizvajalca. V posamezno luknjo 96-lukenske plošče z 10^5 celicami oziroma ustrezno kontrolo smo dodali 20 % reagenta XTT in plošče inkubirali 3,5 h pri temperaturi 37 °C do razvoja oranžne barve v celičnem supernatantu. Po inkubaciji smo izmerili absorbance supernatantov na napravi EL808 Plate Reader (Bio-Tek, ZDA) pri valovni dolžini 450 nm, z referenčno valovno dolžino 690 nm. Število živih celic smo izračunali iz dobljenih absorbanc z uporabo standardnih krivulj. Standardni krivulji za celice CEC-32 in HD11 smo določili v preliminarnem poskusu, v katerem smo na 96-lukenske plošče nasadili redčitveno vrsto celic CEC-32 in HD11, jim dodali reagent XTT, po 3,5 h izmerili absorbanco in izrisali krivulji, ki sta prikazovali odvisnost absorbance supernatantov od števila celic. Odstotek preživetja celic CEC-32 in HD11 smo glede na število živih celic v kontrolnih skupinah izračunali iz števila živih celic v poskusnih skupinah. Analize smo opravili z dvojnimi tehničnimi ponovitvami znotraj vsake izmed treh ponovitev posamezne poskusne skupine ($n = 6$) v dveh ločenih poskusih. Za določanje statistično značilnih sprememb v odstotku preživetja med poskusnimi skupinami smo uporabili Studentov t-test. Podatki so bili statistično značilno različni, če je bila vrednost $p < 0,05$.

4.3.4 Vzorčenje celičnih supernatantov, celic in osamitev RNA

Pred določanjem koncentracije NO in prisotnosti citokinov v supernatantih celic CEC-32 in HD11 smo celične supernatante odstranili iz gojitvenih posod ter jih centrifugirali 10

minut na 1000 rpm. S tem smo iz suspenzije odstranili celične ostanke, ki bi lahko motili analizo. Polovico posameznega vzorca supernatanta smo uporabili za merjenje koncentracije NO, drugo polovico pa shranili pri temperaturi -70°C za naknadne analize določanja prisotnosti citokinov. Test za določanje koncentracije NO smo izvedli v roku 1–2 h po vzorčenju in vzorce supernatantov do analize hrаниli pri temperaturi 4°C . Koncentracijo NO smo merili le v supernatantih celic HD11.

Celice CEC-32 in HD11 smo po odstranitvi supernatantov sprali s sterilnim fosfatnim pufrom (PBS; pH 7,4; 1000 ml pufra je vsebovalo 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na₂HPO₄; 0,23 g KH₂PO₄; miliQ vodo), jih odstranili s površine gojitvenih posod s plastičnimi strgali in resuspendirali v PBS. Resuspendirane celice smo centrifugirali 10 min na 900 rpm. Iz celičnih usedlin smo celokupno RNA osamili s komercialnim kompletom PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, ZDA) po navodilih proizvajalca. Koncentracije RNA smo določili na podlagi meritev pri valovni dolžini 260 nm in čistost RNA določili z razmerjem 260 : 280 nm z napravo NanoVue (GE Healthcare, VB). RNA celic, ki so bile nasajene v treh ponovitvah, smo s qRT-PCR analizirali v dveh ponovitvah ($n = 6$).

4.3.5 Določanje NO v celičnih supernatantih

Koncentracije NO v supernatantih celic HD11 smo določali posredno s spektrofotometričnim merjenjem nitrita s komercialnim Griessovim testom (Promega, ZDA) po navodilih proizvajalca. Dvakrat po 50 µl posameznega supernatanta smo prenesli v 96-lukensko ploščo z ravnim dnom, vzorcem dodali 50 µl sulfanilamida in plošče inkubirali 10 minut v temi. Vzorcem smo nato dodali 50 µl reagenta NED in plošče ponovno inkubirali 10 minut v temi do razvoja vijolične barve. Absorbanci supernatantov na 96-ploščah smo izmerili na napravi EL808 Plate Reader (Bio-Tek, ZDA) pri valovni dolžini 550 nm. Iz dobljenih absorbanci smo izračunali koncentracije nitrita v supernatantih s pomočjo predhodno pripravljene standardne krivulje, ki smo jo določili s serijsko redčitvijo nitritnega standarda (Sigma-Aldrich, Nemčija) in z merjenjem absorbanci redčin standarda po dodatku Griessovega reagenta. Analize smo opravili z dvojnimi tehničnimi ponovitvami znotraj vsake izmed treh ponovitev posamezne poskusne skupine ($n = 6$), v dveh ločenih poskusih. Statistično značilne spremembe med povprečji absorbanci posameznih poskusnih skupin smo določali s Studentovim t-testom ($p < 0,05$).

4.3.6 Določanje vnetnih citokinov v celičnih supernatantih

V celičnih supernatantih smo določali vsebnost citokinov z encimsko imunskim testom DIBA po podobnem protokolu, kot so ga opisali Benčina in sod. (2005). Pred analizo smo vzorce odtalili in jih dobro resuspendirali. Immobilon-P membrano (Millipore, ZDA), na

katero smo nanesli vzorce, smo za nekaj sekund potopili v 100-odstotni metanol in jo nato 5 minut spirali v destilirani vodi. Na membrano smo nanesli po 3 µl posameznega vzorca supernatanta. Ko je membrana vpila nanešene vzorce, smo jo inkubirali 1 h v 0,5 % Tween PBS (TPBS; reagent Tween 20 v PBS). Membrano smo nato inkubirali 1 h v kunčjih imunskih serumih proti kokošjim IL-1 β , IL-6, IFN- γ in IL-18, redčenih v razmerju 1 : 100, in jo po inkubaciji 3-krat po 10 minut spirali v 0,05 % TPBS. Po spiranju smo membrano inkubirali 45 minut v sekundarnih kozjih (anti-kunčja Ab) protitelesih, konjugiranih s hrenovo peroksidazo (HRP), redčenih v razmerju 1 : 1000 (A-0545, Sigma-Aldrich, Nemčija) v PBS. Po inkubaciji smo membrano spirali 2-krat po 10 minut v 0,05 % TPBS. Po zadnjem spiranju v 0,05 % TPBS smo membrano spirali 10 minut v PBS. Na membrano smo nanesli substrat TrueBlueTM Peroxidase Substrate (KPL, ZDA) in počakali, da se je ozadje rahloobarvalo. Membrano smo nato prenesli v vodo in s tem ustavili reakcijo, jo posušili in fotografirali.

4.3.7 Analiza invazivnosti bakterije *M. synoviae* v celice CEC-32 in HD11 ob prisotnosti APMV-1

Invazivnost *M. synoviae* WVU 1853 v celice CEC-32 in HD11 ob prisotnosti APMV-1 La Sota smo z nekaterimi spremembami analizirali po protokolu, ki so ga opisali Dušanić in sod. (2009). Celice CEC-32 in HD11 smo nasadili v 24-lukenske plošče (5×10^5 celic na posamezno luknjo) in jih gojili v gojišču brez prisotnih antibiotikov. Pred okuževanjem smo gojišče odstranili, celice okužili s 100 µl kulture *M. synoviae*, ki so vsebovali 10^7 – 10^8 CFU, in okužene celice prekrili z 1 ml dopolnjenega Freyevega gojišča. Celicam, ki smo jih okužili z obema patogenoma, smo dodali 20 µl suspenzije APMV-1, pripravljene v sterilni fiziološki raztopini (0,001 enota cepiva z 10^3 EID₅₀). Celicam CEC-32 in HD11 v kontrolnih skupinah smo odstranili gojišče in jim dodali 1 ml Freyevega medija, kontrolam sočasno okuženih celic pa tudi 20 µl sterilne fiziološke raztopine. Okužene celice in njihove kontrole smo inkubirali 24 h pri temperaturi 37–38 °C in v atmosferi s 5 % CO₂. Po končani inkubaciji smo celice postrgali s plastičnim strgalom in vsebino posamezne luknje 24-lukenske plošče centrifugirali 10 minut na 300×g. Celične usedline smo resuspendirali v 1 ml dopolnjenega Freyevega gojišča z dodanim 500 µg/ml gentamicinom ali pa v 1 ml dopolnjenega Freyevega gojišča brez dodanega gentamicina in celice inkubirali 4 h pri temperaturi 37–38 °C v atmosferi s 5 % CO₂. Med inkubacijo smo celice 8-krat resuspendirali. Po končani inkubaciji smo celice 3-krat sprali v sterilnem PBS, z vmesnimi 10-minutnimi centrifugiranjem na 300×g. Usedline celic, ki smo jih okužili z *M. synoviae* in tretirali z gentamicinom, smo resuspendirali v 150 µl dopolnjenega Freyevega gojišča, okužene celice, ki jih nismo tretirali z gentamicinom, pa v 1,5 ml dopolnjenega Freyevega gojišča; 50 µl posamezne celične suspenzije smo nanesli na agarske plošče. Neokužene skupine celic, ki smo jih inkubirali v dopolnjenem Freyevem mediju, so nam služile kot negativne kontrole. Agarske plošče smo inkubirali 5–7 dni pri temperaturi 37–

38 °C v atmosferi s 5 % CO₂, prešteli smo tudi kolonije *M. synoviae* in na podlagi njihovega števila določili relativno frekvenco invazivnosti (RIF) *M. synoviae* v celice CEC-32 in HD11. RIF smo izračunali kot razmerje med številom mikoplazemskih kolonij po tretiranju z gentamicinom, glede na število mikoplazemskih kolonij v celičnih vzorcih, ki niso bili izpostavljeni gentamicinu (Enačba 1).

$$\text{RIF [\%]} = \frac{\text{n kolonij (po tretiranju z gentamicinom)}}{\text{n kolonij (brez tretiranja z gentamicinom)}} \times 100 \% \quad \dots(1)$$

Poskus smo opravili v treh ponovitvah v dveh ločenih poskusih (n = 6) in rezultate predstavili kot povprečja teh ponovitev s standardnimi napakami (SE). Statistično značilne spremembe med RIF pri celicah, ki so bile okužene le z *M. synoviae*, in sočasno okuženimi celicami smo določili s Studentovim t-testom ($p < 0,05$).

4.4 ANALIZA IZRAŽANJA GENOV S KVANTITATIVNO VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO V REALNEM ČASU (qRT-PCR)

4.4.1 Obdelava RNA z DNazo I in obratna transkripcija

Vzorce RNA, ki smo jih osamili iz organov kokošjih zarodkov in celic CEC-32 ter HD11, smo obdelali z DNazo I (EN0523, Fermentas, Kanada), s čimer smo odstranili kontaminirajočo genomsko DNA. Kvaliteto RNA pred in po obdelavi z DNazo I smo preverili na 1 % agaroznih gelih z agarozno gelsko elektroforezo. Obratno transkripcijo vzorcev RNA v cDNA smo naredili s komercialnim kompletom High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (4374967, Applied Biosystems, ZDA), skladno z navodili proizvajalca. Koncentracije RNA smo uskladili med vzorci v reakcijskih mešanicah za DNazo I pred obratno transkripcijo. Vstopne koncentracije RNA v reakciji obratne transkripcije so bile enake za vse vzorce, kokošjih zarodkov in celic. Količina RNA posameznega vzorca, ki smo jo uporabili v reakcijah obratne transkripcije, je bila 100 ng s čistostjo nad 2,1 (razmerje 260 : 280 nm). Koncentracija cDNA vsakega izmed vzorcev po obratni transkripciji je bila 5 ng/µl. Vzorce cDNA smo do analiz qRT-PCR hranili pri temperaturi –20 °C.

4.4.2 Načrtovanje oligonukleotidnih začetnikov

Specifične oligonukleotidne začetnike za pomnoževanje tarčnih in referenčnih genov v organih kokošjih zarodkov, celicah CEC-32 in HD11 smo načrtovali z računalniškim programom IDT PrimerQuestSM Software (Integrated DNA Technologies (IDT), Belgija). Podatke o zaporedjih oligonukleotidnih začetnikov za gene IL-1β, IL-6, IL-21, YWHAZ, RPL4 in HPRT1 smo pridobili iz objavljenih študij in njihovo sintezo naročili pri podjetju

IDT (Belgia). Gene za citokine in kemokine smo izbrali na podlagi preliminarnih poskusov in neobjavljenih podatkov analiz izražanja genov z mikromrežami v kokošjih celicah, pretežno makrofagih, po okužbi z *M. synoviae* in glede na imunski odziv kokoši po okužbi z lentogenimi sevi APMV-1 (Kapczynski in sod., 2013). Predvidevali smo, da pri kokošjih zarodkih in celicah CEC-32 ter HD11 okužba z *M. synoviae* WVU 1853 in APMV-1 La Sota vpliva na spremembe v izražanju izbranih genov. Specifičnost uporabljenih oligonukleotidnih začetnikov smo potrdili z računalniškim programom BLAST na portalu NCBI. Značilnosti oligonukleotidnih začetnikov, ki smo jih uporabili pri analizah izražanja genov, so prikazane v preglednici 11.

Preglednica 11: Značilnosti oligonukleotidnih začetnikov, ki smo jih uporabili za pomnoževanje genov pri analizah qRT-PCR.

Table 11: Quantitative real-time PCR primer specifications.

Gen	Zaporedje oligonukleotidnega začetnika	Velikost ⁵	Oznaka v podatkovni bazi ⁶	T _m ⁷	Program ⁹
TGF-β4 ¹	F: 5' TGGCGCTGTACAACCAACACAA 3' R: 5' CACATTCCGGCCCACGTAGTAAAT 3'	104	JQ423909.1 (IDT) ⁸	62	D: 15 s, A: 1 min
LITAF ¹	F: 5' TCCCTTCTGAGGCATTGGAAGC 3' R: 5' AAGAGCTGATGGCAGAGGCAGAA 3'	90	NM_204267.1 (IDT)	65	D: 15 s, A: 1 min
iNOS ¹	F: 5' AGGCAACCAGGCCAGAATTAGTC 3' R: 5' TGCCAATAGCCACCTTCAGTACA 3'	109	D85422.1 (IDT)	60	D: 15 s, A: 1 min
IFN-α ¹	F: 5' TCCAAGACAACGATTACAGCGCCT 3' R: 5' GATAAATAGGACAAGGGTGGGAG 3'	139	NM_205427.1 (IDT)	55	D: 20 s, A: 30 s, E: 30 s
IFN-γ ¹	F: 5' TGATGGCGTGAAGAAGGTG 3' R: 5' GACTGGCTCTTTCTCTTTG 3'	150	NM_205149.1 (IDT)	55	D: 20 s, A: 30 s, E: 30 s
IL-1β ¹	F: 5' ATGACCAAAC TGCTGCGGAG 3' R: 5' GTCGCTGTCA GCAAAGTCCC 3'	51	NM_204524.1 (Lavrič in sod., 2008)	58	D: 20 s, A: 30 s, E: 30 s
IL-6 ¹	F: 5' CAGGACGAGATGTGCAAGAAG 3' R: 5' CCCTCACGGTCTCTCCATA 3'	421	NM_204628.1 (Lavrič in sod., 2008)	56	D: 15 s, A: 20 s, E: 30 s
IL-12 p40 ¹	F: 5' CCCAAGACCTGGAGCACACCGA 3' R: 5' TAGCGATCCCTGGCCTGCACA 3'	167	FJ788636.1 (IDT)	63	D: 20 s, A: 30 s, E: 30 s
IL-18 ¹	F: 5' AGGAGGTGAAATCTGGCAGTGGAA 3' R: 5' TCTACCTGGACGCTGAATGCAACA 3'	100	AJ277865.1 (IDT)	62	D: 15 s, A: 1 min
IL-2 ¹	F: 5' TCCC GTGGCTAACTAAC TCTGCTGT 3' R: 5' TGAGCCCGTAGGTTACAGAAAGGA 3'	114	AF000631.1 (IDT)	62	D: 15 s, A: 1 min
IL-21 ¹	F: 5' CAAC TTCA CAAAAGCAATGAAAT 3' R: 5' ATCCATCCCCAGGGTTTTCT 3'	120	NM_001024835.1 (Shaughnessy in sod., 2011)	54	D: 15 s, A: 20 s, E: 30 s
IL-8 ¹	F: 5' AACGCACAATGGGTCTCCCTGTTCA 3' R: 5' AGCTTGCCGTTCATGGTTAGGAGT 3'	117	AJ009800.1 (IDT)	62	D: 15 s, A: 1 min
IL-16 ¹	F: 5' ACTGCAGAACGCCATTGCAACCTCC 3' R: 5' ATCATCTCACAGACTGGGTGGCA 3'	104	AJ508678.1 (IDT)	62	D: 15 s, A: 1 min
XCL1 ¹	F: 5' ACCCTGAACAGAAATGGGTGCA GT 3' R: 5' TGCTGCCAAGGACAGGATTATCT 3'	89	AF006742.1 (IDT)	60	D: 15 s, A: 1 min
CXCL14 ¹	F: 5' CAAATGCTCAAGGAAAGGGCCGAA 3' R: 5' TCGTCCACAGGGTCACGATAATCA 3'	113	NM_204712.2 (IDT)	60	D: 15 s, A: 1 min
MIP-1β (CCL4) ¹	F: 5' CCCTCATGCTGGTGTGTTCAT 3' R: 5' CATCCCTGGTGCATCAGTT CAGTT 3'	119	AJ243034.1 (IDT)	62	D: 15 s, A: 1 min
GAPDH ²	F: 5' ATGGCATCCAAGGAGTGAGC 3' R: 5' AACAAAGGGCTCTGCTTCCC 3'	66	NM_204305.1 (IDT)	57	D: 15 s, A: 20 s, E: 20 s
YWHAZ ²	F: 5' TCCACCACGACAGACCA 3' R: 5' CCAGCCTTCCAAC TTCC 3'	358	NM_001031343.1 (Yue in sod., 2010)	60	D: 15 s, A: 1 min
RPL4 ²	F: 5' TTATGCCATCTGTTCTG 3' R: 5' GCGATTCTCATCTTACCC 3'	235	NM_001007479.1 (Yue in sod., 2010)	62	D: 15 s, A: 1 min
HPRT1 ²	F: 5' ACTGGCTGCTTCTGTG 3' R: 5' GGTTGGGTTGTGCTGTT 3'	245	NM_204848.1 (Yue in sod., 2010)	60	D: 15 s, A: 1 min

TGF-β4: transformirajoči rastni faktor-β4; LITAF: z lipopolisaharidi induciran faktor tumorske nekroze - α faktor; iNOS: inducibilna sintaza dušikovega oksida; IFN-α: interferon-α; IFN-γ: interferon-γ; IL-1β:

interlevkin-1 β ; IL-6: interlevkin-6; IL-12 p40: interlevkin-12 podenota p40; IL-18: interlevkin-18; IL-2: interlevkin-2; IL-21: interlevkin-21; IL-8: interlevkin-8 (CXCLi2); IL-16: interlevkin-16; XCL1: limfotaktin; CXCL14: kemokin CXCL14; MIP-1 β (CCL4): makrofagni vnetni protein-1 β ; GAPDH: gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza; YWHAZ: tirozin 3-monooksigenaza/triptofan 5-monooksigenaza aktivirajoči protein, zeta polipeptid; RPL4: ribosomalni protein L4; HPRT1: hipoksantin fosforiboziltransferaza 1.

¹ Tarčni gen; ²referenčni gen; ³smiseln začetni oligonukleotidni začetnik; ⁴protismiseln končni oligonukleotidni začetnik; ⁵velikost produkta PCR [bp]; ⁶oznaka zaporedja gena v podatkovni zbirki GenBank in vir na osnovi katerega smo dali sintetizirati oligonukleotidna začetnika; ⁷talilna temperatura oligonukleotidnih začetnikov [$^{\circ}$ C].

⁸ Oligonukleotidne začetnike smo načrtovali s prosto dostopnim računalniškim programom Integrated DNA Technologies (IDT) PrimerQuestSM Software.

⁹ Program qRT-PCR, ki smo ga uporabili za pomnoževanje genov. Uporabili smo dvo- ali tristopenjski qRT-PCR program (D: denaturacija pri 95 $^{\circ}$ C; A: prileganje pri T_m ; E: sinteza pri 72 $^{\circ}$ C).

4.4.3 qRT-PCR

Relativno kvantifikacijo izražanja genov s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qRT-PCR) smo izvedli skladno s priporočenimi smernicami in navodili za izvedbo in objavo podatkov pridobljenih z metodo qRT-PCR (ang. The minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments, MIQE), ki so jih objavili Bustin in sod. (2009). Pri vseh analizah qRT-PCR smo uporabili reagent SYBR Green I, ki je vseboval pasivno referenčno barvilo ROX. Poskuse smo opravili v 8-kratnih stripih Mx3000P z optičnimi pokrovčki (401428 in 401425, Agilent Technologies, VB) na napravi Mx3000P QPCR System (Stratagene, ZDA) v 20 μ l reakcijskih mešanicah in na napravi ViiATM 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, ZDA) v 384-lukenjskih ploščah MicroAmp[®] Optical 384-Well Reaction Plate with Barcode (4309849, Invitrogen, ZDA) z optičnimi prevlekami MicroAmp[®] Optical Adhesive Film (4311971, Invitrogen, ZDA) v 10 μ l reakcijskih mešanicah. Posamezna 20 μ l reakcijska mešanica je vsebovala 10 μ l reagenta FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche Diagnostics GmbH, Nemčija), 250 nM posameznega oligonukleotidnega začetnika, ultra čisto vodo za PCR in 2 μ l cDNA redčene v razmerju 1 : 2 (5 ng). Količino posameznega reagenta smo pri 10 μ l reakcijskih mešanicah ustrezno prilagodili glede na končni volumen, da so bili v enakem razmerju kot pri 20 μ l reakcijskih mešanicah. Vse vzorce smo analizirali v dveh ponovitvah in v vsako analizo vključili kontrolo brez cDNA (ang. no template control, NTC). Temperaturni parametri reakcij qRT-PCR so vsebovali začetno 10-minutno inkubacijo pri 95 $^{\circ}$ C, ki ji je sledilo 40 ciklov določenih temperaturnih programov, ki so bili značilni za posamezne pare oligonukleotidnih začetnikov (Preglednica 11). Po vsaki PCR smo dodali dodaten temperaturni program (inkubacija pri 95 $^{\circ}$ C 1 minuto, pri talilni temperaturi oligonukleotidnih začetnikov (T_m) 30 s in pri 95 $^{\circ}$ C 30 s) za analizo talilne krivulje. Dobljene podatke smo analizirali z računalniškim programom MxPro-Mx3000P software (Stratagene, ZDA) oziroma ViiATM 7 Software (Applied Biosystems, ZDA), z

avtomatično nastavljenou bazno linijo in ročno nastavljenim pragom fluorescence, s katerim smo določili vrednosti ciklov kvantifikacije (ang. quantification cycle, Cq).

Za določanje učinkovitosti pomnoževanja qRT-PCR (E), linearne dinamične območja, meje detekcije (ang. limit of detection, LOD) in meje kvantifikacije (ang. limit of quantification, LOQ) smo naredili standardne krivulje za vsak analizirani tarčni in referenčni gen. Lastnosti standardnih krivulj so prikazane v prilogah A in B. Sedem serijskih redčin referenčnega vzorca sestavljenega iz alikvotov cDNA vseh analiziranih vzorcev smo izrazili z relativnimi enotami. Redčine referenčnega vzorca so vsebovale 10–10.000 relativnih kopij cDNA. Standardne krivulje smo naredili z izrisom odvisnosti vrednosti Cq od logaritmiranih vrednosti relativnih kopij cDNA v referenčnem vzorcu (Livak, 1997; Pfaffl, 2001). Pri relativni kvantifikaciji izražanja genov za citokine in kemokine smo uporabili več referenčnih genov kokoši, s katerimi smo povečali točnost normalizacije, skladno s smernicami, ki so jih opisali Vandesompele in sod. (2002). Iz vrednosti Cq referenčnih genov za GAPDH, YWHAZ, RPL4 in HPRT1 smo izračunali geometrijska povprečja za vsak vzorec. Geometrijska povprečja vrednosti Cq referenčnih genov so predstavljala endogene reference (ER). Vrednosti Cq ER in vrednosti E smo v nadaljevanju uporabili za normalizacijo in izračun podatkov.

4.4.4 Analiza izražanja genov in izračun podatkov

Relativno izražanje genov smo izračunali na osnovi vrednosti E-tarčnih genov za citokine in kemokine in ER. Vrednosti E smo izračunali iz naklonov standardnih krivulj z enačbo 2 po postopku, ki ga je opisal Rasmussen (2001).

$$E = 10^{\frac{-1}{\text{naklon standardne krivulje}}} \quad \dots(2)$$

Spremembe v relativni ravni mRNA smo izračunali z enačbo 3. Razlike med vrednostmi Cq (ΔCq) smo izračunali za tarčne gene in ER z odštevanjem povprečnih vrednosti Cq ($n = 6$) vzorcev od povprečnih vrednosti Cq kontrol z enačbama 4 in 5 po postopku, ki ga je opisal Pfaffl (2001).

$$\text{Sprememba v relativni ravni mRNA} = \frac{E(\text{tarčni gen})^{\Delta Cq(\text{tarčni gen})}}{E(\text{ER})^{\Delta Cq(\text{ER})}} \quad \dots(3)$$

$$\Delta Cq(\text{tarčni gen}) = (Cq_{\text{Kontrola}})_{\text{tarčni gen}} - (Cq_{\text{vzorec}})_{\text{tarčni gen}} \quad \dots(4)$$

$$\Delta Cq(\text{ER}) = (Cq_{\text{Kontrola}})_{\text{ER}} - (Cq_{\text{vzorec}})_{\text{ER}} \quad \dots(5)$$

Cq vzorcev smo pridobili z analizo cDNA iz zarodkov in celic po okužbi z *M. synoviae*, APMV-1 in po zaporedni okužbi z obema patogenoma. Cq kontrol smo določili po analizi cDNA zarodkov in celic v kontrolnih skupinah. Kot kontrolo smo uporabili tudi vrednosti Cq zaporedno okuženih zarodkov, na katere smo normalizirali izražanje genov v zarodkih okuženih z *M. synoviae* in APMV-1 (Poglavlje 5.1.2.5, Preglednica 13). Statistično primerjavo med vzorci različnih poskusnih skupin smo določali s Studentovim t-testom. Razlike med vzorci z vrednostjo $p < 0,05$ smo upoštevali kot statistično značilne.

4.5 ANALIZA NUKLEAZNE AKTIVNOSTI BAKTERIJE *M. synoviae*

4.5.1 Osamitev DNA za teste nukleazne aktivnosti

Substratno dsDNA, ki smo jo uporabili pri testih nukleazne aktivnosti *M. synoviae*, smo osamili iz celic CEC-32. Celice smo gojili do 80 % konfluence in jih s plastičnimi strgali odstranili iz površine gojitvenih posod ter prenesli v 15 ml centrifugirke. Po 10-minutnem centrifugiranju pri 900 rpm smo iz celičnih usedlin osamili DNA s komercialnim kompletom DNeasy® Blood & Tissue Kit (69506, Qiagen, Nemčija) po navodilih proizvajalca. Kvaliteto osamljene DNA smo preverili na 1 % agaroznih gelih z agarozno elektroforezo. Koncentracije DNA smo izmerili z napravo NanoVue (GE Healthcare, VB). Vzorce DNA smo do analiz NA hranili pri temperaturi -20°C .

4.5.2 Priprava celičnih frakcij *M. synoviae* WVU 1853

Nukleazno aktivnosti (NA) smo preverjali na vzorcih celic, membran in citoplazem *M. synoviae* WVU 1853 in tekočega gojišča, v katerem smo gojili *M. synoviae*. Kulturo *M. synoviae* smo gojili do pozne logaritemsko faze rasti, celice posedli s 15 minutnim centrifugiranjem na $20.000 \times g$, jih sprali s sterilnim PBS (pH 7,4) in resuspendirali v nukleaznem pufru (PBS s 5 mM MgCl₂ in 5 mM CaCl₂; pH 7,4). Vzorec tekočega dopolnjjenega Freyevega gojišča, v katerem smo gojili kulturo *M. synoviae*, smo pred testi NA filtrirali skozi filter z 0,22 µm porami (Acrodisc Syringe Filter, Pall, ZDA). Membrane *M. synoviae* smo ločili od citoplazem z ozmotsko lizo po protokolu, ki ga je opisal Razin (1983), in pridobljeno membransko frakcijo resuspendirali v nukleaznem pufru. Vzorce celic, membran, citoplazem in tekočega gojišča *M. synoviae* smo pri testih NA uporabili direktno ali pa smo jih shranili pri temperaturi -20°C za naknadne analize. Celice *M. synoviae* smo inkubirali tudi v gojišču brez proteinov z večjo molekulsko maso 2–4 h pri temperaturi 4 in 37°C . Mikoplazemske celice smo po končani inkubaciji odstranili s 15-minutnim centrifugiranjem na $20.000 \times g$ in supernatante uporabili pri testih NA in proteinskih analizah.

4.5.3 Analiza nukleazne aktivnosti *M. synoviae* WVU 1853

Teste NA z vzorci *M. synoviae* smo izvedli v reakcijskih mešanicah z volumnom 20 µl. Analizo razgradnje DNA smo opravili z agarozno gelsko elektroforezo na 1 % gelih. Agarozne gele smo pripravili iz agaroze (SeaKem, LE, Biozym) in 0,5 × elektroforetskega pufrja TBE s pH 8,3 (10 × raztopina pufrja TBE je vsebovala 0,5 M Tris bazo (Sigma-Aldrich, Nemčija); 0,5 M borno kislino in 10 mM EDTA.). Pred vlivanjem v kalup smo agaroznim gelom dodali 0,5 µg/ml barvila SYBR Safe DNA gel stain (S33102, Invitrogen, ZDA) ali 0,5 µg/ml etidijevega bromida (EtBr). Fragmente DNA smo vizualizirali v agaroznih gelih pri svetlobi valovne dolžine 312 nm. Na gel smo nanesli mešanico 5 µl posameznega vzorca in 1 µl nanašalnega barvila (0,25 % bromfenol modro; 0,25 % ksilen cianol; 30 % glicerol). Za določanje dolžine fragmentov DNA smo uporabili molekularna označevalca GeneRuler 100 bp DNA Ladder (SM0241, Thermo Scientific, ZDA) in GeneRuler 1 kbp DNA Ladder (SM0312, Thermo Scientific, ZDA). Vse teste NA smo ponovili v vsaj treh ločenih poskusih.

Pri testih NA smo 10 µl posameznega vzorca *M. synoviae*, ki je ustrezal $1,3 \times 10^7$ CFU, inkubirali z 10 µl dsDNA (300 ng), ki smo jo osamili iz celic CEC-32. Inkubacija vzorcev je trajala 15–240 minut pri temperaturi 37 °C. Razgradnjo DNA smo ustavili s 3-minutnim prekuhavanjem reakcijskih mešanic pri temperaturi 95 °C. Pri določanju vpliva pH na celično NA smo celice *M. synoviae* resuspendirali v nukleaznem pufrju s pH-vrednostmi med 3 in 11. Analizo NA smo izvedli po zgoraj opisanem postopku. Razgradnjo DNA smo ustavili po 120 minutah inkubacije. Vpliv prisotnosti kalcijevih ionov (Ca^{2+}) na celično NA *M. synoviae* smo analizirali s 30–240 minutno inkubacijo dsDNA in celic *M. synoviae*, ki so bile resuspendirane v različnih nukleaznih pufrih: 1) PBS s 5 mM MgCl_2 in 5 mM CaCl_2 in 2) PBS s 5 mM MgCl_2 . Analizo NA smo izvedli z 10^8 CFU *M. synoviae* po zgoraj opisanem postopku. Vse kontrolne skupine pri analizah NA so vsebovale 10 µl dsDNA (300 ng) in 10 µl nukleaznega pufrja (PBS, 5 mM MgCl_2 , 5 mM CaCl_2). Pri analizi razgradnje genomske DNA celic CEC-32 po okužbi z *M. synoviae* WVU 1853 smo 5×10^6 celic CEC-32 okužili z 10^8 – 10^9 CFU *M. synoviae*. MOI je bila 10–100 mikoplazemskeih celic na evkarijontsko celico. Okužene celice in njihove kontrole smo inkubirali pri temperaturi 37 °C v atmosferi s 5 % CO_2 . Genomsko DNA smo iz celic CEC-32 osamili po 24 in 48 h inkubaciji s komercialnim kompletom ApoTarget™ Quick Apoptotic DNA Ladder Detection Kit (KHO1021, Invitrogen, ZDA), skladno z navodili proizvajalca. Vzorce DNA smo shranili pri temperaturi –20 °C do analize z agarozno gelsko elektroforezo.

4.5.3.1 Analiza zunajcelične nukleazne aktivnosti *M. synoviae* WVU 1853

Pri testih NA gojišča brez proteinov z večjo molekulsko maso, po 2–4 h inkubaciji kulture *M. synoviae*, smo 10 µl filtriranega gojišča inkubirali z 10 µl dsDNA (300 ng), 30 minut pri temperaturi 37 °C. V teste NA smo vključili dve negativni kontroli, ki sta vsebovali dsDNA in elucijski pufer iz komercialnega kompleta za osamitev DNA oziroma dsDNA in gojišče brez proteinov z večjo molekulsko maso. Pozitivna kontrola je vsebovala dsDNA in DNazo I (EN0523, Fermentas, Kanada), ki smo ju inkubirali 15 minut pri temperaturi 37 °C. Reakcije razgradnje DNA smo ustavili s 3-minutnim prekuhavanjem pri temperaturi 95 °C.

Proteinske profile gojišča (brez proteinov z večjo molekulsko maso po inkubaciji *M. synoviae*) smo pridobili z elektroforezo v poliakrilamidnem gelu v prisotnosti NaDS (NaDS-PAGE), ki jo je opisal Laemmli (1970). Ustrezne redčine supernatantov gojišča smo pripravili z nereducirajočim nanašalnim pufrom in proteinske vzorce ločili s 4-odstotnim nabijalnim ter 10-odstotnim ločevalnim poliakrilamidnim gelom. Elektroforezo smo izvedli v napravi Mighty small s pogoji elektroforeze 3 h na 100 V oziroma do izstopa frontnega barvila iz gela. Po končani elektroforezi smo gel odstranili iz naprave in ga pobarvali z barvilm Coomassie Brilliant Blue R-250 (B0149-25G, Sigma-Aldrich, Nemčija). Za določanje molekulske mase ločenih proteinov smo uporabili molekularni označevalec PageRuler Prestained Protein Ladder (10–170 kDa) (SM0671, Thermo Scientific, ZDA).

Frakcije sproščenih mikoplazemskih proteinov z različno molekulsko maso smo pridobili z ultrafiltracijo vzorcev gojišča (brez proteinov z večjo molekulsko maso po inkubaciji *M. synoviae*) v kolonah z membranami, ki so prepuščale proteine velikosti 50, 30 in 10 kDa (Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices K50, K30 in K10; EMD Millipore, Nemčija). Po ultrafiltraciji smo skoncentrirane proteine resuspendirali v nukleaznem pufru (PBS, 5 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂; pH 7,4) in analizirali njihovo NA. Topnost nukleaz v supernatantih smo analizirali z ločevanjem hidrofilnih in hidrofobnih frakcij gojišča z reagentom Triton X-114 po postopku, ki so ga opisali Benčina in sod. (1999). Hidrofilno frakcijo supernatanta z identificirano NA smo nadaljnje frakcionirali z 20-, 40-, 60- in 80-% raztopino amonijevega sulfata (A5479, Sigma-Aldrich, Nemčija) po navodilih proizvajalca. Proteinskim frakcijam smo pred testi NA odstranili amonijev sulfat s centrifugiranjem skozi kolone K10 Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices (EMD Millipore, Nemčija) in jih resuspendirali v nukleaznem pufru. Teste NA s pridobljenimi proteinskimi frakcijami smo izvedli s 3-urno inkubacijo z dsDNA po zgoraj opisanem postopku.

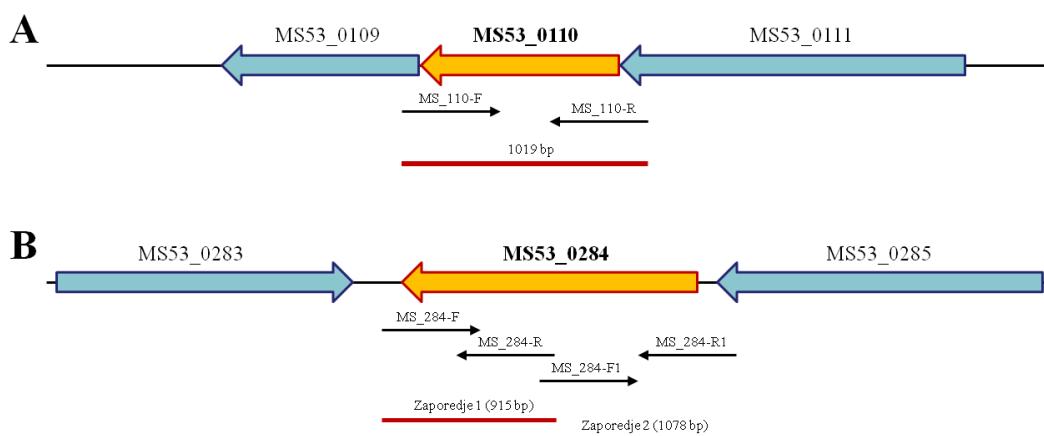
Proteinske frakcije z identificirano NA poobarjanju z amonijevim sulfatom smo analizirali s komercialnimi geli NuPAGE 4–12 % Bis-Tris Protein Gels (NP0335PK2, Novex, ZDA)

po navodilih proizvajalca in gele pobrvali z barvilom Coomassie Brilliant Blue R-250 (B0149-25G, Sigma-Aldrich, Nemčija). Izbrane proteinske lise smo iz gelov izrezali s skalpelom in jih poslali na analizo z MALDI-TOF masno spektrometrijo na inštitutu Jožef Stefan, Oddelku za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo B1 (Ljubljana, Slovenija).

4.5.4 Določanje in primerjava nukleotidnih zaporedij nukleaz MS53_0110 in MS53_0284 med sevi bakterije *M. synoviae* WVU 1853, ULB 9122, ULB 02/T6 in 53

Kulture sevov *M. synoviae* WVU 1853, ULB 9122 in ULB 02/T6 smo gojili do pozne logaritemske faze rasti, jih posedli z 20-minutnim centrifugiranjem na $20.000 \times g$, jih sprali s sterilnim PBS (pH 7,4) in iz celičnih usedlin osamili genomsko DNA s komercialnim kompletom RTP Spin Bacteria DNA Mini Kit (1033200200, Invitex, Nemčija). Uspešnost osamitve DNA smo preverili na 1 % agaroznih gelih z agarozno elektroforezo in koncentracije DNA izmerili z napravo NanoVue (GE Healthcare, VB). Vzorce genomske DNA smo do uporabe hranili pri temperaturi -20°C .

Odseke DNA, ki so vsebovali zaporedja genov za nukleazi MS53_0110 in MS53_0284, smo pomnožili s PCR v 30 μl reakcijskih mešanicah z napravo Gene Amp PCR System 2720 (Applied Biosystems, ZDA). Shema prileganja oligonukleotidnih začetnikov v genomu seva *M. synoviae* 53 in pomnoženi odseki DNA so prikazani na sliki 3.



Slika 3: Shema prileganja oligonukleotidnih začetnikov na gena nukleaz MS53_0110 (A) in MS53_0284 (B) v genomu seva *M. synoviae* 53 in predvidena velikost PCR produktov (rdeče črte). Velikosti genov niso podane v točnih razmerjih.

Figure 3: Schematic representation of specific primer annealing on genes for nucleases MS52_0110 (A) and MS53_0284 (B) in the *M. synoviae* strain 53 genome. PCR products are represented as red lines. Genes are not drawn to actual scale.

Značilnosti uporabljenih oligonukleotidnih začetnikov so prikazane v preglednici 12. Oligonukleotidne začetnike smo načrtovali s prosto dostopnim računalniškim programom IDT PrimerQuest Software, na osnovi znanega nukleotidnega zaporedja genoma *M. synoviae* 53 (oznaka zaporedja genoma v podatkovni zbirki GenBank je AE017245). Sintezo oligonukleotidnih začetnikov je opravilo podjetje IDT (Belgija).

Preglednica 12: Specifični oligonukleotidni začetniki za pomnoževanje genov predvidenih nukleaz MS53_0110 in MS53_0284 pri *M. synoviae*

Table 12: Specific primers used for amplification of *M. synoviae* genes of predicted nucleases MS53_0110 and MS53_0284

Oligonukleotidni začetnik	Zaporedje (od 5' proti 3')	Velikost produkta PCR [bp]	Vezavno mesto ¹	T _m ²
MS_110-F	GGCGGCATTGTCCAGTTGGATT	1019	114.532–114.555	60
MS_110-R	TTTGATCCTCCAAGAGCTGGCTT		115.551–115.528	
MS_284-F	TGCTGTGGTTATCCAATGCCCTACA	915	311.578–311.601	57
MS_284-R	GCAACAAACAGCATCAAGTATTCCAC		312.493–312.469	
MS_284-F1	TGGTGAAGCCACTATTGAATCGC	1078	312.374–312.396	57
MS_284-R1	GCTGCAAATGGAACACAAGTTCAC		313.452–313.428	

Oligonukleotidne začetnike smo uporabili za določanje nukleotidnega zaporedja genov nukleaz MS53_0110 in MS53_0284 pri sevih *M. synoviae* WVU 1853, ULB 9122 in ULB 02/T6.

¹ Vezavno mesto oligonukleotidnega začetnika v genomu *M. synoviae*

² Talilna temperatura oligonukleotidnih začetnikov [°C]

Posamezna reakcijska mešanica PCR je vsebovala 3 µl polimeraznega pufra 10X Taq Buffer; 2,4 µl 25 mM MgCl₂; 0,75 U Taq DNA polimeraze (vse EP0402, Thermo Scientific, ZDA); 1,5 µl mešanice dNTP (20 mM), 500 nM posameznega oligonukleotidnega začetnika, ultra čisto vodo za PCR in 1,5 µl DNA (10 ng). Program PCR je vseboval začetno 5-minutno denaturacijo pri temperaturi 95 °C, ki ji je sledilo 35 ciklov 30 s denaturacije pri 95 °C, 30 s prileganja pri 57 °C oziroma 60 °C in 75 s sinteze pri 72 °C. Po 35 ciklih sta sledili še zaključna 10-minutna sinteza pri 72 °C in ohlajanje pri 4 °C. Produkte PCR smo analizirali z agarozno gelsko elektroforezo v 1 % agaroznih gelih in jih iz gelov osamili s komercialnim kompletom PureLink Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (K220001, Invitrogen, ZDA), skladno z navodili proizvajalca. Čiščenje in določitev nukleotidnega zaporedja PCR pomnoženih odsekov DNA je opravilo podjetje Macrogen Inc (Južna Koreja).

Dobljena nukleotidna zaporedja smo sestavili in poravnali z računalniškima programoma Sequencher 4.8 (Gene Codes Corporation, ZDA) in ClustalW (Chenna in sod., 2003). Nukleotidnim zaporedjem smo s prosto dostopnim spletnim pretvornikom EndMemo določili vsebnost G + C in jih s programi na spletnem portalu ExPASy (Bioinformatics Resource Portal) prevedli v aminokislinska zaporedja, jim določili predvideno molekulsko

maso in izoelektrične točke (pI). Predvidene transmembranske domene nukleaz smo določili na podlagi aminokislinskih zaporedij z računalniškim programom MEMSAT-SVM (The PSIPRED Protein Structure Prediction Server).

4.5.5 Analiza nukleazne aktivnosti *M. synoviae* WVU 1853 ob prisotnosti APMV-1 La Sota

Pri analizah NA *M. synoviae* WVU 1853 ob prisotnosti APMV-1 La Sota smo teste izvedli v reakcijskih mešanicah z volumnom 30 µl. Pri testih NA *M. synoviae* smo 10 µl suspenzije celic *M. synoviae* ($1,3 \times 10^7$ CFU) v nukleaznem pufru (PBS, 5 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂; pH 7,4) inkubirali z 10 µl dsDNA (300 ng) in 10 µl nukleaznega pufra. Pri testih NA APMV-1 smo 10 µl APMV-1 v fiziološki raztopini (10^3 EID₅₀) inkubirali z 10 µl dsDNA in 10 µl nukleaznega pufra. NA *M. synoviae* ob prisotnosti APMV-1 smo analizirali z inkubacijo 10 µl celične suspenzije *M. synoviae* v nukleaznem pufru, 10 µl APMV-1 v fiziološki raztopini in 10 µl dsDNA. Kontrolne skupine so vsebovale 10 µl dsDNA in 20 µl nukleaznega pufra. Inkubacija vzorcev je trajala 15–240 minut pri temperaturi 37 °C. Razgradnjo DNA smo ustavili s 3-minutnim prekuhavanjem reakcijskih mešanic pri temperaturi 95 °C. Analizo razgradnje DNA smo opravili z agarozno gelsko elektroforezo na 1-odstotnih gelih. Za določanje dolžine fragmentov DNA smo uporabili molekularni označevalec GeneRuler 1 kbp DNA Ladder (SM0312, Thermo Scientific, ZDA).

