

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Mateja CIRINGER

**UGOTAVLJANJE KONCENTRACIJE IN VELIKOSTI VIRUSNIH DELCEV Z  
METODO SLEDENJA NANODELCEM (NTA)**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**DETERMINATION OF VIRUS PARTICLE SIZE DISTRIBUTION AND  
CONCENTRATION WITH NANOPARTICLE TRACKING ANALYSIS (NTA)  
METHOD**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Raziskovalno delo je bilo v celoti izvedeno v laboratorijih podjetja Bia Separations, d. o. o., Mirce 21, 5270 Ajdovščina.

Za mentorja diplomskega dela je imenovan prof. dr. Peter Raspot, za somentorja dr. Matjaž Peterka in za recenzentko prof. dr. Sonja Smole Možina.

Mentor: prof. dr. Peter Raspot

Somentor: dr. Matjaž Peterka

Recenzentka: prof. dr. Sonja Smole Možina

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem besedilu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Mateja Ciringer

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK UDK 578.083.2 : 602.44 : 620.3(043) = 163.6  
KG virusi/adenovirusi/virus influence/bakteriofagi/nanodelci /detekcija  
virusov/EPD/metoda plakov/hemaglutinacija/NTA/Brownovo gibanje/koncentracija  
virusov/velikost virusov/zaključni bioprocеси  
AV CIRINGER, Mateja  
SA RASPOR, Peter (mentor)/PETERKA, Matjaž (somentor)/SMOLE MOŽINA, Sonja  
(recenzentka)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo  
LI 2012  
IN UGOTAVLJANJE KONCENTRACIJE IN VELIKOSTI VIRUSNIH DELCEV Z  
METODO SLEDENJA NANODELCEM (NTA)  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP X, 52 str., 11 pregl., 9 sl., 1 pril., 112 vir.  
IJ Sl  
JI sl/en  
AL Virusi so mikroskopsko majhni infektivni delci velikosti od 20 do 300 nm. Uporabljamo jih kot vektorje pri genski terapiji, pripravi cepiv ali kot alternativo antibiotikom. Kontrola bioloških procesov skoraj vedno vključuje biološke tehnike, ki imajo večjo variabilnost kot fizikalno-kemijske spremenljivke, so delovno intenzivne in lahko trajajo več dni. V diplomskem delu smo z metodo sledenja nanodelcem (NTA) sledili velikosti in koncentraciji virusnih delcev. V procesu optimizacije metode smo najprej uporabljali referenčne lateksne delce, ki so bili veliki 120 nm. Njihova koncentracija je znašala  $1,05 \times 10^{12}$  delcev/ml. Zastavili smo si tri kriterije, ki smo jih upoštevali pri določanju velikosti ter končne koncentracije virusnih delcev. Prvi kriterij je bil, da je število delcev v prvem okvirju v razponu med 20 in 60. Drugi je bil več kot 200 zaključenih poti delcev in tretji, interval sprejemljivih rezultatov je bil med 0,8 in 1,2. Na podlagi rezultatov smo pokazali, da je metoda NTA primerna za sledenje adenovirusov, virusov influence in bakteriofagov. Metoda NTA ni primerna za detekcijo virusov v pitni vodi, če je koncentracija virusnih delcev manjša od  $3,8 \times 10^8$  delcev/ml.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 578.083.2 : 602.44 : 620.3(043) = 163.6  
CX viruses/adenoviruses/influenza virus/bacteriophages/ nanoparticles/virus detection/EPD assay/plaque assay/hemagglutination/NTA/Brownian motion/virus concentration/virus size distribution/downstream processes  
AU CIRINGER, Mateja  
AA RASPOR, Peter (supervisor)/PETERKA, Matjaž (co-advisor)/ SMOLE MOŽINA, Sonja (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology  
PY 2012  
TI DETERMINATION OF VIRUS PARTICLE SIZE DISTRIBUTION AND CONCENTRATION WITH NANOPARTICLE TRACKING ANALYSIS (NTA) METHOD  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO X, 52 p., 11 tab., 9 fig., 1 ann., 112 ref.  
LA Sl  
AL sl/en  
AB Viruses are microscopic infectious agents with diameter ranging from 20 to 300 nm. They are currently used as vectors in gene therapy for transferring genetic material, in the preparation of vaccines and also as an alternative antimicrobials. Biologically controlled products always involve biological techniques that are more variable than physico-chemical techniques. They are also time consuming and labour intensive. Therefore, in our diploma thesis the nanoparticle tracking analysis method was used to monitor size and concentration of different viral particles. For the method optimization reference latex particles of 120 nm and concentration of  $1,05 \times 10^{12}$  particles/ml were employed. For the calculation of the final concentration and size of the virus particles three criteria were considered. First criteria was the number of particles in the first frame, which should be between 20 – 60, second criteria was more than 200 completed paths per particle and third criteria was that all the compared results must be distributed between 0,8 and 1,2. We found NTA method to be suitable for tracking adenoviruses, influenza viruses and bacteriophages, however, not useful for tracking viruses in bottled water due to method's concentration limit of detection,  $3,8 \times 10^8$  virus particles/ml.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>II</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>III</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>IX</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>X</b>
<b>1      UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1    NAMEN RAZISKAVE .....	1
1.2    DELOVNE HIPOTEZE .....	1
<b>2      PREGLED OBJAV .....</b>	<b>2</b>
2.1    VIRUSI .....	2
2.2    UPORABA VIRUSNIH DELCEV .....	2
2.2.1    Cepiva .....	2
2.2.2    Genska terapija .....	2
2.2.3    Protimikrobnna sredstva .....	3
2.2.4    Fagni prikaz .....	3
2.3    PRIPRAVLJALNI PROCESI PROIZVODNJE VIRUSNIH DELCEV .....	3
2.4    ZAKLJUČNI PROCESI PROIZVODNJE VIRUSNIH DELCEV .....	4
2.4.1    Obarjanje s polietilenglikolom (PEG) .....	4
2.4.2    Ultracentrifugacija .....	4
2.4.3    Kromatografske metode čiščenja virusnih delcev .....	4
2.4.4    Ultrafiltracija .....	5
2.5    METODE ZA DETEKCIJO VIRUSNIH DELCEV V PROCESNI KONTROLI PRIPRAVLJALNIH IN ZAKLJUČNIH BIOPROCESOV .....	5
2.5.1    Metode za detekcijo števila infektivnih virusnih delcev .....	6
2.5.1.1    Metoda plakov .....	6
2.5.1.2    Test končne razredčitve (EPD test) .....	6
2.5.1.3    Metoda 50-odstotni infektivni odmerek na tkivni kulturi (TCID <sub>50</sub> ) .....	7
2.5.2    Metode in tehnike za detekcijo celokupnega števila virusnih delcev .....	8
2.5.2.1    Detekcija virusnih delcev z metodo dinamičnega razprševanja svetlobe (DLS) .....	8
2.5.2.2    Test hemaglutinacije .....	8
2.5.2.3    Detekcija virusnih delcev z opazovanjem na transmisiskem elektronskem mikroskopu (TEM) .....	8
2.5.2.4    Encimskoimunski test (ELISA) .....	9
2.5.2.5    Detekcija virusnih delcev s frakcioniranjem v tokovnem polju (FFF) .....	10
2.5.2.6    Ugotavljanje celokupnega števila virusnih delcev s kromatografskimi tehnikami in spektrofotometrično detekcijo .....	10
2.5.2.7    Ugotavljanje celokupnega števila virusnih delcev s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo (qPCR) .....	11
2.5.2.8    Detekcija virusnih delcev z metodo sledenja nanodelcem (NTA) .....	11
2.6    VIRUSI V PITNI VODI .....	13