4.6 ANALIZA INTERAKCIJ MED BAKTERIJO *M. synoviae* WVU 1853 IN APMV-1 La Sota V POGOJIH *in vitro*

4.6.1 Analiza razgradnje proteinov APMV-1

Pri analizi vpliva *M. synoviae* WVU 1853 na razgradnjo proteinov APMV-1 La Sota smo teste izvedli v reakcijskih mešanicah z volumnom 100 µl. Pri testih smo inkubirali 10^9 CFU *M. synoviae* skupaj s 95 µl suspenzije APMV-1 v fiziološki raztopini (9×10^3 EID₅₀). Inkubacija je trajala 24 h pri temperaturi 37 °C. Po končani inkubaciji smo celice *M. synoviae* v suspenziji posedli s 15-minutnim centrifugiranjem na 15.500 rpm in supernatante ločili od celične usedline. Kontrolne vzorce *M. synoviae* (10^9 CFU), APMV-1 (9×10^3 EID₅₀), vzorce celičnih usedlin (10^9 CFU) in supernatantov smo v reducirajočih pogojih analizirali z NaDS-PAGE po enakem postopku kot je opisan v poglavju 3.5.3.1. Proteine smo z električnim tokom prenesli iz gela na Immobilon-P membrano (Millipore, ZDA) z napravo Multiphor II Electrophoresis System (LKB Pharmacia, Švedska). Po prenosu proteinov smo membrano 1 uro blokirali v 0,5 % TPBS in proteine APMV-1 detektirali z 1-urno inkubacijo s kokošjimi imunskimi serumi proti APMV-1 redčenimi v

razmerju 1 : 100, ki jih je prispeval doc. dr. Uroš Krapež (Inštitut za zdravstveno varstvo perutnine, Ljubljana, Slovenija). Po inkubaciji smo membrano 3-krat po 10 minut spiralni v 0,05 % TPBS in jo nato inkubirali 45 minut v kunčjih sekundarnih protitelesih, konjugiranih s hrenovo peroksidazo (HRP), redčenih v razmerju 1 : 1000 (A-9046, Sigma-Aldrich, Nemčija) v PBS. Membrano smo nato spirali 2-krat po 10 minut v 0,05 % TPBS in 10 minut v PBS. Proteine APMV-1 na sprani membrani smo vizualizirali z nanosom substrata TrueBlue™ Peroxidase Substrate (KPL, ZDA).

5 REZULTATI

5.1 IZRAŽANJE GENOV V ORGANIH KOKOŠJIH ZARODKOV PO POSAMEZNI IN ZAPOREDNI OKUŽBI Z BAKTERIJO *M. synoviae* WVU 1853 IN APMV-1 La Sota

5.1.1 Potrditev okužbe kokošjih zarodkov

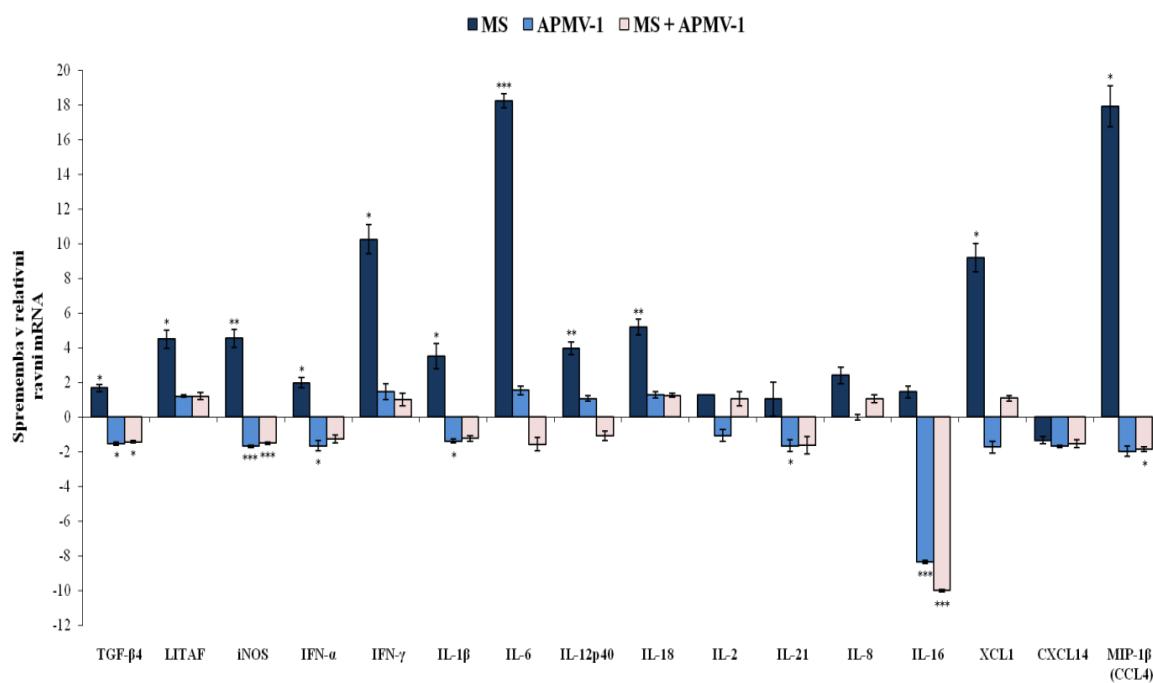
Za analizo molekularnega odziva kokošjih zarodkov na posamični in sočasni tip okužbe z bakterijo *M. synoviae* WVU 1853 in APMV-1 La Sota smo SPF kokošje zarodke na 10. dan inkubacije okužili z *M. synoviae* in na 17. dan inkubacije z APMV-1. Pri posamičnih okužbah smo zarodkom v opisanem časovnem intervalu v alantoisno votlino injicirali pripravek posameznega mikroorganizma, pri zaporednih okužbah pa pripravka obeh mikroorganizmov (Poglavlje 4.2.1, Preglednica 9). Na 19. dan inkubacije smo zarodke usmrtili in odstranili jetra, vranice, Fabricijeve burze in timuse, iz katerih smo osamili RNA za analize izražanja genov z metodo qRT-PCR. Pri vzorčenju organov smo iz okuženih zarodkov odvzeli tudi vzorce ALF in CAM, v katerih smo potrdili okužbo z enim oziroma z obema patogenoma. Okužbo z *M. synoviae* smo s pozitivnimi kulturami potrdili v vzorcih ALF in CAM iz večine ($> 95\%$) okuženih zarodkov. Okužbo z APMV-1 smo potrdili v vzorcih ALF pri vseh inokuliranih zarodkih. Določili smo tudi odstotek preživetja zarodkov pri posameznem tipu okužbe. Preživetje zarodkov po inokulaciji *M. synoviae* in APMV-1 je bilo nad 80 %. Po naselitvi CAM se lahko okužba z *M. synoviae* preko krvnega sistema razširi na številne organe kokošjega zarodka (MacOwan in sod., 1984), zaradi česar smo sklepali, da je okužba povzročila spremembe v izražanju analiziranih genov tudi v izbranih organih. Enako smo predpostavili za okužbo z APMV-1.

5.1.2 Izražanje genov za citokine in kemokine v kokošjih zarodkih po okužbi z bakterijo *M. synoviae* in APMV-1

5.1.2.1 Izražanje genov za citokine in kemokine v jetrih

Izražanje genov za citokine in kemokine v jetrih kokošjih zarodkov po okužbi z *M. synoviae* WVU 1853 in APMV-1 La Sota je prikazano na sliki 4. Vrednosti so izražene kot sprememba v relativni ravni mRNA glede na neokužene zarodke. Okužba kokošjih zarodkov z *M. synoviae* je povzročila v jetrih statistično značilno močno povišanje relativne ravni mRNA za IFN- γ (10-kratno), IL-6 (18-kratno), XCL1 (9-kratno) in MIP-1 β (18-kratno), v primerjavi s kontrolno skupino neokuženih zarodkov. Ostali analizirani geni so imeli od 2- do 5-krat povišano izražanje. Okužba zarodkov z APMV-1 je povzročila znižano izražanje mRNA genov za TGF- β 4, iNOS, IFN- α , IL-1 β , IL-21 in IL-16. Gen za IL-16 je imel statistično značilno najnižje izražanje (8-krat) v primerjavi s kontrolno

skupino ($p < 0,0001$). Pri zaporedno okuženih zarodkih je imel gen za IL-16 podoben nivo znižanja izražanja kot pri zarodkih okuženih z APMV-1, in sicer 10-krat ($p < 0,0001$). Geni za TGF- β 4, iNOS in MIP-1 β (CCL4) so imeli statistično značilno znižano izražanje za približno 2-krat. Zaporedna okužba kokošjih zarodkov ni vplivala na statistično značilnost izražanja ostalih genov. Spremembe v relativni ravni mRNA ostalih analiziranih genov v jetrih zaporedno okuženih kokošjih zarodkov ni bilo statistično značilno.

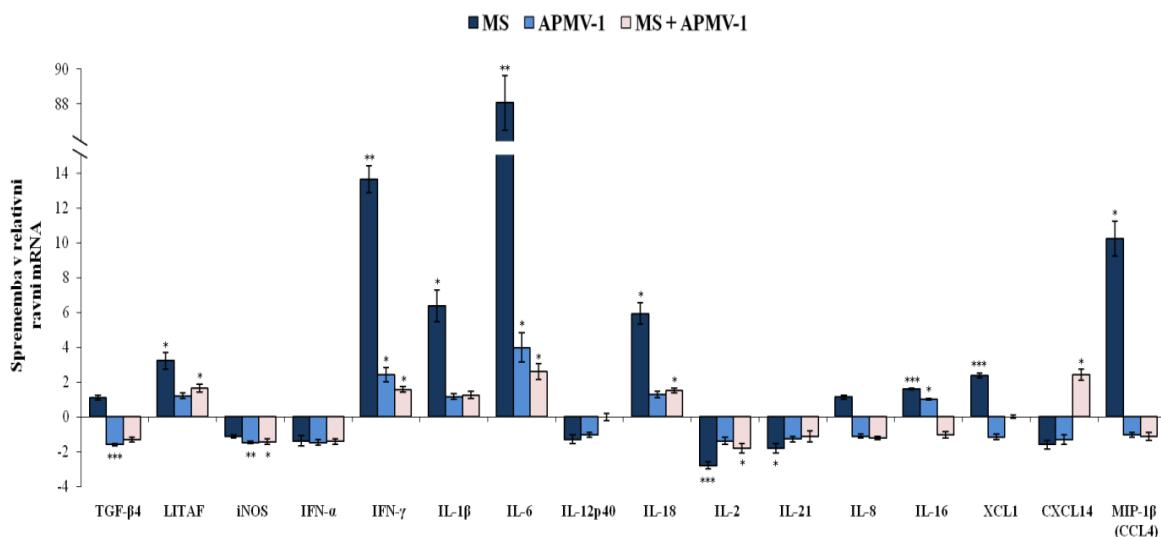


Slika 4: Relativne ravni mRNA za citokine in kemokine v jetrih kokošjih zarodkov po okužbi z bakterijo *M. synoviae* (MS), APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma (MS + APMV-1). Stolpci prikazujejo povprečja s standardno napako (SE); $n = 6$. Izražanje vsakega gena smo primerjali z izražanjem v kontrolni skupini kokošjih zarodkov in ga statistično ovrednotili s Studentovim t-testom. Statistično značilni rezultati so imeli vrednost $p < 0,05$ ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$). Stolpcii nad absciso predstavljajo povišano izražanje, stolpcii pod absciso pa znižano izražanje genov glede na kontrolo. Geni z vrednostjo izražanja 0, so bili enako izraženi kot v kontrolni skupini.

Figure 4: Expression of cytokine and chemokine genes in liver after *M. synoviae* (MS), APMV-1 (APMV-1), and consecutive *M. synoviae*-APMV-1 (MS + APMV-1) infection of chicken embryos. Bars represent the means \pm SE ($n = 6$). Expression of each gene was compared to the control (mock-injected embryos) and statistically evaluated by using unpaired Student's t-test. A p value of < 0.05 was considered statistically significant ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$). Columns above 0 represent upregulation and columns under 0 represent downregulation of gene expression. Genes with value 0 had the same expression as in the control.

5.1.2.2 Izražanje genov za citokine in kemokine v vranici

Izražanje genov za citokine in kemokine v vranicah kokošjih zarodkov po okužbi z *M. synoviae* WVU 1853 in APMV-1 La Sota je prikazano na sliki 5. Okužba z *M. synoviae* je povzročila v vranicah kokošjih zarodkov statistično značilno povišano relativno raven mRNA genov za IFN- γ (13,6-krat), IL-1 β (6,4-krat), IL-6 (88-krat), IL-18 (6-krat) in MIP-1 β (CCL4, 10-krat). Povišano je bilo tudi izražanje genov za IL-16 (1,6-krat), LITAF (3,2-krat) in XCL1 (2,4-krat), vendar je bilo njihovo izražanje manj intenzivno. Povišano izražanje gena za IL-6 ($p < 0,05$), ki ga je povzročila okužba z *M. synoviae* v vranici, je bila višja kot pri drugih organih in drugih tipih okužbe. Po okužbi z *M. synoviae* sta imela statistično značilno znižano izražanje v vranici gena za IL-2 (3-krat) in IL-21 (2-krat). V vranicah kokošjih zarodkov, okuženih z APMV-1, so imeli statistično značilno povišano izražanje geni za IL-16 (1,03-krat), IFN- γ (2,4-krat) in IL-6 (4-krat). Nivo mRNA za IFN- γ in IL-6 je bil znatno nižji kot pri okužbi z *M. synoviae*. Statistično značilno 2-kratno znižano izražanje mRNA pri zarodkih okuženih z APMV-1 sta imela gena za TGF- β 4 in iNOS. Pri zaporedno okuženih kokošjih zarodkih z *M. synoviae* in APMV-1 smo določili statistično značilno 2-kratno znižanje izražanja genov za iNOS in IL-2. Geni za LITAF, IL-18 in CXCL14 so imeli povišano relativno raven mRNA, vendar ni bila večja od 3-kratnega povišanja. Izražanje mRNA genov za IFN- γ in IL-6 je bilo podobno pri vseh treh tipih okužbe, najvišje izražanje obeh genov pa smo določili pri posamični okužbi z *M. synoviae*.

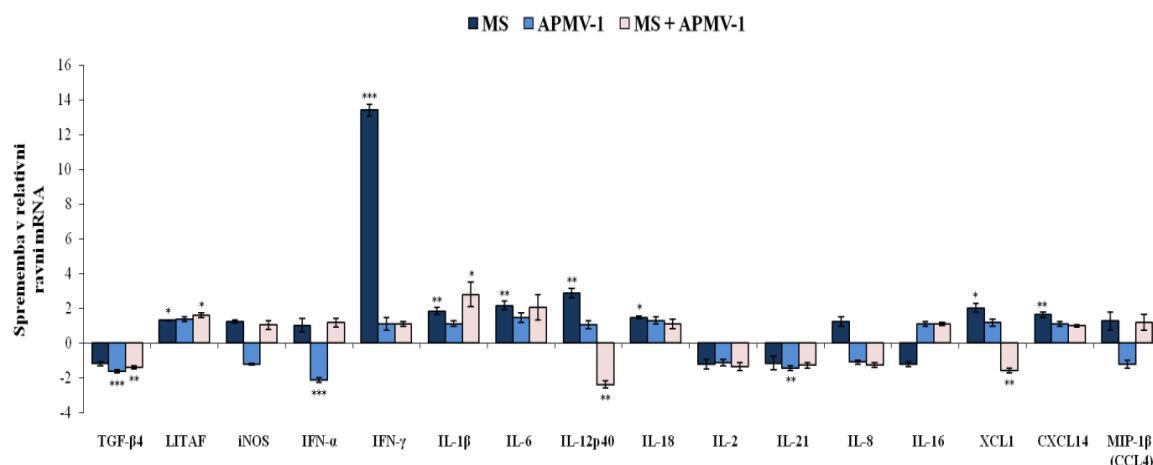


Slika 5: Relativne ravni mRNA za citokine in kemokine v vranicah kokošjih zarodkov po okužbi z bakterijo *M. synoviae* (MS), APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma (MS + APMV-1). Stolpci prikazujejo povprečja s standardno napako (SE); n = 6. Izražanje vsakega gena smo primerjali z izražanjem v kontrolni skupini kokošjih zarodkov in ga statistično ovrednotili s Studentovim t-testom. Statistično značilni rezultati so imeli vrednost $p < 0,05$ ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$). Stolci nad absciso predstavljajo povišano izražanje, stolci pod absciso pa znižano izražanje genov glede na kontrolo. Geni z vrednostjo izražanja 0, so bili enako izraženi kot v kontrolni skupini.

Figure 5: Expression of cytokine and chemokine genes in the spleen after *M. synoviae* (MS), APMV-1 (APMV-1), and consecutive *M. synoviae*-APMV-1 (MS + APMV-1) infection of chicken embryos. Bars represent the means \pm SE (n = 6). Expression of each gene was compared to the control (mock-injected embryos) and statistically evaluated by using unpaired Student's t-test. A p value of < 0.05 was considered statistically significant ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$). Columns above 0 represent upregulation and columns under 0 represent downregulation of gene expression. Genes with value 0 had the same expression as in the control.

5.1.2.3 Izražanje genov za citokine in kemokine v Fabricijevi burzi

Izražanje genov za citokine in kemokine v Fabricijevih burzah kokošjih zarodkov po okužbi z *M. synoviae* WVU 1853 in APMV-1 La Sota je prikazano na sliki 6. V Fabricijevih burzah kokošjih zarodkov okuženih z *M. synoviae* smo določili statistično značilno povišano izražanje genov za LITAF, IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-12 p40, IL-18, XCL1 in CXCL14. Gen za IFN- γ je imel mRNA povišano 13-krat ($p < 0,05$) glede na izražanje v kontrolni skupini in je bil najvišje izražen gen v Fabricijevi burzi. Ostali geni so imeli 3-krat manjše izražanje. Pri zarodkih, okuženih z APMV-1, so imeli statistično značilno znižano izražanje glede na kontrolo geni za TGF- β 4 (1,9-krat), IFN- α (2,2-krat) in IL-12 p40 (1,5-krat). Noben analiziran gen ni imel statistično značilnega povišanega izražanja po okužbi z APMV-1. Pri zaporedno okuženih zarodkih smo določili statistično značilno šibko povišano izražanje genov za LITAF (1,5-krat) in IL-1 β (3-krat). Ostali geni s statistično značilnim spremenjenim izražanjem mRNA glede na kontrolno skupino so bili TGF- β 4, IL-12 p40 in XCL1, ki so imeli znižano izražanje med 1,8- in 3-krat.



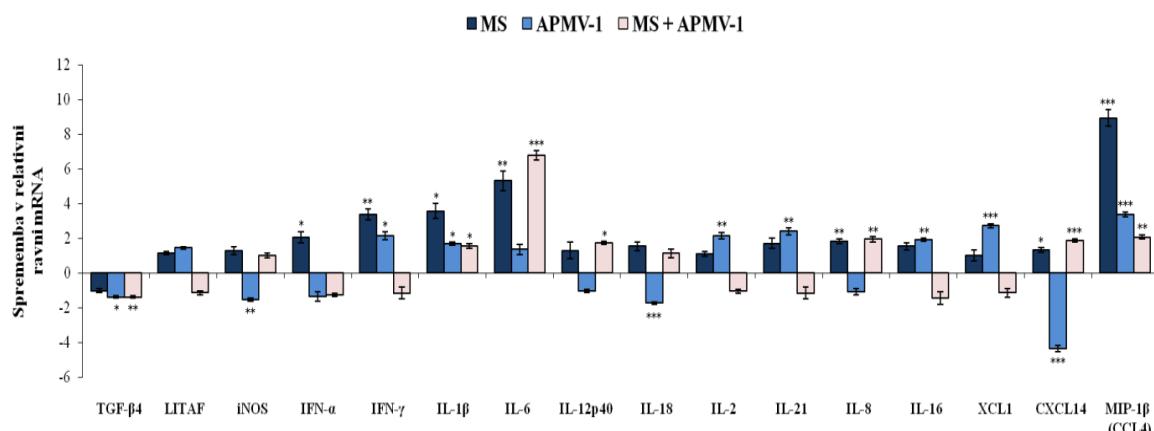
Slika 6: Relativne ravni mRNA za citokine in kemokine v Fabricijevih burzah kokošjih zarodkov po okužbi z bakterijo *M. synoviae* (MS), APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma (MS + APMV-1). Stolpci prikazujejo povprečja s standardno napako (SE); n = 6. Izražanje vsakega gena smo primerjali z izražanjem v kontrolni skupini kokošjih zarodkov in ga statistično ovrednotili s Studentovim t-testom. Statistično značilni rezultati so imeli vrednost $p < 0,05$ ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$). Stolci nad absciso predstavljajo povišano izražanje, stolci pod absciso pa znižano izražanje genov glede na kontrolo. Geni z vrednostjo izražanja 0, so bili enako izraženi kot v kontrolni skupini.

Figure 6: Expression of cytokine and chemokine genes in the bursa of Fabricius after *M. synoviae* (MS), APMV-1 (APMV-1), and consecutive *M. synoviae*-APMV-1 (MS + APMV-1) infection of chicken embryos. Bars represent the means \pm SE (n = 6). Expression of each gene was compared to the control (mock-injected embryos) and statistically evaluated by using unpaired Student's t-test. A p value of < 0.05 was considered statistically significant ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$). Columns above 0 represent upregulation and columns under 0 represent downregulation of gene expression. Genes with value 0 had the same expression as in the control.

5.1.2.4 Izražanje genov za citokine in kemokine v timusu

Izražanje genov za citokine in kemokine v timusih kokošjih zarodkov po okužbi z *M. synoviae* WVU 1853 in APMV-1 La Sota je prikazano na sliki 7. Po okužbi z *M. synoviae* smo v timusih kokošjih zarodkov določili statistično značilno povišano izražanje genov za IFN- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, CXCL14 in MIP-1 β (CCL4). Gena za IL-6 in MIP-1 β sta imela povišano izražanje za 5,3-krat ($p < 0,005$) oziroma 9-krat ($p < 0,001$). Ostali geni so imeli povišano izražanje, vendar manjšo od 4-krat. Po okužbi zarodkov z APMV-1 so imeli geni za TGF- β 4, iNOS, IL-18 in CXCL14 statistično značilno znižano relativno raven mRNA. Gen za CXCL14 je bil najbolj utišan gen, s 4-kratnim znižanjem izražanja glede na kontrolno skupino ($p < 0,00003$). Geni za IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-21, IL-16, XCL1 in MIP-1 β (CCL4) so imeli povišano izražanje, ki pa ni preseglo 3-kratne spremembe v relativni ravni mRNA. Geni za IL-1 β , IL-6, IL-12 p40, IL-8, CXCL14 in MIP-1 β (CCL4) so imeli statistično značilno povišano izražanje v timusih pri zaporedno okuženih kokošjih zarodkih. Najvišje izražanje je imel gen za IL-6 s 6,8-kratno povišano relativno ravnijo

mRNA ($p < 0,00001$). Edini gen s statistično značilno znižanim izražanjem pri zaporedno okuženih zarodkih je bil TGF- β 4.



Slika 7: Relativne ravni mRNA za citokine in kemokine v timusu kokošijh zarodkov po okužbi z bakterijo *M. synoviae* (MS), APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma (MS + APMV-1). Stolpci prikazujejo povprečja s standardno napako (SE); n = 6. Izražanje vsakega gena smo primerjali z izražanjem v kontrolni skupini kokošijh zarodkov in ga statistično ovrednotili s Studentovim t-testom. Statistično značilni rezultati so imeli vrednost $p < 0,05$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Stolci nad absciso predstavljajo povišano izražanje, stolci pod absciso pa znižano izražanje genov glede na kontrolo. Geni z vrednostjo izražanja 0 so bili enako izraženi kot v kontrolni skupini.

Figure 7: Expression of cytokine and chemokine genes in the thymus after *M. synoviae* (MS), APMV-1 (APMV-1), and consecutive *M. synoviae*-APMV-1 (MS + APMV-1) infection of chicken embryos. Bars represent the means \pm SE (n = 6). Expression of each gene was compared to the control (mock-injected embryos) and statistically evaluated by using unpaired Student's t-test. A p value of $< 0,05$ was considered statistically significant (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Columns above 0 represent upregulation and columns under 0 represent downregulation of gene expression. Genes with value 0 had the same expression as in the control.

5.1.2.5 Razlike v izražanju genov za citokine in kemokine med posamičnim ter zaporednim tipom okužbe

Učinek zaporedne okužbe na izražanje genov za citokine in kemokine v organih kokošijh zarodkov smo določili z normalizacijo podatkov posamičnih tipov okužbe na podatke zaporednega tipa okužbe. Relativne ravni mRNA genov pri zarodkih, okuženih z *M. synoviae* in APMV-1, smo normalizirali in primerjali z relativnimi ravnimi mRNA pri zaporedno okuženih zarodkih. Podatki o statistično značilnih spremembah v izražanju genov so predstavljeni v preglednici 13. V zaporedno okuženih zarodkih je imela v vseh analiziranih organih večina genov znižano izražanje v primerjavi z okužbo z *M. synoviae*. Naši rezultati kažejo na to, da inokulacija APMV-1 v kokošje zarodke, ki so predhodno okuženi z *M. synoviae*, zniža izražanje genov za citokine in kemokine, katerih izražanje stimulira okužba z *M. synoviae*. Izjemni sta bila gena za CXCL14 v vranici in timusu ter IL-16 v Fabricijevi burzi, ki sta imela statistično značilno zvišano relativno raven mRNA. Pri

primerjanju okužbe z APMV-1 z zaporedno okužbo zarodkov smo v vseh organih opazili manj statistično značilnih sprememb v izražanju genov kot pri primerjanju z zarodki okuženimi z *M. synoviae*. Izjema je bilo izražanje genov v timusu. Geni s statistično značilno najvišjo relativno ravnijo mRNA po zaporedni okužbi so bili CXCL14 v vranici (3,1-krat; $p < 0,001$) in timusu (8,3-krat; $p < 0,00001$) in IL-6 v timusu (5-krat; $p < 0,0008$), pri primerjavi z okužbo z APMV-1.

Preglednica 13: Primerjava med relativno ravnijo mRNA za citokine in kemokine v organih zaporedno okuženih (MS + APMV-1) in posamično okuženih kokošjih zarodkih (MS ali APMV-1) z *M. synoviae* WVU 1853 in APMV-1 La Sota.

Table 13: Comparison of cytokine and chemokine gene expression between consecutive *M. synoviae*-APMV-1-infected chicken embryos (MS + APMV-1) and *M. synoviae* WVU 1853 (MS) or APMV-1 La Sota (APMV-1)-infected embryos.

Gen	Jetra		Vranica		Fabricijeva burza		Timus	
	MS + APMV-1	APMV-1 ¹	MS	APMV-1	MS	APMV-1	MS	APMV-1
TGF-β4	- 2,64***	NS	- 1,43*	+ 1,25*	NS	NS	- 1,36**	NS
LITAF	- 3,72**	NS	NS	NS	NS	NS	- 1,30*	- 1,64***
iNOS	- 6,83***	NS	NS	NS	NS	NS	NS	+ 1,56**
IFN-α	- 2,51**	NS	NS	NS	NS	+ 2,50***	- 2,55**	NS
IFN-γ	- 10,10**	NS	- 8,63**	NS	NS	NS	- 3,87**	- 2,45**
IL-1β	- 4,34*	NS	- 5,08*	NS	NS	+ 2,50*	- 2,27*	NS
IL-6	- 28,65***	NS	- 33,75*	NS	NS	NS	NS	+ 5,00***
IL-12 p40	- 4,21**	NS	NS	NS	- 6,91***	- 2,55**	NS	+ 1,79***
IL-18	- 4,15**	NS	- 3,91*	NS	NS	NS	NS	+ 1,96**
IL-2	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	- 2,25*
IL-21	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	- 2,78**
IL-8	- 2,26*	NS	- 1,37**	NS	- 1,55*	NS	NS	+ 2,08**
IL-16	- 15,29***	- 1,21*	- 1,63**	NS	+ 1,33*	NS	NS	- 2,78**
XCL1	- 8,47**	+ 1,89*	- 2,39***	NS	- 3,24***	- 1,91**	NS	- 3,09***
CXCL14	NS	NS	+ 3,85***	+ 3,13**	- 1,62**	NS	+ 1,41**	+ 8,33***
MIP-1β	- 33,05**	NS	- 11,45**	NS	NS	NS	- 4,30**	- 1,63**

Izražanje genov v vsakem organu smo normalizirali na izražanje v zaporedno okuženih kokošjih zarodkih in ga statistično ovrednotili s Studentovim t-testom. Statistično značilne spremembe v izražanju so imele vrednost $p < 0,05$. Vrednosti v tabeli predstavljajo spremembe v relativni ravni mRNA glede na zaporedno okužbo.

NS: ni statistično značilne razlike v izražanju; +: povišano izražanje; -: znižano izražanje

¹ Sprememba v izražanju mRNA v primerjavi z MS (zarodki okuženi z *M. synoviae* WVU 1853)

² Sprememba v izražanju mRNA v primerjavi z APMV-1 (zarodki okuženi z APMV-1 La Sota)

* Statistično značilna sprememba v relativni ravni mRNA glede na zaporedno okužene kokošje zarodke z *M. synoviae* WVU 1853 in APMV-1 La Sota (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

5.2 ODZIV CELIČNIH LINIJ CEC-32 IN HD11 NA POSAMEZNE TER ZAPOREDNE OKUŽBE Z BAKTERIJO *M. synoviae* WVU 1853 IN APMV-1 La Sota

Odziv celičnih linij CEC-32 in HD11 na okužbo z bakterijo *M. synoviae* in APMV-1 smo analizirali v dveh ločenih poskusih, z različnim časovnim intervalom okuževanja. Pri prvem poskusu smo celice okužili z *M. synoviae* in jih po 6 h inkubacije okužili še z APMV-1 La Sota. Vzorce smo pobirali 6, 12, 24 in 48 h po okužbi z APMV-1. S tem poskusom smo želeli preveriti, kakšen je odziv okuženih celic na relativno kratek časovni interval med apliciranjem obeh patogenov, kjer je ob apliciranju APMV-1 odziv celic na okužbo z *M. synoviae* še trajal. Pri drugem poskusu smo celice okužili z *M. synoviae* in jih po 24 h inkubacije okužili z APMV-1 La Sota. Vzorce smo pobirali 6, 12, 24 in 48 h po okužbi z APMV-1. S tem poskusom smo želeli preveriti, kakšen je odziv okuženih celic na daljši časovni interval med apliciranjem obeh patogenov in skušali simulirati pogoje, pri katerih molekularni odziv celic na okužbo z *M. synoviae* ne traja več oziroma ni tako intenziven kot v začetni fazи okužbe.

5.2.1 Dinamika preživetja celic po okužbi z bakterijo *M. synoviae* in APMV-1

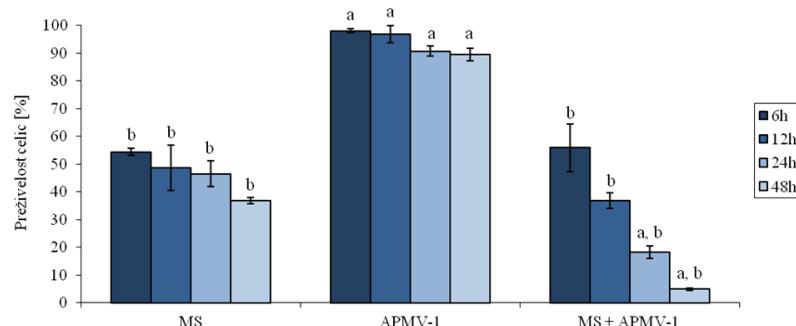
5.2.1.1 Dinamika preživetja celic CEC-32 in HD11 po okužbi z bakterijo *M. synoviae*, APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma s 6-urnim zamikom apliciranja

Dinamika preživetja celic CEC-32 in HD11 po okužbi z *M. synoviae*, APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma po 6-urnem zamiku apliciranja APMV-1 je prikazana na sliki 8. Šest ur po okužbi z *M. synoviae* smo določili 55 % živih celic CEC-32, 48 h po okužbi pa pod 40 %. Pri okužbi z APMV-1 je bilo preživetje celic CEC-32 nad 90 % tekom celotne 48-urne inkubacije. Odstotek preživetja celic CEC-32, ki so bile okužene z *M. synoviae*, je bil statistično značilno nižji kot pri celicah, ki smo jih okužili z APMV-1, pri vseh časih inkubacije. Zaporedna okužba celic CEC-32 s 6-urnim časovnim razmikom se je statistično značilno razlikovala od okužbe celic z *M. synoviae* po 24 in 48 h. Zaporedno okužene celice so imele po 24 in 48 h inkubacije statistično značilno znižano viabilnost v primerjavi s celicami, ki smo jih okužili z *M. synoviae*. Zaporedna okužba s 6-urnim zamikom apliciranja APMV-1 na celice okužene z *M. synoviae* je imela očiten sinergistični učinek na znižanje preživetja celic CEC-32 24 in 48 h po okužbi.

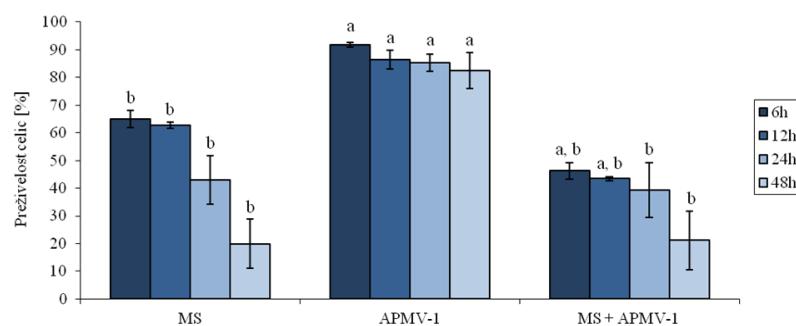
Preživetje celic HD11 je bilo 6 h po okužbi z *M. synoviae* 65 % in se je po 48 h spustilo na 18 % (Slika 8). Preživetje celic po okužbi z APMV-1 je bilo po 48 h 80 % in statistično značilno višje od preživetja celic okuženih z *M. synoviae* in zaporedno okuženih celic. Nasprotno kot pri celicah CEC-32 smo pri zaporedno okuženih celicah HD11 določili statistično značilno znižan odstotek živih celic v prvih 12 h po okužbi v primerjavi s

celicami okuženimi z *M. synoviae*. Statistično značilnih razlik v preživetju celic HD11 med zaporedno okužbo in okužbo z *M. synoviae* po 24 in 48 h ni bilo.

CEC-32



HD11



Slika 8: Odstotek preživetja celic CEC-32 in HD11 po okužbi z bakterijo *M. synoviae*, APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma s 6-urnim zamikom apliciranja. Prikazani so odstotki živih celic v različnih intervalih po okužbi. Stolci prikazujejo povprečja s standardno napako (SE) iz dveh ločenih poskusov. Podatke o preživelosti celic med posameznim tipom okužbe (MS, APMV-1 in MS + APMV-1) smo statistično ovrednotili s Studentovim t-testom. Statistično značilni rezultati so imeli vrednost $p < 0,05$ (a: statistična značilnost glede na okužbo z bakterijo *M. synoviae*; b: statistična značilnost glede na okužbo z APMV-1).

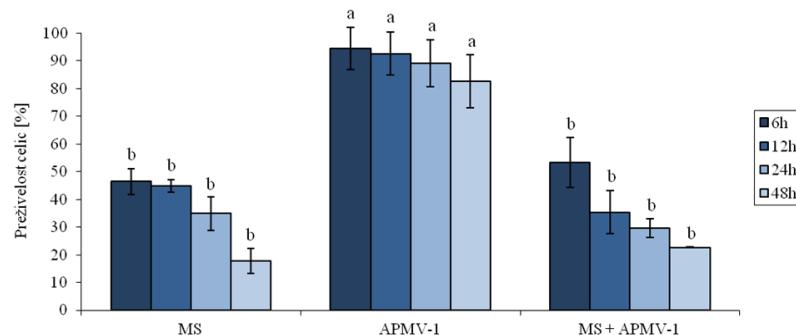
Figure 8: Survival of CEC-32 and HD11 cells after infection with *M. synoviae*, APMV-1 and consecutive infection with both microbes with 6 h delay in pathogen application. Bars represent the percent of live cells in different intervals after infection. Bars represent the means \pm SE from two separate experiments. Cell viability was statistically evaluated by using unpaired Student's t-test. A p value of < 0.05 was considered statistically significant (a: statistical significance compared to *M. synoviae* infection; b: statistical significance compared to APMV-1 infection).

5.2.1.2 Dinamika preživetja celic CEC-32 in HD11 po okužbi z bakterijo *M. synoviae*, APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma s 24-urnim zamikom apliciranja

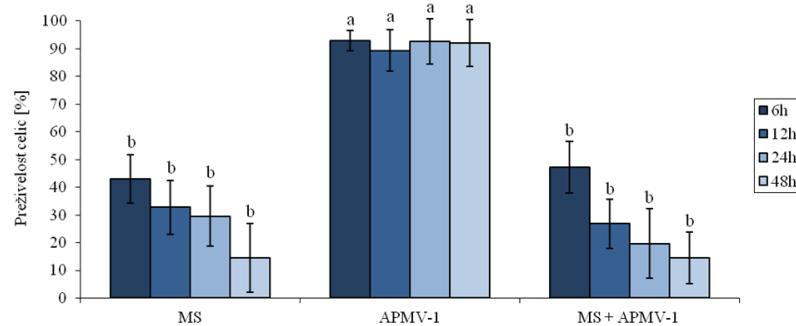
Dinamika preživetja celic CEC-32 in HD11 po okužbi z bakterijo *M. synoviae*, APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma po 24-urnem zamiku apliciranja APMV-1 je prikazana na sliki 9. Okužba celic CEC-32 z *M. synoviae* je povzročila padec v preživetju iz 48 % po 6 h na 18 % po 48 h. Preživetje celic CEC-32 po okužbi z APMV-1 je bilo po 48 h 82 % in statistično značilno višje od preživetja celic okuženih z *M. synoviae* in zaporedno okuženih celic. Podoben trend v preživetju celic CEC-32, kot smo ga določili po okužbi z *M. synoviae*, smo določili pri zaporedno okuženih celicah. Po 6 h smo določili 50 %, po 48 h pa 22 % preživetje. Med zaporedno okuženimi celicami in celicami okuženimi z *M. synoviae* ni bilo statistično značilnih razlik v odstotku preživetja.

Preživetje celic HD11 po 24-urnem zamiku apliciranja APMV-1 na celice okužene z *M. synoviae* je imelo podoben trend kot preživetje celic CEC-32 (Slika 9). Okužba celic HD11 z *M. synoviae* je po 6-urni inkubaciji povzročila padec v preživetju celic na 44 % in po 48 h na 15 %. Preživetje celic HD11 po okužbi z APMV-1 je bilo tekom 48-urne inkubacije relativno konstantno in je znašalo 90 %. Odstotek živih celic HD11 po okužbi z APMV-1 je bil statistično značilno višji kot pri celicah okuženih z *M. synoviae* in zaporedno okuženih celicah. Celice HD11 okužene z *M. synoviae* in zaporedno okužene celice so imele podoben trend preživetja. Med njimi ni bilo statistično značilnih razlik v odstotku preživetja.

CEC-32



HD11



Slika 9: Odstotek preživetja celic CEC-32 in HD11 po okužbi z bakterijo *M. synoviae*, APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma s 24-urnim zamikom apliciranja. Prikazani so odstotki živih celic v različnih intervalih po okužbi. Stolpci prikazujejo povprečja s standardno napako (SE) iz dveh ločenih poskusov. Podatke o preživelosti celic med posameznim tipom okužbe (MS, APMV-1 in MS + APMV-1) smo statistično ovrednotili s Studentovim t-testom. Statistično značilni rezultati so imeli vrednost $p < 0,05$ (a: statistična značilnost glede na okužbo z bakterijo *M. synoviae*; b: statistična značilnost glede na okužbo z APMV-1).

Figure 9: Survival of CEC-32 and HD11 cells after infection with *M. synoviae*, APMV-1 and consecutive infection with both microbes with 24 h delay in pathogen application. Bars represent the percent of live cells in different intervals after infection. Bars represent the means \pm SE from two separate experiments. Cell viability was statistically evaluated by using unpaired Student's t-test. A p value of < 0.05 was considered statistically significant (a: statistical significance compared to *M. synoviae* infection; b: statistical significance compared to APMV-1 infection).

5.2.2 Izražanje genov za citokine in kemokine po okužbi celic z bakterijo *M. synoviae* ter APMV-1 in prisotnost vnetnih citokinov v celičnih supernatantih

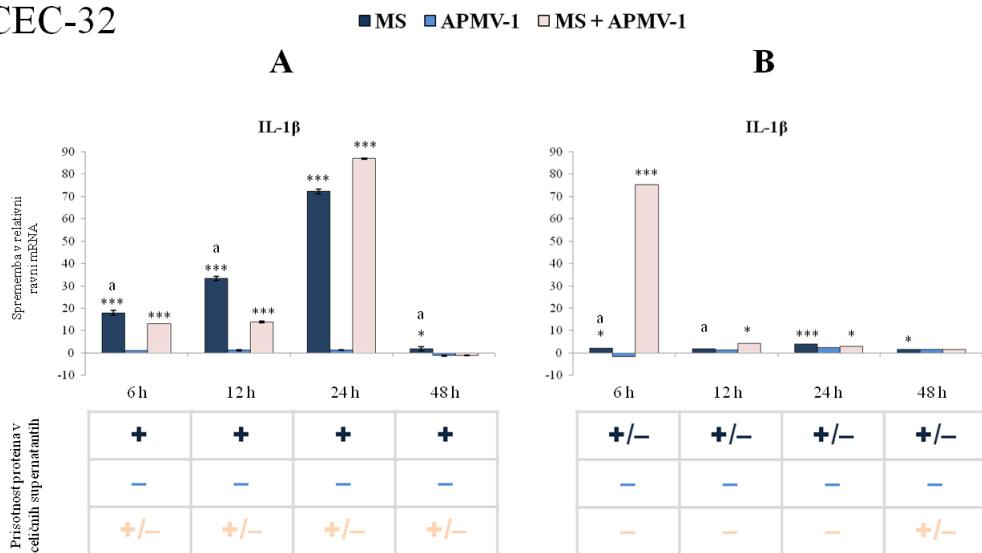
V sklopu poskusov okuževanja in analize odziva celic CEC-32 in HD11 na okužbo z *M. synoviae* in APMV-1 smo po okužbi v celicah analizirali izražanje genov za IL-1 β , IL-6, IL-18, IFN- γ , IL-12 p40, MIP-1 β (CCL4) in iNOS s qRT-PCR. Izražanja gena za IL-6 v celicah HD11 nismo uspeli določiti zaradi prevelikih odstopanj med posameznimi ponovitvami reakcij qRT-PCR in posledično netočne normalizacije. Citokine IL-1 β , IL-6, IL-18 in IFN- γ smo določali tudi v celičnih supernatantih z encimsko imunskim testom DIBA z uporabo specifičnih protiteles. Intenzitetu posamezne reakcije testa DIBA smo ocenili z lestvico: jasno pozitivna (+), mejno pozitivna (+/-) in negativna (-).

5.2.2.1 Izražanje IL-1 β v celicah CEC-32 in HD11

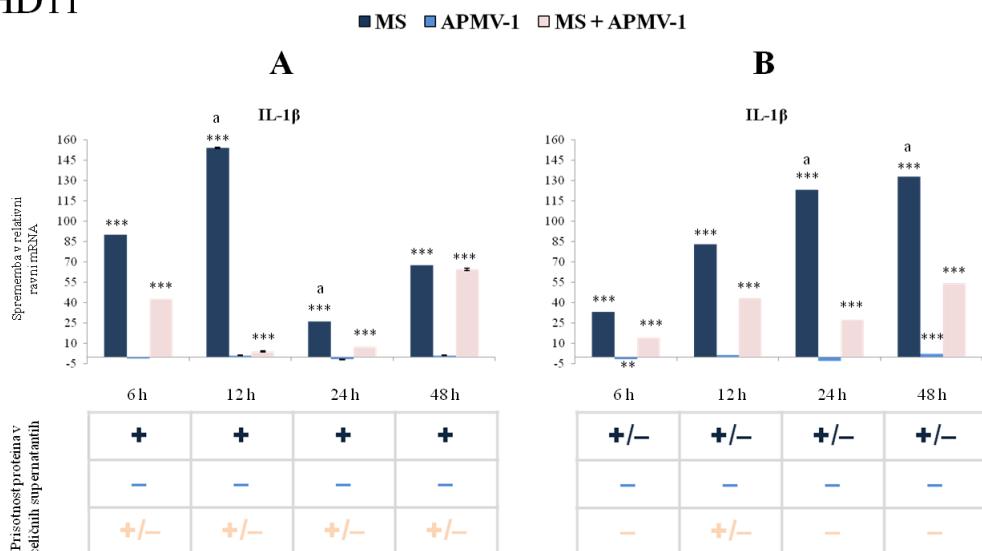
Izražanje IL-1 β v celicah CEC-32 in HD11 po okužbi z *M. synoviae* WVU 1853 in APMV-1 La Sota je prikazano na sliki 10. Po okužbi z *M. synoviae* smo v celicah CEC-32 določili statistično značilno povišano izražanje gena za IL-1 β tekom celotne inkubacije s 6-urnim zamikom apliciranja APMV-1 na celice, okužene z *M. synoviae* (Slika 10A), ki je doseglo vrh po 24 h. Zaporedno okužene celice CEC-32 so imele 6 in 12 h po okužbi nižji nivo izražanja IL-1 β kot celice okužene z *M. synoviae*, ki je bilo statistično značilno, kar smo pokazali tudi s testom DIBA. Podobne tende v izražanju IL-1 β po okužbi z *M. synoviae* in zaporedni okužbi so imele tudi celice HD11, ki pa so imele višji nivo aktivacije IL-1 β . Okužba celic z APMV-1 ni vplivala na povišano izražanje IL-1 β .

V celicah CEC-32 po 24-urnem zamiku apliciranja APMV-1 na celice okužene z *M. synoviae* (Slika 10B) smo določili visoko statistično značilno izražanje gena za IL-1 β 6 h po okužbi. S testom DIBA podobnega povišanja v izražanju IL-1 β nismo potrdili, najverjetnejše zaradi relativno nizke količine samega proteina v celičnih supernatantih. Pri ostalih časih inkubacije izražanje gena za IL-1 β ni bile višje od 5-krat glede na kontrolo. Pri celicah HD11 okuženih z *M. synoviae* je nivo mRNA IL-1 β tekom inkubacije konstantno naraščal in dosegel 135-kratno povišanje glede na kontrolo. Izražanje gena za IL-1 β je bilo nižje pri zaporedno okuženih celicah HD11, ki je bilo statistično značilno nižje od izražanja v celicah po okužbi z *M. synoviae* 24 in 48 h po okužbi. Tovrstnega močno povišanega izražanja IL-1 β s testom DIBA nismo potrdili.

CEC-32



HD11

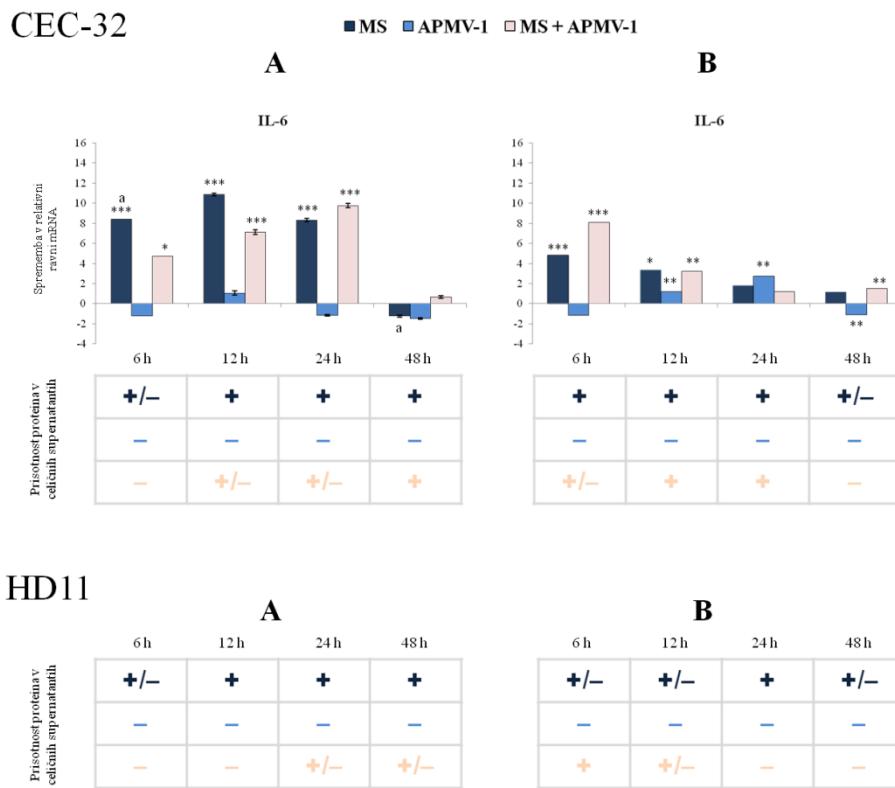


Slika 10: Izražanje gena za IL-1 β v celicah CEC-32 in HD11 ter prisotnost IL-1 β v celičnih supernatantih po okužbi z bakterijo *M. synoviae* (MS), APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma (MS + APMV-1). Stolpci prikazujejo povprečja relativne ravni mRNA IL-1 β s standardno napako (SE) iz dveh ločenih poskusov. Pod diagrami so prikazani rezultati encimsko imunskega testa DIBA s katerim smo v celičnih supernatantih določali IL-1 β v dveh ponovitvah na vzorec. Intenziteto posamezne reakcije smo ocenili z lestvico: jasno pozitivna (+), mejno pozitivna (+/−) in negativna (−). A: IL-1 β v celicah po 6-urnem zamiku apliciranja APMV-1 na celice okužene z *M. synoviae*; B: IL-1 β v celicah po 24-urnem zamiku apliciranja APMV-1 na celice okužene z *M. synoviae*. Izražanje gena smo primerjali z izražanjem v kontrolni skupini neokuženih celic in ga statistično ovrednotili s Studentovim t-testom. Statistično značilni rezultati so imeli vrednost $p < 0,05$ ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$; *: izražanje glede na kontrolo; a: izražanje v *M. synoviae*-okuženih celicah, glede na zaporedno okužene celice). Stolci nad absciso predstavljajo povišano izražanje, stolci pod absciso pa znižano izražanje genov glede na kontrolo. Geni z vrednostjo izražanja 0, so bili enako izraženi kot v kontrolni skupini.

Figure 10: Expression of IL-1 β gene in CEC-32 and HD11 cells and presence of IL-1 β in cell supernatants after *M. synoviae* (MS), APMV-1 (APMV-1), and consecutive *M. synoviae*-APMV-1 (MS + APMV-1) infection. Bars represent the means \pm SE of two separate experiments ($n = 6$). Results of the test DIBA that was used for detection of IL-1 β in cell supernatants in two replicates per sample are shown under the diagrams. Each DIBA reaction was evaluated as: positive (+), partially positive (+/-) and negative (-). A: IL-1 β in cells with 6 h delay in pathogen application; B: IL-1 β in cells with 24 h delay in pathogen application. Expression of IL-1 β gene was compared to the control (uninfected cells) and statistically evaluated by using unpaired Student's t-test. A p value of < 0.05 was considered statistically significant (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; *: expression compared to the control; a: expression compared to consecutive *M. synoviae*-APMV-1 infected cells. Columns above 0 represent upregulation and columns under 0 represent downregulation of gene expression. Genes with value 0 had the same expression as in the control.

5.2.2.2 Izražanje IL-6 v celicah CEC-32 in HD11

Izražanje IL-6 v celicah CEC-32 in HD11 po okužbi z *M. synoviae* WVU 1853 in APMV-1 La Sota je prikazano na sliki 11. Pri celicah CEC-32 je imel IL-6 podoben trend izražanja pri celicah okuženih z *M. synoviae* in zaporedno okuženih celicah, z dvema statistično značilnima razlikama v izražanju, 6 in 48 h po okužbi (Slika 11A). Nivo izražene mRNA IL-6 v celicah CEC-32 ni presegel 12-kratnega povišanja glede na kontrolo. Pri celicah HD11 smo lahko prisotnost IL-6 potrdili le z določanjem proteina v celičnih supernatantih in ne tudi s qRT-PCR, zaradi prevelikih odstopanj med posameznimi tehničnimi ponovitvami. S testom DIBA smo pokazali, da je bilo izražanje IL-6 povišano po okužbi z *M. synoviae* in je bilo višje kot pri zaporedno okuženih celicah (Slika 11A). Pri celicah po 24-urnem zamiku apliciranja APMV-1 na celice okužene z *M. synoviae* (Slika 11B) sta bila trenda v izražanju IL-6 pri celicah okuženih z *M. synoviae* in zaporedno okuženih celicah HD11 podobna. Okužba celic CEC-32 in HD11 z APMV-1 ni vplivala na povišano količino IL-6 v supernatantih, čeprav je bil gen za IL-6 statistično značilno povišan pri celicah CEC-32 po 12- in 24-urni inkubaciji (Slika 11B).



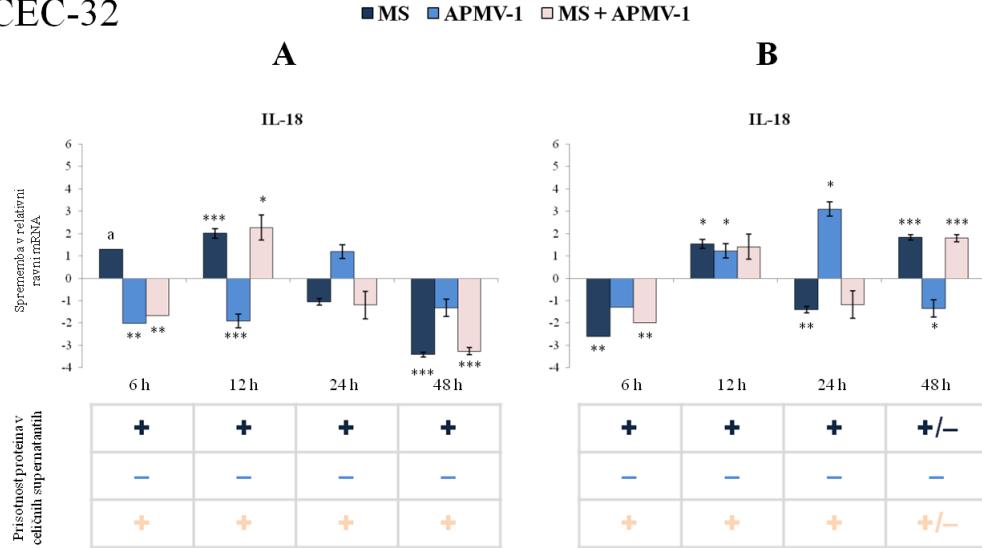
Slika 11: Izražanje gena za IL-6 v celicah CEC-32 in prisotnost IL-6 v supernatantih celic CEC-32 ter HD11 po okužbi z bakterijo *M. synoviae* (MS), APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma (MS + APMV-1). Stolpci prikazujejo povprečja relativne ravni mRNA IL-6 s standardno napako (SE) iz dveh ločenih poskusov. Pod diagrami so prikazani rezultati encimsko imunskega testa DIBA, s katerim smo v celičnih supernatantih določali IL-6 v dveh ponovitvah na vzorec. Intenziteto posamezne reakcije smo ocenili z lestvico: jasno pozitivna (+), mejno pozitivna (+/-) in negativna (-). A: IL-6 v celicah po 6-urnem zamiku apliciranja APMV-1 na celice okužene z *M. synoviae*; B: IL-6 v celicah po 24-urnem zamiku apliciranja APMV-1 na celice okužene z *M. synoviae*. Izražanje gena smo primerjali z izražanjem v kontrolni skupini neokuženih celic in ga statistično ovrednotili s Studentovim t-testom. Statistično značilni rezultati so imeli vrednost $p < 0,05$ ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$; *: izražanje glede na kontrolo; a: izražanje v *M. synoviae*-okuženih celicah, glede na zaporedno okužene celice). Stolci nad absciso predstavljajo povišano izražanje, stolci pod absciso pa znižano izražanje genov glede na kontrolo. Geni z vrednostjo izražanja 0 so bili enako izraženi kot v kontrolni skupini.

Figure 11: Expression of IL-6 gene in CEC-32 cells and presence of IL-1 β in cell supernatants of CEC-32 and HD11 cells after *M. synoviae* (MS), APMV-1 (APMV-1), and consecutive *M. synoviae*-APMV-1 (MS + APMV-1) infection. Bars represent the means \pm SE of two separate experiments ($n = 6$). Results of the test DIBA that was used for detection of IL-6 in cell supernatants in two replicates per sample are shown under the diagrams. Each DIBA reaction was evaluated as: positive (+), partially positive (+/-) and negative (-). A: IL-6 in cells with 6 h delay in pathogen application; B: IL-6 in cells with 24 h delay in pathogen application. Expression of IL-6 gene was compared to the control (uninfected cells) and statistically evaluated by using unpaired Student's t-test. A p value of < 0.05 was considered statistically significant ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; *: expression compared to the control; a: expression compared to consecutive *M. synoviae*-APMV-1 infected cells. Columns above 0 represent upregulation and columns under 0 represent downregulation of gene expression. Genes with value 0 had the same expression as in the control.

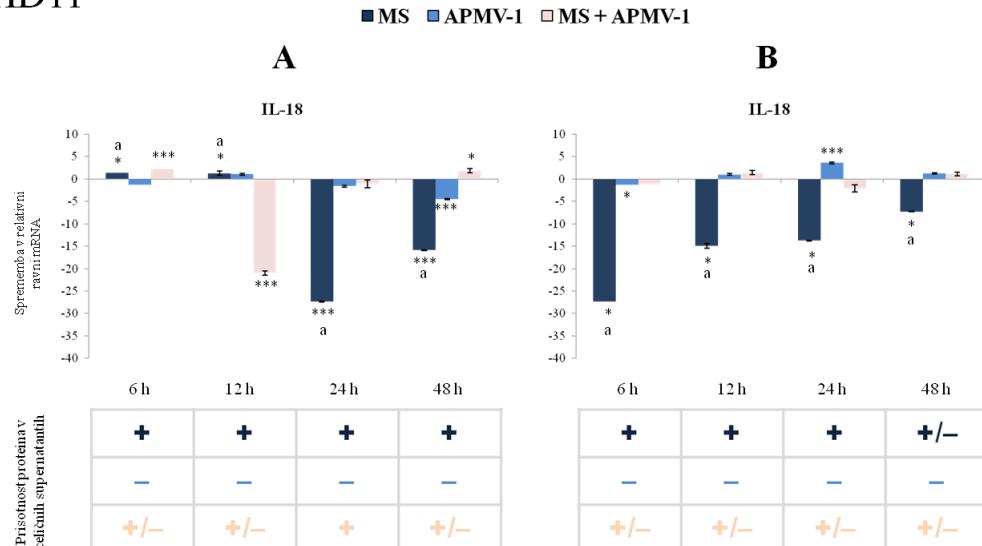
5.2.2.3 Izražanje IL-18 v celicah CEC-32 in HD11

Izražanje IL-18 v celicah CEC-32 in HD11 ter njihovih supernatantih po okužbi je prikazano na sliki 12. Izražanje gena za IL-18 ni bilo višje od 5-kratne relativne spremembe v ravni mRNA glede na kontrolo pri obeh celičnih tipih, kljub temu, da smo v celičnih supernatantih po okužbi z *M. synoviae* in tudi zaporedni okužbi z obema patogenoma potrdili prisotnost proteina IL-18 (Slika 12A). Gen za IL-18 je bil najnižje izražen v celicah HD11 po okužbi z *M. synoviae*. Inhibicija izražanja mRNA IL-18 v celicah HD11 po okužbi z *M. synoviae* se je tekom inkubacije zmanjševala in po 48 h dosegla 10-kratno znižanje glede na kontrolo (Slika 12B). Pri zaporedno okuženih celicah je imel gen za IL-18 najnižje izražanje 12 h po apliciranju APMV-1 (Slika 12A). Pri celicah CEC-32 so imele podoben trend v izražanju gena za IL-18 celice okužene z *M. synoviae* in zaporedno okužene celice, ki se je statistično značilno razlikoval le 6 h po začetku inkubacije (Slika 12A). Najvišje izražanje mRNA IL-18 so imele celice CEC-32 in HD11 po okužbi z APMV-1, 24 h po apliciranju cepiva, ki je bila statistično značilno 3-krat povisjana glede na kontrolo (Slika 12B).

CEC-32



HD11



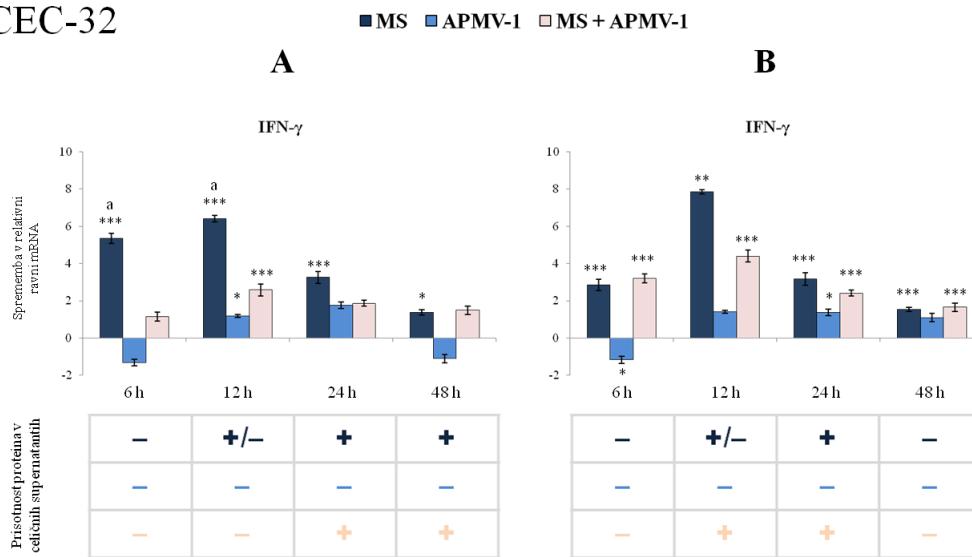
Slika 12: Izražanje gena za IL-18 v celicah CEC-32 in HD11 ter prisotnost IL-18 v celičnih supernatantih po okužbi z bakterijo *M. synoviae* (MS), APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma (MS + APMV-1). Stolpci prikazujejo povprečja relativne ravni mRNA IL-18 s standardno napako (SE) iz dveh ločenih poskusov. Pod diagrami so prikazani rezultati encimsko imunskega testa DIBA, s katerim smo v celičnih supernatantih določali IL-18 v dveh ponovitvah na vzorec. Intenziteto posamezne reakcije smo ocenili z lestvico: jasno pozitivna (+), mejno pozitivna (+/-) in negativna (-). A: IL-18 v celicah po 6-urnem zamiku apliciranja APMV-1 na celice okužene z *M. synoviae*; B: IL-18 v celicah po 24-urnem zamiku apliciranja APMV-1 na celice okužene z *M. synoviae*. Izražanje gena smo primerjali z izražanjem v kontrolni skupini neokuženih celic in ga statistično ovrednotili s Studentovim t-testom. Statistično značilni rezultati so imeli vrednost $p < 0,05$ ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$; *: izražanje glede na kontrolo; a: izražanje v *M. synoviae*-okuženih celicah, glede na zaporedno okužene celice). Stolci nad absciso predstavljajo povišano izražanje, stolci pod absciso pa znižano izražanje genov glede na kontrolo. Geni z vrednostjo izražanja 0 so bili enako izraženi kot v kontrolni skupini.

Figure 12: Expression of IL-18 gene in CEC-32 and HD11 cells and presence of IL-18 in cell supernatants after *M. synoviae* (MS), APMV-1 (APMV-1), and consecutive *M. synoviae*-APMV-1 (MS + APMV-1) infection. Bars represent the means \pm SE of two separate experiments ($n = 6$). Results of the test DIBA that was used for detection of IL-18 in cell supernatants in two replicates per sample are shown under the diagrams. Each DIBA reaction was evaluated as: positive (+), partially positive (+/-) and negative (-). A: IL-18 in cells with 6 h delay in pathogen application; B: IL-18 in cells with 24 h delay in pathogen application. Expression of IL-18 gene was compared to the control (uninfected cells) and statistically evaluated by using unpaired Student's t-test. A p value of < 0.05 was considered statistically significant (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; *: expression compared to the control; a: expression compared to consecutive *M. synoviae*-APMV-1 infected cells. Columns above 0 represent upregulation and columns under 0 represent downregulation of gene expression. Genes with value 0 had the same expression as in the control.

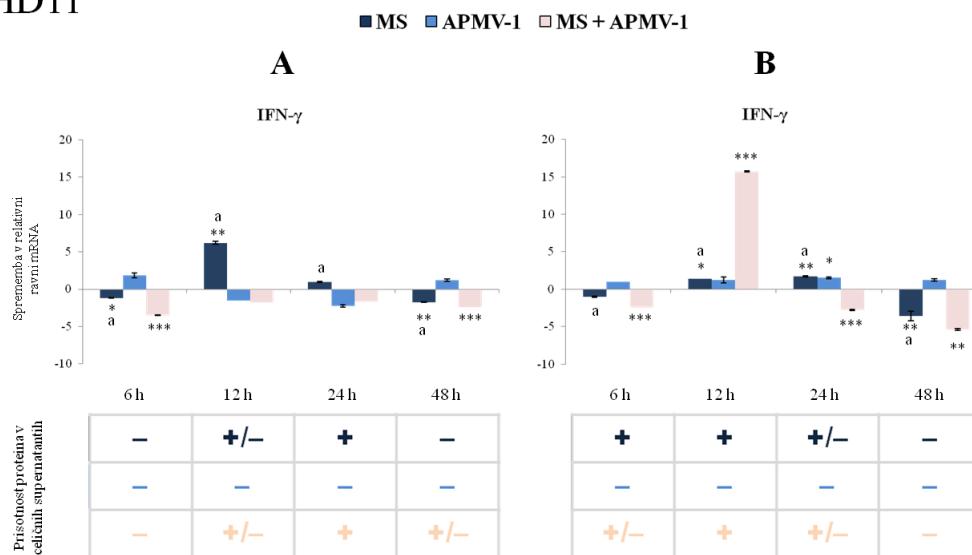
5.2.2.4 Izražanje IFN- γ v celicah CEC-32 in HD11

Izražanje IFN- γ v celicah CEC-32 in HD11 po posamezni in zaporedni okužbi je prikazano na sliki 13. Pri celicah CEC-32, po okužbi z *M. synoviae*, je bilo izražanje gena za IFN- γ statistično značilno povišano in statistično značilno inhibirano 6 in 12 h po zaporedni okužbi celic z *M. synoviae* in APMV-1 (Slika 13A), kar namiguje za imunosupresivni učinek APMV-1 La Sota v danih pogojih, ki se je kazal tudi pri zgoraj opisanih citokinih. V celicah CEC-32 po 24-urnem zamiku apliciranja APMV-1 na celice okužene z *M. synoviae*, kljub relativno visokem statistično značilnem povišanjima izražanja gena za IFN- γ , supresija izražanja ni bila prisotna. Pri celicah CEC-32 smo tudi pri analizi IFN- γ določili podobne trende v izražanju mRNA IFN- γ pri celicah okuženih z *M. synoviae* in zaporedno okuženih celicah. Pri celicah HD11 je bil splošni nivo izražanja gena za IFN- γ nižji kot pri celicah CEC-32, z izjemo visoke indukcije izražanja po 12 h, ki smo jo pokazali tudi s testom DIBA (Slika 13B). Najmočnejše utišanje izražanja gena za IFN- γ (5-krat) glede na kontrolo smo določili v celicah HD11 48 h po apliciranju cepiva pri zaporedno okuženih celicah in celicah okuženih z *M. synoviae*.

CEC-32



HD11

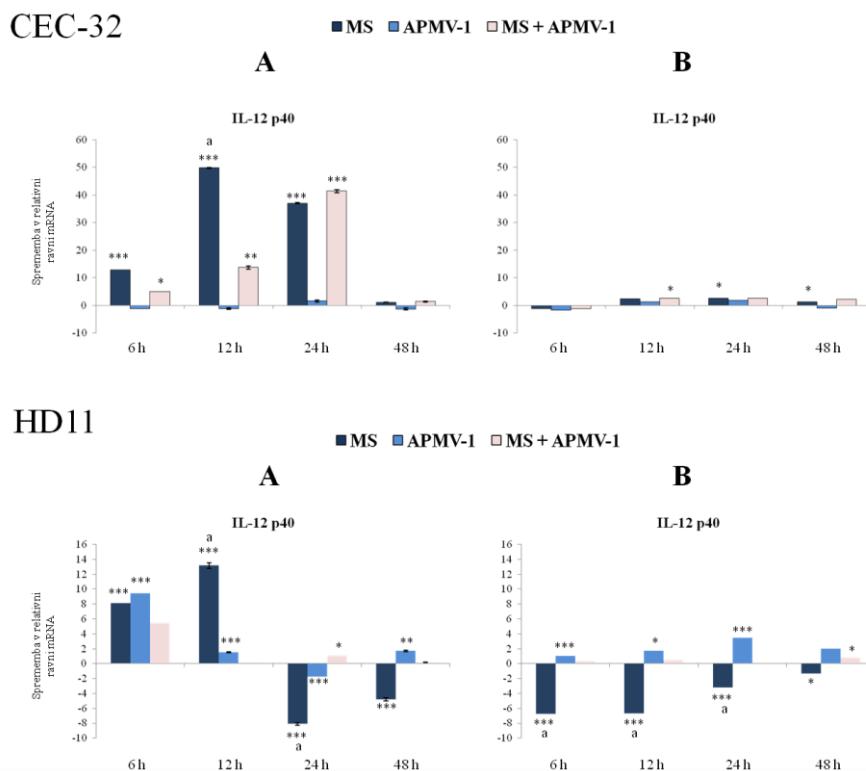


Slika 13: Izražanje gena za IFN- γ v celicah CEC-32 in HD11 ter prisotnost IFN- γ v celičnih supernatantih po okužbi z bakterijo *M. synoviae* (MS), APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma (MS + APMV-1). Stolpci prikazujejo povprečja relativne ravni mRNA IFN- γ s standardno napako (SE) iz dveh ločenih poskusov. Pod diagrami so prikazani rezultati encimsko imunskega testa DIBA, s katerim smo v celičnih supernatantih določali IFN- γ v dveh ponovitvah na vzorec. Intenzitetu posamezne reakcije smo ocenili z lestvico: jasno pozitivna (+), mejno pozitivna (+/-) in negativna (-). A: IFN- γ v celicah po 6-urnem zamiku apliciranja APMV-1 na celice okužene z *M. synoviae*; B: IFN- γ v celicah po 24 h zamiku aplikiranja APMV-1 na celice okužene z *M. synoviae*. Izražanje gena smo primerjali z izražanjem v kontrolni skupini neokuženih celic in ga statistično ovrednotili s Studentovim t-testom. Statistično značilni rezultati so imeli vrednost $p < 0,05$ ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$; *: izražanje glede na kontrolo; a: izražanje v *M. synoviae*-okuženih celicah, glede na zaporedno okužene celice). Stolci nad absciso predstavljajo povišano izražanje, stolci pod absciso pa znižano izražanje genov glede na kontrolo. Geni z vrednostjo izražanja 0 so bili enako izraženi kot v kontrolni skupini.

Figure 13: Expression of IFN- γ gene in CEC-32 and HD11 cells and presence of IFN- γ in cell supernatants after *M. synoviae* (MS), APMV-1 (APMV-1), and consecutive *M. synoviae*-APMV-1 (MS + APMV-1) infection. Bars represent the means \pm SE of two separate experiments ($n = 6$). Results of the test DIBA that was used for detection of IFN- γ in cell supernatants in two replicates per sample are shown under the diagrams. Each DIBA reaction was evaluated as: positive (+), partially positive (+/-) and negative (−). A: IFN- γ in cells with 6 h delay in pathogen application; B: IFN- γ in cells with 24 h delay in pathogen application. Expression of IFN- γ gene was compared to the control (uninfected cells) and statistically evaluated by using unpaired Student's t-test. A p value of < 0.05 was considered statistically significant ($^*p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$; *: expression compared to the control; a: expression compared to consecutive *M. synoviae*-APMV-1 infected cells. Columns above 0 represent upregulation and columns under 0 represent downregulation of gene expression. Genes with value 0 had the same expression as in the control.

5.2.2.5 Izražanje genov za IL-12 p40, MIP-1 β (CCL4) in iNOS v celicah CEC-32 in HD11

Izražanje gena za IL-12 p40 v celicah CEC-32 je bilo močno statistično značilno povišano po okužbi z *M. synoviae* in zaporedno okužbo v prvih 24 h (Slika 14A); pri ostalih časih inkubacije ni bilo večje od 5-kratnega povišanja v izražanju glede na kontrolo (Slika 14). Močno povišano statistično značilno izražanje gena za IL-12 p40 pri celicah HD11 po okužbi z *M. synoviae* in APMV-1 je bilo prisotno po 12 h inkubacije, ki mu je nato sledil padec v izražanju (Slika 14A). Po 24-urnem zamiku apliciranja APMV-1 na celice HD11, ki so bile okužene z *M. synoviae* (Slika 14B), je bilo izražanje gena za IL-12 p40 pri celicah okuženih z APMV-1 šibko statistično značilno povišano tekom 24-urne inkubacije in znižano pri celicah okuženih z *M. synoviae*, s konstantnim zmanjševanjem inhibicije izražanja tekom inkubacije.

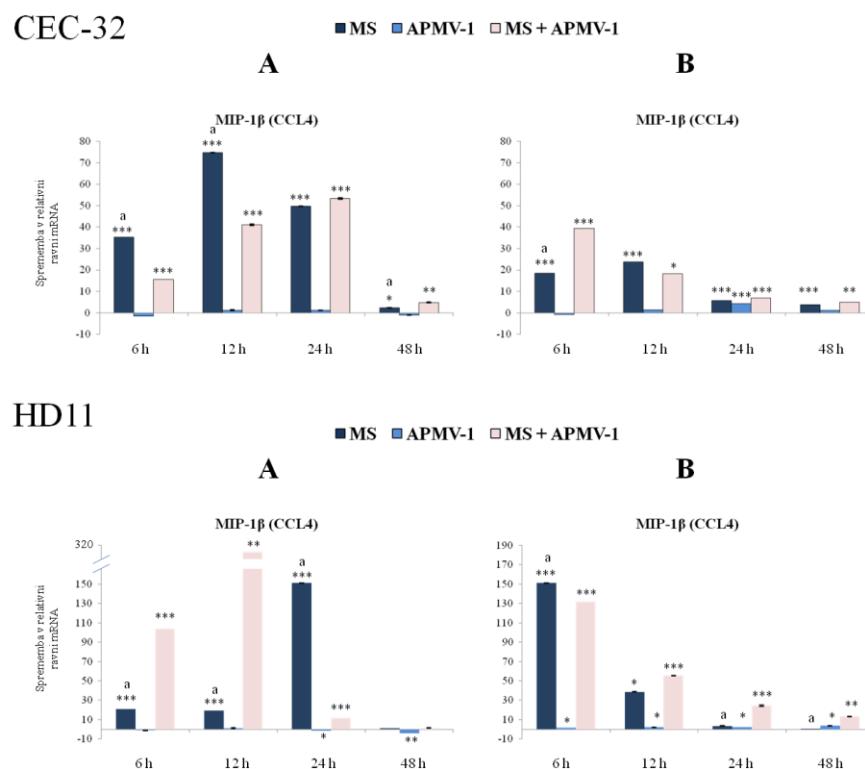


Slika 14: Izražanje gena za IL-12 p40 v celicah CEC-32 in HD11 po okužbi z bakterijo *M. synoviae* (MS), APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma (MS + APMV-1). Stolpci prikazujejo povprečja relativne ravni mRNA IL-12 p40 s standardno napako (SE) iz dveh ločenih poskusov. A: relativne ravni mRNA IL-12 p40 v celicah po 6-urnem zamiku apliciranja APMV-1 na celice okužene z *M. synoviae*; B: relativne ravni mRNA IL-12 p40 v celicah po 24-urnem zamiku apliciranja APMV-1 na celice okužene z *M. synoviae*. Izražanje gena smo primerjali z izražanjem v kontrolni skupini neokuženih celic in ga statistično ovrednotili s Studentovim t-testom. Statistično značilni rezultati so imeli vrednost $p < 0,05$ ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$; *: izražanje glede na kontrolo; a: izražanje v *M. synoviae*-okuženih celicah, glede na zaporedno okužene celice). Stolpci nad absciso predstavljajo povišano izražanje, stolci pod absciso pa znižano izražanje genov glede na kontrolo. Geni z vrednostjo izražanja 0 so bili enako izraženi kot v kontrolni skupini.

Figure 14: Expression of IL-12 p40 gene in CEC-32 and HD11 cells after *M. synoviae* (MS), APMV-1 (APMV-1), and consecutive *M. synoviae*-APMV-1 (MS + APMV-1) infection. Bars represent the means \pm SE of two separate experiments ($n = 6$). A: IL-12 p40 gene fold change in cells with 6 h delay in pathogen application; B: IL-12 p40 gene fold change in cells with 24 h delay in pathogen application. Expression of IL-12 p40 gene was compared to the control (uninfected cells) and statistically evaluated by using unpaired Student's t-test. A p value of < 0.05 was considered statistically significant ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; *: expression compared to the control; a: expression compared to consecutive *M. synoviae*-APMV-1 infected cells. Columns above 0 represent upregulation and columns under 0 represent downregulation of gene expression. Genes with value 0 had the same expression as in the control.

Izražanje gena za MIP-1 β (CCL4) v celicah CEC-32 in HD11 po okužbi z *M. synoviae*, APMV-1 ter zaporedno okužbo z obema patogenoma je prikazano na sliki 15. Pri obeh celičnih tipih smo opazili močno statistično značilno povišanje v izražanju mRNA MIP-1 β po okužbi z *M. synoviae* in zaporedni okužbi z obema patogenoma. Pri celicah CEC-32 je

najvišje izražanje MIP-1 β inducirala okužba z *M. synoviae* po 12 h inkubacije (75-kratno statistično značilno povišanje glede na kontrolo), pri celicah HD11 pa zaporedna okužba, ki je glede na kontrolo prav tako po 12 h inkubacije inducirala 313-kratno statistično značilno povišanje v izražanju. Po 48 h inkubacije pri obeh celičnih tipih nivo mRNA MIP-1 β ni bil višji od 10-kratnega povišanja glede na kontrolo. Po okužbi celic CEC-32 in HD11 z APMV-1 smo opazili šibke spremembe v izražanju gena za MIP-1 β (CCL4).

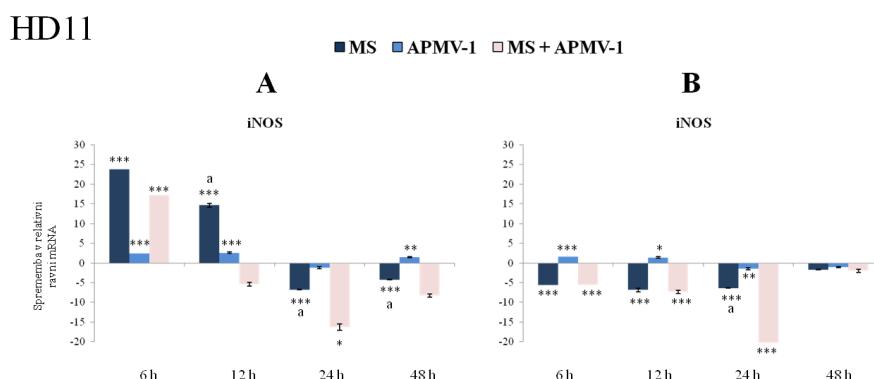


Slika 15: Izražanje gena za MIP-1 β (CCL4) v celicah CEC-32 in HD11 po okužbi z bakterijo *M. synoviae* (MS), APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma (MS + APMV-1). Stolpci prikazujejo povprečja relativne ravni mRNA MIP-1 β (CCL4) s standardno napako (SE) iz dveh ločenih poskusov. A: relativne ravni mRNA MIP-1 β (CCL4) v celicah po 6-urnem zamiku apliciranja APMV-1 na celice okužene z *M. synoviae*; B: relativne ravni mRNA MIP-1 β (CCL4) v celicah po 24-urnem zamiku apliciranja APMV-1 na celice okužene z *M. synoviae*. Izražanje gena smo primerjali z izražanjem v kontrolni skupini neokuženih celic in ga statistično ovrednotili s Studentovim t-testom. Statistično značilni rezultati so imeli vrednost $p < 0,05$ ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$; *: izražanje glede na kontrolo; a: izražanje v *M. synoviae*-okuženih celicah, glede na zaporedno okužene celice). Stolpci nad absciso predstavljajo povišano izražanje, stolci pod absciso pa znižano izražanje genov glede na kontrolo. Geni z vrednostjo izražanja 0 so bili enako izraženi kot v kontrolni skupini.

Figure 15: Expression of MIP-1 β (CCL4) gene in CEC-32 and HD11 cells after *M. synoviae* (MS), APMV-1 (APMV-1), and consecutive *M. synoviae*-APMV-1 (MS + APMV-1) infection. Bars represent the means \pm SE of two separate experiments ($n = 6$). A: MIP-1 β (CCL4) gene fold change in cells with 6 h delay in pathogen application; B: MIP-1 β (CCL4) gene fold change in cells with 24 h delay in pathogen application. Expression of MIP-1 β (CCL4) gene was compared to the control (uninfected cells) and statistically evaluated by using unpaired Student's t-test. A p value of < 0.05 was considered statistically significant ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; *: expression compared to the control; a: expression compared to consecutive *M.*

synoviae-APMV-1 infected cells. Columns above 0 represent upregulation and columns under 0 represent downregulation of gene expression. Genes with value 0 had the same expression as in the control.

Izražanje gena za iNOS v celicah HD11 po okužbi je prikazano na sliki 16. Statistično značilno povišano izražanje gena za iNOS smo določili v prvih 12 h inkubacije po okužbi celic HD11 z *M. synoviae* in po 6 h inkubacije zaporedno okuženih celic (Slika 16A). Izražanje je bilo v kasnejši fazi inkubacije statistično značilno znižano glede na kontrolo. Šibko povišano izražanje mRNA gena iNOS smo določili pri celicah HD11 okuženih z APMV-1 po različnih časih inkubacije. Supresijo izražanja gena za iNOS, pri celicah okuženih z *M. synoviae* glede na zaporedno okužene celice, smo določili po 12, 24 in 48 h (Slika 16A) in 24-urni inkubaciji (Slika 16B). Zaporedna okužba je povzročila znižano izražanje gena iNOS pri vseh vzorcih, z izjemo 6-urne inkubacije, ko je bilo izražanje podobno kot pri okužbi celic z *M. synoviae*.

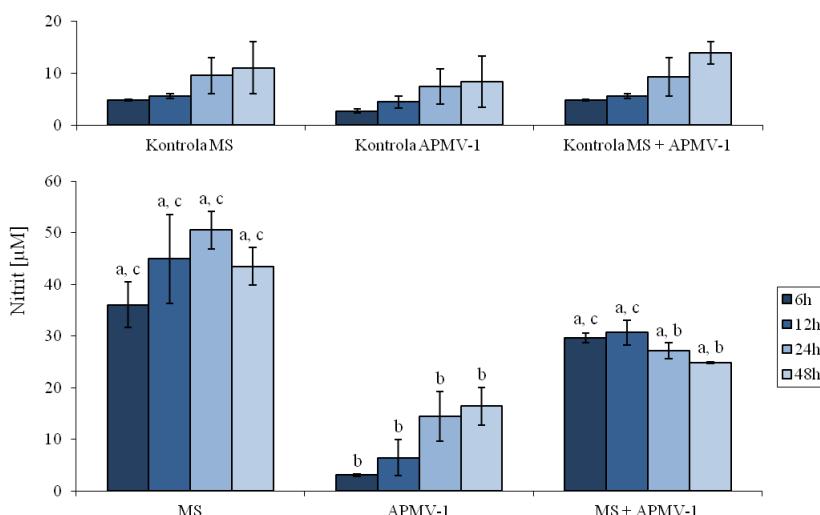


Slika 16: Izražanje gena za iNOS v celicah HD11 po okužbi z bakterijo *M. synoviae* (MS), APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma (MS + APMV-1). Stolpci prikazujejo povprečja relativne ravni mRNA iNOS s standardno napako (SE) iz dveh ločenih poskusov. A: relativne ravni mRNA iNOS v celicah HD11 po 6-urnem zamiku apliciranja APMV-1 na celice okužene z *M. synoviae*; B: relativne ravni mRNA iNOS v celicah HD11 po 24-urnem zamiku apliciranja APMV-1 na celice okužene z *M. synoviae*. Izražanje gena smo primerjali z izražanjem v kontrolni skupini neokuženih celic in ga statistično ovrednotili s Studentovim t-testom. Statistično značilni rezultati so imeli vrednost $p < 0,05$ ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$; *: izražanje glede na kontrolo; a: izražanje v *M. synoviae*-okuženih celicah, glede na zaporedno okužene celice). Stolpci nad absciso predstavljajo povišano izražanje, stolci pod absciso pa znižano izražanje genov glede na kontrolo. Geni z vrednostjo izražanja 0, so bili enako izraženi kot v kontrolni skupini.

Figure 16: Expression of iNOS gene in HD11 cells after *M. synoviae* (MS), APMV-1 (APMV-1), and consecutive *M. synoviae*-APMV-1 (MS + APMV-1) infection. Bars represent the means \pm SE of two separate experiments ($n = 6$). A: iNOS gene fold change in cells with 6 h delay in pathogen application; B: iNOS gene fold change in cells with 24 h delay in pathogen application. Expression of iNOS gene was compared to the control (uninfected cells) and statistically evaluated by using unpaired Student's t-test. A p value of < 0.05 was considered statistically significant ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; *: expression compared to the control; a: expression compared to consecutive *M. synoviae*-APMV-1 infected cells. Columns above 0 represent upregulation and columns under 0 represent downregulation of gene expression. Genes with value 0 had the same expression as in the control.

5.2.3 Prisotnost NO v supernatantih celic HD11

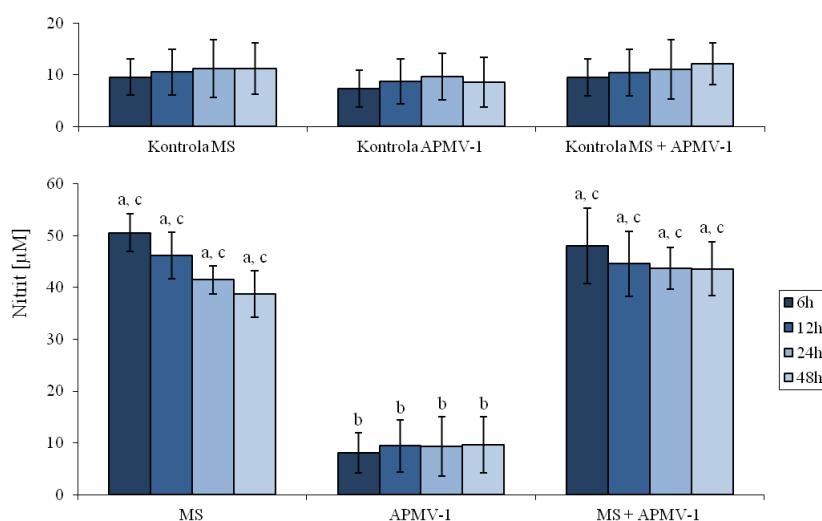
Makrofagi lahko ob okužbi z določenimi mikroorganizmi sintetizirajo in izločajo NO, ki ima številne pleiotropne funkcije in pomembno vlogo pri imunski obrambi. V supernatantih celic HD11 smo NO določali z Griessovim testom, saj se v fizioloških raztopinah oksidira do nitrita oziroma nitrata. Koncentracija nitrita v supernatantih celic HD11 po 6-urnem zamiku apliciranja APMV-1 na celice okužene z *M. synoviae* je prikazana na sliki 17. V supernatantih celic HD11, ki smo jih okužili z *M. synoviae*, smo določili naraščanje koncentracije nitrita do 24 h, ko je dosegla 50 µM, in rahlo znižanje na 43 µM po 48 h. Koncentracije nitrita so bile statistično značilno višje po okužbi celic HD11 z *M. synoviae* in zaporedno okužbo glede na neokužene celice. Koncentracije nitrita pri celicah, okuženih z APMV-1, se niso statistično značilno razlikovale od koncentracij nitrita v kontrolni skupini in so bile statistično značilno nižje kot pri okužbi z *M. synoviae*. Pri zaporedno okuženih celicah smo določili statistično značilno povišane koncentracije nitrita po 6 in 12 h inkubacije glede na okužbo z APMV-1, ki se po 24 in 48 h niso več statistično značilno razlikovale. Zaporedna okužba je povzročila statistično značilno znižanje koncentracije nitrita v celičnih supernatantih za približno 20 µM po 24 in 48 h glede na okužbo z *M. synoviae*.