<b>2.6.1</b>	<b>Metode za ugotavljanje virusov v pitnih vodah .....</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>15</b>
3.1	MATERIALI .....	15
<b>3.1.1</b>	<b>Materiali za namnoževanje adenovirusov s transfekcijo celične linije HEK 293 .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Materiali za čiščenje virusnega materiala na CIM® monolitnih kolonah.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Materiali za ugotavljanje števila infektivnih virusnih delcev .....</b>	<b>15</b>
3.1.3.1	Metoda plakov.....	15
3.1.3.2	Test končne razredčitve (EPD) .....	16
<b>3.1.4</b>	<b>Materiali za ugotavljanje celokupnega števila virusnih delcev.....</b>	<b>16</b>
3.1.4.1	Test hemaglutinacije .....	16
3.1.4.2	Metoda NTA .....	16
<b>3.1.5</b>	<b>Materiali, uporabljeni pri tangencialni pretočni filtraciji.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1.6</b>	<b>Materiali, uporabljeni pri transmisijski elektronski mikroskopiji .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1.7</b>	<b>Aparature.....</b>	<b>16</b>
3.1.7.1	Aparature za namnoževanje adenovirusa s transfekcijo celic HEK 293.....	16
3.1.7.2	Aparature za sistem HPLC.....	17
3.1.7.3	Aparature za izvedbo metode NTA.....	17
<b>3.1.8</b>	<b>Kemikalije .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1.9</b>	<b>Lateksni delci .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1.10</b>	<b>Ustekleničena pitna voda .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1.11</b>	<b>Virusni delci .....</b>	<b>17</b>
3.2	METODE .....	18
<b>3.2.1</b>	<b>Metode za predpripravo virusnega materiala .....</b>	<b>18</b>
3.2.1.1	Namnoževanje adenovirusov s transfekcijo celične linije HEK 293 .....	18
3.2.1.2	Čiščenje adenovirusov na CIM® QA monolitni koloni .....	18
3.2.1.3	Namnoževanje virusov influence .....	19
3.2.1.4	Čiščenje virusov influence na CIM® SO <sub>3</sub> monolitni koloni .....	19
3.2.1.5	Namnoževanje bakteriofagov .....	19
3.2.1.6	Koncentriranje bakteriofagov s tangencialno pretočno filtracijo (TFF) .....	19
<b>3.2.2</b>	<b>Metode za ugotavljanje celokupnega števila virusnih delcev .....</b>	<b>19</b>
3.2.2.1	Test hemaglutinacije .....	19
3.2.2.2	Metoda sledenja nanodelcem (NTA) .....	20
<b>3.2.3</b>	<b>Elektronska mikroskopija .....</b>	<b>21</b>
3.2.3.1	Priprava mrežice za presevni elektronski mikroskop .....	21
<b>3.2.4</b>	<b>Metode za ugotavljanje števila infektivnih virusnih delcev .....</b>	<b>21</b>
3.2.4.1	Test končne razredčitve (EPD) .....	21
3.2.4.2	Metoda plakov .....	21
<b>4</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>22</b>
4.1	OPTIMIZACIJA NASTAVITEV INSTRUMENTA NTA Z UGOTAVLJANJEM VELIKOSTI IN KONCENTRACIJE LATEKSNIH DELCEV .....	22
<b>4.1.1</b>	<b>Optimizacija nastavitev kamere .....</b>	<b>22</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Ugotavljanje koncentracije in velikosti lateksnih delcev .....</b>	<b>22</b>
4.2	UGOTAVLJANJE VELIKOSTI IN KONCENTRACIJE ADENOVIRUSOV .....	25
<b>4.2.1</b>	<b>Ugotavljanje velikosti in koncentracije celokupnih in infektivnih virusnih delcev .....</b>	<b>25</b>