Slika 17: Koncentracija nitrita v supernatantih celic HD11 po okužbi z bakterijo *M. synoviae*, APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma s 6-urnim zamikom apliciranja. Stolpci prikazujejo povprečja s standardno napako (SE) iz dveh ločenih poskusov. Koncentracije nitrita med posameznim tipom okužbe (MS, APMV-1 in MS + APMV-1) smo statistično ovrednotili s Studentovim t-testom. Statistično značilni rezultati so imeli vrednost $p < 0,05$ (a: statistična značilnost glede na kontrolno skupino; b: statistična značilnost glede na okužbo z bakterijo *M. synoviae*; c: statistična značilnost glede na okužbo z APMV-1).

Figure 17: Nitrite concentrations in HD11 cell supernatants after infection with *M. synoviae*, APMV-1 and consecutive infection with both microbes with 6 h delay in pathogen application. Bars represent the means \pm SE from two separate experiments. Nitrite concentrations after each type of infection (MS, APMV-1 and MS + APMV-1) were statistically evaluated by using unpaired Student's t-test. A p value of $< 0,05$ was considered statistically significant (a: statistical significance compared to the control; b: statistical significance compared to *M. synoviae* infection; c: statistical significance compared to APMV-1 infection).

Koncentracija nitrita v supernatantih celic HD11 po 24-urnem zamiku apliciranja APMV-1 na celice okužene z *M. synoviae* je prikazana na sliki 18. Po okužbi celic HD11 z *M. synoviae* smo v supernatantih določili padajočo koncentracijo nitrita, ki je tekom 48-urne inkubacije padla iz 50 na 38 µM. Koncentracije nitrita po okužbi z APMV-1 se niso statistično značilno razlikovale od koncentracij pri celicah v kontrolni skupini, bile pa so statistično značilno nižje kot pri celicah, okuženih z *M. synoviae*, in zaporedno okuženih celicah. Relativno konstantne koncentracije nitrita so bile prisotne v supernatantih zaporedno okuženih celic HD11 tekom 48-urne inkubacije in so bile med 50 in 40 µM. Statistično značilnih razlik v koncentracijah nitrita med supernatanti celic HD11 po okužbi z *M. synoviae* in zaporedno okužbo nismo določili.



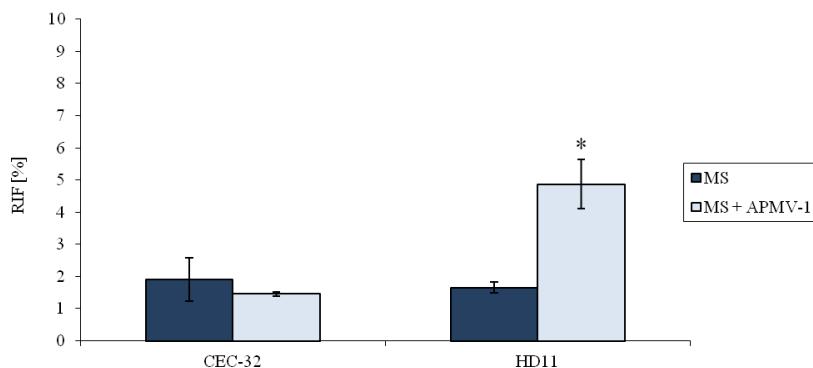
Slika 18: Koncentracija nitrita v supernatantih celic HD11 po okužbi z bakterijo *M. synoviae*, APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma s 24-urnim zamikom apliciranja. Stolci prikazujejo povprečja s standardno napako (SE) iz dveh ločenih poskusov. Koncentracije nitrita med posameznim tipom okužbe (MS, APMV-1 in MS + APMV-1) smo statistično ovrednotili s Studentovim t-testom. Statistično značilni rezultati so imeli vrednost $p < 0,05$ (a: statistična značilnost glede na kontrolno skupino; b: statistična značilnost glede na okužbo z bakterijo *M. synoviae*; c: statistična značilnost glede na okužbo z APMV-1).

Figure 18: Nitrite concentrations in HD11 cell supernatants after infection with *M. synoviae*, APMV-1 and consecutive infection with both microbes with 24 h delay in pathogen application. Bars represent the means ± SE from two separate experiments. Nitrite concentrations after each type of infection (MS, APMV-1 and MS + APMV-1) were statistically evaluated by using unpaired Student's t-test. A p value of < 0.05 was considered statistically significant (a: statistical significance compared to the control; b: statistical significance compared to *M. synoviae* infection; c: statistical significance compared to APMV-1 infection).

5.2.4 Invazivnost bakterije *M. synoviae* v celice CEC-32 in HD11 ob prisotnosti APMV-1

Z analizo invazivnosti *M. synoviae* WVU 1853 v nefagocitirajoče celice CEC-32 in fagocitirajoče celice HD11 ob prisotnosti APMV-1 La Sota smo želeli preveriti, če prisotnost virusnega cepiva vpliva na vdiranje *M. synoviae* v gostiteljske celice. Relativna

frekvenca invazivnosti (RIF) *M. synoviae* v celice CEC-32 in HD11 ob prisotnosti APMV-1 je prikazana na sliki 19. RIF bakterije *M. synoviae* v celice CEC-32 je po 24-urni inkubaciji znašala približno 1,9 % in je bila ob prisotnosti APMV-1 manjša za 0,4 %. Razlika v RIF ni bila statistično značilna. RIF *M. synoviae* v celice CEC-32 je bila podobna kot pri študiji, ki so jo opravili Dušanić in sod. (2009). Invazivnost *M. synoviae* v makrofage HD11 je bila 1,7 % in je bila ob prisotnosti APMV-1 statistično značilno višja. RIF *M. synoviae* je ob prisotnosti APMV-1 znašala 4,9 %.



Slika 19: Relativna frekvenca invazivnosti (RIF) bakterije *M. synoviae* WVU 1853 v celice CEC-32 in HD11 brez in ob prisotnosti APMV-1 La Sota po 24-urni inkubaciji. Stolpci prikazujejo povprečja s standardno napako (SE) iz dveh ločenih poskusov ($n = 6$). Razlike v RIF smo statistično ovrednotili s Studentovim t-testom ($*p < 0,05$).

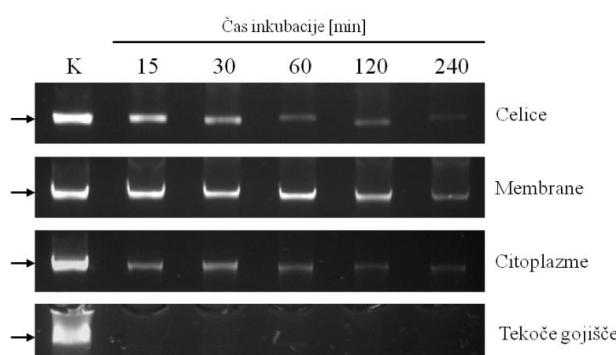
Figure 19: Relative invasion frequency of (RIF) of *M. synoviae* WVU 1853 in CEC-32 and HD11 cells with or without the presence of APMV-1 La Sota after 24 h incubation. Bars represent the means \pm SE from two separate experiments ($n = 6$). Differences in RIF values were statistically evaluated by using unpaired Student's t-test ($*p < 0.05$).

5.3 NUKLEAZNA AKTIVNOST BAKTERIJE *M. synoviae* WVU 1853

5.3.1 Značilnosti nukleazne aktivnosti bakterije *M. synoviae* WVU 1853

Nukleazno aktivnost (NA) bakterije *M. synoviae* smo preverjali pri 37 °C na dsDNA, ki smo jo za teste NA osamili iz celic CEC-32. V sklopu opravljenih analiz smo NA določili celicam *M. synoviae*, njeni membranski in citoplazemski frakciji in tudi gojišču, v katerem smo kulturo *M. synoviae* gojili (Slika 20). Z naraščanjem časa inkubacije se je vsebnost DNA oz. intenziteta lise DNA zmanjševala pri vseh vzorcih, kar je nakazovalo na NA vseh analiziranih vzorcev. NA bakterijskih celic in njihovih citoplazem je bila močnejša kot NA membranske frakcije. Razgradnja DNA je bila opazna že po 15-minutni izpostavitvi celicam ali njihovi citoplazemski frakciji, po 240 minutah pa je bila substratna DNA skoraj popolnoma razgrajena. Razgradnja DNA z membranami *M. synoviae* je postala vidna po 120 minutah inkubacije. Vzorec tekočega gojišča, v katerem smo gojili kulturo *M. synoviae*, je imel najmočnejšo NA izmed vseh analiziranih vzorcev. Nukleaza oz. nukleaze iz gojišča so razgradile substratno DNA v manj kot 15 minutah. Analizirali smo tudi NA

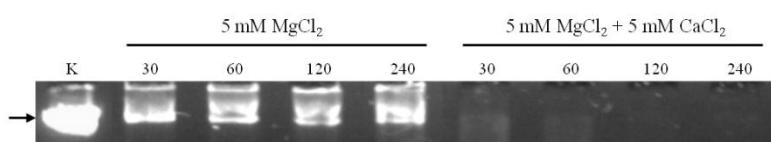
tekočega medija z nizko vsebnostjo proteinov, v katerem smo inkubirali kulturo *M. synoviae* 2 do 4 h. Opazili smo podobno aktivnost kot pri normalnem gojišču. Z opravljenimi analizami smo dokazali, da ima bakterija *M. synoviae* WVU 1853 celično NA in funkcionalne nukleaze, ki se lahko sproščajo v okolje.



Slika 20: Nukleazna aktivnost celičnih frakcij in tekočega gojišča, v katerem je bila gojena kultura bakterije *M. synoviae* WVU 1853, ob različnih časih inkubacije pri temperaturi 37 °C. Kontrola (K) je vsebovala dsDNA in nukleazni pufer s pH 7,4 (pri vzorcih celic, membran in citoplazem *M. synoviae*) ozziroma nenasajeno gojišče (vzorec tekočega gojišča, v katerem je rasla *M. synoviae*). Puščice označujejo velikost 10 kbp.

Figure 20: Nuclease activity of *M. synoviae* cell fractions and culture medium in which *M. synoviae* WVU 1853 was grown, at different time points at 37 °C. Control (K) included dsDNA and nuclease buffer with pH 7.4 (*M. synoviae* cells, membranes and cytoplasms) or fresh culture medium, not inoculated with *M. synoviae* (culture medium). Arrows indicate 10 kbp.

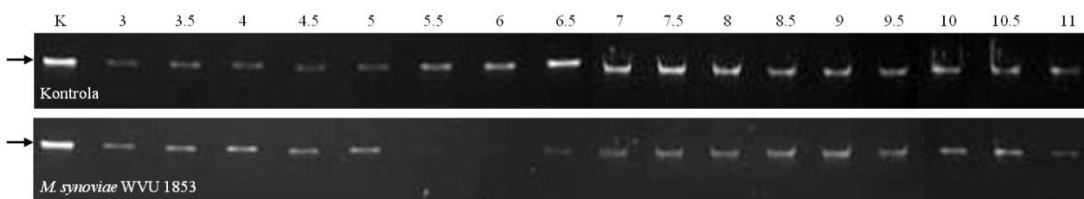
Prisotnost kalcijevih (Ca^{2+}) ionov omogoča funkcionalno NA pri številnih vrstah rodu *Mycoplasma* in veliko mikoplazemskeh nukleaz vsebuje visoko ohranjeno domeno, ki omogoča vezavo Ca^{2+} ionov (Minion in sod., 1993; Schmidt in sod., 2007). Vpliv prisotnosti Ca^{2+} ionov na celično NA smo preverjali z inkubacijo dsDNA in celic *M. synoviae* v dveh nukleaznih pufrih, ki sta vsebovala 5 mM MgCl_2 ozziroma 5 mM MgCl_2 in 5 mM CaCl_2 (Slika 21). NA celic *M. synoviae* je bila močnejša ob prisotnosti obeh, Mg^{2+} in Ca^{2+} ionov. Substratna dsDNA je bila močno razgrajena v manj kot 30 minutah, razgradnja pa je bila skoraj popolna po 240 minutah inkubacije. Razgradnja DNA v pufru, ki je vseboval le Mg^{2+} ione, je bila relativno šibka. Z analizo smo pokazali, da je za močno NA celic *M. synoviae* WVU 1853 v pogojih *in vitro* potrebna prisotnost Mg^{2+} in Ca^{2+} ionov, predvsem Ca^{2+} .



Slika 21: Nukleazna aktivnost celic bakterije *M. synoviae* WVU 1853 ob prisotnosti magnezijevih (Mg²⁺) in kalcijevih (Ca²⁺) ionov pri temperaturi 37 °C. Kontrola (K) je vsebovala dsDNA in nukleazni pufer s 5 mM MgCl₂ ter 5 mM CaCl₂ (pH 7,4). Puščica označuje velikost 10 kbp.

Figure 21: Nuclease activity of *M. synoviae* WVU 1853 cells in the presence of magnesium (Mg²⁺) and calcium (Ca²⁺) ions at 37 °C. Control (K) included dsDNA and nuclease buffer with 5 mM MgCl₂ and 5 mM CaCl₂ (pH 7.4). Arrow indicates 10 kbp.

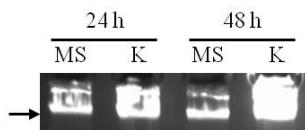
Optimalno pH-območje za celično NA smo določili z inkubacijo celic *M. synoviae* WVU 1853 z dsDNA v nukleaznih pufrih (PBS, 5 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂) s pH-vrednostmi med 3 in 11 (Slika 22). NA celic *M. synoviae* WVU 1853 je bila funkcionalna pri pH vrednostih 5,5 in 6, kar nakazuje na to, da ima celična NA *M. synoviae* v pogojih *in vitro* optimalno območje delovanja v rahlo kislem pH-območju.



Slika 22: Nukleazna aktivnost celic bakterije *M. synoviae* WVU 1853 pri različnih pH-vrednostih nukleaznega pufra (PBS, 5 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂). Kontrola (K) je vsebovala dsDNA in nukleazni pufer s pH 7,4. V kontrolni skupini smo substratni dsDNA namesto celic bakterije *M. synoviae* WVU 1853 dodali nukleazni pufer. Puščici označujeta velikost 10 kbp.

Figure 22: Nuclease activity of *M. synoviae* WVU 1853 cells in nuclease buffer (PBS, 5 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂) with different pH values. Control (K) included dsDNA and nuclease buffer (pH 7.4). In the control group, dsDNA was incubated with nuclease buffer. Arrows indicate 10 kbp.

Poleg analiz NA *M. synoviae* na izolirani dsDNA v pogojih *in vitro* smo izvedli tudi celični poskus, kjer smo genomsko DNA osamili iz okuženih celic CEC-32 in jo analizirali z agarozno gelsko elektroforezo. Vpliv NA na razgradnjo genomske DNA celic CEC-32 v različnih časovnih intervalih po okužbi z *M. synoviae* WVU 1853 je prikazan na sliki 23. Genomska DNA smo osamili iz okuženih celic 24 in 48 h po okužbi z *M. synoviae*. Okužba je povzročila razgradnjo genomske DNA po 24 h in je bila opazno močnejša po 48 h, v primerjavi z genomsko DNA iz neokuženih celic. Razgradnje genomske DNA neokuženih celic nismo opazili.

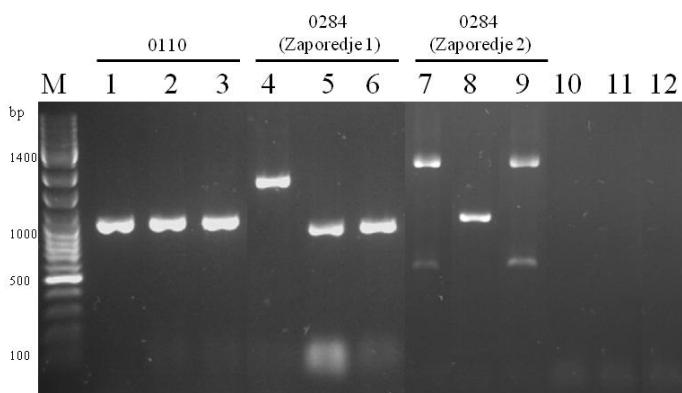


Slika 23: Vpliv nukleazne aktivnosti bakterije *M. synoviae* WVU 1853 na genomsko DNA po 24 in 48 h okužbi celic CEC-32. MS: genomska DNA osamljena iz okuženih celic CEC-32; K: genomska DNA osamljena iz neokuženih celic CEC-32. Puščica označuje velikost 10 kbp.

Figure 23: Influence of *M. synoviae* WVU 1853 nuclease activity on genomic DNA degradation 24 and 48 h after infection of CEC-32 cells. MS: genomic DNA isolated from infected CEC-32 cells; K: genomic DNA isolated from uninfected CEC-32 cells. Arrow indicates 10 kbp.

5.3.2 Primerjava nukleotidnih zaporedij nukleaz MS53_0110 in MS53_0284 med sevi bakterije *M. synoviae* WVU 1853, ULB 9122, ULB 02/T6 ter 53

Z uporabo oligonukleotidnih začetnikov MS_110-F, MS_110-R in MS_284-F, MS_284-R, MS_284-F1, MS_284-R1 smo s PCR pomnožili regiji v genomski DNA *M. synoviae*, ki vsebujeta gena za nukleazi MS53_0110 in MS53_0284. Gena za obe nukleazi smo pomnožili pri sevih WVU 1853, ULB 9122 in ULB 02/T6. Oligonukleotidne začetnike smo načrtovali na osnovi znanega nukleotidnega zaporedja genoma seva *M. synoviae* 53 (oznaka v GenBank AE017245, Vasconcelos in sod., 2005). Predvidena dolžina zaporedja 0110, ki je zajemalo gen za MS53_0110, je bila 1019 bp; dolžini zaporedij 0284-1 in 0284-2, ki sta zajemali gen za MS53_0284, pa 915 in 1078 bp. Analiza produktov PCR z agarozno gelsko elektroforezo je pokazala, da vsebuje tipski sev WVU 1853 za približno 300 bp daljšo medgensko regijo na 5' koncu gena za MS53_0284, na katero se je prilegal oligonukleotidni začetnik MS_284-F, kot sevi ULB 9122, ULB 02/T6 in 53 (Slika 24, steza 4). Za približno 400 bp sta bili daljši tudi zaporedji 0284-2 pri sevih WVU 1853 in ULB 02/T6. Oligonukleotidni začetnik MS_284-R1 smo načrtovali tako, da se je prilegal na 5' konec gena za MS53_0285. S tem smo pokazali, da je medgenska regija med genoma za MS53_0284 in MS53_0285 daljša kot pri sevih ULB 9122 in 53 (Slika 24, stezi 7 in 9).



Slika 24: Analiza produktov PCR po agarozni gelski elektroforezi, ki smo jih izolirali iz gela in uporabili za pridobitev nukleotidnega zaporedja genov za nukleazi MS53_0110 in MS53_0284. Določanje nukleotidnega zaporedja je opravilo podjetje Macrogen Inc (Južna Koreja). M: molekularni označevalec; 1, 4, 7: tipski sev WVU 1853; 2, 5, 8: sev ULB 9122; 3, 6, 9: sev ULB 02/T6; 10, 11, 12: negativne kontrole PCR za posamezen par oligonukleotidnih začetnikov.

Figure 24: Analysis of PCR products after agarose gel electrophoresis that were used for nucleotide sequencing of genes of nucleases MS53_0110 and MS53_0284 in *M. synoviae* strains WVU 1853, ULB 9122 and ULB 02/T6. Nucleotide sequencing was performed by Macrogen Inc (South Korea). M: molecular marker; 1, 4, 7: type strain WVU 1853; 2, 5, 8: strain ULB 9122; 3, 6, 9: strain ULB 02/T6; 10, 11, 12: negative PCR controls for each primer pair.

Produkte PCR smo osamili iz agaroznega gela in jih prečistili s komercialnim kompletom PureLink Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen, ZDA) po navodilih proizvajalca. Določanje nukleotidnega zaporedja produktov PCR je opravilo podjetje Macrogen Inc (Južna Koreja). Lastnosti zaporedij nukleaz MS53_0110 in MS53_0284 pri sevih *M. synoviae* WVU 1853, ULB 9122, ULB 02/T6 in 53 so prikazane v preglednici 14. Poravnave nukleotidnih zaporedij nukleaz MS53_0110 in MS53_0284 pri sevih WVU 1853, ULB 9122, ULB 02/T6 in 53, ki smo jih opravili s prosto dostopnim računalniškim programom ClustalW (Chenna in sod., 2003), so prikazane v prilogah C in D.

Preglednica 14: Velikost genov, predvideno število aminokislinskih ostankov, molekulska masa in pI nukleaz MS53_0110 in MS53_0284 pri tipskem sevu bakterije *M. synoviae* WVU 1853 in sevih ULB 9122, ULB 02/T6 in 53, ki smo jih pridobili z določanjem nukleotidnega zaporedja. Podatke o nukleotidnem zaporedju seva 53 smo pridobili iz podatkovne baze NCBI.

Table 14: Gene sizes, predicted number of amino acids, molecular weight and pI of nucleases MS53_0110 and MS53_0284 in *M. synoviae* type strain WVU 1853 and strains ULB 9122, ULB 02/T6 and 53 that were obtained by nucleotide sequencing. Nuclease nucleotide sequence data for strain 53 were obtained from the NCBI database.

	Sev bakterije <i>M. synoviae</i>			
	WVU 1853	ULB 9122	ULB 02/T6	53
MS53_0110				
Velikost gena [bp]	696	696	696	696
Vsebnost G + C [%]	28,31	28,31	28,16	28,59
Velikost proteina [ak] ¹	231	231	231	231
Molekulska masa [kDa] ²	26,71	26,67	26,63	26,65
Teoretična pI ³	9,34	9,22	9,22	9,34
MS53_0284				
Velikost gena [bp]	1335	1356	1356	1356
Vsebnost G + C [%]	26,89	26,25	26,55	26,70
Velikost proteina [ak]	444	451	451	451
Molekulska masa [kDa]	50,13	51,03	51,02	51,03
Teoretična pI	8,65	8,63	8,64	8,87

¹ Aminokislinske ostanke smo določili glede na pridobljeno nukleotidno zaporedje.

² Molekulska masa proteina, ki smo jo določili na osnovi aminokislinskega zaporedja.

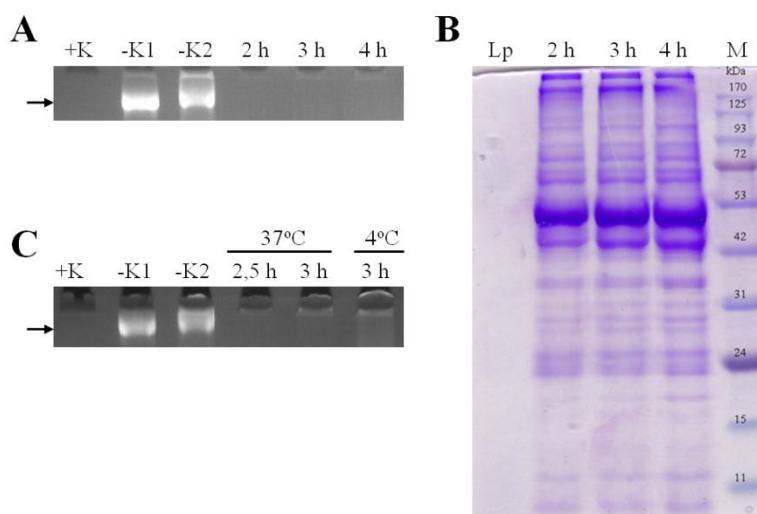
³ Teoretična izoelektrična točka proteina, ki smo jo določili na osnovi aminokislinskega zaporedja.

Analiza nukleotidnega in aminokislinskega zaporedja nukleaze MS53_0284 pri sevu WVU 1853 je pokazala, da ima gen za MS53_0284 delecijo adenina na mestu 1332, ki povzroči prezgodnjo prekinitev translacije in posledično 7 aminokislinskih ostanov krajši protein na C-terminalnem koncu (Preglednica 14). Gen za MS53_0284 določa pri sevih ULB 9122, ULB 02/T6 in 53 proteine dolge 451 aminokislinskih ostanov, z okvirno molekulsko maso 51 kDa. Gen za MS53_0110 določa pri vseh analiziranih sevih proteine z 231 aminokislinskimi ostanki in okvirnimi molekulskimi masami 27 kDa. Analiza aminokislinskega zaporedja nukleaz MS53_0110 in MS53_0284 z računalniškim programom MEMSAT-SVM (The PSIPRED Protein Structure Prediction Server) pri sevu WVU 1853 je pokazala, da vsebujeta obe nukleazi transmembransko domeno. Analiza je pokazala, da se predvideno aktivno mesto nukleaze MS53_0284 nahaja na citoplazemski strani, aktivno mesto nukleaze MS53_0110 pa na zunajcelični strani membrane *M. synoviae*.

5.3.3 Zunajcelične nukleaze bakterije *M. synoviae* WVU 1853

Po določitvi NA medija, v katerem smo gojili kulturo *M. synoviae* (Slika 20), smo želeli okarakterizirati zunajcelične proteine, odgovorne za močno NA medija. Kulturo *M.*

synoviae WVU 1853 smo gojili v tekočem gojišču z nizko vsebnostjo proteinov in mikoplazemske celice po različnih časih inkubacije odstranili s centrifugiranjem. Supernatante medija smo pred testi NA filtrirali skozi filtre z velikostjo por $0,22 \mu\text{m}$. NA filtriranih alikvotov medija in njihovi proteinski profili so prikazani na sliki 25 (A, B). NA vseh vzorcev medija je bila zelo močna in je povzročila popolno razgradnjo substratne dsDNA po 30 minutah. S tem smo dokazali, da se nukleaze sproščajo iz celic *M. synoviae* WVU 1853. Preverili smo tudi, če se nukleaze iz celic *M. synoviae* sproščajo pri nizkih temperaturah gojenja. Medij z nizko vsebnostjo proteinov je imel po 3 h gojenja kulture *M. synoviae* pri 4°C podobno močno NA kot po 3 h gojenja pri temperaturi 37°C (Slika 25C).

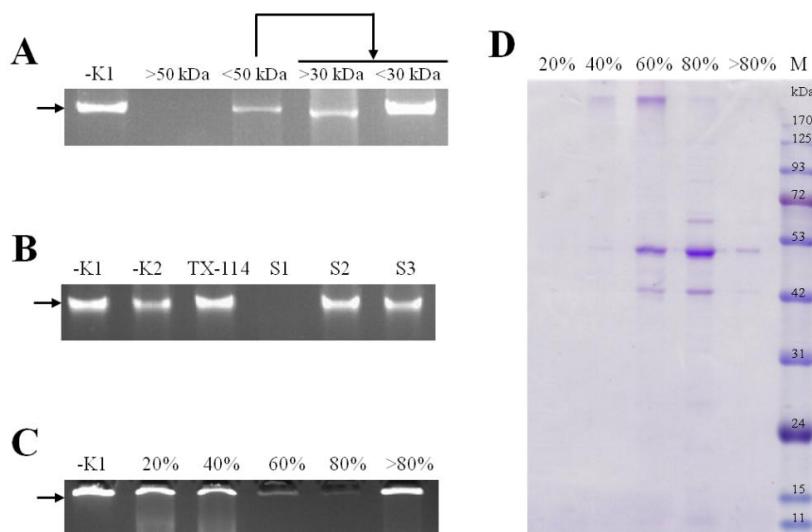


Slika 25: Nukleazna aktivnost (NA) in proteinski profil medija z nizko vsebnostjo proteinov, v katerem je rasla bakterijska kultura *M. synoviae* WVU 1853. (A) NA medija po 2, 3 in 4 h gojenja bakterije *M. synoviae*; (B) proteinski profil medija po 2, 3 in 4 h gojenja bakterije *M. synoviae*; (C) primerjava NA medija po gojenju bakterije *M. synoviae* 3 h pri 37°C in 4°C . Pri testih NA smo vzorce inkubirali z dsDNA 30 minut pri 37°C . +K: dsDNA po 15 minutni inkubaciji z DNazoi; –K1: dsDNA po inkubaciji z elucijskim pufrom; –K2: dsDNA po inkubaciji z medijem z nizko vsebnostjo proteinov; Lp: medij z nizko vsebnostjo proteinov, v katerem nismo gojili kulture bakterije *M. synoviae*. Puščici označujeta velikost 10 kbp.

Figure 25: Nuclease activity (NA) and protein profile of low protein culture medium in which *M. synoviae* WVU 1853 culture was grown. (A) NA of low protein culture medium after 2, 3 and 4 h of *M. synoviae* growth; (B) protein profile of low protein culture medium after 2, 3 and 4 h of *M. synoviae* growth; (C) comparison of NA of low protein culture media in which *M. synoviae* was grown for 3 h at 37°C and 4°C . Each sample was incubated with dsDNA for 30 min at 37°C . +K: dsDNA after 15 min incubation with DNasel; –K1: dsDNA after incubation with elution buffer; –K2: dsDNA after incubation with low protein culture medium; Lp: fresh low protein culture medium, not inoculated with *M. synoviae*. Arrows indicate 10 kbp.

Za določitev območja velikosti zunajceličnih nukleaz smo medij z močno NA ultracentrifugirali s kolonami, ki prepuščajo proteine z določeno molekulsko maso. Močno NA smo določili v supernatantu s proteini večimi od 50 kDa (Slika 26A). NA je bila prisotna tudi v vzorcu proteinov velikosti med 30 in 50 kDa, vendar je bila šibkejša. Pri določanju topnosti nukleaz smo ločili proteine v mediju na hidrofobno in hidrofilno

frakcijo z uporabo reagenta Triton X-114. Močno NA smo določili v hidrofilni frakciji medija (Slika 26B). Hidrofilno frakcijo medija smo v nadaljevanju oborili z dodajanjem različnih koncentracij amonijevega sulfata do 20, 40, 60, 80 in > 80 %. Najmočnejšo NA so imeli proteini oborjeni z 80 % amonijevim sulfatom. NA smo določili tudi pri vzorcu, ki smo ga oborili s 60 % amonijevim sulfatom, vendar je bila nižja (Slika 26C). Proteinski profil oborjenih vzorcev hidrofilne frakcije medija je pokazal 5 skupnih proteinskih lis pri vzorcih oborjenih s 60 in 80 % amonijevim sulfatom, s približno molekulsko maso 60, 50, 48, 43 in 27 kDa (Slika 26D). Velikost predvidenih nukleaz MS53_0110 in MS53_0284 pri sevu *M. synoviae* WVU 1853, ki smo jih določili na osnovi analize nukleotidnega zaporedja je znašala 26,7 in 50,1 kDa (Preglednica 14). Z določanjem aminokislinskega zaporedja z N-terminalnega konca in masno spektrometrijo smo analizirali proteinske lise pri približno 50, 48, 43 in 27 kDa (Slika 26D) in preverili, če vsebujejo predvideni nukleazi. Analize z določanjem aminokislinskega zaporedja z N-terminalnega konca nismo mogli izvesti, saj se je izkazalo, da so bili proteini na N-terminalnem koncu blokirani, najverjetneje acilirani. Z masno spektrometrijo v proteinskih vzorcih nismo uspeli identificirali nukleaz *M. synoviae* WVU 1853. Možno je, da se funkcionalni nukleazi nahajata v kraji obliki oziroma sta prisotni pod mejo detekcije pri ločevanju proteinov z NaDS-PAGE. Kljub neuspešni proteinski identifikaciji naši rezultati kažejo na to, da ima bakterija *M. synoviae* WVU 1853 funkcionalne zunajcelične nukleaze z molekulsko maso od 30 do > 50 kDa, ki imajo v pogojih *in vitro* močno aktivnost.



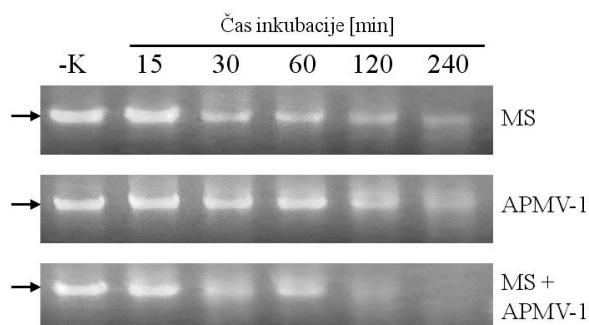
Slika 26: Nukleazna aktivnost (NA) in proteinski profil frakcij medija z nizko vsebnostjo proteinov, v katerem smo 2 uri gojili kulturo bakterije *M. synoviae* WVU 1853. (A) NA vzorcev medija po ultracentrifugiraju s kolonami, ki prepuščajo proteine določene velikosti; (B) NA vzorcev medija po ločitvi hidrofilne in hidrofobne frakcije z reagentom Triton X-114; (C) NA hidrofilne frakcije medija poobarjanju z različnimi koncentracijami amonijevega sulfata; (D) proteinski profil z amonijevim sulfatom oborjenih vzorcev hidrofilne frakcije medija. Pri testih NA smo vzorce inkubirali z dsDNA 3 h pri 37 °C. –K1: dsDNA po inkubaciji z nukleaznim pufrom (PBS, 5 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂; pH 7,4); –K2: dsDNA po inkubaciji s supernatantom medija z nizko vsebnostjo proteinov po frakcionaciji z reagentom Triton X-114; S1–S3: supernatanti s hidrofilnimi proteini po 1., 2. in 3. spiranju. Puščice označujejo velikost 10 kbp.

Figure 26: Nuclease activity (NA) of low protein culture medium protein fractions in which *M. synoviae* WVU 1853 was grown for 2 h. (A) NA of low protein culture medium samples after ultracentrifugation with specific molecular weight cut-off filters; (B) NA of low protein culture medium samples after fractination with Triton X-114; (C) NA of hydrophilic low protein culture medium fractions after precipitation with different ammonium sulphate concentrations; (D) Protein profiles of hydrophilic low protein culture medium fractions after precipitation with different ammonium sulphate concentrations. Each sample was incubated with dsDNA for 3 h at 37 °C. –K1: dsDNA after incubation with nuclease buffer (PBS, 5 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂; pH 7.4); –K2: dsDNA after incubation with low protein culture medium following Triton X-114 fractination; S1–S3: supernatants containing hydrophilic proteins after 1., 2. and 3. washing step. Arrows indicate 10 kbp.

5.3.4 Nukleazna aktivnost bakterije *M. synoviae* WVU 1853 ob prisotnosti APMV-1 La Sota

V sklopu analiziranja NA *M. synoviae* smo preverili tudi, če skupna inkubacija *M. synoviae* WVU 1853 in APMV-1 La Sota vpliva na nukleazno aktivnost *M. synoviae* v pogojih *in vitro*. Ker se lahko oba patogena mikroorganizma v določenih pogojih skupaj pojavita v gostitelju v pogojih *in vivo*, nas je zanimalo, ali prisotnost seva APMV-1, ki se pogosto uporablja kot živo cepivo, poveča oziroma zmanjša NA celic *M. synoviae*. Pri testih NA smo celice *M. synoviae* in APMV-1 resuspendirali v nukleaznem pufru (PBS, 5 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂; pH 7,4) in ju v različnih intervalih inkubirali s substratno

dsDNA pri 37 °C (Slika 27). Pričakovano so imele celice bakterije *M. synoviae* NA, ki je bila opazna po 30 minutah inkubacije glede na kontrolni vzorec. APMV-1 La Sota je imel v danih pogojih šibko NA po 240 minutah, kar je bilo presenetljivo. NA je bila po 240 minutah inkubacije DNA z obema patogenoma močnejša kot NA celic *M. synoviae*, kar namiguje na sinergistični vpliv razgrajevanja DNA ob sočasni prisotnosti *M. synoviae* in APMV-1 v danih pogojih *in vitro*.



Slika 27: Nukleazna aktivnost celic bakterije *M. synoviae* WVU 1853 ob prisotnosti APMV-1 La Sota pri različnih časih inkubacije pri temperaturi 37 °C v pogojih *in vitro*. –K: dsDNA po 240 min inkubaciji z nukleaznim pufrom (PBS, 5 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂; pH 7,4) oziroma fiziološko raztopino. Puščice označujejo velikost 10 kbp.

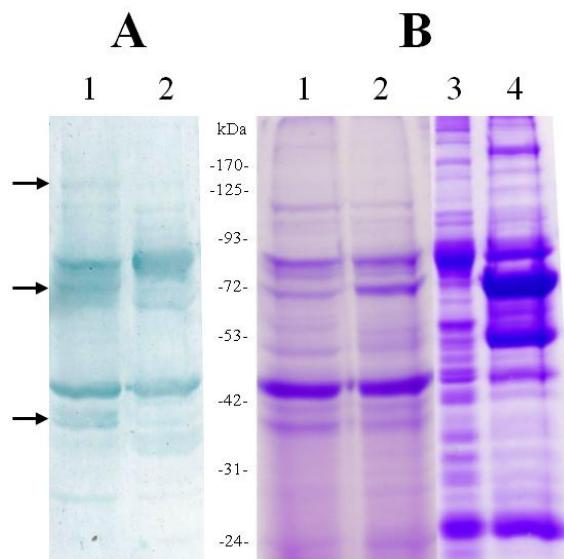
Figure 27: *In vitro* nuclease activity of *M. synoviae* WVU 1853 cells in the presence of APMV-1 La Sota at different time points at 37 °C. –K: dsDNA after 240 min incubation with nuclease buffer (PBS, 5 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂; pH 7.4) and physiological solution. Arrows indicate 10 kbp.

5.4 INTERAKCIJE MED BAKTERIJO *M. synoviae* WVU 1853 IN APMV-1 La Sota V POGOJIH *in vitro*

5.4.1 Razgradnja proteinov APMV-1 ob prisotnosti bakterije *M. synoviae*

Pri analizi interakcij med *M. synoviae* WVU 1853 in APMV-1 La Sota smo želeli preveriti, če lahko *M. synoviae* s svojimi proteazami vpliva na proteine APMV-1 po skupni inkubaciji v pogojih *in vitro*. Analiza bi nam dala jasnejši vpogled v dogajanje med sočasnimi okužbami gostitelja z obema patogenoma, saj bi lahko cepitev površinskih proteinov APMV-1 La Sota vplivala na učinkovitost cepljenja in tudi vplivala na patogenost tega lentogenega seva APMV-1 v pogojih *in vivo* pri uporabi živilih cepiv. *M. synoviae* smo inkubirali z APMV-1 24 h pri temperaturi 37 °C. Po končani inkubaciji smo celice *M. synoviae* odstranili s centrifugiranjem in z NaDS-PAGE ter z metodo po Westernu analizirali celične pelete in supernatante. Proteinski profili APMV-1, celic *M. synoviae*, peletov in supernatantov po inkubaciji so prikazani na sliki 28. Pri analizi proteinskih profilov smo opazili, da se je veliko število mikoplazemskih proteinov med inkubacijo sprostilo iz celic, kar je otežilo analizo razgradnje proteinov APMV-1 z NaDS-PAGE. Z metodo po Westernu smo z uporabo kokošjih serumov proti APMV-1 določili

znižano intenziteto lis pri približno 130, 72 in 40 kDa (Slika 28A), kar je nakazovalo na razgradnjo proteinov APMV-1 s strani mikoplazemskih proteaz v danih pogojih *in vitro*.



Slika 28: Analiza proteinskega profila APMV-1 z metodo po Westernu (A) in proteinski profil celic bakterije *M. synoviae* WVU 1853 in APMV-1 La Sota (B) po skupni 24-urni inkubaciji pri temperaturi 37 °C v pogojih *in vitro*. 1: vzorec APMV-1 La Sota; 2: vzorec supernatanta po skupni inkubaciji bakterije *M. synoviae* in APMV-1; 3: vzorec peleta po skupni inkubaciji bakterije *M. synoviae* in APMV-1; 4: vzorec celic bakterije *M. synoviae* WVU 1853. Puščice prikazujejo znižano intenziteto proteinskih lis pri približno 130, 72 in 40 kDa na stezi A2.

Figure 28: Western blot analysis of APMV-1 protein profiles (A) and protein profiles of *M. synoviae* WVU 1853 cells and APMV-1 La Sota (B) after mixed 24 h *in vitro* incubation at 37 °C. 1: sample of APMV-1 La Sota; 2: supernatant sample after mixed incubation of *M. synoviae* and APMV-1; 3: pelet sample after mixed incubation of *M. synoviae* and APMV-1; 4: sample of *M. synoviae* WVU 1853 cells. Arrows indicate a decreased intensity of protein bands at approximately 130, 72 and 40 kDa on lane A2.

6 RAZPRAVA IN SKLEPI

6.1 RAZPRAVA

Poznavanje patogenih mikroorganizmov in mehanizmov imunskega sistema ptic je nujnega pomena za uvedbo ustreznih strategij preprečevanja in zdravljenja okuž ter cepljenj pri perutnini. Imunski sistem kokoši je kompleksen in v določeni meri podoben imunkemu sistemu sesalcev, med obema pa obstajajo ključne razlike v naboru limfoidnih organov, tkiv, celic in molekul (Kaiser, 2012). Prepoznavanje določenega patogenega mikroorganizma v gostitelju vodi v: aktivacijo dejavnikov prirojene imunosti, ki omogočijo in usmerjajo aktivacijo dejavnikov pridobljene imunosti; omejevanje okužbe, uničenje patogenega mikroorganizma; razvoj imunskega spomina. Nepogrešljivo vlogo pri stimuliraju in koordinaciji imunskega odziva po okužbi s patogenim mikroorganizmom imajo citokini in kemokini, ki jih lahko razdelimo v poddružine na podlagi njihove strukture, funkcije, specifičnosti za receptorje in drugih dejavnikov (Kaiser, 2012; Kaiser in Stäheli, 2008). Signalne poti in aktivacija elementov imunskega sistema, ki jih sprožajo glavni kokošji patogeni mikroorganizmi, so relativno dobro poznane, slabše pa je poznavanje molekularnih mehanizmov imunskega odziva na sočasne in zaporedne okužbe z dvema ali več mikroorganizmi. Interakcije med bakterijo *M. synoviae* in APMV-1 lahko vplivajo na potek in nastanek bolezni oziroma na učinkovitost cepljenja pri perutnini (Bradbury, 1984; Kleven, 2003b). Čeprav so bili opisani določeni patološki učinki, ki jih je povzročila zaporedna okužba kokoši z *M. synoviae* in APMV-1, manjkajo ključni podatki o molekularnem dogajanju pri vnetnih procesih med zaporedno okužbo v pogojih *in vivo* ali *in vitro*.

Bakterija *M. synoviae* spada poleg *M. gallisepticum*, *M. meleagridis* in *M. iowae* med štiri najpomembnejše patogene ptiče mikoplazme, ki okužujejo perutnino. Najpogosteje povzroča subklinične okužbe zgornjega dela dihal. Okužba se lahko iz epitelijev dihalnega trakta prenese na ostale organe, predvsem sklepe in jajcevode. Slednje pogojuje vertikalni prenos okužbe na kokošje zarodke preko valilnih jajc (Bradbury, 2005; Olson, 1984). V določenih primerih lahko okužba postane sistemska in vodi v nastanek kužnega sinovitisa, kjer so najbolj prizadete sinovialne membrane sklepov in kit. Pri sistemski okužbi lahko nastane tudi eksudativni sinovitis in tenovaginitis. Okužba z *M. synoviae* pogosto preide iz subklinične v klinično obliko ob prisotnosti določenih sevov oziroma cepiv APMV-1 (Kleven in Ferguson-Noel, 2008). Sevi oziroma izolati *M. synoviae* se med seboj razlikujejo po virulenčnih dejavnikih in po zmožnosti povzročitve bolezni pri kokoših, njihova virulanca pa je odvisna tudi od mesta okužbe (Kleven in sod., 1975). Tipski sev WVU 1853 je zmerno patogeni sev *M. synoviae*, ki je bil izoliran iz sklepov kokoši z infektivnim sinovitisom. Po inokulaciji WVU 1853 v podplate SPF piščancev so določili poškodbe in prisotnost mikroorganizma v zračnih vrečkah, vranici, jetrih, sklepih, podplatih, burzi grodnice, sinusih, pljučih, srcu, ledvicah, kitah, trahejah in notranjih

organih. Po inokulaciji seva WVU 1853 v oči piščancev so identificirali poškodbe v zgornjem in spodnjem delu dihal in WVU 1853 določili le v zgornjem delu dihal (Lockaby in sod., 1998). Tipski sev WVU 1853 lahko vdira v kokošje nefagocitirajoče celice (Dušanić in sod., 2009), vpliva na spremembo metabolne aktivnosti kokošjih hondrocytov (Dušanić in sod., 2014) in vpliva na njihovo povišano apoptozo preko aktivacije citokinov, NO in proapoptotskih genov (Dušanić in sod., 2012). *M. synoviae* WVU 1853 vsebuje visoko variabilni imunodominantni hemagglutinin VlhA (Benčina in sod., 1999; Noormohammadi in sod., 1997, 1998), nevraminidazo NanH, s katero lahko desializira IgY in glikoproteine sluznice dihalnih poti (Berčič in sod., 2011) ter cisteinsko proteazo CysP, s katero lahko cepi IgY na Fc in Fab fragmente (Cizelj in sod., 2011). VlhA, NanH in CysP so imunogeni proteini (Berčič in sod., 2011; Cizelj in sod., 2013; Noormohammadi in sod., 1997). VlhA in drugi lipoproteini tipskega seva WVU 1853 so stimulirali odziv kokošjih makrofagov (Lavrič in sod. 2007, 2008), ki so izražali vnetne citokine, kemokine, NO in druge vnetne molekule, tudi preko vezave na TLR15 (Oven in sod., 2013). Hemaglutinacija, antigenska variacija hemagglutinina VlhA, nevraminidazna aktivnost in proteazna aktivnost spadajo med glavne virulentne dejavnike *M. synoviae*. Mednje spada tudi nukleazna aktivnost, ki smo jo dokazali in analizirali v sklopu te doktorske naloge.

APMV-1 spada v rod *Avulavirus*, v katerega uvrščamo virus z enoverižno, nesegmentirano in negativno polarno genomsko RNA molekulo. APMV-1 povzroča pri perutnini AKK, kjer je lahko pogin kokoši 90–100 %. Pri pticah je po okužbi mogoč razpon med zelo hudimi in subkliničnimi bolezenskimi stanji, ki so odvisna od seva APMV-1 in gostitelja (Alexander in Senne, 2008). Seve APMV-1 lahko glede na klinične znaake pri kokoših razdelimo v pet tipov: viscerotropni velogeni, nevrotropni velogeni, mezogeni, lentogeni in asimptomatski tip (Beard in Hanson, 1984). Patogenezo in virulenco APMV-1 določajo virusni proteini F, HN in V (Ganar in sod., 2014). Kokoši se lahko z APMV-1 okužijo z vdihom ali zaužitjem kontaminiranih aerosolov oziroma krme. Možnost horizontalnega širjenja okužbe je izredno visoka, vertikalni prenos pa je mogoč le v primeru kontaminacije jajčne lupine in jajčne vsebine. Glavno mesto podvajanja APMV-1 pri okuženi perutnini sta dihalni in prebavni trakt. Od tam se lahko okužba razširi na druge notranje organe in tkiva, v odvisnosti od seva oziroma izolata virusa in njegove virulence (Alexander in Senne, 2008). Lentogeni sevi APMV-1 se pogosto uporabljo kot živa cepiva in lahko ob prisotnosti drugih mikroorganizmov ali neugodnih okoljskih pogojih povzročijo hujše bolezni dihal cepljenih živali (OIE, 2012). Med najpogosteje uporabljena živa cepiva za cepljenje perutnine spada lentogeni sev APMV-1 La Sota (Goldhaft, 1980), ki je terenski izolat (Alexander in Senne, 2008) in uvrščen v serotipu APMV-1 v razred II, genotip II (Miller in sod., 2010). Sev La Sota se uporablja kot živo cepivo, ima vrednost ICPI < 0,4 in se lahko pri piščancih aplicira intranasalno, intraokularno, s pitno vodo in kapljično (Alexander in Senne, 2008). Sev La Sota proizvajalca Genera (Hrvaška) ima vrednost ICPI 0,06 (Rojš in sod., 2007). APMV-1 La

Sota je pri 8 tednov starih intramuskularno inokuliranih piščancih okužil respiratorni trakt (Beard in Hanson, 1984), pokazali pa so tudi, da se v pogojih *in vivo* 72 h po okužbi La Sota pri piščancih razmnožuje le na mestu inokulacije in ne doseže notranjih organov (Rue in sod., 2011; Wakamatsu in sod., 2006a, b). Podobno kot pri nekaterih drugih lentogenih sevih APMV-1 so po cepljenju piščancev z La Soto opazili hujša obolenja dihal ob prisotnosti določenih mikroorganizmov, tudi mikoplazem. Tovrstno cepljenje ali okužba piščancev lahko vodi v septikemijo ali vnetje zračnih vrečk (Alexander in Senne, 2008).

Cepljenje proti AKK je navadno urejeno glede na trenutno situacijo bolezni in zakonske predpise določene države in je načeloma obvezno v večjih rejah perutnine (OIE, 2012). V Sloveniji se proti AKK cepi vse jate kokoši, piščancev, puranov, japonskih prepelic, nojev, pegatk, jerebic in matične jate fazanov na gospodarstvih z več kot 350 živalmi; v naseljih, kjer so gospodarstva z več kot 350 živalmi; v fazanerijah in v rejah nojev. Cepi se tudi golobe, ki se udeležujejo tekem oziroma razstav (Atipična kokošja kuga. Načrt ukrepov ob pojavi atypične kokošje kuge v Republiki Sloveniji, 2014). Ker so subklinične okužbe dihalnega trakta kokoši z *M. synoviae* relativno pogoste in klinično neprepoznavne, bi lahko v praksi pri cepljenju proti AKK s kapljičnimi metodami ali tudi med naravno okužbo z lentogenimi sevi APMV-1 prišlo do interakcije med APMV-1 La Sota in *M. synoviae* v gostitelju. Znano je, da lahko pride pri kokoših do hujšega vnetja in poškodb zračnih vrečk, ki jih povzroči respiratorna okužba z *M. synoviae* v kombinaciji s cepivi proti AKK, kužnim bronhitisom (IB) ali okužbi z obema virusoma (Kleven in Ferguson-Noel, 2008; Kleven in sod., 1972b; Olson in sod., 1964). Okužba z *M. synoviae* se lahko prenaša vertikalno preko valilnih jajc, zato je lahko subklinična okužba prisotna v zarodkih že pred izvalitvijo. Na razvoj hujših vnetnih reakcij in znižano preživetje bi lahko vplivala tudi zgodnja cepljenja proti AKK v primerih, ko bi bili en dan stari piščanci zaradi vertikalnega prenosa mikoplazem že okuženi, in tudi vedno bolj aktualne novejše strategije cepljenja kokošjih zarodkov *in ovo*. Pri cepljenjih *in ovo* se cepivo navadno mehansko injicira v amnionsko vrečko kokošjih zarodkov med 17 in 19 dnevom inkubacije. Dokazali so, da so kokošji zarodki, ki so bili okuženi z mešanico različnih živih virusnih cepiv, razvili imunski odziv proti posamezni komponenti cepiva (Sharma, 1985; Sharma in sod., 2002; Sharma in Witter, 1983). *In ovo* cepiva proti APMV-1 še niso na voljo za rutinsko uporabo, obstaja pa več kandidatnih poskusnih cepiv, testiranih v laboratorijskih pogojih; ta vsebujejo rekombinantne mutante APMV-1, kompleksne nosilcev z Ag APMV-1 in protitelesi ter DNA cepiva. Slednja so se v laboratorijskih pogojih izkazala kot učinkovita za vzpostavitev zaščite proti kokcidiozi, IB, IBD in AKK (Schijns in sod., 2008). Cepiva za *in ovo* cepljenje proti ptičjim mikoplazmam obstajajo, vendar se v praksi še ne uporabljajo rutinsko. Trenutno je v poskusni fazi *in ovo* cepivo za zaščito proti okužbi z bakterijo *M. gallisepticum* (El-Safty in sod., 2005). Pri načrtovanju novih strategij cepljenja ima velik pomen identifikacija subkliničnih mikoplazemskih okužb pred apliciranjem cepiv zarodkom oziroma piščancem, ki se najpogosteje izvaja s testiranjem starševskih jat. Načrtovanje kombiniranih cepiv mora biti natančno in skladno s

smernicami OIE (2012), saj bi lahko posamezne komponente cepiv povzročile podobne učinke kot sočasne okužbe; vodile bi v nastanek hujših vnetnih reakcij po aplikaciji in tudi povišale dovzetnost za okužbo s tretjim ali z več patogenimi mikroorganizmi. Skupna prisotnost *M. synoviae* in APMV-1 La Sota v kokošjem zarodku po zaporednih okužbah ali cepljenjih bi lahko povzročila podobne spremembe v izražanju citokinov in kemokinov in vplivala na povišano patogenost *M. synoviae* kot pri že opisanih okužbah piščancev. Izražanje citokinov in kemokinov med zaporedno okužbo kokošjih zarodkov z *M. synoviae* in APMV-1 La Sota in njun vpliv na aktivacijo imunskega odziva smo preverili v sklopu te doktorske naloge.

Prednosti uporabe SPF kokošjih zarodkov, v primerjavi s piščanci, pri poskusih okuževanja z *M. synoviae* WVU 1853 in APMV-1 La Sota ter analizah izražanja genov je več: lažja dostopnost in nizka cena; relativno enostavno ravnanje; enostavno zagotavljanje gojenja pod enakimi pogoji; možnost gojenja v laboratoriju; ni prisotnih drugih patogenih mikroorganizmov, ki bi lahko vplivali na rezultate analiz (SPF); enostavnejša pridobitev dovoljenj za izvedbo poskusov; razširjanje inokuliranih patogenih mikroorganizmov v večino tkiv zaradi dobre prekrvavitve zarodkov in uspešno razmnoževanje obeh patogenov v CAM in izločanje v ALF. Patogenost *M. synoviae* WVU 1853, APMV-1 La Sota in preživetje zarodkov sta odvisna od mesta inokulacije v kokošje zarodke. Kokošji zarodki, ki jim v alantoisno votlino injiciramo *M. synoviae*, preživijo po inokulaciji približno 13 dni in 5 dni po injiciranju lentogenih sevov APMV-1 (Beard and Hanson, 1984; Olson, 1984). Injiciranje v druga mesta povzroči hitrejše zamiranje zarodkov in nižji odstotek preživetja. V naši študiji smo z inokulacijo 10^8 CFU *M. synoviae* WVU 1853 na 10. dan in 10^3 EID₅₀ APMV-1 La Sota na 17. dan inkubacije v alantoisne votline zagotovili 80 % preživetje zarodkov do vzorčenja na 19. dan inkubacije. Opazili smo, da so bili zarodki, okuženi z *M. synoviae* WVU 1853 in zaporedno okuženi zarodki, opazno manjši od zarodkov v kontrolnih skupinah, opazna pa je bila tudi sprememba barve nekaterih notranjih organov. Zarodki, v katere smo inokulirali APMV-1 La Sota, se od zarodkov v kontrolnih skupinah niso očitno razlikovali (rezultati niso prikazani). V preliminarnih poskusih smo nekaterim zarodkom injicirali *M. synoviae* v rumenjak in kulturo iz rumenjakov re-izolirali. Pri ponovni inokulaciji teh kultur v alantoisne votline smo opazili hitrejše zamiranje zarodkov kot pri inokulaciji tekoče kulture *M. synoviae*. Povišana patogeneza *M. synoviae* po enkratnem razmnoževanju v rumenjaku v primerjavi s tekočo kulturo je bila skladna s podatki iz literature (rezultati niso prikazani) (Kleven in Ferguson-Noel, 2008). Okužbo z obema patogenoma smo potrdili v ALF in CAM inokuliranih zarodkov. Po kolonizaciji CAM se lahko okužba z *M. synoviae* WVU 1853 preko krvnega sistema razširi na številne notranje organe, vključno z jetri (MacOwan in sod., 1984). Tkvni tropizem APMV-1 La Sota v kokošjih zarodkih so določili Al-Garib in sod. (2003b), kjer se je sev La Sota po inokulaciji v alantoisno votlino 8 in 14 dni starih kokošjih zarodkov razmnoževal v epitelnih celicah CAM in v kapsulah notranjih organov. Jetra, vranico, Fabricijevo burzo in timus smo za analize izražanja genov izbrali na osnovi dovzetnosti in patoloških poškodb

med okužbo kokoši z *M. synoviae* in APMV-1 (Beard and Hanson, 1984; Olson, 1984). Zaradi dobro razvitega žilnega sistema in visoke prekrvavljenosti CAM (Gabrielli in Accili, 2010) ter zmožnosti razširjanja okužbe WVU 1853 in La Sota preko krvnega sistema po inokulaciji v alantoisno votlino smo predpostavili, da sta oba mikroorganizma okužila izbrane organe in v njih povzročila spremembe v izražanju genov za citokine in kemokine.

Razvoj kokošjega imunskega sistema se začne v zgodnji fazi embriogeneze z migracijo izvornih celic v različna zarodna tkiva (Schijns in sod., 2008). Izvorne celice, ki naseljujejo Fabricijevo burzo, so prisotne od 7. dneva embrionalnega razvoja in nepopolno razvita Fabricijeva burza, kjer kasneje poteka diferenciacija celic B, od 10. dneva embrionalnega razvoja (Coltey in sod., 1989; Mast in Goddeeris, 1999). Celice, ki izražajo površinske IgM, IgY in IgA, so identificirali od 10., 14. in 16. dneva embrionalnega razvoja (Schijns in sod., 2008). Diferenciacija celic T poteka v timusu po vstopu prekurzorskih celic v tkiva timusa v strogo reguliranih procesih pri 6,5., 12. in 18. dnevu embrionalnega razvoja (Coltey in sod., 1989; Janse in Jeurissen, 1991). Z razvojem progenitorjev celic B in T se lahko v zarodku sprožijo mehanizmi pridobljene imunosti proti določenemu antigenu, navadno od 12.–14. dneva embrionalnega razvoja (Schijns in sod., 2008). Z *in ovo* cepljenji so dokazali, da je prirojeni imunski odziv kokošjih zarodkov funkcionalen in da lahko cepljenje zarodkov z določenimi cepivi zagotovi boljši imunski odziv kot cepljenje piščancev po izvalitvi (Sharma in Burmester, 1982; Sharma in sod., 1984; Worthington in sod., 2003). Razlike v zmožnosti imunskega odziva proti določenim patogenim mikroorganizmom med razvojem kokošjih zarodkov je očitna. Inokulacija zarodkov z MDV med 12.–14. dnevom embrionalnega razvoja lahko povzroči smrt inokuliranih zarodkov (Zhang and Sharma, 2003), inokulirani zarodki v 18. dnevu embrionalnega razvoja pa lahko razvijejo odpornost na cepljenje z več mikroorganizmi (Sharma in sod., 2002). Predvidoma naj bi bili vsi elementi imunskega sistema v 18. dnevu embrionalnega razvoja funkcionalni ter po stimulaciji zarodkov z antigeni zmožni vzpostaviti učinkovit imunski odziv (Schijns in sod., 2008). Čeprav imajo kokošji zarodki v pozni fazi razvoja funkcionalne mehanizme prirojenega in pridobljenega imunskega odziva na cepiva, je ta odgovor šibkejši in nudi slabšo zaščito v primerjavi z zrelim imunskim sistemom odraslih živali (Peters in sod., 2003). Vrh zrelosti imunskega sistema piščanca se navadno pojavi 3–6 tednov po izvalitvi (Sharma, 1997). Pomemben vpliv pri kolonizaciji zarodnih tkiv z imunskimi celicami, dozorevanju limfatičnih organov in imunskemu odzivu kokošjih zarodkov imajo predvsem citokini in kemokini, ki se v kokošjih zarodkih aktivno izražajo (Abdul-Careem in sod., 2007; Kaiser in Stäheli, 2008).

Gene za citokine in kemokine, ki smo jih analizirali v naši študiji, lahko po funkciji razdelimo na vnetne citokine (IL-1 β , IL-6, IL-18), kemokine (IL-8 (CXCLi2), MIP-1 β (CCL4), XCL1, CXCL14, IL-16), Th1 citokine (IFN- γ , IL-12 p40), proliferativne citokine za celice T (IL-2, IL-21) in druge citokine ozziroma encime (IFN- α , iNOS, LITAF, TGF-

β4) (Kaiser in Stäheli, 2008). Gene smo izbrali na podlagi preliminarnih podatkov analiz izražanja genov z mikromrežami v kokošjih celicah, pretežno makrofagih, po okužbi z *M. synoviae* in znanih podatkih o imunskemu odzivu na okužbo z lentogenimi sevi APMV-1 (Kapczynski in sod., 2013). Namen naše študije je bila analiza razlik v izražanju izbranih genov za citokine in kemokine v posameznih organih kokošjih zarodkov po okužbi z *M. synoviae* WVU 1853, APMV-1 La Sota in zaporedno okužbo z obema patogenoma. Pričakovali smo, da bosta na izražanje izbranih genov vplivala oba mikroorganizma in da bodo med organi razlike v izražanju.

Po okužbi kokošjih zarodkov z *M. synoviae* WVU 1853 smo v jetrih, vranici, Fabricijevi burzi in timusu določili statistično značilno povišano relativno raven mRNA pri večini analiziranih citokinov in kemokinov. V primerjavi z mikoplazemsko okužbo je okužba z APMV-1 La Sota povzročila bistveno nižje spremembe v relativni ravni mRNA analiziranih citokinov in kemokinov. Izražanje genov bi bilo verjetno višje, če bi za okuževanje uporabili sev APMV-1 z višjo virulenco, vendar bi verjetno zarodki okuženi z bolj virulentnimi sevi zamrli pred predvidenim vzorčenjem. Bolje bi bilo, če bi poskus izvedli na piščancih. Navadno lentogeni sevi APMV-1 povzročijo šibkejšo aktivacijo izražanja imunskega genov pri piščancih kot virulentni sevi (Kapczynski in sod., 2013). V pogojih *in vitro* so z okuževanjem vraničnih levkocitov primerjali stimulacijo imunskega gena med virulentnim sevom APMV-1 CA02 in sevom La Sota. Sev CA02 je povzročil hitro in močno povišanje v izražanju genov za IFN-α, IFN-γ, IL-1β, in IL-6, ki so ključni pri vnetnem odzivu na okužbo. Izražanje istih genov je bilo po okužbi s sevom La Sota bistveno nižje oziroma do statistično značilnega povišanja v izražanju ni prišlo (Rue in sod., 2011). Do močnejšega imunskega odziva zarodkov po okužbi z *M. synoviae* je lahko prišlo tudi zaradi učinkovitejše kolonizacije tkiv z *M. synoviae* in relativno slabšega razširjanja okužbe APMV-1 La Sota iz ALF na ostala zarodna tkiva. Zaporedna okužba kokošjih zarodkov z WVU 1853 in La Soto je v naši študiji očitno vplivala na utišanje izražanja genov, ki jih je stimulirala predhodna okužba z *M. synoviae*. Trendi v izražanju genov za citokine in kemokine v organih zaporedno okuženih zarodkov in zarodkov okuženih z APMV-1 La Sota so bili med seboj podobni in njihova relativna raven mRNA primerljiva v večini vzorcev.

Geni za citokine in kemokine, ki so imeli največjo spremembo v relativni ravni mRNA po okužbi kokošjih zarodkov, so bili IL-1β, IL-6, IFN-γ, MIP-1β (CCL4), XCL1, IL-16, IL-18, IL-12 p40, IFN-α in CXCL14. Večina genov je imela statistično značilno povišano izražanje ob okužbi z *M. synoviae*, ki je bilo najvišje v jetrih in vranici. V vranici so te gene najverjetneje izražali makrofagi oziroma ostale imunske celice retikuloendotelialnega sistema, ki je v zarodkih prisoten od 10. dneva embrionalnega razvoja (Jeurissen in Janse, 1989). Dokazali so, da se v vranici, žilah in ostalih tkivih med razvojem kokošjega zarodka nahaja veliko število makrofagov (Balic in sod., 2012), v jetrih kokošjih zarodkov pa več različnih tipov celic (parenhimske in perisinusoidne stelatne celice, ekstrasinusoidni

makrofagi, Kupferjeve celice, intraluminalni primitivni makrofagi), ki so zmožne aktivno fagocitirati večje delce (Kanai in sod., 2007). Pri kokoših povzroča okužba z *M. synoviae* proliferacijo retikuloendotelialnega sistema v jetrih in vranici (Olson, 1984). Podobne tendence v izražanju genov za IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-18, MIP-1 β (CCL4) in XCL1 v obeh organih najverjetneje omogoča nabor enakih imunskih celic, najverjetneje makrofagov. Podobne rezultate v izražanju genov za citokine in kemokine, vključno z nekaterimi, ki smo jih uporabili v naši študiji, so določili po okužbi transformirane celične linije kokošjih makrofagov HD11 in makrofagov monocitnega izvora (MDM) po okužbi z *M. synoviae* (Lavrič in sod., 2007, 2008). Glede na povišano izražanje genov lahko zaključimo, da je v jetrih in vranici prišlo po okužbi z *M. synoviae* do močnega odziva dejavnikov vnetja in prirojene imunosti ter kemotaktične aktivnosti za ostale imunske celice. V Fabricijevi burzi in timusu so gene za citokine in kemokine po okužbi najverjetneje izražali limfocitni prekurzorji, ki kolonizirajo oba organa med razvojem zarodka (Peters in sod., 2003; Ratcliffe, 2008), nivo njihovega izražanja pa je bil bistveno nižji kot v jetrih in vranici. Povišano izražanje genov za IL-2 in IL-21 v timusu po okužbi s cepivom APMV-1 La Sota nakazuje na odziv in proliferacijo limfocitov T in kemotaktično aktivnost za ostale imunske celice, predvsem vranične limfocite in celice T CD4 $^{+}$, preko signalizacije s kemokini IL-16, MIP-1 β (CCL4) in XCL1 (Kaiser in Stäheli, 2008; Min in Lillehoj, 2004; Wigley in Kaiser, 2003). Gen za regulatorni protein TGF- β 4 (Kaiser in Stäheli, 2008) je imel v večini tkiv znižano izražanje ozioroma je bil šibko izražen. Geni za IFN- γ , IL-1 β in IL-6 so imeli povišano izražanje v vseh organih po okužbi z *M. synoviae* WVU 1853. To nakazuje na splošno aktivacijo prirojene imunosti v zarodkih po okužbi z *M. synoviae*, ki pa ob prisotnosti APMV-1 La Sota ni bila opazna.

Supresija izražanja genov za citokine in kemokine v zaporedno okuženih kokošjih zarodkih nakazuje, da cepni sev APMV-1 La Sota zniža predhodno aktiviran imunski odziv proti *M. synoviae*. Znižano izražanje genov bi lahko razložili z več aktivnostmi APMV-1: s supresijo izražanja genov za vnetne kemokine, s čimer bi se onemogočila migracija makrofagov in ostalih imunskih celic na mesto okužbe in razmnoževanja *M. synoviae*; vplivom virusa na znižano viabilnost, baktericidno aktivnost in signalizacijo imunskih celic; inhibicijo citokinske in kemokinske signalizacije vezivnega tkiva organov; vplivom na znižano sposobnost kolonizacije tkiv *M. synoviae* iz mesta inokulacije. Vpliv APMV-1 La Sota na znižanje protitelesnega odziva na okužbo z *M. synoviae* pri sočasnih okužbah in vplivi cepiv APMV-1 na nastanek vnetja zračnih vrečk in bolezni dihal pri kokoših ob prisotnosti *M. synoviae* so bili opisani v več študijah (Kleven in sod., 1975; Silva in sod., 2008; Vardaman in sod., 1973). Znižanje izražanja imunskih genov, ki ga je povzročila inokulacija APMV-1 La Sota v naši študiji, bi lahko pri piščancih ozioroma kokoših znižala odpornost in povečala dovetnost za okužbo z drugimi mikroorganizmi. Dokazali so, da lahko okužba z APMV-1 inhibira imunsko obrambo puranov proti okužbi z bakterijo *E. coli* (Ficken in sod., 1987a). Okužba z APMV-1 je znižala fagocitozo bakterije *Salmonella Enteritidis* s kokošjimi heterofilci in povzročila višjo dovetnost

piščancev za okužbo z drugimi mikroorganizmi (Lam in sod., 1996). Prikazali so tudi vpliv APMV-1 na znižanje baktericidne aktivnosti puranjih respiratornih makrofagov (Ficken in sod., 1987b) in vpliv APMV-1 na povišano patogenost bakterije *Pasteurella anatipestifer* po okužbi puranov (Charles in sod., 1993). Imunosupresivni učinki so znani in opisani za IBDV, virus kužne anemije kokoši, reovirus, virus Marekove bolezni in nekatere retroviruse (Schat in Skinner, 2008). Čeprav je znano, da APMV-1 deluje inhibitorno in antagonistično na signalizacijo IFN (Ganar in sod., 2014) in lahko vpliva na razvoj bolezenskih stanj pri sočasnih okužbah kokoši z več mikroorganizmi (Kleven, 2003b), direktni imunosupresivni učinki APMV-1 še niso bili opisani. Ti bi lahko povzročili oslabljenje imunsko obrambo gostitelja na subklinično okužbo z mikoplazmami oziroma drugimi bakterijami in omogočili nastanek klinične bolezni, povečali dovetnost za okužbo z drugimi patogenimi mikroorganizmi, znižali učinkovitost cepljenja in povzročili nastanek hujših vnetnih reakcij. Z našo študijo smo prvi pokazali, da ima APMV-1 La Sota v kokošjih zarodkih imunosupresivni učinek in zniža izražanje genov za citokine in kemokine, ki jih stimulira predhodna okužba z *M. synoviae* WVU 1853. V nadaljnjih študijah bo potrebno dokazati, ali se lahko podobna supresija genov za citokine in kemokine pojavi tudi pri piščancih oziroma kokoših.

Limfoidni organi kokošjih zarodkov oziroma kokoši so sestavljeni iz predelkov, ki jih sestavljajo različni tipi imunskih in neimunskih celic. Vsak anatomska predelek ima svojevrstno celično organizacijo z ločenimi področji celic B in T ter specifično mikrokolje, ki ga omogočajo različni tipi neimunskih celic. V limfoidnih organih obstajajo ločena področja, kjer antigen predstavitevne celice predstavljajo antigene celicam T, celice T se povezujejo s celicami B in nastajajo Ig. Pri načrtovanju poskusov *in vitro* je potrebno tovrstno zgradbo limfoidnih organov upoštevati, saj lahko interakcije med določenimi celičnimi tipi v pogojih *in vivo* ne potekajo ravno zaradi kompartmentalizacije (Oláh in Vervelde, 2008). Pri interpretaciji rezultatov analiz izražanja genov v organih oziroma tkivih se je potrebno zavedati, da analiziramo mRNA iz heterogene skupine celic, kar ne prikazuje nujno dejanske aktivacije genov v posameznem celičnem tipu, ampak zajema celokupno izražanje genov v organu. Pri analizi izražanja genov v posameznih celičnih tipih v pogojih *in vitro* pa so lahko za normalen potek nekega procesa potrebni tudi drugi celični tipi, ki omogočajo ustrezno medcelično komunikacijo in interakcije, potrebne za vzpostavitev imunskega odziva kot v pogojih *in vivo*. Med funkcije makrofagov v kokošjih zarodkih spadajo organogeneza, homeostaza, odstranjevanje apoptotičnih in mrtvih celic; prepoznavanje, fagocitoza in uničenje patognih mikroorganizmov; predstavljanje antigenov, usmerjanje rasti aksonov in razvoja žil v centralnem živčnem sistemu in udeleženost pri razvoju limfoidnih tkiv, se pa ne odzivajo na celjenje ran (Balic in sod., 2014; Cuadros in sod., 1993; Houssaint, 1987; Jones in Ricardo, 2013; Martín-Partido in Navascués, 1990; Martín-Partido in sod., 1991; Pollard, 2009; Wynn in sod., 2013). Prisotnost velikega števila makrofagov so določili po celotnem zarodku tekom razvoja in diferenciacije. Makrofagi so bili skoncentrirani na območjih

programirane celične smrti, v krvnih žilah in perivaskularnih območjih in bili podvrženi lokalni proliferaciji v tkivih (Balic in sod., 2014). Veliko število makrofagov so določili tudi v vranici in jetrih (Balic in sod., 2012; Kanai in sod., 2007). Med embriogenezo je v kokošjih zarodkih prisotnih veliko zarodnih fibroblastoidnih celic, ki so prisotne v večini organov in tkiv. So najpogostejši celični tip v vezivnem tkivu, z izločanjem kolagena omogočajo nastanek strukturnih ogrodij za številna tkiva in imajo pomembno vlogo pri celjenju ran. Fibroblasti imajo pomembno vlogo pri nastanku lokalnega vnetja s sproščanjem citokinov in kemokinov po okužbi in komunikaciji z imunskimi celicami, predvsem makrofagi. Zaradi visoke indukcije izražanja genov za IL-1 β , IL-6, IL-18, IFN- γ , IL-12 p40, MIP-1 β (CCL4) in iNOS v jetrih in vranici kokošjih zarodkov po okužbi z *M. synoviae* WVU 1853, močni inhibiciji teh genov po zaporedni inokulaciji APMV-1 La Sota in visoke vsebnosti makrofagov ter fibroblastov v obeh organih smo se odločili za nadaljevanje naše študije z okuževanjem makrofagov in kokošjih zarodnih celic v pogojih *in vitro*. Želeli smo preveriti, če enaki pogoji okuževanja vplivajo na nastanek podobne imunosupresije izražanja genov tudi v obeh tipih imunskih in neimunskih celic, ki sta bila zelo verjetno v interakciji z *M. synoviae* v jetrih in vranici po okužbi kokošjih zarodkov. Za poskuse okuževanja v pogojih *in vitro* smo uporabili celično linijo kokošjih zarodnih fibroblastoidnih celic CEC-32 (Kaaden in sod., 1982) in celično linijo kokošjih makrofagov HD11 (Beug in sod., 1979), ki se od makrofagov v pogojih *in vivo* razlikuje v določenih lastnostih (Kaspers in sod., 2008). Za izvedbo poskusov na trajnih celičnih linijah *in vitro* smo se odločili zato, ker so v takšnih poskusih pogoji standardizirani in omogočajo lažje spremeljanje določenih parametrov, niso pa direktno primerljivi s pogoji *in vivo*, saj imamo v kulturi le eno vrsto celic. Analizirali smo tudi razlike v izražanju genov pri različnem časovnem zamiku apliciranja APMV-1 La Sota na celice, predhodno okužene z *M. synoviae* WVU 1853. V poskusih *in vitro* smo okužbo z APMV-1 La Sota izvedli 6 oziroma 24 h po okužbi z *M. synoviae* in skušali simulirati pogoje, pri katerih molekularni odziv celic na okužbo z *M. synoviae* še traja (6-urni zamik apliciranja APMV-1) in kjer odziv celic na okužbo z *M. synoviae* predvidoma ne traja več (24-urni zamik apliciranja APMV-1). Da bi podatke, pridobljene v poskusih okuževanja zarodkov in celic, med seboj lahko primerjali, smo za okuževanje celic CEC-32 in HD11 uporabili enake količine *M. synoviae* WVU 1853 in APMV-1 La Sota kot za okuževanje zarodkov.

V celicah CEC-32 smo po okužbi z *M. synoviae* določili statistično značilno povišano izražanje genov za IL-1 β , IL-6, IFN- γ , IL-12 p40 in MIP-1 β (CCL4), pri poskusih s 6-urnim zamikom apliciranja APMV-1. Podobno povišanje v izražanju genov smo določili pri celicah HD11. Geni s podobnim trendom izražanja po okužbi z *M. synoviae*, pri poskusih s 6- in 24-urnim zamikom apliciranja APMV-1, pri celicah CEC-32 so bili IL-6, IFN- γ in IL-18; pri celicah HD11 pa gena za IL-1 β in IFN- γ ter IL-6, ki smo ga lahko določili le v celičnih supernatantih. Očitne razlike v izražanju genov po okužbi z *M. synoviae*, med poskusi s 6- in 24-urnim zamikom apliciranja APMV-1, smo v celicah CEC-32 določili za IL-1 β in IL-12 p40; pri celicah HD11 pa za IL-1 β , IFN- γ , IL-12 p40, MIP-1 β .

(CCL4), IL-18 in iNOS. Pri celicah CEC-32 smo pri različnih časih inkubacije opazili supresijo izražanja genov za IL-1 β , IL-6, IL-18, IFN- γ , IL-12 p40 in MIP-1 β (CCL4) ter genov za IL-1 β , IL-18, IFN- γ , IL-12 p40 in iNOS pri celicah HD11, po apliciranju APMV-1 na celice predhodno okužene z *M. synoviae*. Imunosupresija je bila podobna kot pri zaporedni okužbi kokošjih zarodkov. Obratno je zaporedna okužba vplivala na statistično značilno povišanje izražanja genov za IL-1 β v celicah CEC-32 ter MIP-1 β (CCL4) in IFN- γ v celicah HD11, v primerjavi s celicami okuženimi z *M. synoviae*. Citokine IL-1 β , IL-6, IL-18 in IFN- γ ter koncentracije nitrita smo določali tudi v celičnih supernatantih okuženih celic in so sorazmerno dobro sovpadali z izražanjem njihovih genov in gena iNOS po okužbi z *M. synoviae*, APMV-1 in zaporedno okužbo z obema patogenoma. Podobno kot pri kokošjih zarodkih okužba z APMV-1 La Sota ni povzročila večjih sprememb v izražanju genov za IL-1 β , IL-6, IFN- γ , MIP-1 β (CCL4) in iNOS v celicah CEC-32 in HD11. Izjemi sta bila gena za IL-18 in IL-12 p40, ki sta imela povišano izražanje po 24-urni inkubaciji, kar je namigovalo na to, da okužba z APMV-1 La Sota stimulira razvoj T celičnega imunskega odziva preko signalizacije z IL-12 in IL-18 (Kaiser in Stäheli, 2008). Z analizo izražanja genov v celicah CEC-32 in HD11 smo potrdili relativno šibek odziv organov kokošjih zarodkov na okužbo z APMV-1 in vpliv okužbe z *M. synoviae* na visoko povišanje izražanja citokinov in kemokinov. Z dobljenimi rezultati smo potrdili imunosupresivni učinek APMV-1 na povišano izražanje genov glavnih vnetnih molekul, stimuliranih s strani *M. synoviae* pri zaporedni okužbi kokošjih zarodkov, imunskih in neimunskih kokošjih celic, v danih pogojih.

Odstotek preživetja celic CEC-32 in HD11 po okužbi z APMV-1 La Sota je bil pričakovano visok ($> 80\%$), saj propad določenih celičnih kultur navadno povzročajo le visoko virulentni sevi. Razmnoževanje lentogenih sevov je omogočeno le ob prisotnosti tripsina in je odvisno od seva APMV-1 in tipa celičnih kultur (Alexander in Senne, 2008), med katere CEC-32 in HD11 ne spadajo. Visoko preživetje celic je bila lahko tudi posledica relativne neprilagojenosti virusa na rast v izbranih celičnih kulturah, saj ta ni bil gojen in presajan na celičnih kulturah. Trend v manjšem preživetju celic CEC-32 in HD11 po okužbi z *M. synoviae* je bil tekom 48-urne inkubacije podoben kot pri študiji, ki so jo izvedli Dušanić in sod. (2012). Pri zaporedni okužbi s 6-urnim zamikom apliciranja APMV-1 La Sota smo opazili znižan odstotek preživetja zaporedno okuženih celic CEC-32 in HD11. Zaporedna okužba z APMV-1 je imela pri celicah CEC-32 statistično značilen vpliv na znižanje odstotka preživetja okuženih celic v kasnejši fazи okužbe (po 24 in 48 h), pri celicah HD11 pa v zgodnejši fazи okužbe (po 6 in 12 h) v primerjavi s celicami, ki smo jih okužili le z *M. synoviae* WVU 1853. Naši rezultati kažejo, da je za sinergistično delovanje zaporedne okužbe z *M. synoviae* WVU 1853 in APMV-1 La Sota, na zmanjšanje odstotka preživetja celic CEC-32, potrebnih vsaj 24 h skupne inkubacije. Obratno, zaporedna okužba povzroči znižanje odstotka preživetja celic HD11 v prvih 24 h skupne inkubacije, ki se nato ustali, najverjetneje zaradi povišanja tolerance celic na okužbo, ki jo omogoči indukcija določenih homeostaznih genov.

Invazivnost *M. synoviae* WVU 1853 v celice CEC-32 je bila podobna kot pri študiji, ki so jo opravili Dušanić in sod. (2009) in se ob prisotnosti APMV-1 ni statistično značilno razlikovala. Invazivnost *M. synoviae* v celice HD11 je bila 1,7 % in se ni statistično značilno razlikovala od invazivnosti v celice CEC-32. Invazivnost *M. synoviae* WVU 1853 v celice HD11 je bila statistično značilno povišana ob prisotnosti APMV-1 La Sota. Povišan odstotek živih celic *M. synoviae* ob prisotnosti APMV-1 v celicah HD11 bi bil lahko posledica povišane fagocitoze celic *M. synoviae* oziroma povišane občutljivosti makrofagov HD11 in posledično povišanega števila invadiranih bakterij. Povišan odstotek živih znotrajceličnih mikoplazemskih celic po fagocitozi lahko namiguje tudi na znižan nivo znotrajceličnega ubijanja fagocitiranih mikroorganizmov v okuženih makrofagih HD11 in možen vpliv APMV-1 na znižanje baktericidne aktivnosti, ki so jo ob prisotnosti APMV-1 opisali v več študijah (Faden in sod., 1981; Ficken in sod., 1987b). Naši rezultati kažejo, da je znižan odstotek preživetja celic HD11 v prvih 24 h po zaporedni okužbi z obema patogenoma v primerjavi s celicami okuženimi z *M. synoviae*, najverjetneje povezan s povišanim odstotkom RIF bakterije *M. synoviae* WVU 1853 ob prisotnosti APMV-1 La Sota po 24 h inkubaciji.

Skupna prisotnost dveh ali več patogenih mikroorganizmov in njuno oziroma njihovo medsebojno delovanje lahko vpliva na nastanek različnih stanj v gostitelju. Patogeni mikroorganizmi lahko delujejo sinergistično, antagonistično, s svojo aktivnostjo vplivajo drug na drugega, lahko pa sobivajo brez medsebojnega vpliva in vidnih vplivov na gostitelja. Medsebojne interakcije mikroorganizmov pri mešanih okužbah lahko vplivajo na imunski odziv gostitelja z imunosupresijo kjer se lahko poviša patogenost enega ali obeh patogenov; s povišano aktivacijo imunskega odziva, ki lahko vodi v povečano odstranjevanje enega ali obeh mikroorganizmov; z avtoimunskimi poškodbami, ki jih lahko povzročijo velike količine dejavnikov vnetja in molekularna mimikrija ter fenotipska variabilnost površinskih mikrobnih antigenov; in s povečanjem doveznosti gostitelja za okužbe s tretjim oziroma več mikroorganizmi. Imunosupresivno delovanje APMV-1 La Sota na nekatere imunske gene, ki jih inducira okužba z *M. synoviae* WVU 1853 v kokošjih zarodkih in celicah CEC-32 ter HD11 smo pokazali v sklopu analiz te doktorske naloge. Neposredni medsebojni vplivi *M. synoviae* in APMV-1 so slabo raziskani in bi lahko v določenih pogojih vplivali na spremembo virulence živih lentogenih sevov APMV-1, ki se uporablajo za cepljenje perutnine in spremembo površinskih virusnih proteinov, na podlagi katerih se po cepljenju razvije ustrezni imunski odgovor. Pomembna dejavnika patogeneze APMV-1 sta površinska proteina F in HN, ki omogočata pritrjevanje, vstop in sproščanje virusa iz gostitelja. Protein F postane funkcionalen po cepitvi proteina F₀ na polipeptida F₁ in F₂ s specifičnimi celičnimi proteazami. Virulenco APMV-1 določa aminokislinsko zaporedje na cepnem mestu proteina F, ki je med sevi APMV-1 različno (Alexander in Senne, 2008; Ganar in sod., 2014). *M. synoviae* vsebuje proteaze, ki so udeležene v različnih metabolnih procesih in procesih pridobivanja hrani iz okolice. Vsebuje cisteinsko proteazo CysP (Cizelj in sod., 2011) in predvideno subtilizinu

podobno serinsko proteazo (Staats in sod., 2007), ki bi lahko pod določenimi pogoji cepila F₀ živih lentogenih sevov APMV-1. Cepljenje subklinično okuženih piščancev z živimi lentogenimi sevi APMV-1 s kapljičnimi metodami lahko omogoči interakcije med *M. synoviae* in APMV-1 v dihalnem traktu. V teoriji bi bila možna posledica te interakcije mikoplazemska proteoliza virusnih proteinov, ki bi lahko povzročila slabšo zaščito živali, spremenila imunogenost virusnega cepiva in vplivala na imunski odziv živali po cepljenju. S skupno inkubacijo *M. synoviae* WVU in APMV-1 La Sota smo pokazali, da lahko pride v pogojih *in vitro* do proteolize virusnih proteinov s približno molekulsko maso 130, 72 in 40 kDa. Naši rezultati kažejo na to, da lahko v pogojih *in vitro*, *M. synoviae* s svojimi proteazami razgradi proteina HN (74 kDa) in M (40 kDa), ni pa znano, kakšen bi bil vpliv na razgradnjo proteinov APMV-1 in posledica cepitve v pogojih *in vivo*, saj do tako tesnega stika v dihalih med *M. synoviae* in APMV-1 ne pride pogosto.

V sklopu analiz doktorske naloge smo identificirali NA bakterije *M. synoviae* WVU 1853, ki smo jo določili celicam *M. synoviae*, membranski frakciji, citoplazmemski frakciji in tekočemu gojišču, v katerem smo mikoplazemske kulturo gojili. Celična NA *M. synoviae* je popolnoma razgradila substratno dsDNA ob prisotnosti Ca²⁺ ionov in v pH območju 5,5–6 po 30 minutah inkubacije pri 37 °C. Pokazali smo tudi, da okužba z *M. synoviae* WVU 1853 vpliva na razgradnjo genomske DNA okuženih celic CEC-32 24 in 48 h po okužbi. Nukleaze so pri mikoplazmah udeležene v številnih celičnih procesih (Brocchi in sod., 2007; Carvalho in sod., 2005; Minion in sod., 1993; Razin in sod., 1998) in NA naj bi predvidoma služila kot glavni mehanizem za pridobivanje prekurzorjev za sintezo nukleinskih kislin (Minion in sod., 1993). Prikazana odvisnost NA od Ca²⁺ ionov pri *M. synoviae* WVU 1853 ni presenetljiva, saj vsebuje veliko okarakteriziranih mikoplazemskih nukleaz visoko ohranjeno termonukleazno domeno, za katero predpostavljajo, da omogoča encimsko aktivnost z vezavo kovinskih ionov, predvsem kalcija (Schmidt in sod., 2007). Večina mikoplazemskih vrst z identificirano NA ima relativno močno NA membranskih frakcij (Minion in sod., 1993; Schmidt in sod., 2007), ki je membrane *M. synoviae* WVU 1853 v naši študiji niso imele. Razlog za šibko NA membran in močno NA tekočega gojišča, v katerem smo gojili kulturo *M. synoviae* WVU 1853, bi bilo lahko sproščanje mikoplazemskih nukleaz z membrane v zunajcelični prostor tekom rasti. Močna NA tekočega gojišča vsekakor nakazuje na sproščanje nukleaz iz celic *M. synoviae*, ni pa še znano, ali je to aktivni proces. Z analizami smo pokazali, da so bile nukleaze v tekočem gojišču hidrofilne narave z molekulsko maso od 30 do > 50 kDa. V pogojih *in vitro* so imele močno NA, s katero so razgradile substratno dsDNA že po 15 minutah. Med sproščenimi proteini *M. synoviae* WVU 1853 v tekočem gojišču nismo uspeli identificirati predvidenih nukleaz MS53_0110 in MS53_0284, ki so jih določili v genomu seva *M. synoviae* 53 (Vasconcelos in sod., 2005). Z določitvijo nukleotidnega zaporedja genov obeh predvidenih nukleaz pri sevu WVU 1853 smo pri genu *MS53_0284* določili delečijo adenina na mestu 1332, ki povzroči predčasno terminacijo translacije in kodira 7 aminokislin krajši protein na C-terminalnem koncu kot pri sevih ULB 02/T6, ULB 9122 in

53. Bioinformacijska analiza predvidenih aminokislinskih zaporedij nukleaz MS53_0110 in MS53_0284 pri sevu WVU 1853 s programom MEMSAT-SVM (The PSIPRED Protein Structure Prediction Server) je pokazala, da imata ova proteina aktivno mesto znotraj domene SNC superdružine in transmembransko domeno, zaradi česar se po sintezi najverjetneje nahajata na membrani mikoplazemskih celic. Bioinformacijska analiza je pokazala, da se predvideno aktivno mesto nukleaze MS53_0110 nahaja na zunajcelični strani, aktivno mesto nukleaze MS53_0284 pa na citoplazemski strani membrane *M. synoviae* WVU 1853 in se verjetno pred katalizo DNA sprosti v zunajcelično okolje. Vpliv nukleaz pri patogenezi različnih mikoplazemskih vrst so opisali v številnih študijah. Tretiranje gostiteljskih celic z mikoplazemskimi nukleazami je povzročilo številne patološke značke v okuženih celicah, morfološke spremembe celic in jeder, internukleosomalno fragmentacijo kromatina in značke podobne apoptozi (Bendjennat in sod., 1997, 1999; Li in sod., 2010; Minion in sod., 1993; Paddenberg in sod., 1996, 1998; Schmidt in sod., 2007; Sokolova in sod., 1998; Somarajan in sod., 2010). Vpliv prisotnosti virusov na povišano NA mikoplazem pri sočasnih okužbah so opisali Lidsky in sod. (2009), kjer je virusna okužba omogočila učinkovitejše prehajanje mikoplazemskih nukleaz v celična jedra gostiteljskih celic in povzročila močnejšo razgradnjo genomske DNA. Analiza NA *M. synoviae* WVU 1853 ob prisotnosti APMV-1 La Sota v naši študiji je pokazala, da prisotnost APMV-1 vpliva na povišano razradnjo dsDNA v pogojih *in vitro* pri 37 °C. NA obeh patogenov skupaj je bila po 240 minutah inkubacije višja od NA celic *M. synoviae*. NA APMV-1, ki je pri pomogla k povišani NA ob prisotnosti obeh mikroorganizmov, najverjetneje ni bila posledica neposrednega delovanja samega virusa; možno je, da so se nukleaze v virusnem pripravku prenesle iz gostiteljskih celic, v katerih se je virus gojil. NA, ki smo jo identificirali in delno okarakterizirali v sklopu naših analiz, je potencialen virulentni dejavnik *M. synoviae* WVU 1853, potrebne pa so še nadaljnje analize, ki bodo pokazale vpliv NA na patogenezo *M. synoviae* tudi v pogojih *in vivo*.

Z analizami, ki smo jih opravili v sklopu te doktorske naloge, smo razjasnili določene molekularne učinke, ki jih povzroči zaporedna okužba gostitelja z bakterijo *M. synoviae* WVU 1853 in APMV-1 La Sota. Prvi smo pokazali imunosupresivno delovanje APMV-1 La Sota na izražanje nekaterih citokinskih in kemokinskih genov v kokošjih zarodkih, imunskih in neimunskih celicah, vpliv zaporedne okužbe na preživetje gostiteljskih celic in invazivnost *M. synoviae* v gostiteljske celice. Identificirali smo NA tipskega seva *M. synoviae* WVU 1853, ki spada med potencialne virulentne dejavnike te mikoplazme, in pokazali vpliv APMV-1 na mikoplazemsko NA ter razgradnjo proteinov APMV-1 s proteazami *M. synoviae*, v danih pogojih. Naši rezultati lahko priomorejo k: razvoju novih, učinkovitejših strategij cepljenja, predvsem pri cepljenju dan starih piščancev in tudi cepljenju *in ovo*; načrtovanju in uporabi kombiniranih cepiv; učinkovitejšemu zdravljenju oziroma preprečevanju okužb; načrtovanju cepljenj, kjer bi minimalizirali dozvetnost perutnine na nenačrtovane okužbe z več mikroorganizmi; povečanju odpornosti živali brez dodajanja antibiotikov in kvalitetnejši reji. Izpostavili smo tudi

problem subkliničnih mikoplazemskih okužb, ki lahko po cepljenju z virusnimi cepivi preidejo v klinično obliko, in pomen identifikacije mikoplazemske okužbe pred izvedbo cepljenja z virusi. V nadalnjih študijah bi se bilo smiselno posvetiti analizam potencialne imunosupresije APMV-1 La Sota in tudi drugih ptičjih virusov v piščancih oziroma kokoših, na terenskih vzorcih in v kombinaciji z drugimi bakterijami. Podobne analize interakcij med bakterijami in virusi med zaporednimi naravnimi okužbami ali cepljenji bi bilo zanimivo izvesti tudi pri drugih ekonomsko pomembnih živalskih vrstah, predvsem govedu in prašičih ter navsezadnje tudi pri ljudeh, s čimer bi lahko dodatno razjasnili molekularno dogajanje v gostitelju ob virusnih okužbah subklinično okuženega gostitelja z bakterijami.

6.2 SKLEPI

Preverili smo vse postavljene hipoteze in postavili naslednje skele:

1. Okužba z *M. synoviae* WVU 1853 povzroči močnejši imunski odziv v organih kokošjih zarodkov in celicah CEC-32 ter HD11 kot okužba s cepivom APMV-1 La Sota.
2. Zaporedna okužba z *M. synoviae* WVU 1853 in APMV-1 La Sota povzroči znižanje izražanja genov za vnetne citokine in kemokine, katerih izražanje stimulira okužba z *M. synoviae*, kar kaže na imunosupresivni učinek cepiva La Sota na okužbo z *M. synoviae* v kokošjih zarodkih in celicah CEC-32 ter HD11.
3. V celicah CEC-32 in HD11 zaporedna okužba povzroči znižano prisotnost citokinov IL-1 β , IL-6, IL-18 in IFN- γ v celičnih supernatantih in znižane koncentracije nitrita pri zaporedni okužbi celic HD11 s 6-urnim zamikom apliciranja obeh mikroorganizmov.
4. Preživetje celic CEC-32 in HD11 je nižje po okužbi z *M. synoviae* WVU 1853 kot po okužbi z APMV-1 La Sota. Preživetje celic CEC-32 in HD11 je po zaporedni okužbi z obema patogenoma nižje kot pri celicah okuženih le z *M. synoviae* WVU 1853.
5. Invazivnost *M. synoviae* WVU 1853 v celice HD11 je višja ob prisotnosti APMV-1 La Sota.
6. *M. synoviae* WVU 1853 je sposobna s svojimi proteazami razgraditi proteine APMV-1 La Sota velikosti 130, 72 in 40 kDa v pogojih *in vitro*, med katere spadata najverjetneje tudi proteina HN in M.
7. *M. synoviae* WVU 1853 ima nukleazno aktivnost (NA), ki razgradi dsDNA v pogojih *in vitro*. NA imajo celice *M. synoviae*, njene membrane, citoplazme in tudi gojišče v katerem raste kultura *M. synoviae*, kar kaže na funkcionalnost celičnih in zunajceličnih nukleaz. NA celic *M. synoviae* je močnejša ob prisotnosti kalcijevih ionov, ima pH-optimum 5,5–6 in razgradi genomsko DNA celic CEC-32 24 in 48 h po okužbi z *M. synoviae*.
8. Gena za nukleazi *M. synoviae* WVU 1853, MS53_0110 in MS53_0284 sta dolga 696 in 1335 bp in določata proteina s predvideno molekulsko maso 26,7 in 50,1 kDa.
9. Zunajcelične nukleaze se sproščajo iz celic *M. synoviae* WVU 1853 pri temperaturi 37 in 4 °C, imajo molekulsko maso med 30 in > 50 kDa, nahajajo se v hidrofilni frakciji tekočega gojišča in se obarjajo pri 60–80-odstotnem amonijevem sulfatu.
10. NA celic *M. synoviae* WVU 1853 je intenzivnejša ob prisotnosti APMV-1 La Sota v pogojih *in vitro*.

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.1 POVZETEK

Subklinične okužbe kokoši z bakterijo *M. synoviae* pogosto preidejo v klinično obliko ob prisotnosti določenih sevov APMV-1, ki se uporablajo kot cepiva proti atipični kokošji kugi (Kleven in Ferguson-Noel, 2008). Imunski odziv kokoši in molekularni odzivi različnih tipov kokošjih celic na posamične okužbe z *M. synoviae* in APMV-1 so relativno dobro raziskani (Dušanić in sod., 2012, 2014; Kapczynski in sod., 2013; Lavrič in sod., 2007, 2008; Oven in sod., 2013; Rue in sod., 2011), manjkajo pa ključni podatki o molekularnem dogajanju, predvsem izražanju citokinov in kemokinov, v pogojih *in vivo* in *in vitro*, pri vnetnih procesih po zaporednih okužbah z obema patogenoma. Namen raziskav v sklopu te doktorske disertacije je bila analiza molekularnega odziva kokoši, v pogojih *in vivo* in *in vitro*, pri zaporednih okužbah z *M. synoviae* WVU 1853 in s cepivom APMV-1 La Sota. Analizirali smo tudi nekatere interakcije med obema patogenoma v pogojih *in vitro*, ki bi lahko vodile v povišano patogenost *M. synoviae* oziroma vplivale na učinkovitost cepljenja z APMV-1. Z metodo qRT-PCR smo analizirali izražanje genov za citokine in kemokine v jetrih, vranicah, Fabricijevih burzah in timusih kokošjih zarodkov in v celicah CEC-32 ter HD11, po posamični in zaporedni okužbi z obema mikroorganizmoma. Gene za citokine in kemokine, ki smo jih analizirali v naši študiji, lahko po funkciji razdelimo na vnetne citokine (IL-1 β , IL-6, IL-18), kemokine (IL-8 (CXCLi2), MIP-1 β (CCL4), XCL1, CXCL14, IL-16), Th1 citokine (IFN- γ , IL-12 p40), proliferativne citokine za celice T (IL-2, IL-21) in druge citokine oziroma encime (IFN- α , iNOS, LITAF, TGF- β 4) (Kaiser in Stäheli, 2008). Z opravljenimi analizami smo pokazali imunosupresivno delovanje APMV-1 La Sota na izražanje večine citokinskih in kemokinskih genov, katerih izražanje je stimulirala okužba z *M. synoviae* v kokošjih zarodkih in obeh celičnih tipih. Znižano prisotnost nitrita, IL-1 β , IL-6, IL-18 in IFN- γ pri sočasno okuženih celicah v primerjavi s celicami okuženimi z *M. synoviae* smo določili tudi v celičnih supernatantih z uporabo Griessovega testa in imuno-encimskega testa DIBA. S komercialnim testom, ki temelji na redukciji tetrazolijeve soli XTT z mitohondrijskimi dehidrogenazami v živih celicah, smo določili preživetje celic CEC-32 in HD11, ki je bilo nižje po okužbi z *M. synoviae* WVU 1853 kot po okužbi z APMV-1 La Sota. Preživetje obeh celičnih tipov je bilo po zaporedni okužbi s 6-urnim zamikom apliciranja obeh mikroorganizmov nižje kot pri celicah okuženih le z *M. synoviae*. Z uporabo gentamicinskega testa invazivnosti smo določili invazivnost *M. synoviae* WVU 1853 v celice CEC-32 in HD11, ki je bila pri celicah HD11 za približno 3 % višja ob prisotnosti APMV-1 La Sota. Z inkubacijo celic in celičnih frakcij *M. synoviae* z dsDNA pri različnih poskusnih pogojih *in vitro* smo identificirali nukleazno aktivnost (NA) tipskega seva *M. synoviae* WVU 1853, ki spada med potencialne virulentne dejavnike *M. synoviae*. NA so imele celice *M. synoviae*, njene membrane, citoplazme in tudi gojišče, v katerem je rasla kultura *M. synoviae*. NA celic *M. synoviae* je bila močnejša ob prisotnosti

kalcijevih ionov, imela je pH-optimum 5,5–6 in je razgradila genomsko DNA celic CEC-32 24 in 48 h po okužbi z *M. synoviae*. Z določitvijo nukleotidnega zaporedja smo analizirali gena za nukleazi MS53_0110 in MS53_0284 ter primerjali njune lastnosti med sevi *M. synoviae* WVU 1853, ULB 9122, ULB 02/T6 in 53. Gena za nukleazi MS53_0110 in MS53_0284 sta bila pri tipskem sevu WVU 1853 dolga 696 in 1335 bp in najverjetneje določata proteina s predvideno molekulsko maso 26,7 in 50,1 kDa. Z analizo zunajceličnih nukleaz *M. synoviae* WVU 1853 z inkubacijo z dsDNA, analizo z NaDS-PAGE, s frakcionacijo z reagentom Triton X-114, z ultrafiltracijo inobarjanjem z amonijevim sulfatom smo pokazali, da so se zunajcelične nukleaze sproščale iz celic *M. synoviae* pri temperaturi 37 °C in 4 °C, imale so molekulsko maso med 30 in > 50 kDa, nahajale so se v hidrofilni frakciji tekočega gojišča, obarjale pa so se pri 60–80-odstotnem amonijevem sulfatu. Z inkubacijo dsDNA z *M. synoviae* WVU 1853 in cepivom APMV-1 La Sota smo pokazali, da je bila v danih pogojih NA celic *M. synoviae* intenzivnejša ob prisotnosti APMV-1. S skupno inkubacijo *M. synoviae* WVU 1853 in APMV-1 La Sota v pogojih *in vitro* pa smo z uporabo NaDS-PAGE in z metodo po Westernu pokazali, da je *M. synoviae* sposobna s svojimi proteazami razgraditi proteine APMV-1 velikosti 130, 72 in 40 kDa.

Z rezultati, ki smo jih pridobili v sklopu raziskav te doktorske disertacije, smo izpostavili nekatere ključne učinke, ki jih ima lahko zaporedna okužba z *M. synoviae* in cepivom proti APMV-1 na imunski odziv kokošjih zarodkov, odziv fibroblastoidnih celic ter makrofagov. Izpostavili smo tudi problem subkliničnih mikoplazemskih okužb, ki lahko po cepljenju z virusnimi cepivi preidejo v klinično obliko, in pomen identifikacije mikoplazemskih okužb pred izvedbo cepljenja z virusnimi cepivi. V nadalnjih študijah bi bilo smiselno analizirati potencialne imunosupresivne lastnosti APMV-1 La Sota in tudi drugih virusnih cepiv v piščancih oziroma kokoših in v kombinaciji z drugimi bakterijami. To bi omogočilo razvoj in načrtovanje učinkovitejših strategij cepljenja in zmanjšanje dovetnosti perutnine na sekundarne okužbe.

7.2 SUMMARY

Subclinical infections of chickens with *M. synoviae* often result in clinical disease forms in the presence of certain APMV-1 strains that are used as vaccines against Newcastle disease (Kleven in Ferguson-Noel, 2008). Chicken immune responses and molecular mechanisms of different chicken cell types to individual infections with *M. synoviae* and APMV-1 are relatively well characterised (Dušanić in sod., 2012, 2014; Kapczynski in sod., 2013; Lavrič in sod., 2007, 2008; Oven in sod., 2013; Rue in sod., 2011), however, there is limited data about host's immune responses after consecutive infections with these two pathogens *in vivo* and *in vitro*. The aim of our study, was to analyze chicken molecular responses *in vivo* and *in vitro* to consecutive infections with *M. synoviae* WVU 1853 and APMV-1 La Sota. We also analyzed certain interactions between the two pathogens that could lead to enhanced *M. synoviae* pathogenicity and affect APMV-1 vaccination efficiency. Using qRT-PCR, we analyzed the expression of cytokine and chemokine genes in livers, spleens, bursas of Fabricius and thymi of chicken embryos and CEC-32 and HD11 cells after individual and consecutive infections with both pathogens. Analyzed cytokine and chemokine genes can be classified as inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-18), chemokines (IL-8 (CXCLi2), MIP-1 β (CCL4), XCL1, CXCL14, IL-16), Th1 cytokines (IFN- γ , IL-12 p40), T-cell proliferatory cytokines (IL-2, IL-21) and other cytokines and enzymes (IFN- α , iNOS, LITAF, TGF- β 4) (Kaiser in Stäheli, 2008). With our results, we demonstrated immunosuppressive properties of APMV-1 La Sota, that could downregulate the expression of *M. synoviae*-induced cytokine and chemokine genes in chicken embryos and both cell types. Reduced levels of nitrite, IL-1 β , IL-6, IL-18 and IFN- γ could also be detected by Griess test and DIBA in cell supernatants after consecutive infection with both pathogens, when compared to *M. synoviae*-infected cells. Viability of CEC-32 and HD11 cells, which was determined by a commercial kit, was lower after *M. synoviae* infection than APMV-1 infection. Viability of both cell types was lower after consecutive infection with both microbes with 6 h delay in pathogen application than in *M. synoviae*-infected cells. Using a gentamicin invasion assay, we determined a 3 % increase in *M. synoviae* invasion into HD11 cells, when APMV-1 La Sota was also present. In the presence of APMV-1, we determined no differences in *M. synoviae* invasion into CEC-32 cells. By incubating *M. synoviae* cells and their fractions with dsDNA under different experimental conditions *in vitro*, we identified nuclease activity (NA) of *M. synoviae* WVU 1853, which could be a major virulent factor of this mycoplasma. NA was demonstrated for *M. synoviae* cells, their membranes, cytoplasms and culture medium in which *M. synoviae* culture was grown. NA of *M. synoviae* cells was stronger in the presence of calcium ions, had a pH optimum 5.5–6 and degraded genomic DNA of CEC-32 cells 24 and 48 h after infection with *M. synoviae*. We analyzed two genes for *M. synoviae* nucleases, MS53_0110 and MS53_0284, by nucleotide sequencing and compared gene sequences between *M. synoviae* strains WVU 1853, ULB 9122, ULB 02/T6 in 53. Genes for MS53_0110 and MS53_0284 in the type strain WVU 1853 were 696 and 1335

bp long and most likely encode proteins with 26.7 and 50.1 kDa, respectively. Strong extracellular NA of *M. synoviae* was further analyzed by incubation with dsDNA, NaDS-PAGE analysis, Triton X-114 fractionation, ultrafiltration and ammonium sulphate precipitation. We demonstrated, that extracellular nucleases of *M. synoviae* WVU 1853 were released from *M. synoviae* cells at 37 and 4 °C, had molecular weight between 30 and > 50 kDa, were located in the hydrophilic fraction of the media and were precipitated at 60–80 % ammonium sulphate. Also, *in vitro* dsDNA-specific NA of *M. synoviae* WVU 1853 was stronger in the presence of APMV-1 La Sota under used experimental conditions. With the use of NaDS-PAGE and Western blotting, we determined proteolytic activity of *M. synoviae* cells toward APMV-1 proteins, which could degrade proteins at 130, 72 in 40 kDa after mixed *in vitro* incubation of *M. synoviae* WVU 1853 and APMV-1 La Sota.

With results obtained within this doctoral dissertation, we highlighted some crucial effects that may accompany consecutive infections with *M. synoviae* and APMV-1 vaccines in chicken embryos, chicken fibroblastoid cells and chicken macrophages, and the influence of these infections on chicken immune responses. In the future, further analyses of the potential immunosuppressive effects of APMV-1 vaccinal strains and, also, other virus vaccines in chickens should be performed, in combination with mycoplasmas and other bacteria. The data obtained in these studies could be crucial for future vaccine development, establishment of new vaccination strategies and lowering the susceptibility of poultry to secondary infections.

8 VIRI

- Abdul-Careem M. F., Hunter D. B., Lambourne M. D., Barta J., Sharif S. 2007. Ontogeny of cytokine gene expression in the chicken spleen. *Poultry Science*, 86, 7: 1351–1355
- Abenes G. B., Kida H., Yanagawa R. 1986. Biological activities of monoclonal antibodies to the hemagglutinin-neuraminidase (HN) protein of Newcastle disease virus. *Japanese Journal of Veterinary Science*, 48, 2: 353–362
- Ahmed K. A., Saxena V. K., Ara A., Singh K. B., Sundaresan N. R., Saxena M., Rasool T. J. 2007. Immune response to Newcastle disease virus in chicken lines divergently selected for cutaneous hypersensitivity. *International Journal of Immunogenetics*, 34, 6: 445–455
- Al-Garib S. O., Gielkens A. L. J., Gruys E., Hartog L., Koch G. 2003a. Immunoglobulin class distribution of systemic and mucosal antibody responses to Newcastle disease in chickens. *Avian Diseases*, 47, 1: 32–40
- Al-Garib S. O., Gielkens A. L. J., Gruys E., Peeters B. P. H., Koch G. 2003b. Tissue tropism in the chicken embryo of non-virulent and virulent Newcastle diseases strains that express green fluorescence protein. *Avian Pathology*, 32, 6: 591–596
- Alamares J. G., Elankumaran S., Samal S. K., Iorio R. M. 2010. The interferon antagonistic activities of the V proteins from two strains of Newcastle disease virus correlate with their known virulence properties. *Virus Research*, 147, 1: 153–157
- Aldous E. W., Mynn J. K., Banks J., Alexander D. J. 2003. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. *Avian Pathology*, 32, 3: 239–356
- Alexander D. J. 1998. Newcastle disease virus and other avian paramyxoviruses. V: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. 4th ed. Swayne D. E., Glisson J. R., Jackwood M. W., Pearson J. E., Reed W. M. (eds.). Kennett Square, American Association of Avian Pathologists: 156–163
- Alexander D. J. 2001. Newcastle disease—The Gordon Memorial Lecture. *British Poultry Science*, 42, 1: 5–22
- Alexander D. J., Campbell G., Manvell R. J., Collins M. S., Parsons G., McNulty M. S. 1992. Characterisation of an antigenically unusual virus responsible for two outbreaks of Newcastle disease in the Republic of Ireland in 1990. *Veterinary Record*, 130, 4: 65–68
- Alexander D. J., Mackenzie J. S., Russell P. H. 1986. Two types of Newcastle disease virus isolated from feral birds in Western Australia detected by monoclonal antibodies. *Australian Veterinary Journal*, 63, 11: 365–367

- Alexander D. J., Manvell R. J., Banks J., Collins M. S., Parsons G., Cox B., Frost K. M., Speidel E. C., Ashman S., Aldous E. W. 1999. Experimental assessment of the pathogenicity of the Newcastle disease viruses from outbreaks in Great Britain in 1997 for chickens and turkeys and the protection afforded by vaccination. *Avian Pathology*, 28, 5: 501–512
- Alexander D. J., Manvell R. J., Kemp P. A., Parsons G., Collins M., Brockman S., Russell P. H., Lister S. A. 1987. Use of monoclonal antibodies in the characterisation of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates submitted to an international reference laboratory. *Avian Pathology*, 16, 4: 553–565
- Alexander D. J., Manvell R. J., Lowings J. P., Frost K. M., Collins M. S., Russell P. H., Smith J. E. 1997. Antigenic diversity and similarities detected in avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates using monoclonal antibodies. *Avian Pathology*, 26, 2: 399–418
- Alexander D. J., Manvell R. J., Parsons G. 2006. Newcastle disease virus (strain Herts 33/56) in tissues and organs of chickens infected experimentally. *Avian Pathology*, 35, 2: 99–101
- Alexander D. J., Russell P. H., Parsons G., Abu Elzein E. M. E., Ballough A., Cernik K., Engstrom B., Fevereiro M., Fleury H. J. A., Guittet M., Kaleta E. F., Kihm U., Kosters J., Lomniczi B., Meister J., Meulemans G., Nerome K., Petek M., Pokornuski S., Polten B., Prip M., Richter R., Saghy E., Samberg Y., Spanoghe L., Tumova B. 1985. Antigenic and biological characterisation of avian paramyxovirus type 1 isolates from pigeons—An international collaborative study. *Avian Pathology*, 14, 3: 365–376
- Alexander D. J., Senne D. A. 2008. Newcastle Disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. V: Diseases of poultry. 12th ed. Saif Y. M., Fadly A. M., Glisson J. R., McDougald L. R., Nolan L. K., Swayne D. E. (eds.). Oxford, Blackwell Publishing Ltd: 75–116
- Allen J. L., Noormohammadi A. H., Browning G. F. 2005. The *vlhA* loci of *Mycoplasma synoviae* are confined to a restricted region of the genome. *Microbiology*, 151, 3: 935–940
- Almagor M., Kahane I., Gilon C., Yatziv S. 1986. Protective effects of the glutathione redox cycle and vitamin E on cultured fibroblasts infected by *Mycoplasma pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 52, 1: 240–244
- Anderson D. P., Beard C. W., Hanson R. P. 1964. The adverse effects of ammonia on chickens including resistance to infection with Newcastle disease virus. *Avian Diseases*, 8, 3: 369–379
- Andrejeva J., Childs K. S., Young D. F., Carlos T. S., Stock N., Goodbourn S., Randall R. E. 2004. The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase,

- mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101, 49: 17264–17269
- Andrews D. M., Andoniou C. E., Scalzo A. A., van Dommelen S. L. H., Wallace M. E., Smyth M. J., Degli-Esposti M. A. 2005. Cross-talk between dendritic cells and natural killer cells in viral infection. Molecular Immunology, 42, 4: 547–555
- Atipična kokošja kuga. Načrt ukrepov ob pojavu atipične kokošje kuge v Republiki Sloveniji. 2014. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo in okolje RS: 76 str.
- Audsley M. D., Moseley G. W. 2013. Paramyxovirus evasion of innate immunity: Diverse strategies for common targets. World Journal of Virology, 2, 2: 57–70
- Avrameas S. 1991. Natural autoantibodies: from »horror autotoxicus« to »gnothi seauton«. Immunology Today, 12, 5: 154–159
- Balic A., Garcia-Morales C., Sherman A., Gilhooley H., Kaiser P., Hume D., Sang H. 2012. Advances in live imaging of macrophage development and function in the chicken embryo. V: AIRG 2012: XII Avian Immunology Research Group Meeting, Edinburgh, 28.–31. avg. 2012. The University of Edinburgh, The Roslin Institute: 33
- Balic A., Garcia-Morales C., Vervelde L., Gilhooley H., Sherman A., Garceau V., Gutowska M. W., Burt D. W., Kaiser P., Hume D. A., Sang H. M. 2014. Visualisation of chicken macrophages using transgenic reporter genes: insights into the development of the avian macrophage lineage. Development, 141, 16: 3255–3265
- Balu S., Kaiser P. 2003. Avian interleukin-12 β (p40): cloning and characterisation of the cDNA and gene. Journal of Interferon & Cytokine Research, 23, 12: 699–707
- Barile M. F., Rottem S. 1993. Mycoplasmas in cell cultures. V: Rapid diagnosis of mycoplasmas. Kahane I., Adoni A. (eds.). New York, Plenum Press: 155–193
- Beard C. W., Easterday B. C. 1967. The influence of route of administration of Newcastle disease virus on host response. The Journal of Infectious Diseases, 117, 1: 55–70
- Beard C. W., Hanson R. P. 1984. Newcastle disease. V: Diseases of poultry. 8th ed. Hofstad M. S., Barnes H. J., Calnek B. W., Reid W. M., Yoder Jr. H. W. (eds.). Ames, Iowa State University Press: 452–470
- Benčina D. 2002. Hemagglutinins of pathogenic avian mycoplasmas. Avian Pathology, 31, 6: 535–547
- Benčina D., Bradbury J. M. 1991. Indirect immunoperoxidase assay for the detection of antibody in chicken *Mycoplasma* infections. Avian Pathology, 20, 1: 113–124

- Benčina D., Bradbury J. M. 1992. Combination of immunofluorescence and immunoperoxidase techniques for serotyping mixtures of *Mycoplasma* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 2: 407–410
- Benčina D., Drobnič-Valič M., Horvat S., Narat M., Kleven S. H., Dovč P. 2001. Molecular basis of the length variation in the N-terminal part of *Mycoplasma synoviae* hemagglutinin. *FEMS Microbiology Letters*, 203, 1: 115–123
- Benčina D., Mrzel I., Svetlin A., Dorrer D., Tadina-Jakšić T. 1991a. Reactions of chicken biliary immunoglobulin A with avian mycoplasmas. *Avian Pathology*, 20, 2: 303–313
- Benčina D., Narat M., Bidovec A., Zorman-Rojs O. 2005. Transfer of maternal immunoglobulins and antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* to the allantoic and amniotic fluid of chicken embryos. *Avian Pathology*, 34, 6: 463–472
- Benčina D., Narat M., Dovč P., Drobnič-Valič M., Habe F., Kleven S. H. 1999. The characterization of *Mycoplasma synoviae* EF-Tu protein and proteins involved in hemadherence and their N-terminal amino acid sequences. *FEMS Microbiology Letters*, 173, 1: 85–94
- Benčina D., Svetlin A., Dorrer D., Tadina-Jakšić T. 1991b. Humoral and local antibodies in chickens with mixed infection with three *Mycoplasma* species. *Avian Pathology*, 20, 2: 325–334
- Bendjennat M., Blanchard A., Loutfi M., Montagnier L., Bahraoui E. 1997. Purification and characterization of *Mycoplasma penetrans* $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -dependent endonuclease. *Journal of Bacteriology*, 179, 7: 2210–2220
- Bendjennat M., Blanchard A., Loutfi M., Montagnier L., Bahraoui E. 1999. Role of *Mycoplasma penetrans* endonuclease P40 as a potential pathogenic determinant. *Infection and Immunity*, 67, 9: 4456–4462
- Berčič R. L., Cizelj I., Dušanić D., Narat M., Zorman-Rojs O., Dovč P., Benčina D. 2011. Neuraminidase of *Mycoplasma synoviae* desialylates heavy chain of the chicken immunoglobulin G and glycoproteins of chicken tracheal mucus. *Avian Pathology*, 40, 3: 299–308
- Berčič R. L., Slavec B., Lavrič M., Narat M., Bidovec A., Dovč P., Benčina D. 2008a. Identification of major immunogenic proteins of *Mycoplasma synoviae* isolates. *Veterinary Microbiology*, 127, 1–2: 147–154
- Berčič R. L., Slavec B., Lavrič M., Narat M., Zorman-Rojs O., Dovč P., Benčina D. 2008b. A survey of avian *Mycoplasma* species for neuraminidase enzymatic activity. *Veterinary Microbiology*, 130, 3–4: 391–397

- Beug H., Von Kirchbach A., Doderlein G., Conscience J. F., Graf T. 1979. Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation. *Cell*, 18, 2: 375–390
- Borovsky Z., Tarshis M., Zhang P., Rottem S. 1998. Protein kinase C activation and vacuolation in HeLa cells invaded by *Mycoplasma penetrans*. *Journal of Medical Microbiology*, 47, 10: 915–922
- Bowie A. G., Unterholzner L. 2008. Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 8, 12: 911–922
- Boyd A., Philbin V. J., Smith A. L. 2007. Conserved and distinct aspects of the avian Toll-like receptor (TLR) system: implications for transmission and control of bird-borne zoonoses. *Biochemical Society Transactions*, 35, 6: 1504–1507
- Bradbury J. M. 1977. Rapid biochemical tests for characterization of the *Mycoplasmatales*. *Journal of Clinical Microbiology*, 5, 5: 531–534
- Bradbury J. M. 1984. Avian mycoplasma infections: prototype of mixed infections with mycoplasmas, bacteria and viruses. *Annales de Microbiologie*, 135A, 1: 83–89
- Bradbury J. M. 2005. Gordon Memorial Lecture. Poultry mycoplasmas: sophisticated pathogens in simple guise. *British Poultry Science*, 46, 2: 125–136
- Brocchi M., Vasconcelos A. T. R., Zaha A. 2007. Restriction-modification systems in *Mycoplasma* spp. *Genetics and Molecular Biology*, 30, 1: 236–244
- Brown D. R., Zacher L. A., Farmerie W. G. 2004. Spreading factors of *Mycoplasma alligatoris*, a flesh-eating mycoplasma. *Journal of Bacteriology*, 186, 12: 3922–3927
- Brownlie R., Allan B. 2011. Avian toll-like receptors. *Cell and Tissue Research*, 343, 1: 121–130
- Brownlie R., Zhu J., Allan B., Mutwiri G. K., Babiuk L. A., Potter A., Griebel P. 2009. Chicken TLR21 acts as a functional homologue to mammalian TLR9 in the recognition of CpG oligodeoxynucleotides. *Molecular Immunology*, 46, 15: 3163–3170
- Bucy R. P., Coltey M., Chen C. I., Char D., Le Douarin N. M., Cooper M. D. 1989. Cytoplasmic CD3⁺ surface CD8⁺ lymphocytes develop as a thymus-independent lineage in chick-quail chimeras. *European Journal of Immunology*, 19, 8: 1449–1455
- Bucy R. P., Chen C. L., Cooper M. D. 1990. Development of cytoplasmic CD3⁺/T cell receptor-negative cells in the peripheral lymphoid tissues of chickens. *European Journal of Immunology*, 20, 6: 1345–1350
- Bustin S. A., Benes V., Garson J. A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M. W., Shipley G. L., Vandesompele J., Wittwer C. T. 2009. The

- MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clinical Chemistry, 55, 4: 611–622
- Cahill J. F., Cole B. C., Wiley B. B., Ward J. R. 1971. Role of biological mimicry in the pathogenesis of rat arthritis induced by *Mycoplasma arthritidis*. Infection and Immunity, 3, 1: 24–35
- Cannon M. J., Russell P. H. 1986. Secondary *in vitro* stimulation of specific cytotoxic cells to Newcastle disease virus in chickens. Avian Pathology, 15, 4: 731–740
- Carle P., Laigret F., Tully J. G., Bove J. M. 1995. Heterogeneity of genome sizes within the genus *Spiroplasma*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 45, 1: 178–181
- Carroll M. C. 2004. The complement system in regulation of adaptive immunity. Nature Immunology, 5, 10: 981–986
- Carvalho F. M., Fonseca M. M., De Medeiros S. B., Scortecci K. C., Blaha C. A. G., Agnez-Lima L. F. 2005. DNA repair in reduced genome: The Mycoplasma model. Gene, 360, 2: 111–119
- Casali P., Notkins A. L. 1989. CD5⁺ B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire. Immunology Today, 10, 11: 364–368
- Chambers P., Millar N. S., Emmerson P. T. 1986a. Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus. Journal of General Virology, 67, 12: 2685–2694
- Chambers P., Millar N. S., Platt S. G., Emmerson P. T. 1986b. Nucleotide sequence of the gene encoding the matrix protein of Newcastle disease virus. Nucleic Acids Research, 14, 22: 9051–9061
- Chang P. W. 1981. Newcastle disease. V: CRC Handbook Series in Zoonoses. Section B: Viral Zoonoses Volume II. Beran G. W. (ed.). Boca Raton, CRC Press: 261–274
- Charles S. D., Nagaraja K. V., Halvorson D. A., Barnes D. M. 1993. Influence of Newcastle disease virus on the severity of *Pasteurella anatipestifer* infection in turkeys. Research in Veterinary Science, 55, 2: 209–214
- Chenna R., Sugawara H., Koike T., Lopez R., Gibson T. J., Higgins D. G., Thompson J. D. 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acids Research, 31, 13: 3497–3500
- Christensen N. H., Yavari C. A., McBain A. J., Bradbury J. M. 1994. Investigations into the survival of *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma iowae* on materials found in the poultry house environment. Avian Pathology, 23, 1: 127–143

- Chuammitri P., Ostojić J., Andreasen C. B., Redmond S. B., Lamont S. J., Palić D. 2009. Chicken heterophil extracellular traps (HETs): novel defense mechanism of chicken heterophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 129, 1–2: 126–131
- Citti C., Blanchard A. 2013. Mycoplasmas and their host: emerging and re-emerging minimal pathogens. *Trends in Microbiology*, 21, 4: 196–203
- Citti C., Browning G., Rosengarten R. 2005. Phenotypic diversity and cell invasion in host subversion by pathogenic mycoplasmas. V: *Mycoplasmas: molecular biology, pathogenicity and strategies for control*. Blanchard A., Browning G. (eds.). Norfolk, Horizon Bioscience: 439–484
- Cizelj I., Berčič R. L., Dušanić D., Narat M., Kos J., Dovč P., Benčina D. 2011. *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* express a cysteine protease CysP, which can cleave chicken IgG into Fab and Fc. *Microbiology*, 157, 2: 362–372
- Cizelj I., Berčič R. L., Dušanić D., Benčina M., Narat M., Zorman-Rojs O., Benčina D. 2013. Poultry infected with *Mycoplasma gallisepticum* or *Mycoplasma synoviae* produce antibodies to their cysteine protease CysP. *Acta agriculturae Slovenica*, 102, 1: 19–27
- Cole R. K., Hutt F. B. 1961. Genetic differences in resistance to Newcastle disease. *Avian Diseases*, 5, 2: 205–214
- Collins M. S., Bashiruddin J. B., Alexander D. J. 1993. Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity. *Archives of Virology*, 128, 3–4: 363–370
- Collins M. S., Strong I., Alexander D. J. 1994. Evaluation of the molecular basis of pathogenicity of the variant Newcastle disease viruses termed »pigeon PMV-1 viruses«. *Archives of Virology*, 134, 3–4: 403–411
- Coltey M., Bucy R. P., Chen C. H., Cihak J., Losch U., Char D., Le Douarin N. H., Cooper M. D. 1989. Analysis of the first two waves of thymus homing stem cells and their T-cell progeny in chick-quail chimeras. *The Journal of Experimental Medicine*, 170, 2: 543–557
- Corey E. A., Mirza A. M., Levandowsky E., Iorio R. M. 2003. Fusion deficiency induced by mutations at the dimer interface in the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase is due to a temperature-dependent defect in receptor binding. *Journal of Virology*, 77, 12: 6913–6922
- Cormican P., Lloyd A. T., Downing T., Connel S. J., Bradley D., O'Farrelly C. 2009. The avian Toll-like receptor pathway – subtle differences amidst general conformity. *Developmental and Comparative Immunology*, 33, 9: 967–973

- Courtney S. C., Susta L., Gomez D., Hines N., Pearson J. E., Brown C. C., Miller P. J., Afonso C. L. 2012. Highly divergent virulent isolates of Newcastle disease virus from the Dominican Republic are members of a new genotype that may have evolved unnoticed for over two decades. *Journal of Clinical Microbiology*, 51, 2: 508–517
- Crennell S., Takimoto T., Portner A., Taylor G. 2000. Crystal structure of the multifunctional paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase. *Nature Structural Biology*, 7, 11: 1068–1074
- Cuadros M. A., Martin C., Coltey P., Almendros A., Navascués J. 1993. First appearance, distribution, and origin of macrophages in the early development of the avian central nervous system. *The Journal of Comparative Neurology*, 330, 1: 113–129
- Czeglédi A., Ujvári D., Somogyi E., Wehmann E., Werner O., Lomniezi B. 2006. Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. *Virus Research*, 120, 1–2: 36–48
- Davison F., Kaspers B., Schat K. A. 2008a. Avian immunology. 1st ed. Oxford, Elsevier Ltd: 481 str.
- Davison F., Magor K. E., Kaspers B. 2008b. Structure and evolution of avian immunoglobulins. V: Avian immunology. 1st ed. Davison F., Kaspers B., Schat K. A. (eds.). Oxford, Elsevier Ltd: 107–127
- de Leeuw O. S., Koch G., Hartog L., Ravenshorst N., Peeters B. P. 2005. Virulence of Newcastle disease virus is determined by the cleavage site of the fusion protein and by both the stem region and globular head of the haemagglutinin-neuraminidase protein. *Journal of General Virology*, 86, 6: 1759–1769
- Degefa T., Dadi L., Yami A., Mariam G., Nassir M. 2004. Technical and economic evaluation of different methods of Newcastle disease vaccine administration. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine*, 51, 7–8: 365–369
- Degen W. G., van Daal N., Rothwell L., Kaiser P., Schijns V. E. 2005. Th1/Th2 polarization by viral and helminth infection in birds. *Veterinary Microbiology*, 105, 3–4: 163–167
- Degen W. G., van Daal N., van Zuilekom H. I., Burnside J., Schijns V. E. 2004. Identification and molecular cloning of functional chicken IL-12. *Journal of Immunology*, 172, 7: 4371–4380
- Diel D. G., da Silva L. H., Liu H., Wang Z., Miller P. J., Afonso C. L. 2012. Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes. *Infection, Genetics and Evolution*, 12, 8: 1770–1779

- Digby M. R., Lowenthal J. W. 1995. Cloning and expression of the chicken interferon- γ gene. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 15, 11: 939–945
- Ding A. H., Nathan C. F., Stuehr D. J. 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *Journal of Immunology*, 141, 7: 2407–2412
- Dortmans J. C., Rottier P. J., Koch G., Peeters B. P. 2010. The viral replication complex is associated with the virulence of Newcastle disease virus. *Journal of Virology*, 84, 19: 10113–10120
- Dušanić D., Berčič R. L., Cizelj I., Salmič S., Narat M., Benčina D. 2009. *Mycoplasma synoviae* invades non-phagocytic chicken cells *in vitro*. *Veterinary Microbiology*, 138, 12: 114–119
- Dušanić D., Benčina D., Oven I., Cizelj I., Benčina M., Narat M. 2012. *Mycoplasma synoviae* induces upregulation of apoptotic genes, secretion of nitric oxide and appearance of an apoptotic phenotype in infected chicken chondrocytes. *Veterinary Research*, 43: 7
- Dušanić D., Benčina D., Narat M., Oven I. 2014. Phenotypic characterization of *Mycoplasma synoviae* induced changes in the metabolic and sensitivity profile of *in vitro* infected chicken chondrocytes. *BioMed Research International*, 2014: 613730
- Dybvig K., Sitaraman R., French C. T. 1998. A family of phase-variable restriction enzymes with differing specificities generated by high-frequency gene rearrangements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 23: 13923–13928
- El-Safty M. M., Sherif N. A., Salama S. S., El-Ebary E. A., Daoud A. M. 2005. A trial *in ovo* vaccination of chicken embryo against *M. gallisepticum* and Gumboro infection. *Veterinary Medical Journal (Giza)*, 53, 2: 515–522
- Erdei J., Erdei J., Bachir K., Kaleta E. F., Shortridge K. F., Lomniczi B. 1987. Newcastle disease vaccine (La Sota) strain specific monoclonal antibody. *Archives of Virology*, 96, 3–4: 265–269
- Errington W., Emmerson P. T. 1997. Assembly of recombinant Newcastle disease virus nucleocapsid protein into nucleocapsid-like structures is inhibited by the phosphoprotein. *Journal of General Virology*, 78, 9: 2335–2339
- Faden H., Humbert J., Lee J., Sutyla P., Ogra P. L. 1981. The *in vitro* effects of Newcastle disease virus on the metabolic and antibacterial functions of human neutrophils. *Blood*, 58, 2: 221–227

- Farrager J. T., Allan W. H., Wyeth P. J. 1974. Immunosuppressive effect of infectious bursal agent on vaccination against Newcastle disease. *Veterinary Record*, 95, 17: 385–388
- Feberwee A., de Wit J. J., Landman W. J. M. 2009. Induction of eggshell apex abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: field and experimental studies. *Avian Pathology*, 38, 1: 77–85
- Ficken M. D., Edwards J. F., Lay J. C. 1987b. Effects of Newcastle disease virus infection on the binding, phagocytic, and bactericidal activities of respiratory macrophages of the turkey. *Avian Diseases*, 31, 4: 888–894
- Ficken M. D., Edwards J. F., Lay J. C., Tveter D. E. 1987a. Tracheal mucus transport rate and bacterial clearance in turkeys exposed by aerosol to LaSota strain of Newcastle disease virus. *Avian Diseases*, 31, 2: 241–248
- Fijii Y., Sakaguchi T., Kiyotani K., Yoshida T. 1999. Comparison of substrate specificities against the fusion glycoprotein of virulent Newcastle disease virus between a chick embryo fibroblast processing protease and mammalian subtilisin-like proteases. *Microbiology and Immunology*, 43, 2: 133–140
- Fiorentin L., Mores M. A. Z., Trevisol I. M., Antunes S. C., Costa J. L. A., Soncini R. A., Vieira N. A. 2003. Test profiles of broiler breeder flocks housed in farms with endemic *Mycoplasma synoviae* infection. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 5, 1: 37–43
- Fraser C. M., Gocayne J. D., White O., Adams M. D., Clayton R. A., Fleischmann R. D., Bult C. J., Kerlavage A. R., Sutton G., Kelley J. M., Fritchman J. L., Weidman J. F., Small K. V., Sandusky M., Fuhrmann J., Nguyen D., Utterback T. R., Saudek D. M., Phillips C. A., Merrick J. M., Tomb J.-F., Dougherty B. A., Bott K. F., Hu P.-C., Lucier T. S., Petterson S. N., Smith H. O., Hutchison III C. A., Venter J. C. 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*, 270, 5235: 397–403
- Frey M. L., Hanson R. P., Anderson D. P. 1968. A medium for the isolation of avian mycoplasmas. *American Journal of Veterinary Research*, 29, 11: 2163–2171
- Gabrielli M. G., Accili D. 2010. The chick chorioallantoic membrane: a model of molecular, structural, and functional adaptation to transepithelial ion transport and barrier function during embryonic development. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 940741: 1–12
- Ganar K., Das M., Sinha S., Kumar S. 2014. Newcastle disease virus: Current status and our understanding. *Virus Research*, 184: 71–81
- García M., Jackwood M. W., Levisohn S., Kleven S. H. 1995. Detection of *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, and *M. iowae* by multi-species polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Avian Diseases*, 39, 3: 606–616

- Garcia-Sastre A., Gabezas J. A., Villar E. 1989. Protein of Newcastle disease virus envelope: interaction between the outer hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein and the inner non-glycosylated matrix protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 999, 2: 171–175
- Garrity G. M., Lilburn T. G., Cole J. R., Harrison S. H., Euzéby J., Tindall B. J. 2007. The Bacteria: Phylum »*Firmicutes*«: Class *Mollicutes*. *Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea*, Release 7.7: 317–332
- Ghumman J. S., Wiggins A. D., Bankowski R. A. 1976. Antibody response and resistance of turkeys to Newcastle disease vaccine strain LaSota. *Avian Diseases*, 20, 1: 1–8
- Giambrone J. J., Closser J. 1990. Effect of breeder vaccination on immunization of progeny against Newcastle disease. *Avian Diseases*, 34, 1: 114–119
- Giambrone J. J., Eidson C. S., Kleven S. H. 1977. Effect of infectious bursal disease on the response of chickens to *Mycoplasma synoviae*, Newcastle disease virus, and infectious bronchitis virus. *American Journal of Veterinary Research*, 38, 2: 251–253
- Giambrone J. J., Eidson C. S., Page R. K., Fletcher O. J., Barger B. O., Kleven S. H. 1976. Effect of infectious bursal agent on the response of chickens to Newcastle disease and Marek's disease vaccination. *Avian Diseases*, 20, 3: 534–544
- Glickman R., Syddall R. J., Iorio R. M., Sheehan J. P., Bratt M. A. 1988. Quantitative basic residue requirements in the cleavage activation site of the fusion glycoprotein as a determinant of virulence for Newcastle disease virus. *Journal of Virology*, 62, 1: 354–356
- Goldhaft T. M. 1980. Historical note on the origin of the La Sota strain of Newcastle disease virus. *Avian Diseases*, 24, 2: 297–301
- Gordon S. 2003. Macrophages and the immune response. V: *Fundamental Immunology*. 5th ed. Paul W. (ed.). Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 481–495
- Gorman J. J., Nestorowicz A., Mitchell S. J., Corino G. L., Selleck P. W. 1988. Characterization of the sites of proteolytic activation of Newcastle disease virus membrane glycoprotein precursors. *The Journal of Biological Chemistry*, 263, 25: 12522–12531
- Gould A. R., Kattenbelt J. A., Selleck P., Hansson E., Della-Porta A., Westbury H. A. 2001. Virulent Newcastle disease in Australia: molecular epidemiological analysis of viruses isolated prior to and during the outbreaks of 1998–2000. *Virus Research*, 77, 1: 51–60
- Göbel T. W., Chen C. L., Shrimpf J., Grossi C. E., Bernot A., Bucy R. P., Auffray C., Cooper M. D. 1994. Characterization of avian natural killer cells and their intracellular CD3 protein complex. *European Journal of Immunology*, 24, 7: 1685–1691

- Göbel T. W., Kaspers B., Stangassinger M. 2001. NK and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken. International Immunology, 13, 6: 757–762
- Guittet M., Le Coq H., Morin M., Jestin V., Bennejean G. 1993. Distribution of Newcastle disease virus after challenge in tissues of vaccinated broilers. V: Proceedings of the Tenth World Veterinary Poultry Association Congress, Sydney, 16.–19. avg. 1993. Sydney, World Veterinary Poultry Association: 179
- Gurevich V. A., Ley D. H., Markham J. F., Whithear K. G., Walker I. D. 1995. Identification of *Mycoplasma synoviae* immunogenic surface proteins and their potential use as antigens in the enzyme-linked immunosorbent assay. Avian Diseases, 39, 3: 465–474
- Gyorfy Z., Ohnemus A., Kaspers B., Duda E., Staeheli P. 2003. Truncated chicken interleukin-1beta with increased biologic activity. Journal of Interferon & Cytokine Research, 23, 5: 223–238
- Hamaguchi M., Yoshida T., Nishikawa K., Naruse H., Nagai Y. 1983. Transcriptive complex of Newcastle disease virus. I. Both L and P proteins are required to constitute an active complex. Virology, 128, 1: 105–117
- Hamal K. R., Burgess S. C., Pevzner I. Y., Erf G. F. 2006. Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens. Poultry Science, 85, 8: 1364–1372
- Hammond P. P., Ramírez A. S., Morrow C. J., Bradbury J. M. 2009. Development and evaluation of an improved diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the haemagglutinin encoding gene *vhA* and its value for strain typing. Veterinary Microbiology, 136, 1–2: 61–68
- Hanson R. P. 1988. Heterogeneity within strains of Newcastle disease virus: Key to survival. V: Newcastle Disease. Alexander D. J. (ed.). Boston, Kluwer Academic Publishers: 113–130
- Harmon B. G. 1998. Avian heterophils in inflammation and disease resistance. Poultry Science, 77, 7: 972–977
- Harrison L., Brown C., Afonso C., Zhang J., Susta L. 2011. Early occurrence of apoptosis in lymphoid tissues from chickens infected with strains of Newcastle disease virus of varying virulence. Journal of Comparative Pathology, 145, 4: 327–335
- Hibbs Jr. J. B., Taintor R. R., Vavrin Z. 1987. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. Science, 235, 4787: 473–476

- Higgins D. A. 1971. Nine disease outbreaks associated with myxoviruses among ducks in Hong Kong. *Tropical Animal Health and Production*, 3, 4: 232–240
- Higgins D. A. 1975. Physical and chemical properties of fowl immunoglobulins. *Veterinary Bulletin*, 45, 3: 139–154
- Higgins P. A., Whithear K. G. 1986. Detection and differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* antibodies in chicken serum using enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Diseases*, 30, 1: 160–168
- Higgs R., Cormican P., Cahalane S., Allan B., Lloyd A. T., Meade K., James T., Lynn D. J., Babiuk L. A., O'Farrelly C. 2006. Induction of a novel chicken Toll-like receptor following *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infection and Immunity*, 74, 3: 1692–1698
- Himmelreich R., Hilbert H., Plagens H., Pirkl E., Li B.-C., Herrmann R. 1996. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Research*, 24, 22: 4420–4449
- Hinz K. H., Blome C., Ryll M. 2003. Virulence of *Mycoplasma synoviae* strains in experimentally infected broiler chickens. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 116, 1–2: 59–66
- Hirai K., Shimakura S., Kawamoto E., Taguchi F., Kim S. T., Chang C. N., Iritani Y. 1974. The immunodepressive effect of infectious bursal disease virus in chickens. *Avian Diseases*, 18, 1: 50–57
- Hirano T. 1998. Interleukin 6. V: The cytokine handbook. 3rd ed. Thomson A. E. (ed.). San Diego, Academic Press: 197–227
- Hofmann A., Plachy J., Hunt L., Kaufman J., Hala K. 2003. *v-src* oncogene-specific carboxy-terminal peptide is immunoprotective against Rous sarcoma growth in chickens with MHC class I allele B-F12. *Vaccine*, 21, 32: 4694–4699
- Hong Y., García M., Leiting V., Benčina D., Dufour-Zavala L., Zavala G., Kleven S. H. 2004. Specific detection and typing of *Mycoplasma synoviae* strains in poultry with PCR and DNA sequence analysis targeting the hemagglutinin encoding gene *vhA*. *Avian Diseases*, 48, 3: 606–616
- Hopkins S. R., Yoder H. W. 1982. Influence of infectious bronchitis strains and vaccines on the incidence of *Mycoplasma synoviae* airsacculitis. *Avian Diseases*, 26, 4: 741–752
- Hopkins S. R., Yoder H. W. 1984. Increased incidence of airsacculitis in broilers infected with *Mycoplasma synoviae* and chicken passaged infectious bronchitis vaccine virus. *Avian Diseases*, 28, 2: 386–396

- Horikami S. M., Smallwood S., Moyer S. A. 1996. The Sendai virus V protein interacts with the NP protein to regulate viral genome RNA replication. *Virology*, 222, 2: 383–390
- Hoshi S., Mikami T., Nagata K., Onuma M., Izawa H. 1983. Monoclonal antibodies against a paramyxovirus isolated from Japanese sparrow-hawks (*Accipiter virugatus gularis*). *Archives of Virology*, 76: 145–151
- Houssaint E. 1987. Cell lineage segregation during bursa of Fabricius ontogeny. *Journal of Immunology*, 138, 11: 3626–3634
- Huang Y., Robertson J. A., Stemke G. W. 1995. An unusual rRNA gene organization in *Mycoplasma fermentas* (incognitus strain). *Canadian Journal of Microbiology*, 41, 4–5: 424–427
- Huang Y., Wan H. Q., Liu H. Q., Wu Y. T., Liu X. F. 2004a. Genomic sequence of an isolate of Newcastle disease virus isolated from an outbreak in geese: a novel six nucleotide insertion in the non-coding region of the nucleoprotein gene. *Archives of Virology*, 149, 7: 1445–1457
- Huang Z., Krishnamurthy S., Panda A., Samal S. K. 2003. Newcastle disease virus V protein is associated with viral pathogenesis and functions as an alpha interferon antagonist. *Journal of Virology*, 77, 16: 8676–8685
- Huang Z., Panda A., Elankumaran S., Govindarajan D., Rockemann D. D., Samal S. K. 2004b. The hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence. *Journal of Virology*, 78, 8: 4176–4184
- Hughes S., Poh T. Y., Bumstead N., Kaiser P. 2007. Re-evaluation of the chicken MIP family of chemokines and their receptors suggest that CCL5 is the prototypic MIP family chemokine, and that different species have developed different repertoires of both the CC chemokines and their receptors. *Developmental and Comparative Immunology*, 31, 1: 72–86
- Iorio R. M., Glickman R. L., Riel A. M., Sheehan J. P., Bratt M. A. 1989. Functional and neutralization profile of seven overlapping antigenic sites on the HN glycoprotein of Newcastle disease virus: monoclonal antibodies to some sites prevent viral attachment. *Virus Research*, 13, 3: 245–261
- Ishada N., Tairo H., Omata T., Mizumoto K., Hattori S., Iwasaki K., Kawakita M. 1986. Sequence of 2,617 nucleotides from the 3' end of Newcastle disease virus genome RNA and the predicted amino acid sequence of viral NP protein. *Nucleic Acids Research*, 14, 16: 6551–6564
- Ishida M., Nerome K., Matsumoto M., Mikami T., Oye A. 1985. Characterization of reference strains of Newcastle disease virus (NDV) and NDV-like isolates by monoclonal antibodies to HN subunits. *Archives of Virology*, 85, 1–2: 109–121

- Janse E. M., Jeurissen S. H. M. 1991. Ontogeny and function of two non-lymphoid cell populations in the chicken embryo. *Immunobiology*, 182, 5: 472–481
- Jeffery N., Browning G. F., Noormohammadi A. H. 2006. Organization of the *Mycoplasma synoviae* WVU 1853T vlhA gene locus. *Avian Pathology*, 35, 1: 53–57
- Jensen J. G., Blom J., Lind K. 1993. Intracellular location of *Mycoplasma genitalium* in cultured Vero cells as demonstrated by electron microscopy. *International Journal of Pathology*, 75, 2: 91–98
- Jeurissen S. H., Boonstra-Blom A. G., Al-Garib S. O., Hartog L., Koch G. 2000. Defence mechanisms against viral infection in poultry: a review. *Veterinary Quarterly*, 22, 4: 204–208
- Jeurissen S. H., Janse E. M. 1989. Distribution and function of non-lymphoid cells in liver and spleen of embryonic and adult chickens. *Progress in Clinical & Biological Research*, 307: 149–157
- Johansson K. E., Pettersson B. 2002. Taxonomy of Mollicutes. V: Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Razin S., Herrmann R. (eds.). New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 1–30
- Jones C. V., Ricardo S. D. 2013. Macrophages and CSF-1: implications for development and beyond. *Organogenesis*, 9, 4: 249–260
- Jordan F. T. W., Erno H., Cottew G. S., Hinz K. H., Stipkovits L. 1982. Characterization and taxonomic description of five mycoplasma serovars (serotypes) of avian origin and their elevation to species rank and further evaluation of the taxonomic status of *Mycoplasma synoviae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 32, 1: 108–115
- Juul-Madsen H. R., Viertlboeck B., Smith A. L., Göbel T. W. F. 2008. Avian innate immune responses. V: Avian immunology. 1st ed. Davison F., Kaspers B., Schat K. A. (eds.). Oxford, Elsevier Ltd: 129–158
- Kaaden O.-R., Lange S., Stiburek B. 1982. Establishment and characterization of chicken embryo fibroblast clone LSCC-H32. *In Vitro*, 18, 10: 827–834
- Kagan B. L., Selsted M. E., Ganz T., Lehrer R. I. 1990. Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 1: 210–214
- Kaiser P. 2007. The avian immune genome – a glass half-full or half-empty? *Cytogenetic and Genome Research*, 117, 1–4: 221–230

- Kaiser P. 2010. Advances in avian immunology—prospects for disease control: a review. *Avian Pathology*, 39, 5: 309–324
- Kaiser P. 2012. The long view: a bright past, a brighter future? Forty years of chicken immunology pre- and post-genome. *Avian Pathology*, 41, 6: 511–518
- Kaiser P., Poh T. Y., Rothwell L., Avery S., Balu S., Pathania U. S., Hughes S., Goodchild M., Morrell S., Watson M., Bumstead N., Kaufman J., Young J. R. 2005. A genomic analysis of chicken cytokines and chemokines. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 25, 8: 467–484
- Kaiser P., Stäheli P. 2008. Avian cytokines and chemokines. V: *Avian immunology*. 1st ed. Davison F., Kaspers B., Schat K. A. (eds.). Oxford, Elsevier Ltd: 203–222
- Kanai M., Murata Y., Herbert D. C., Soji T. 2007. Uptake behavior of embryonic chick liver cells. *The Anatomical Record*, 290, 7: 862–874
- Kapczynski D. R., Afonso C. L., Miller P. J. 2013. Immune responses of poultry to Newcastle disease virus. *Developmental and Comparative Immunology*, 41, 3: 447–453
- Kaspers B., Kothlow S., Butter C. 2008. Avian antigen presenting cells. V: *Avian immunology*. 1st ed. Davison F., Kaspers B., Schat K. A. (eds.). Oxford, Elsevier Ltd: 183–202
- Kaspers B., Schranner I., Lösch U. 1991. Distribution of immunoglobulins during embryogenesis in the chicken. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A*, 38, 2: 73–79
- Kaufman J. 2000. The simple chicken major histocompatibility complex: life and death in the face of pathogens and vaccines. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 355, 1400: 1077–1084
- Kaufman J. 2008. The avian MHC. V: *Avian immunology*. 1st ed. Davison F., Kaspers B., Schat K. A. (eds.). Oxford, Elsevier Ltd: 159–181
- Kaufman J., Milne S., Göbel T. W. F., Walker B. A., Jacob J. P., Auffray C., Zoorob R., Beck S. 1999. The chicken B locus is a minimal essential major histocompatibility complex. *Nature*, 401, 6756: 923–925
- Khiari A. B., Mardassi B. B. 2012. Characterization of the antigenic and functional domains of a *Mycoplasma synoviae* variant *vlhA* gene. *Veterinary Microbiology*, 156, 3–4: 322–329
- Kho C. L., Tan W. S., Tey B. T., Yusoff K. 2003. Newcastle disease virus nucleocapsid protein: self-assembly and length-determination domains. *Journal of General Virology*, 84, 8: 2163–2168

- Kim S. H., Xiao S., Paldurai A., Collins P. L., Samal S. K. 2014. Role of C596 in the C-terminal extension of the haemagglutinin-neuraminidase protein in replication and pathogenicity of a highly virulent Indonesian strain of Newcastle disease virus. *Journal of General Virology*, 95, 2: 331–336
- Kleven S. H. 1998. Mycoplasmas in the etiology of multifactorial respiratory disease. *Poultry Science*, 77, 8: 1146–1149
- Kleven S. H. 2003a. *Mycoplasma synoviae* infection. V: Diseases of poultry. 11th ed. Saif Y. M., Barnes H. J., Glisson J. R., Fadly A. M., McDougald L. R., Swayne D. E. (eds.). Ames, Iowa State University Press: 756–766
- Kleven S. H. 2003b. Multicausal respiratory diseases. V: Diseases of poultry. 11th ed. Saif Y. M., Barnes H. J., Glisson J. R., Fadly A. M., McDougald L. R., Swayne D. E. (eds.). Ames, Iowa State University Press: 1164–1168
- Kleven S. H. 2008a. Mycoplasmosis. Introduction. V: Diseases of poultry. 12th ed. Saif Y. M., Fadly A. M., Glisson J. R., McDougald L. R., Nolan L. K., Swayne D. E. (eds.). Oxford, Blackwell Publishing Ltd: 805–807
- Kleven S. H. 2008b. Multicausal respiratory diseases. V: Diseases of poultry. 12th ed. Saif Y. M., Fadly A. M., Glisson J. R., McDougald L. R., Nolan L. K., Swayne D. E. (eds.). Oxford, Blackwell Publishing Ltd: 1262–1266
- Kleven S. H., Eidson C. S., Anderson D. P., Fletcher O. J. 1972a. Decrease of antibody response to *Mycoplasma synoviae* in chickens infected with Marek's disease herpesvirus. *American Journal of Veterinary Research*, 33, 10: 2037–2042
- Kleven S. H., Eidson C. S., Fletcher O. J. 1978. Airsacculitis induced in broilers with a combination of *Mycoplasma gallinarum* and respiratory viruses. *Avian Diseases*, 22, 4: 707–716
- Kleven S. H., Ferguson-Noel N. 2008. *Mycoplasma synoviae* infection. V: Diseases of poultry. 12th ed. Saif Y. M., Fadly A. M., Glisson J. R., McDougald L. R., Nolan L. K., Swayne D. E. (eds.). Oxford, Blackwell Publishing Ltd: 845–856
- Kleven S. H., Fletcher O. J., Davis R. B. 1975. Influence of strain of *Mycoplasma synoviae* and route of infection on development of synovitis or airsacculitis in broilers. *Avian Diseases*, 19, 1: 126–135
- Kleven S. H., King D. D., Anderson D. P. 1972b. Airsacculitis in broilers from *Mycoplasma synoviae*: effect on air-sac lesions of vaccinating with infectious bronchitis and Newcastle virus. *Avian Diseases*, 16, 4: 915–924
- Kogut M. H., Rothwell L., Kaiser P. 2003. Differential regulation of cytokine gene expression by avian heterophils during receptor-mediated phagocytosis of opsonized

- and non-opsonized *Salmonella enteritidis*. Journal of Interferon & Cytokine Research, 23, 6: 319–327
- Kolakofsky D., Boy de la Tour E., Delius H. 1974. Molecular weight determination of Sendai and Newcastle disease virus RNA. Journal of Virology, 13, 2: 261–268
- Koppad S., Raj G. D., Gopinath V. P., Kirubarajan J. J., Thangavelu A., Thiagarajan V. 2011. Calcium phosphate coupled Newcastle disease vaccine elicits humoral and cell mediated immune responses in chickens. Research in Veterinary Science, 91, 3: 384–390
- Kowalczyk K., Daiss J., Halpern J., Roth T. F. 1985. Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken. Immunology, 54, 4: 755–762
- Kume K., Kawakubo Y., Morita C., Hayatsu E., Yoshioka M. 1977. Experimentally induced synovitis of chickens with *Mycoplasma synoviae*. Effects of bursectomy and thymectomy on course of the infection for the first four weeks. American Journal of Veterinary Research, 38, 10: 1595–1600
- Kurilla M. G., Stone H. O., Keene J. D. 1985. RNA sequence and transcriptional properties of the 3' end of the Newcastle disease virus genome. Virology, 145, 2: 203–212
- Ladefoged S. A., Christiansen G. 1991. Analysis of the nucleotide sequence of the *Mycoplasma hominis tuf* gene and its flanking region. FEMS Microbiology Letters, 63, 2–3: 133–139
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 5259: 680–685
- Lam K. M. 1996a. Growth of Newcastle disease virus in chicken macrophages. Journal of Comparative Pathology, 115, 3: 253–263
- Lam K. M. 1996b. Newcastle disease virus-induced apoptosis in the peripheral blood mononuclear cells of chickens. Journal of Comparative Pathology, 114, 1: 63–71
- Lam K. M., Kabbur M. B., Eiserich J. P. 1996. Newcastle disease virus-induced functional impairments and biochemical changes in chicken heterophils. Veterinary Immunology and Immunopathology, 53, 3–4: 313–327
- Lam K. M., Vasconcelos A. C. 1994. Newcastle disease virus-induced apoptosis in chicken peripheral blood lymphocytes. Veterinary Immunology and Immunopathology, 44, 1: 45–56
- Lamb R., Parks G. 2007. *Paramyxoviridae*: the viruses and their replication. V: Fields Virology. 5th ed. Knipe D. M., Howley P. M., Griffin D. E., Lamb R. A., Martin M. A., Roizman B., Straus S. E. (eds.). Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 1449–1496

- Lamb R. A., Kolakofsky D. 1996. *Paramyxoviridae*: the viruses and their replication. V: Fields virology. 3rd ed. Fields B. N., Knipe D. M., Howley P. M. (eds.). Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers: 1177–1203
- Lambreht B., Gonze M., Meulemans G., van den Berg T. P. 2004. Assessment of the cell-mediated immune response in chickens by detection of chicken interferon-gamma in response to mitogen and recall Newcastle disease viral antigen stimulation. *Avian Pathology*, 33, 3: 343–350
- Lammers A., Klomp M. E., Nieuwland M. G., Savelkoul H. F., Parmentier H. K. 2004. Adoptive transfer of natural antibodies to non-immunized chickens affects subsequent antigen-specific and cellular immune responses. *Developmental and Comparative Immunology*, 28, 1: 51–60
- Lan D., Tang C., Li M., Yue H. 2010. Screening and identification of differentially expressed genes from chickens infected with Newcastle disease virus by suppression subtractive hybridization. *Avian Pathology*, 39, 3: 151–159
- Lana D. P., Snyder D. B., King D. J., Marquardt W. W. 1988. Characterization of a battery of monoclonal antibodies for differentiation of Newcastle disease virus and pigeon paramyxovirus-1 strains. *Avian Diseases*, 32, 2: 273–281
- Landman W. J. M. 2014. Is *Mycoplasma synoviae* outrunning *Mycoplasma gallisepticum*? A viewpoint from the Netherlands. *Avian Pathology*, 43, 1: 2–8
- Landman W. J. M., Feberwee A. 2004. Aerosol-induced *Mycoplasma synoviae* arthritis: the synergistic effect of infectious bronchitis virus infection. *Avian Pathology*, 33, 6: 591–598
- Lauerman L. H., Shah S. M., Williams J. C., Corsiglia C. M., Herring R. J. 1993. Immunoglobulin receptors used in avian *Mycoplasma* identification. *Avian Diseases*, 37, 4: 1080–1084
- Lavrič M., Benčina D., Kothlow S., Kaspers B., Narat M. 2007. *Mycoplasma synoviae* lipoprotein MSPB, the N-terminal part of VlhA haemagglutinin, induces secretion of nitric oxide, IL-6 and IL-1 β in chicken macrophages. *Veterinary Microbiology*, 121, 3–4: 278–287
- Lavrič M., Maughan M. N., Bliss T. W., Dohms J. E., Benčina D., Keeler Jr. C. L., Narat M. 2008. Gene expression modulation in chicken macrophages exposed to *Mycoplasma synoviae* and *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, 126, 1–3: 111–121
- Leslie G. A., Clem L. W. 1969. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. III. Immunoglobulins of the chicken. *The Journal of Experimental Medicine*, 130, 6: 1337–1352

- Leslie J. 2000. Newcastle disease: outbreak losses and control policy costs. *Veterinary Record*, 146, 21: 603–606
- Lessard M., Hutchings D., Cave N. A. 1997. Cell-mediated and humoral immune responses in broiler chickens maintained on diets containing different levels of vitamin A. *Poultry Science*, 76, 10: 1368–1378
- Li L., Krishnan M., Baseman J. B., Kannan T. R. 2010. Molecular cloning, expression, and characterization of a Ca^{2+} -dependent, membrane-associated nuclease of *Mycoplasma genitalium*. *Journal of Bacteriology*, 192, 19: 4876–4884
- Lidsky P. V., Romanova L. I., Kolesnikova M. S., Bardina M. V., Khitrina E. V., Hato S. V., van Kuppeveld F. J. M., Agol V. I. 2009. Interactions between viral prokaryotic pathogens in a mixed infection with cardiovirus and mycoplasma. *Journal of Bacteriology*, 83, 19: 9940–9951
- Lillehoj H. S., Min W., Choi K. D., Babu U. S., Burnside J., Miyamoto T., Rosenthal B. M., Lillehoj E. P. 2001. Molecular, cellular, and functional characterization of chicken cytokines homologous to mammalian IL-15 and IL-2. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 82, 3–4: 229–244
- Litman G. W., Rast J. P., Shambott M. J., Haire R. N., Hulst M., Roess W., Litman R. T., Hinds-Frey K. R., Zilch A., Amemiya C. T. 1993. Phylogenetic diversification of immunoglobulin genes and the antibody repertoire. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 1: 60–72
- Livak K. J. 1997. (Updated 2001). Relative quantification of gene expression: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems User Bulletin #2. Foster City, USA, Applied Biosystems: 1–36
- Ljunggren H. G., Karre K. 1990. In search of the »missing self«: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology Today*, 11, 7: 237–244
- Lo S. C., Hayes M. M., Kotani H., Pierce P. F., Wear D. J., Newton P. B., Tully J. G., Shih J. W. 1993. Adhesion onto and invasion into mammalian cells by *Mycoplasma penetrans*: a newly isolated mycoplasma from patients with AIDS. *Modern Pathology*, 6, 3: 276–280
- Lockaby S. B., Hoerr F. J., Kleven S. H., Lauerman L. H. 1999. Pathogenicity of *Mycoplasma synoviae* in chicken embryos. *Avian Diseases*, 43, 2: 331–337
- Lockaby S. B., Hoerr F. J., Lauerman L. H., Kleven S. H. 1998. Pathogenicity of *Mycoplasma synoviae* in broiler chickens. *Veterinary Pathology*, 35, 3: 178–190
- Locke D. P., Sellers H. S., Crawford J. M., Schultz-Cherry A., King D. J., Meinersmann R. J., Seal B. S. 2000. Newcastle disease virus phosphoprotein gene analysis and transcriptional editing in avian cell. *Virus Research*, 69, 1: 55–68

- Lu G., Reinert J. T., Pitha-Rowe I., Okumura A., Kellum M., Knobeloch K. P., Hassel B., Pitha P. M. 2006. ISG15 enhances the innate antiviral response by inhibition of IRF-3 degradation. *Cellular and Molecular Biology* (Noisy-le-Grand, France), 52, 1: 29–41
- Lynn D. J., Higgs R., Lloyd A. T., O'Farrelly C., Hervé-Grépinet V., Nys Y., Brinkman F. S., Yu P. L., Soulier A., Kaiser P., Zhang G., Lehrer R. I. 2007. Avian beta-defensin nomenclature: a community proposed update. *Immunology Letters*, 110, 1: 86–89
- MacOwan K. J., Atkinson M. J., Bell M. A., Brand T. F., Randall C. J. 1984. Egg transmission of a respiratory isolate of *Mycoplasma synoviae* and infection of the chicken embryo. *Avian Pathology*, 13, 1: 51–58
- Maniloff J. 2002. Phylogeny and Evolution. V: Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Razin S., Herrmann R. (eds.). New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 31–44
- Marangon S., Busani L. 2006. The use of vaccination in poultry production. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 26, 1: 265–274
- Marchalonis J. J. 1977. Immunity in evolution. Boston, Harvard University Press: 336 str.
- Marino O. C., Hanson R. P. 1987. Cellular and humoral response of *in ovo*-bursectomized chickens to experimental challenge with velogenic Newcastle disease virus. *Avian Diseases*, 31, 2: 293–301
- Marois C. F., Oufour-Gesbert F., Kempf I. 2000. Detection of *Mycoplasma synoviae* in poultry environment samples by culture and polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*, 73, 4: 311–318
- Martín-Partido G., Cuadros M. A., Martin C., Coltey P., Navascués J. 1991. Macrophage-like cells invading the suboptic necrotic centres of the avian embryo diencephalon originate from haemopoietic precursors. *Journal of Neurocytology*, 20, 12: 962–968
- Martín-Partido G., Navascués J. 1990. Macrophage-like cells in the presumptive optic pathways in the floor of the diencephalon of the chick embryo. *Journal of Neurocytology*, 19, 6: 820–832
- Mast J., Goddeeris B. M. 1999. Development of immunocompetence of broiler chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 70, 3–4: 245–256
- McFerran J. B., McCracken R. M. 1988. Newcastle disease. V: Newcastle Disease. Alexander D. J. (ed.). Boston, Kluwer Academic Publishers: 161–183
- McGarry G. J., Kotani H., Butler G. H. 1992. Mycoplasmas and tissue culture cell. V: Mycoplasmas: Molecular biology and pathogenesis. Maniloff J., McElhaney R. N.,

- Finch L. R., Baseman J. B. (eds.). Washington, DC, American Society for Microbiology: 445–454
- McGinnes L., McQuain C., Morrison T. 1988. The P protein and the nonstructural 38K and 29K proteins of Newcastle disease virus are derived from the same open reading frame. *Virology*, 164, 1: 256–264
- Mebatsion T., Weiland F., Conzelmann K. K. 1999. Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G. *Journal of Virology*, 73, 1: 242–250
- Merz D. C., Scheid A., Choppin P. W. 1981. Immunological studies of the functions of paramyxovirus glycoproteins. *Virology*, 109, 1: 94–105
- Meulemans G. 1988. Control by vaccination. V: Newcastle Disease. Alexander D. J. (ed.). Boston, Kluwer Academic Publishers: 318–332
- Meulemans G., Gonze M., Carlier M. C., Petit P., Burny A., Le Long. 1987. Evaluation of the use of monoclonal antibodies to hemagglutinin and fusion glycoproteins of Newcastle disease virus for virus identification and strain differentiation purposes. *Archives of Virology*, 92, 1–2: 55–62
- Miles R. J. 1992. Catabolism in mollicutes. *Journal of General Microbiology*, 138, 9: 1773–1783
- Millar N. S., Chambers P., Emmerson P. T. 1986. Nucleotide sequence analysis of the haemagglutinin-neuraminidase gene of Newcastle disease virus. *Journal of General Virology*, 67, 9: 1917–1927
- Miller P. J., Decanini E. L., Afonso C. L. 2010. Newcastle disease: evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. *Infection, Genetics and Evolution*, 10, 1: 26–35
- Miller P. J., Killian M. L., Pederson J. C., Afonso C. L. 2011. Avian paramyxovirus serotype 1 strains of low virulence with unusual fusion cleavage sites isolated from poultry species. V: American Association of Avian Pathologists. St. Louis, USA, American Veterinary Medical Association: 14
- Miller P. J., Koch G. 2007. Newcastle disease. V: Diseases of poultry. 13th ed. Swayne D. E., Glisson J. R., McDougald L. R., Nolan L. K., Suarez D. L., Nair V. L. (eds.). Wiley-Blackwell Publishing: 89–107
- Min W., Lillehoj H. S. 2004. Identification and characterization of chicken interleukin-16 cDNA. *Developmental and Comparative Immunology*, 28, 2: 153–162
- Minion F. C., Jarvill-Taylor K. J., Billings D. E., Tigges E. 1993. Membrane-associated nuclease activities in mycoplasmas. *Journal of Bacteriology*, 175, 24: 7842–7847

- Mohammed H. O., Carpenter T. E., Yamamoto R. 1987. Economic impact of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in commercial layer flocks. *Avian Diseases*, 31, 3: 477–482
- Mosmann T. R., Cherwinski H., Bond M. W., Giedlin M. A., Coffman R. L. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology*, 136, 7: 2348–2357
- Mosmann T. R., Coffman R. L. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology*, 7: 145–173
- Munir S., Sharma J. M., Kapur V. 2005. Transcriptional response of avian cells to infection with Newcastle disease virus. *Virus Research*, 107, 1: 103–108
- Nagai Y., Hamaguchi M., Toyoda T. 1989. Molecular biology of Newcastle disease virus. *Progress in Veterinary Microbiology and Immunology*, 5: 16–64
- Nagai Y., Klenk H. D., Rott R. 1976a. Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. *Virology*, 72, 2: 494–508
- Nagai Y., Ogura H., Klenk H. D. 1976b. Studies on the assembly of the envelope of Newcastle disease virus. *Virology*, 69, 2: 523–538
- Nakamura K., Ueda H., Tanimura T., Noguchi K. 1994. Effect of mixed live vaccine (Newcastle disease and infectious bronchitis) and *Mycoplasma gallisepticum* on the chicken respiratory tract and on *Escherichia coli* infection. *Journal of Comparative Pathology*, 111, 1: 33–42
- Narat M., Benčina D., Kleven S. H., Habe F. 1998. The hemagglutination-positive phenotype of *Mycoplasma synoviae* induces experimental infectious synovitis in chickens more frequently than does the hemagglutination-negative phenotype. *Infection and Immunity*, 66, 12: 6004–6009
- Nishikawa K., Isomura S., Suzuki S., Wanatabe E., Hamaguchi M., Yoshida T., Nagai Y. 1983. Monoclonal antibodies to the HN glycoprotein of Newcastle disease virus. Biological characterization and use for strain comparisons. *Virology*, 130, 2: 318–330
- Noormohammadi A. H., Markham P. F., Duffy M. F., Whithear K. G., Browning G. H. 1998. Multigene families encoding the major hemagglutinins in phylogenetically distinct mycoplasmas. *Infection and Immunity*, 66, 7: 3470–3475
- Noormohammadi A. H., Markham P. F., Kanci A., Whithear K. G., Browning G. F. 2000. A novel mechanism for control of antigenic variation in the haemagglutinin gene family of *Mycoplasma synoviae*. *Molecular Microbiology*, 35, 4: 911–923

- Noormohammadi A. H., Markham P. F., Whithear K. G., Walker I. D., Gurevich V. A., Ley D. H., Browning G. F. 1997. *Mycoplasma synoviae* has two distinct phase-variable major membrane antigens, one of which is a putative hemagglutinin. *Infection and Immunity*, 65, 7: 2542–2547
- Oberdörfer A., Werner O. 1998. Newcastle disease virus: detection and characterization by PCR of recent German isolates differing in pathogenicity. *Avian Pathology*, 27, 3: 237–243
- Ochsenbein A. F., Fehr T., Lutz C., Suter M., Brombacher F., Hengartner H., Zinkernagel R. M. 1999. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science*, 286, 5447: 2156–2159
- OIE (Office International des Epizooties). 2012. Chapter 2.3.14. Newcastle disease. OIE Terrestrial Manual 2012. Paris, World Organisation for Animal Health: 555–573
- Oláh I., Vervelde L. 2008. Structure of the avian lymphoid system. V: Avian immunology. 1st ed. Davison F., Kaspers B., Schat K. A. (eds.). Oxford, Elsevier Ltd: 13–50
- Olson N. O. 1984. *Mycoplasma synoviae* infection. V: Diseases of poultry. 8th ed. Hofstad M. S., Barnes H. J., Calnek B. W., Reid W. M., Yoder Jr. H. W. (eds.). Ames, Iowa State University Press: 212–220
- Olson N. O., Adler H. E., DaMassa A. J., Corstvet R. E. 1964. The effect of intranasal exposure to *Mycoplasma synoviae* and infectious bronchitis on development of lesions and agglutinins. *Avian Diseases*, 8, 4: 623–631
- Olson N. O., Kerr K. M., Campbell A. 1963. Control of infectious synovitis. 12. Preparation of an agglutination test antigen. *Avian Diseases*, 7, 3: 310–317
- Opitz H. M. 1983. *Mycoplasma synoviae* infection in Maine's egg farms. *Avian Diseases*, 27, 2: 324–326
- Opitz H. M., Duplessis J. B., Cyr M. J. 1983. Indirect micro-enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *Mycoplasma synoviae* and *M. gallisepticum*. *Avian Diseases*, 27, 3: 773–786
- Oven I., Resman Rus K., Dušanić D., Benčina D., Keeler C. L., Narat M. 2013. Diacylated lipopeptide from *Mycoplasma synoviae* mediates TLR15 induced innate immune responses. *Veterinary Research*, 44: 99
- Paddenberg R., Weber A., Wulf S., Mannherz H. G. 1998. Mycoplasma nucleases able to induce internucleosomal DNA degradation in cultured cells possess many characteristics of eukaryotic apoptotic nucleases. *Cell Death and Differentiation*, 5, 6: 517–528

- Paddenberg R., Wulf S., Weber A., Heimann P., Beck L. A., Mannherz H. G. 1996. Internucleosomal DNA fragmentation in cultured cells under conditions reported to induce apoptosis may be caused by mycoplasma endonucleases. European Journal of Cell Biology, 71, 1: 105–119
- Palmer R. M., Ferrige A. G., Moncada S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature, 327, 6122: 524–526
- Panda A., Elankumaran S., Krishnamurthy S., Huang Z., Samal S. K. 2004b. Loss of N-linked glycosylation from the hemagglutinin-neuraminidase protein alters virulence of Newcastle disease virus. Journal of Virology, 78, 10: 4965–4975
- Panda A., Huang Z., Elankumaran S., Rockemann D. D., Samal S. K. 2004a. Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virus. Microbial Pathogenesis, 36, 1: 1–10
- Parede L., Young P. L. 1990. The pathogenesis of velogenic Newcastle disease virus infection of chickens of different ages and different levels of immunity. Avian Diseases, 34, 4: 803–808
- Park M.-S., Garcia-Sastre A., Cros J. F., Basler C. F., Palese P. 2003. Newcastle disease virus V protein is a determinant of host range restriction. Journal of Virology, 77, 17: 9522–9532
- Parmentier H. K., Lammers A., Hoekman J. J., De Vries Reilingh G., Zaanen I. T., Savelkoul H. F. 2004. Different levels of natural antibodies in chickens divergently selected for specific antibody responses. Developmental and Comparative Immunology, 28, 1: 39–49
- Patten B. E., Higgins P. A., Whithear K. G. 1984. A urease-ELISA for the detection of mycoplasma infections in poultry. Australian Veterinary Journal, 61, 5: 151–155
- Patterson R., Youngner J. S., Weigle W. O., Dixon F. J., 1962a. Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. Journal of Immunology, 89: 272–278
- Patterson R., Youngner J. S., Weigle W. O., Dixon F. J., 1962b. The metabolism of serum proteins in the hen and chick and secretion of serum proteins by the ovary of the hen. Journal of General Physiology, 45, 3: 501–513
- Peeples M. E., Bratt M. A. 1984. Mutation in the matrix protein of Newcastle disease virus can result in decreased fusion glycoprotein incorporation into particles and decreased infectivity. Journal of Virology, 51, 1: 81–90
- Peeters B. P., Gruijthuijsen Y. K., de Leeuw O. S., Gielkens A. L. 2000. Genome replication of Newcastle disease virus: involvement of the rule-of-six. Archives of Virology, 145, 9: 1829–1845

- Perey D. Y., Cleland G. B., Dent P. B. 1975. Newcastle disease in normal and immunodeficient chickens. American Journal of Veterinary Research, 36, 4 Pt 2: 513–517
- Peters M. A., Browning G. F., Washington E. A., Crabb B. S., Kaiser P. 2003. Embryonic age influences the capacity for cytokine induction in chicken thymocytes. Immunology, 110, 3: 358–367
- Pfaffl M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research, 29, 9: e45
- Phillips R. J., Samson A. C. R., Emmerson P. T. 1998. Nucleotide sequence of the 5'-terminus of Newcastle disease virus and assembly of the complete genomic sequence: agreement with the »rule of six«. Archives of Virology, 143, 10: 1993–2002
- Pollack J. D. 2002. The necessity of combining genomic and enzymatic data to infer metabolic function and pathways in the smallest bacteria: amino acid, purine and pyrimidine metabolism in Mollicutes. Frontiers in Bioscience, 7: d1762–d1781
- Pollack J. D., Williams M. V., McElhaney R. N. 1997. The comparative metabolism of the mollicutes (Mycoplasmas): the utility for taxonomic classification and the relationship of putative gene annotation and phylogeny to enzymatic function. Critical Reviews in Microbiology, 23, 4: 269–354
- Pollard J. W. 2009. Trophic macrophages in development and disease. Nature Reviews Immunology, 9, 4: 259–270
- Powell F., Rothwell L., Clarkson M., Kaiser P. 2009. The turkey, compared to the chicken, fails to mount an effective early immune response to *Histomonas meleagridis* in the gut; towards an understanding of the mechanisms underlying the differential survival of poultry species. Parasite Immunology, 31, 6: 312–327
- Quan C. P., Berneman A., Pires R., Avrameas S., Bouvet J.-P. 1997. Natural polyreactive secretory immunoglobulin A autoantibodies as a possible barrier to infection in humans. Infection and Immunity, 65, 10: 3997–4004
- Ragland W. L., Mazija H., Cvelić-Čabrillo V., Savić V., Novak R., Pogačnik M. 1998. Immune suppression of commercial broilers in Croatia, Slovenia, and Bosnia and Herzegovina. Avian Pathology, 27, 2: 200–204
- Rasmussen R. 2001. Quantification on the LightCycler. V: Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications. Meuer S., Wittwer C., Nakagawara K. (eds.). Heidelberg, Springer Press: 21–34
- Ratcliffe M. J. H. 2008. B cells, the bursa of Fabricius and the generation of antibody repertoires. V: Avian immunology. 1st ed. Davison F., Kaspers B., Schat K. A. (eds.). Oxford, Elsevier Ltd: 67–89

- Rath N. C., Parcells M. S., Xie H., Santin E. 2003. Characterization of a spontaneously transformed chicken mononuclear cell line. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 96, 1–2: 93–104
- Rauw F., Gardin Y., Palya V., van Borm S., Gonze M., Lemaire S., van den Berg T., Lambrecht B. 2009. Humoral, cell-mediated and mucosal immunity induced by oculo-nasal vaccination of one-day-old SPF and conventional layer chicks with two different live Newcastle disease vaccines. *Vaccine*, 27, 27: 3631–3642
- Razin S. 1978. The mycoplasmas. *Microbiological Reviews*, 42, 2: 414–470
- Razin S. 1983. Cell lysis and isolation of membranes. V: *Methods in mycoplasmology*. 1st ed. Razin S., Tully J. G. (eds.). New York, Academic Press: 225–233
- Razin S. 1992. Mycoplasma taxonomy and ecology. V: *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. Maniloff J., McElhaney R. N., Finch L. R., Baseman J. B. (eds.). Washington, D.C., American Society for Microbiology: 3–22
- Razin S., Yogev D., Naot Y. 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 4: 1094–1156
- Reschner A., Hubert P., Delvenne P., Boniver J., Jacobs N. 2008. Innate lymphocyte and dendritic cell cross-talk: a key factor in the regulation of the immune response. *Clinical and Experimental Immunology*, 152, 2: 219–226
- Reynolds D. L., Maraqa A. D. 2000. Protective immunity against Newcastle disease: the role of cell-mediated immunity. *Avian Diseases*, 44, 1: 145–154
- Roach J. C., Glusman G., Rowen L., Kaur A., Purcell M. K., Smith K. D. Hood L. E., Aderem A. 2005. The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 27: 9577–9582
- Robertson B. D., Meyer T. F. 1992. Genetic variation in pathogenic bacteria. *Trends in Genetics*, 8, 12: 422–427
- Rodwell A. W., Whitcomb R. F. 1983. Method for direct and indirect measurement of mycoplasma growth. V: *Methods in mycoplasmology*. 1st ed. Razin S., Tully J. G. (eds.). New York, Academic Press: 185–196
- Rojs O. Z., Slavec B., Markuš-Cizelj L., Čajavec S. 2007. Characterization of some vaccine viruses of commonly used poultry vaccines in Slovenia. V: *Proceedings of the 7th Symposium of Poultry Days 2007 with international participation*, Poreč, Croatia, 7.–10. maj 2007. Zagreb, Centar za peradarstvo: 76–83

- Römer-Oberdörfer A., Veits J., Werner O., Mettenleiter T. C. 2006. Enhancement of pathogenicity of Newcastle disease virus by alteration of specific amino acid residues in the surface glycoproteins F and HN. *Avian Diseases*, 50, 2: 259–263
- Rose M. E., Orlans E. 1981. Immunoglobulins in the egg, embryo and young chick. *Developmental and Comparative Immunology*, 5, 1: 15–20
- Rothwell L., Young J. R., Zoorob R., Whittaker C. A., Hesketh P., Archer A., Smith A. L., Kaiser P. 2004. Cloning and characterization of chicken IL-10 and its role in the immune response to *Eimeria maxima*. *Journal of Immunology*, 173, 4: 2675–2682
- Rott R., Klenk H. D. 1988. Molecular basis of infectivity and pathogenicity of Newcastle disease virus. V: Newcastle Disease. Alexander D. J. (ed.). Boston, Kluwer Academic Publishers: 98–112
- Rottem S. 2003. Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiological Reviews*, 83, 2: 417–432
- Rout S. N., Samal S. K. 2008. The large polymerase protein is associated with the virulence of Newcastle disease virus. *Journal of Virology*, 82, 16: 7828–7836
- Rue C. A., Susta L., Cornax I., Brown C. C., Kapczynski D. R., Suarez D. L., King D. J., Miller P. J., Afonso C. L. 2011. Virulent Newcastle disease virus elicits a strong innate immune response in chickens. *Journal of General Virology*, 92, 4: 931–939
- Ruepp A., Soppa J. 1996. Fermentative arginine degradation in *Halobacterium salinarium* (formerly *Halobacterium halobium*): genes, gene products, and transcripts of the *arcRACB* gene cluster. *Journal of Bacteriology*, 178, 16: 4942–4947
- Russell P., Alexander D. J. 1983. Antigenic variation of Newcastle disease virus strains detected by monoclonal antibodies. *Archives of Virology*, 75, 4: 243–253
- Russell P. H., Dwivedi P. N., Davison T. F. 1997. The effects of cyclosporin A and cyclophosphamide on the populations of B and T cells and virus in the Harderian gland of chickens vaccinated with the Hitchner B1 strain of Newcastle disease virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 60, 1–2: 171–185
- Russell P. H., Samson A. C. R., Alexander D. J. 1990. Newcastle disease virus variations. V: Applied Virology Research, vol. II. Kurstak E., Marusyk R. G., Murphy F. A., Regenmortel M. H. V. (eds.). New York, Plenum: 177–195
- Saif Y. M. 2008. Emerging diseases and diseases of complex and unknown etiology. Introduction. V: Diseases of poultry. 12th ed. Saif Y. M., Fadly A. M., Glisson J. R., McDougald L. R., Nolan L. K., Swayne D. E. (eds.). Oxford, Blackwell Publishing Ltd: 1261

- Salih O., Omar A. R., Ali A. M., Yusoff K. 2000. Nucleotide sequence analysis of the F protein gene of a Malaysian velogenic NDV strain AF2240. *Journal of Biochemistry, Molecular Biology & Biophysics*, 4: 51–57
- Samal S., Khattar S. K., Kumar S., Collins P. L., Samal S. K. 2012. Coordinate deletion of N-glycans from the heptad repeats of the fusion F protein of Newcastle disease virus yields a hyperfusogenic virus with increased replication, virulence, and immunogenicity. *Journal of Virology*, 86, 5: 2501–2511
- Samal S., Khattar S. K., Paldurai A., Palaniyandi S., Zhu X., Collins P. L., Samal S. K. 2013. Mutations in the cytoplasmic domain of the Newcastle disease virus fusion protein confer hyperfusogenic phenotypes modulating viral replication and pathogenicity. *Journal of Virology*, 87, 18: 10083–10093
- Samal S., Kumar S., Khattar S. K., Samal S. K. 2011. A single amino acid change, Q114R, in the cleavage-site sequence of Newcastle disease virus fusion protein attenuates viral replication and pathogenicity. *Journal of General Virology*, 92, 10: 2333–2338
- Schat K. A., Skinner M. A. 2008. Avian immunosuppressive diseases and immune evasion. V: *Avian immunology*. 1st ed. Davison F., Kaspers B., Schat K. A. (eds.). Oxford, Elsevier Ltd: 299–322
- Scheid A., Choppin P. W. 1974. The hemagglutinin and neuraminidase protein of a paramyxovirus: interaction with neuraminic acid in affinity chromatography. *Virology*, 62, 1: 125–133
- Schijns V. E. J. C., Sharma J., Tarpey I. 2008. Practical aspects of poultry vaccination. V: *Avian immunology*. 1st ed. Davison F., Kaspers B., Schat K. A. (eds.). Oxford, Elsevier Ltd: 373–393
- Schmidt J. A., Browning G. F., Markham P. F. 2007. *Mycoplasma hyopneumoniae* mhp379 is a Ca²⁺-dependent, sugar-nonspecific exonuclease exposed on the cell surface. *Journal of Bacteriology*, 189, 9: 3414–3424
- Schneider K., Klaas R., Kaspers B., Staeheli P. 2001. Chicken interleukin-6. cDNA structure and biological properties. *European Journal of Biochemistry*, 268, 15: 4200–4206
- Schuy W., Garten W., Linder D., Klenk H. D. 1984. The carboxyterminus of the hemagglutinin-neuraminidase of Newcastle disease virus is exposed at the surface of the viral envelope. *Virus Research*, 1, 5: 415–426
- Seal B. S., King D. J., Meinersmann R. J. 2000. Molecular evolution of the Newcastle disease virus matrix protein gene and phylogenetic relationships among the paramyxoviridae. *Virus Research*, 66, 1: 1–11

- Sekellick M. J., Ferrandino A. F., Hopkins D. A., Marcus P. I. 1994. Chicken interferon gene: cloning, expression, and analysis. *Journal of Interferon Research*, 14, 2: 71–79
- Senne D. A. 2006. Virus propagation in embryonating eggs. V: A laboratory manual for isolation and identification of avian pathogens. 4th ed. Swayne D. E., Glisson J. R., Jackwood M. W., Pearson J. E., Reed W. M. (eds.). Kennett Square, American Association of Avian Pathologists: 235–240
- Sergel T., Mcginnes L. W., Peeples M. E., Morrison T. G. 1993. The attachment function of the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein can be separated from fusion promotion by mutation. *Virology*, 193, 2: 717–726
- Shah-Majid M. 1996. Effect of mixed infection of *Mycoplasma gallinarum* and Newcastle disease virus (F strain) on the tracheal epithelium of village chickens. *Research in Veterinary Science*, 61, 2: 176–178
- Sharma J. M. 1985. Embryo vaccination with infectious bursal disease virus alone or in combination with Marek's disease vaccine. *Avian Diseases*, 29, 4: 1155–1169
- Sharma J. M. 1997. The structure and function of the avian immune system. *Acta Veterinaria Hungarica*, 45, 3: 229–238
- Sharma J. M. 1999. Introduction to poultry vaccines and immunity. *Advances in Veterinary Medicine*, 41: 481–494
- Sharma J. M., Burmester B. R. 1982. Resistance to Marek's disease at hatching in chickens vaccinated as embryos with the turkey herpesvirus. *Avian Diseases*, 26, 1: 134–139
- Sharma J. M., Lee L. F., Wakenell P. S. 1984. Comparative viral, immunologic, and pathologic responses of chickens inoculated with herpesvirus of turkeys as embryos or at hatch. *American Journal of Veterinary Research*, 45, 8: 1619–1623
- Sharma J. M., Witter R. L. 1983. Embryo vaccination against Marek's disease with serotypes 1, 2 and 3 vaccines administered singly or in combination. *Avian Diseases*, 27, 2: 453–463
- Sharma J. M., Zhang Y., Jensen D., Rautenschlein S., Yeh H. Y. 2002. Field trial in commercial broilers with a multivalent *in ovo* vaccine comprising a mixture of live viral vaccines against Marek's disease, infectious bursal disease, Newcastle disease, and fowl pox. *Avian Diseases*, 46, 3: 613–622
- Shaughnessy R. G., Meade K. G., McGivney B. A., Allan B., O'Farrelly C. 2011. Global gene expression analysis of chicken caecal response to *Campylobacter jejuni*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 142, 1–2: 64–71
- Shibata K. I., Sasaki T., Watanabe T. 1995. AIDS-associated mycoplasmas possess phospholipases C in the membrane. *Infection and Immunity*, 63, 10: 4174–4177

- Sick C., Schneider K., Staeheli P., Weining K. C. 2000. Novel chicken CXC and CC chemokines. *Cytokine*, 12, 3: 181–186
- Sick C., Schultz U., Munster U., Meier J., Kaspers B., Staeheli P. 1998. Promoter structures and differential responses to viral and nonviral inducers of chicken type 1 interferon genes. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 16: 9749–9754
- Sick C., Schultz U., Staeheli P. 1996. A family of genes coding for two serologically distinct chicken interferons. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 13: 7635–7639
- Silva R. C. F., Nascimento E. R., Pereira V. L. A., Barreto M. L., Nascimento M. G. F. 2008. *Mycoplasma synoviae* infection on Newcastle disease vaccination of chickens. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 2: 384–389
- Simecka J. W., Davis J. K., Davidson M. K., Ross S. E., Städlander C. T. K.-H., Cassell G. H. 1992. Mycoplasma diseases of animals. V: Mycoplasmas. Molecular biology and pathogenesis. Maniloff J., McElhaney R. N., Finch L. R., Baseman J. B. (eds.). Washington D. C., American Society for Microbiology: 391–415
- Slavec B., Berčič R. L., Cizelj I., Narat M., Zorman-Rojs O., Dovč P., Benčina D. 2011. Variation of *vlhA* gene in *Mycoplasma synoviae* clones isolated from chickens. *Avian Pathology*, 40, 5: 481–489
- Smith C. K., Kaiser P., Rothwell L., Humphrey T., Barrow P. A., Jones M. A. 2005. *Campylobacter jejuni*-induced cytokine responses in avian cells. *Infection and Immunity*, 73, 4: 2094–2100
- Sokolova I. A., Vaughan A. T. M., Khodarev N. N. 1998. Mycoplasma infection can sensitize host cells to apoptosis through contribution of apoptotic-like endonuclease(s). *Immunology and Cell Biology*, 76, 6: 526–534
- Somarajan S. R., Kannan T. R., Baseman J. B. 2010. *Mycoplasma pneumoniae* Mpn133 is a cytotoxic nuclease with a glutamic acid-, lysine- and serine-rich region essential for binding and internalization but not enzymatic activity. *Cellular Microbiology*, 12, 12: 1821–1831
- Soruri A., Grigat J., Forssmann U., Riggert J., Zwirner J. 2007. beta-Defensins chemoattract macrophages and mast cells but not lymphocytes and dendritic cells: CCR6 is not involved. *European Journal of Immunology*, 37, 9: 2474–2486
- Springer W. T., Luskus C., Pourciau S. S. 1974. Infectious bronchitis and mixed infections of *Mycoplasma synoviae* and *Escherichia coli* in gnotobiotic chickens. I. Synergistic role in the airsacculitis syndrome. *Infection and Immunity*, 10, 3: 578–589
- Srinivasappa G. B., Snyder D. B., Marquardt W. W., King D. J. 1986. Isolation of a monoclonal antibody with specificity for commonly employed vaccine strains of Newcastle disease virus. *Avian Diseases*, 30, 3: 562–567

- Staats C. C., Boldo J., Broetto L., Vainstein M., Schrank A. 2007. Comparative genome analysis of proteases, oligopeptide uptake and secretion systems in *Mycoplasma* spp. *Genetics and Molecular Biology*, 30, 1: 225–229
- Stadtlander C. T. K.-H., Watson H. L., Simecka J. W., Cassell G. H. 1993. Cytopathogenicity of *Mycoplasma fermentans* (including strain incognitus). *Clinical Infectious Diseases*, 17, Suppl 1: S289–S301
- Stakenborg T., Vicca J., Verhelst R., Butaye P., Maes D., Naessens A., Claeys G., De Gnack C., Haesebrouck F., Vaneechoutte M. 2005. Evaluation of tRNA gene PCR for identification of *Mollicutes*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 9: 4558–4566
- Steward M., Vipond I. B., Millar N. S., Emmerson P. T. 1993. RNA editing in Newcastle disease virus. *Journal of General Virology*, 74, 12: 2539–2547
- Stieneke-Gröber A., Vey M., Angliker H., Shaw E., Thomas G., Klenk H. D., Garten W. 1992. Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *The EMBO Journal*, 11, 7: 2407–2414
- Stone-Hulslander J., Morrison T. G. 1997. Detection of an interaction between the HN and F proteins in Newcastle disease virus-infected cells. *Journal of Virology*, 71, 9: 6287–6295
- Sundick R. S., Gill-Dixon C. 1997. A cloned chicken lymphokine homologous to both mammalian IL-2 and IL-15. *Journal of Immunology*, 159, 2: 720–725
- Talkington F. D., Kleven S. H. 1983. A classification of laboratory strains of avian *Mycoplasma* serotypes by direct immunofluorescence. *Avian Diseases*, 27, 2: 422–429
- Taylor P. R., Martinez-Pomares L., Stacey M., Lin H. H., Brown G. D., Gordon S. 2005. Macrophage receptors and immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 23: 901–944
- Taylor R. R., Varsani H., Miles R. J. 1994. Alternatives to arginine as energy sources for the non-fermentative *Mycoplasma gallinarum*. *FEMS Microbiology Letters*, 115, 2–3: 163–168
- Taylor-Robinson D., Davies H. A., Sarathchandra P., Furr P. M. 1991. Intracellular location of mycoplasmas in cultured cells demonstrated by immunocytochemistry and electron microscopy. *International Journal of Experimental Pathology*, 72, 6: 705–714
- Temperley N. D., Berlin S., Paton I. R., Griffin D. K., Burt D. W. 2008. Evolution of the chicken Toll-like receptor gene family: a story of gene gain and gene loss. *BMC Genomics*, 9: 62

- Thornton B. P., Větvicka V., Ross G. D. 1994. Natural antibody and complement-mediated antigen processing and presentation by B lymphocytes. *Journal of Immunology*, 152, 4: 1727–1737
- Toyoda T., Sakaguchi T., Hirota H., Gotoh B., Kuma K., Miyata T., Nagai Y. 1989. Newcastle disease virus evolution II. Lack of gene recombination in generating virulent and avirulent strains. *Virology*, 169, 2: 273–282
- Toyoda T., Sakaguchi T., Imai K., Inocencio N. M., Gotoh B., Hamaguchi M., Nagai Y. 1987. Structural comparison of the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein between virulent and avirulent strains of Newcastle disease virus. *Virology*, 158, 1: 242–247
- Travers A. F. 1996. Concomitant *Ornithobacterium rhinotracheale* and Newcastle disease infection in broilers in South Africa. *Avian Diseases*, 40, 2: 488–490
- Utterback W. W., Schwartz J. H. 1973. Epizootiology of velogenic viscerotropic Newcastle disease in southern California, 1971–1973. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 163, 9: 1080–1088
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3, 7: research0034.1–0034.11
- Vardaman T. H. 1976. The resistance and carrier status of meat-type hens exposed to *Mycoplasma synoviae*. *Poultry Science*, 55, 1: 268–273
- Vardaman T. H., Reece F. N., Deaton J. W. 1973. Effect of *Mycoplasma synoviae* on broiler performance. *Poultry Science*, 52, 5: 1909–1912
- Vasconcelos A. T. R., Ferreira H. B., Bizarro C. V., Bonatto S. L., Carvalho M. O., Pinto P. M., Almeida D. F., Almeida L. G. P., Almeida R., Alves-Filho L., Assuncao E. N., Azevedo V. A. C., Bogo M. R., Brígido M. M., Brocchi M., Burity H. A., Camargo A. A., Camargo S. S., Carepo M. S., Carraro D. M., Cascardo J. C. M., Castro L. A., Cavalcanti G., Chemale G., Collevatti R. G., Cunha C. W., Dallagiovanna B., Dambros B. P., Dellagostin O. A., Falcao C., Fantinatti-Garboggini F., Felipe M. S. S., Fiorentin L., Franco G. R., Freitas N. S. A., Frias D., Grangeiro T. B., Grisard E. C., Guimaraes C. T., Hungria M., Jardim S. N., Krieger M. A., Laurino J. P., Lima L. F. A., Lopes M. I., Loreto E. L. S., Madeira H. M. F., Manfio G. P., Maranhao A. Q., Martinkovics C. T., Medeiros S. R. B., Moreira M. A. M., Neiva M., Ramalho-Neto C. E., Nicolas M. F., Oliveira S. C., Paixao R. F. C., Pedrosa F. O., Pena S. D. J., Pereira M., Pereira-Ferrari L., Piffer I., Pinto L. S., Potrich D. P., Salim A. C. M., Santos F. R., Schmitt R., Schneider M. P. C., Schrank A., Schrank I. S., Schuck A. F., Seuanez H. N., Silva D. W., Silva R., Silva S. C., Soares C. M. A., Souza K. R. L., Souza R. C., Staats C. C., Steffens M. B. R., Teixeira S. M. R., Urményi T. P., Vainstein M. H., Zuccherato L. W., Simpson A. J. G., Zaha A. 2005. Swine and poultry pathogens: the complete genome

- sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. Journal of Bacteriology, 187, 16: 5568–5577
- Villegas P., Kleven S. H., Anderson D. P. 1976. Effect of route of Newcastle disease vaccination on the incidence of airsacculitis in chickens infected with *Mycoplasma synoviae*. Avian Diseases, 20, 2: 395–400
- Vleugels B., Ververken C., Goddeeris B. M. 2002. Stimulatory effect of CpG sequences on humoral response in chickens. Poultry Science, 81, 9: 1317–1321
- Wakamatsu N., King D. J., Seal B. S., Peeters B. P., Brown C. C. 2006a. The effect on pathogenesis of Newcastle disease virus LaSota strain from a mutation of the fusion cleavage site to a virulent sequence. Avian Diseases, 50, 4: 483–488
- Wakamatsu N., King D. J., Seal B. S., Samal S. K., Brown C. C. 2006b. The pathogenesis of Newcastle disease: a comparison of selected Newcastle disease virus wild-type strains and their infectious clones. Virology, 353, 2: 333–343
- Weining K. C., Sick C., Kaspers B., Staeheli P. 1998. A chicken homolog of mammalian interleukin-1 beta: cDNA cloning and purification of active recombinant protein. European Journal of Biochemistry, 258, 3: 994–1000
- West A. P., Herr A. B., Bjorkman P. J. 2004. The chicken yolk sac IgY receptor, a functional equivalent of the mammalian MHC-related Fc receptor, is a phospholipase A2 receptor homolog. Immunity, 20, 5: 601–610
- Westbury H. 2001. Newcastle disease virus: an evolving pathogen? Avian Pathology, 30, 1: 5–11
- Westbury H. A., Parsons G., Allan W. H. 1984. Comparison of the immunogenicity of Newcastle disease virus strains V4, Hitchner B1 and La Sota in chickens. 2. Tests in chickens with maternal antibody to the virus. Australian Veterinary Journal, 61, 1: 10–13
- Wigley P., Hulme S., Rothwell L., Bumstead N., Kaiser P., Barrow P. 2006. Macrophage isolated from chickens genetically resistant or susceptible to systemic salmonellosis show magnitudinal and temporal differential expression of cytokines and chemokines following *Salmonella enterica* challenge. Infection and Immunity, 74, 2: 1425–1430
- Wigley P., Kaiser P. 2003. Avian cytokines in health and disease. Brazilian Journal of Poultry Science, 5, 1: 1–14
- Winner F., Rosengarten R., Citti C., 2000. In vitro cell invasion of *Mycoplasma gallisepticum*. Infection and Immunity, 68, 7: 4238–4244
- Wise M. G., Suarez D. L., Seal B. S., Pedersen J. C., Senne D. A., King D. J., Kapczynski D. R., Spakman E. 2004. Development of a real-time reverse-transcription PCR for

- detection of Newcastle disease virus RNA in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 1: 329–338
- Worthington K. J., Sargent B. A., Davelaar F. G., Jones R. C. 2003. Immunity to avian pneumovirus infection in turkeys following *in ovo* vaccination with an attenuated vaccine. *Vaccine*, 21, 13–14: 1355–1362
- Wynn T. A., Chawla A., Pollard J. W. 2013. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, 496, 7446: 445–455
- Yamamoto H. 1975. Identification of immunoglobulins in chicken eggs and their antibody activity. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 23, 3: 117
- Yoder H. W., Drury L. N., Hopkins S. R. 1977. Influence of environment on airsacculitis: Effects of relative humidity and air temperature on broilers infected with *Mycoplasma synoviae* and infectious bronchitis. *Avian Diseases*, 21, 2: 195–208
- Yue H., Lei X., Yang F., Li M.-Y., Tang C. 2010. Reference gene selection for normalization of PCR analysis in chicken embryo fibroblast infected with H5N1 AIV. *Virologica Sinica*, 25, 6: 425–431
- Yusoff K., Millar N. S., Chambers P., Emmerson P. T. 1987. Nucleotide sequence analysis of the L gene of Newcastle disease virus: homologies with Sendai and vesicular stomatitis viruses. *Nucleic Acids Research*, 15, 10: 3961–3976
- Yusoff K., Tan W. S. 2001. Newcastle disease virus: macromolecules and opportunities. *Avian Pathology*, 30, 5: 439–455
- Yusoff K., Tey B. T., Tan W. S. 1997. Determination of the 3' terminal sequence of the HN genes of Newcastle disease virus isolates by direct nucleotide sequencing. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology & Biotechnology*, 5: 48–50
- Zhang M., Tracey K. J. 1998. Tumor necrosis factor. V: The cytokine handbook. 3rd ed. Thomson A. E. (ed.). San Diego, Academic Press: 517–547
- Zhang S. P., Lillehoj H. S., Ruff M. D. 1995. *In vivo* role of tumor necrosis-like factor in *Eimeria tenella* infection. *Avian Diseases*, 39, 4: 859–866
- Zhang Y., Sharma J. M. 2003. Immunological tolerance in chickens hatching from eggs injected with cell-associated herpesvirus of turkey (HVT). *Developmental and Comparative Immunology*, 27, 5: 431–438

ZAHVALA

Sreča ni v glavi in ne v daljavi,
ne pod palcem skrit zaklad.
Sreča je, ko se delo dobro opravi.
In ko imaš nekoga rad.

T. Pavček

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Mojci Narat za vodenje, pomoč in koristne nasvete pri raziskovalnem delu in izdelavi te doktorske disertacije.

Za pomoč in nasvete pri laboratorijskem delu, oblikovanju znanstvenih člankov in izdelavi doktorske disertacije se zahvaljujem znanstvenemu svetniku dr. Dušanu Benčini.

Prof. dr. Olgi Zorman Rojs se zahvaljujem za omogočeno izvedbo poskusov na kokošjih zarodkih, temeljiti pregled doktorske disertacije in pomoč ter nasvete pri pisaju.

Za hiter pregled doktorske disertacije, konstruktivno kritiko in koristne nasvete se zahvaljujem vsem trem članom komisije za oceno in zagovor.

Za pomoč pri laboratorijskem delu, praktične nasvete in veliko dobre volje, smeha ter pozitivnosti se zahvaljujem dr. Ivanki Cizelj.

Za pomoč in nasvete tekom mojega raziskovalnega dela se zahvaljujem tudi ostalim sodelavcem iz Katedre za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo; Oddelka za zootehniko in kolegom iz Inštituta za zdravstveno varstvo perutnine.

Posebna zahvala je namenjena moji družini in prijateljem. Hvala za podporo in veliko lepih trenutkov, ki smo jih doživelvi skupaj.

PRILOGE

Priloga A:

Lastnosti standardnih krivulj tarčnih in referenčnih genov, ki smo jih uporabili za relativno kvantifikacijo izražanja genov za citokine in kemokine v kokošjih zarodkih in celicah CEC-32 in HD11.

Gen	Naklon standardne krivulje	E ²	E [%] ³	(R ²) ⁴	(r) ⁵
TGF-β4	- 3.3263	2.00	100	0.9941	- 0.9970
LITAF	- 3.0969	2.10	110	0.9953	- 0.9977
iNOS	- 3.5988	1.90	90	0.9921	- 0.9960
IFN-α	- 3.9659	1.86	86	0.9941	- 0.9970
IFN-γ	- 3.5569	1.91	91	0.9791	- 0.9895
IL-1β	- 3.5837	1.90	90	0.9925	- 0.9963
IL-6	- 3.6178	1.89	89	0.9888	- 0.9944
IL-12 p40	- 3.1680	2.07	107	0.9816	- 0.9908
IL-18	- 3.0129	2.15	115	0.9956	- 0.9978
IL-2	- 3.4137	1.96	96	0.9988	- 0.9994
IL-21	- 3.7342	1.85	85	0.9817	- 0.9908
IL-8	- 3.5489	1.91	91	0.9961	- 0.9980
IL-16	- 3.4481	1.95	95	0.9974	- 0.9987
XCL1	- 3.3823	1.98	98	0.9983	- 0.9991
CXCL14	- 3.6005	1.90	90	0.9962	- 0.9981
MIP-1β (CCL4)	- 3.1803	2.06	106	0.9905	- 0.9952
GAPDH	- 3.5134	1.93	93	0.9978	- 0.9989
YWHAZ	- 3.4830	1.94	94	0.9957	- 0.9978
RPL4	- 3.2546	2.03	103	0.9950	- 0.9975
HPRT1	- 3.3906	1.97	97	0.9891	- 0.9945
Endogena referenca ¹	- 3.4395	1.95	95	0.9867	- 0.9933

¹ Endogeno referenco smo izračunali z geometrijskim povprečenjem vrednosti Cq referenčnih genov za GAPDH, YWHAZ, RPL4 in HPRT1 in jo uporabili za normalizacijo podatkov qRT-PCR.

² Učinkovitost pomnoževanja qRT-PCR.

³ Učinkovitost pomnoževanja qRT-PCR izražena v %.

⁴ Koeficient determinacije.

⁵ Pearson-ov koeficient korelcije. Negativna vrednost predstavlja usmerjenost standardne krivulje.

Priloga B:

Linearno dinamično območje, meja detekcije (LOD) in meja kvantifikacije (LOQ) pri analiziranih genih.

Gen	Linearno dinamično območje ¹	LOD ^{1, 2}	LOQ ^{1,3}
TGF- β 4	20–10000	20	20
LITAF	10–10000	10	10
iNOS	100–10000	10	100
IFN- α	200–10000	20	200
IFN- γ	200–10000	100	200
IL-1 β	100–10000	20	100
IL-6	100–10000	100	100
IL-12 p40	100–10000	100	100
IL-18	20–10000	10	20
IL-2	20–10000	10	20
IL-21	500–10000	500	500
IL-8	20–10000	10	20
IL-16	10–10000	10	10
XCL1	20–10000	10	20
CXCL14	100–10000	10	100
MIP-1 β (CCL4)	10–5000	10	10
GAPDH	100–10000	10	100
YWHAZ	100–10000	10	100
RPL4	10–5000	10	10
HPRT1	10–1000	10	10
Endogena referenca	10–10000	10	10

¹ Vrednosti predstavljajo relativno število kopij cDNA. 10000 relativnih kopij je ustrezalo 10 ng neredčenega referenčnega vzorca cDNA v reakcijski mešanici qRT-PCR.

² Meja detekcije.

³ Meja kvantifikacije.

Priloga C:

Poravnavo nukleotidnih zaporedij nukleaz MS53_0110 pri sevih bakterije *M. synoviae* WVU 1853, ULB 9122, ULB 02/T6 in 53.

WVU 1853	ATGAAAAAGAAAATTTTGAAAAAGTTAATTTATCTATTAGTAATTTATTTGTAACA	60
ULB 9122	ATGAAAAAGAAAATTTTGAAAAAGTTAATTTATCTATTAGTAGTTATTTGTAACA	60
ULB 02T6	ATGAAAAAGAAAATTTTGAAAAAGTTAATTTATCTATTAGTAGTTATTTGTAACA	60
53	ATGAAAAAGAAAATTTTGAAAAAGTTAATTTGTCTATTAGTAGTTATTTGTAACA	60
	*****	*****
WVU 1853	GCTACTGTTGTAACCTCATGTTCATGGCTTAGTCAGAAAAAGACGAAAACAAAAC	120
ULB 9122	GCTACTGTTGTAACCTCATGTTCATGGCTTAGTCAGAAAAAGACGAAAACAAAAC	120
ULB 02T6	GCTACTGTTGTAACCTCATGTTCATGGCTTAGTCAGAAAAAGACGAAAACAAAAC	120
53	GCTACTGTTGTAACCTCATGTTCATGGCTTAGTCAGAAAAAGACGAAAACAAAAC	120
	*****	*****
WVU 1853	GAACAAAGCTCGCTAGGAACACTCAGCGGACAAACTCAAATCAAGATCAAAAGTTGCC	180
ULB 9122	GAACAAAGCTCGCTAGGAACACTCAGCGGACAAACTCAAATCAAGATCAAAAGTTGCC	180
ULB 02T6	GAACAAAGCTCGCTAGGAACACTCAGCGGACAAACTCAAATCAAGATCAAAAGTTGCC	180
53	GAACAAAGCTCGCCAAGAACACTCAGCGGACAAACTCAAATCAAGATCAAAAGTTGCC	180
	*****	*****
WVU 1853	GCTAGCAATCTCCAAAAGCTAAAGTAGCAAGATATAACCGATGGAGATACAGTTGACATC	240
ULB 9122	GCTAGCAATCTCCAAAAGCTAAAGTAGCAAGATATAACCGATGGAGATACAGTTGACATC	240
ULB 02T6	GCTAGCAATCTCCAAAAGCTAAAGTAGCAAGATATAACCGATGGAGATACAGTTGACATC	240
53	GCTAGCAATCTCCAAAAGCTAAAGTAACAAAATATAACCGATGGAGATACAGTTAACATC	240
	*****	*****
WVU 1853	ATCTACGATACTATCGAAGTACAGCTAAAATTAGATTCTATGGAATTGACACTCCTGAA	300
ULB 9122	ATCTACGATACTATCGAAGTACAGCTAAAATTAGATTCTATGGAATTGACACTCCTGAA	300
ULB 02T6	ATCTACGATACTATCGAAGTACAGCTAAAATTAGATTATGGAATTGACACTCCTGAA	300
53	GTCTACGATACTATCGGAGTTACAGCTAAAATTAGATTCTATGGAATTGACACTCCTGAA	300
	*****	*****
WVU 1853	ACTTTAAAAGGATCAAATAGAAATCTAATAGCTAAATATGAAAACGTTATGCTCAAAAA	360
ULB 9122	ACTTTAAAAGGATCAAATAGAAATCTAATAGCTAAATATGAAAACGTTATGCTCAAAAA	360
ULB 02T6	ACTTTAAAAGGATCAAATAGAAATCTAATAGCTAAATATGAAAACGTTATGCTCAAAAA	360
53	ACTTTAAAAGGATCAAATAGAAATCTAATAGCTAAATATGAAAACGTTATGCTCAAAAA	360
	*****	*****
WVU 1853	GCAAAAGACTATGTTAATCACTAAAACAATCACGTAGTTACGTTAAAAAA	420
ULB 9122	GCAAAAGACTATGTTAATCACTAAAACAATCACGTAGTTACGTTAAAAAA	420
ULB 02T6	GCAAAAGACTATGTTAATCACTAAAACAATCACGTAGTTACGTTAAAAAA	420
53	GCAAAAGACTATGTTAATCACTAAAACAATCACGTAGTTACGTTAAAAAA	420
	*****	*****
WVU 1853	ATAACACCAGATAAAATATAATCGTACCGTTGCAATTATTTAACCAGATGACCAAAC	480
ULB 9122	ATAACAACTGATAAAATATAATCGTACTATTGCAATTATTTAACCAGATGACCAAAC	480
ULB 02T6	ATAACAACTGATAAAATATAATCGTACTATTGCAATTATTTAATCGATGACCAAAC	480
53	ATAACACCAGATAAAATATAATCGTACTATTGCAATTATTTAACCAGATGACGAAAC	480
	*****	*****
WVU 1853	TCAAAAGCGTTAACGAATTATTGAAAAACGGTTACGGTGCCTAGATATATTCA	540
ULB 9122	TCAAAAGCGTTAACGAATTATTGAGAAAACGGTTACGGTGCCTAGATATATTCA	540
ULB 02T6	TCAAAAGCGTTAACGAATTATTGAGAAAACGGTTACGGTGCCTAGATATATTCA	540
53	TCAAAAGCGTTAACGAATTATTGAGAAAACGGTTACGGTGCCTAGATATATTCA	540
	*****	*****

se nadaljuje

nadaljevanje priloge C.

WVU 1853	CTAACTAATAAAACCTATAAAGTAAAAGATGATTTCAAAGAGACTTTACTTAGACTA	600
ULB 9122	CTAACTAATAAAACCTATAAAGTAAAAGATGATTTCAAAGAGACTTTACTTAGACTA	600
ULB 02T6	CTAACTAATAAAACCTATAAAGTAAAAGATGATTTCAAAGAGACTTTACTTAGACTA	600
53	CTAACTAATAAAACCTATAAAGTAAAAGATGATTTCAAAGAGACTTTACTTAGACTA	600

WVU 1853	CTTAATTCCAAGAAGAACAAATCTAAATCATTAAATATTGAGAACATGATTAAAA	660
ULB 9122	CTTAATTACAAGAAGAACAAATCTAAATCATTAAATATCTGAGAACATGATTAAAA	660
ULB 02T6	CTTAATTACAAGAAGAACAAATCTAAATCATTAAATATCTGAGAACATGATTAAAA	660
53	CTTAATTACAAGAAGAACAAATCTAAATCATTAAATATCTGAGAACATGATTAAAA	660

WVU 1853	GATGTTACTATAAATACCCTTTAATAATGATTAAG	697
ULB 9122	GATGTTACTATAAATACCCTTTAATAATGATTAG-	696
ULB 02T6	GATGTTACTATAAATACCCTTTAATAATGATTAG-	696
53	GATGTTACTATAAATACCCTTTAATAATGATTAG-	696

Priloga D:

Poravnavo nukleotidnih zaporedij nukleaz MS53_0284 pri sevih bakterije *M. synoviae* WVU 1853, ULB 9122, ULB 02/T6 in 53.

WVU 1853	ATGAAAAAAAATAAAAGCATTAGTTAGCCCAATTTCATTCTAACTTCTATTAGC	60
ULB 9122	ATGAAAAAAAATAAAAGCATTAGTTAGCCCAATTTCATTCTAACTTCTATTAGC	60
ULB 02T6	ATGAAAAAAAATAAAAGCATTAGTTAGCCCAATTTCATTCTAACTTCTATTAGC	60
53	ATGAAAAAAAATAAAAGCATTAGTTAGCCCAATTTCATTCTAACTTCTATTAGC	60

WVU 1853	GCTATAAGTTGTGGCAATGCAAATACAGAAAATAATGGTCAAACACTACAGCTAGCTTCAAA	120
ULB 9122	GCTATAAGTTGTGGCAATGCAAATACAGAAAATAATGGTCAAACACTACAGCTAGCTTCAAA	120
ULB 02T6	GCTATAAGTTGTGGCAATGCAAATACAGAAAATAATGGTCAAACACTACAGCTAGCTTCAAA	120
53	GCTATAAGTTGTGGCAATGCAAATACAGAAAATAATGGCCTAAACTACAGCTAGCTTCAAA	120

WVU 1853	ACTGGAAGTAATAGCGATATTAATTAAACAACCTTCTTATAATTCAACTAGTTTACCT	180
ULB 9122	ACTGGAAGTAATAGCGATATTAATTAAACAACCTTCTTATAATTCAACTAGTTTACCT	180
ULB 02T6	ACTGGAAGTAATAGCGATATTAATTAAACAACCTTCTTATAATTCAACTAATTTCACCT	180
53	ACTGGAAGTAATAGCGATATTAATTAAACAACCTTCTTATAATTCAACTAGTTTACCT	180

WVU 1853	AAAAGTTTCAACACAATATTATTGAGATTAATGAAAATTATTATAAAAATAATATT	240
ULB 9122	AAAAGTTTCAACACAATATTATTGAGATTAATGAAAATTATTATAAAAATAATATT	240
ULB 02T6	AAAAGTTTCAACACAATATTATTGAGATTAATGAAAATTATTATAAAAATAATATT	240
53	AAAAGTTTCAACACAATATTATTGAGATTAATGAAAATTATTATAAAAATAATATT	240

WVU 1853	AATAAATTAACTCAAGACAGTATTGATTTAATTCTAACAGTAAATCAGCATTAGAATCT	300
ULB 9122	AATAAATTAACTCAAGACAGTATTGATTTAATTCTAACAGTAAATCAGCATTAGAATCT	300
ULB 02T6	AATAAATTAACTCAAGACAGTATTGATTTAATTCTAACAGTAAATCAGCATTAGAATCT	300
53	AATAAATTAACTCAAGACAGTATTGATTTAATTCTAACAGTAAATCAGCATTAGAATCT	300

WVU 1853	GCCTTGGATCAAAATTCCAATCAAATAATACAAGTTCACAGGAAATATAACAGTA	360
ULB 9122	GCCTTGGATCAAAATTCCAATCAAATAATACAAGTTCACAGGAAATATAACAGTA	360
ULB 02T6	GCCTTGGATCAAAATTCCAATCAAATAATACAAGTTCACAGGAAATATAACAGTA	360
53	GCCTTGGATCAAAATTCCAATCAAATAACAGTTCACAGGAAATATAACAGTA	360

WVU 1853	GAACCAACTGATTATTTAACCTAAAGAAAACATCAAAATTACCTCAGGTTTT	420
ULB 9122	GAACCAACTGATTATTTAACCTAAAGAAAACATCAAAATTACCTCAGGTTTT	420
ULB 02T6	GAACCAACTGATTATTTAACCTAAAGAAAACATCAAAATTACCTCAGGTTTT	420
53	GAACCAACTGATTATTTAACCTAAAGAAAACATCAAAATTACCTCAGGTTTT	420

WVU 1853	AATTAAAATTAAACGATAATTCCAATTAAATATTGAAACTAATAGTAGTTA	480
ULB 9122	AATTAAAATTAAACGATAATTCCAATTAAATATTGAAACTAATAGTAGTTA	480
ULB 02T6	AATTAAAATTAAACGATAATTCCAATTAAATATTGAAACTAATAGTAGTTA	480
53	AATTAAAATTAAACGATAATTCCAATTAAATATTGAAACTAATAGTAGTTA	480

WVU 1853	GAACCTGGTAATTAGGTGAAAAAGAAGTGATGGCGAAACTGTTCCATAAATTCA	540
ULB 9122	GAACCTGGTAATTAGGTGAAAAAGAAGTGATGGCGAAACTGTTCCATAAATTCA	540
ULB 02T6	GAACCTGGTAATTAGGTGAAAAAGAAGTGATGGCGAAACTGTTCCATAAATTCA	540
53	GAACCTGGTAATTAGGTGAAAAAGAAGTGATGGCGAAACTGTTCCATAAATTCA	540

se nadaljuje

nadaljevanje priloge D.

WVU 1853	AGCAATAAATTGTCAATAATTTATGGACTTTTACAACAACTTACCACTGTTAATGGTTTT	600
ULB 9122	AGCAATAAATTGTCAATAATTTATGGACTTTTACAACAACTTACCACTGTTAATAGTTTT	600
ULB 02T6	AGCAATAAATTGTCAATAATTTATGGACTTTTACAACAACTTACCACTGTTAATGGTTTT	600
53	AGCAATAAATTGTCAATAATTTATGGACTTTTACAACAACTTACCACTGTTAATGGTTTT	600

WVU 1853	CAAAATATTTTATCAATAAACAAAATGTTGTAATCCAGATTAAAAACAAAA	660
ULB 9122	CAAAATATTTTATCAATAAACAAAATGTTGTAATCCAGATTAAAAACAAAA	660
ULB 02T6	CAAAATATTTTATCAATAAACAAAATGTTGTAATCCAGATTAAAAACAAAA	660
53	CAAAATATTTTATCAATAAACAAAATGTTGTAATCCAGATTAAAAACAAAA	660

WVU 1853	CTAGAAAGCATCACTCAGTTGATACATCAAATTTCAAAAAGTAATATTGATTGAGTC	720
ULB 9122	CTAGAAAGCATCACTCAGTTGATACATCAAATTTCAAAAAGTAATATTGATTGAGTC	720
ULB 02T6	CTAGAAAGCATCACTCAGTTGATACATCAAATTTCAAAAAGTAATATTGATTGAGTC	720
53	CTAGAAAGCATCACTCAGTTGATACATCAAATTTCAAAAAGTAATATTGATTGAGTC	720

WVU 1853	AAACAAGAAGGAAATTATTTGATGCAAAATAGTTCACAAACAAAGATGGCGATACTTT	780
ULB 9122	AAACAAGAAGGAAATTATTTGATGCAAAATAGTTCACAAACAAAGATGGCGATACTTT	780
ULB 02T6	AAACAAGAAGGAAATTATTTGATGCAAGAATAGTTCACAAACAAAGATGGCGATACTTT	780
53	AAACAGGAAGGAAATTATTTGATGCAAAATAGTTCACAAACAAAGATGGCGATACTTT	780

WVU 1853	ACAGTACAACCAGTAAAGCAACAAACAGCATCAAGTATTCCACTTACTACTGATCAAAAA	840
ULB 9122	ACAGTACAACCAGTAAAGCAACAAACAGCATCAAGTATTCCACTTACTACTGATCAAAAA	840
ULB 02T6	ACAGTACAACCAGTAAAGCAACAAACAGCATCAAGTATTCCACTTACTACTGATCAAAAA	840
53	ACAGTACAACCAGTAAAGCAACAAACAGCATCAAGTATTCCACTTACTACTGATCAAAAA	840

WVU 1853	ATTAGAATTAGACTTAAAGGAATAGATACTCCTGAAAAGCTGTTGGTAAAAAAAGCGAT	900
ULB 9122	ATTACAATTAGACTTAAAGGAATAGATACTCCTGAAAAGCTGTTGGTAAAAAAAGCGAT	900
ULB 02T6	ATTACAATTAGACTTAAAGGAATAGATACTCCTGAAAAGCTGTTGGCAAAAAAAAGCGAT	900
53	ATTAGAATTAGACTTAAAGGAATAGATACTCCTGAAAAGCTGTTGGCAAAAAAAAGCGAT	900

WVU 1853	TCAATAGTGGCTTCACCATTGAAATATGACTTCGTTATATGTCAACTAATTGGGAA	960
ULB 9122	TCAATAGTGGCTTCACCATTGAAATATGACTTCGTTATATGTCAACTAATTGGGAA	960
ULB 02T6	TCAATAGTGGCTTCACCATTGAAATATGACTTCGTTATATGTCAACTAATTGGGAA	960
53	TCAATAGTGGCTTCACCATTGAAATATGACTTCGTTATATGTCAACTAATTGGGAA	960

WVU 1853	GCTGCTTAGTTGATCCAAACAAAACAGTAAGAGTTGCTTTACCGAAGGTTAGACGCT	1020
ULB 9122	ACTGCTTAGTTGATCCAAACAAAACAATAAGAGTTGCTTTACTGAAGGTTAGACGCT	1020
ULB 02T6	GCTGCTTAGTTGATCCAAACAAAACAATAAGAGTTGCTTTACCGAAGGTTAGACGCT	1020
53	GCTGCTTAGTTGATCCAAACAAAACAGTAAGAATTGCTTTACTGAAGGTTAGACGCT	1020

WVU 1853	TTTGGAAAGAATGGTGGAGATATTTTGAGATGATTCCAATATTCAATTTCAGTT	1080
ULB 9122	TTTGGAAAGAATGGTGGAGATATTTTGAGATGATTCCAATATTCAATTTCAGTT	1080
ULB 02T6	TTTGGAAAGAATGGTGGAGATATTTTGAGATGATTCCAATATTCAATTTCAGTT	1080
53	TTTGGAAAGAATGGTGGAGATATTTTGAGATGATTCCAATATTCAATTTCAGTT	1080

WVU 1853	GAAATCACAGAGCTGGTTATACTCTTCCATATGGAGATGATGGCTGAAAAGCGCAATTA	1140
ULB 9122	GAAATCACAGAGCTGGTTATACTCTTCCATATGGAGATGATGGCTGAAAAGCGCAATTA	1140
ULB 02T6	GAAATCACAGAGCTGGTTATACTCTTCCATATGGAGATGATGGCTGAAAAGCGCAATTA	1140
53	GAAATCACAGAGCTGGTTATACTCTTCCATATGGAGATGATGGCTGAAAAGCGCAATTA	1140

se nadaljuje

nadaljevanje priloge D.

WVU 1853	AACAATCCTAATTCAATTCTAGTTGGTATATCAAAAATATCAGATGCCATGTCAA	1200
ULB 9122	AACAATCCTAATTCAATTCTAGTTGGTATATCAAAAATATCAGATGCCATGTCAA	1200
ULB 02T6	AACAATCCTAATTCAATTCTAGTTGGTATATCAAAAATATCAGATGCCATGTCAA	1200
53	AACAATCCTAATTCAATTCTAGTTGGTATATCAAAAATATCAGATGCCATGTCAA	1200

WVU 1853	GCACAAAGTAAAAAGTTGGATATTATCATTATTTAAAAATTTCGAAGATATAACAAATT	1260
ULB 9122	GCACAAAGTAAAAAGTTGGATATTATCATTATTTAAAAATTTCGAAGATATAACAAATT	1260
ULB 02T6	GCACAAAGTAAAAAGTTGGATATTATCATTATTTAAAAATTTCGAAGATATAACAAATT	1260
53	GCACAAATGAAAAAGTTGGATATTATCATTATTTAAAAATTTCGAAGATATAACAAATT	1260

WVU 1853	AATATATATAGATTAAGAGAACTCAAAATGAATTATTTCACTGATGAAATGTTAAGG	1320
ULB 9122	AATATATATAGATTAAGAGAACTCAAAATGAATTATTTCACTGATGAAATGTTGAGG	1320
ULB 02T6	AATATATATAGATTAAGAGAACTCAAAATGAATTATTTCACTGATGAAATGTTAAGG	1320
53	AATATATATAGATTAAGAGAACTCAAAATGAATTATTTCACTGATGAAATGTTAAGG	1320
	*****	***
WVU 1853	GGAAATAAAAAA-TAAAACATAAAACTATTAATAA	1355
ULB 9122	GGAAATAAAAAAATAAAACATGAAACTATTAATAA	1356
ULB 02T6	GGAAATAAAAAAATAAAACATGAAACTATTAATAA	1356
53	GGAAATAAAAAAATAAAACATGAAACTATTAATAA	1356