<b>4.2.2</b>	<b>Ugotavljanje koncentracije virusnih delcev v žetvi z dodajanjem standardnega dodatka.....</b>	<b>26</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Ugotavljanje koncentracije in velikosti adenovirusov med kromatografskim čiščenjem .....</b>	<b>27</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Vpliv odtajanja in zamrzovanja na velikost in koncentracijo adenovirusov .....</b>	<b>28</b>
<b>4.3</b>	<b>UGOTAVLJANJE VELIKOSTI IN KONCENTRACIJE VIRUSOV INFLUENCE</b>	<b>28</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Ugotavljanje koncentracije in velikosti virusov influence med kromatografskim čiščenjem.....</b>	<b>29</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Vpliv odtajanja in zamrzovanja na velikost in koncentracijo virusov influence</b>	<b>30</b>
4.3.2.1	Vpliv uporabe ultrazvočne kopeli in vibracijskega mešala na koncentracijo in velikost virusov influence .....	31
<b>4.4</b>	<b>UGOTAVLJANJE VELIKOSTI IN KONCENTRACIJE BAKTERIOFAGOV .....</b>	<b>32</b>
<b>4.5</b>	<b>UGOTAVLJANJE VELIKOSTI IN KONCENTRACIJE VIRUSNIH DELCEV V USTEKLENIČENI VODI.....</b>	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI .....</b>	<b>36</b>
5.1	RAZPRAVA .....	36
<b>5.1.1</b>	<b>Optimizacija metode NTA z uporabo lateksnih delcev .....</b>	<b>36</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Ugotavljanje koncentracije in velikosti adenovirusov .....</b>	<b>37</b>
5.1.2.1	Vpliv MOI na koncentracijo adenovirusov .....	37
5.1.2.2	Spremljanje kromatografskega čiščenja adenovirusov z metodo NTA .....	37
5.1.2.3	Vpliv zamrzovanja in odtajanja na koncentracijo in velikost adenovirusov.....	38
<b>5.1.3</b>	<b>Ugotavljanje velikosti in koncentracije virusov influence.....</b>	<b>38</b>
5.1.3.1	Spremljanje kromatografskega čiščenja virusov med kromatografskim čiščenjem z metodo NTA .....	38
5.1.3.2	Vpliv odtajanja in zamrzovanja na velikost in koncentracijo virusov influence .....	39
5.1.3.3	Vpliv uporabe ultrazvočne kopeli in vibracijskega mešala na koncentracijo in velikost virusov influence .....	39
<b>5.1.4</b>	<b>Ugotavljanje velikosti in koncentracije bakteriofagov .....</b>	<b>40</b>
5.1.4.1	Spremljanje velikosti in koncentracije bakteriofagov v postopku koncentriranja .....	40
<b>5.1.5</b>	<b>Odkrivanje virusov v ustekleničeni vodi.....</b>	<b>40</b>
5.2	SKLEPI .....	42
<b>6</b>	<b>POVZETEK .....</b>	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>VIRI.....</b>	<b>44</b>
<b>ZAHVALA</b>		
<b>PRILOGE</b>		

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Meritve koncentracije in velikosti lateksnih delcev.....	24
Preglednica 2: Koncentracije in razmerje med celokupnim številom adenovirusov in številom infektivnih adenovirusov.....	26
Preglednica 3: Ocena napake pri ugotavljanju koncentracije adenovirusov v žetvi (C <sub>ST</sub> = koncentracija standardnega dodatka). .....	26
Preglednica 4: Predpriprava vzorca z nukleazo. ....	27
Preglednica 5: Analiza frakcij z metodo NTA in EPD testom, pridobljenih s kromatografskim čiščenjem.....	27
Preglednica 6: Vpliv odtajanja in zamrzovanja na velikost in koncentracijo adenovirusov....	28
Preglednica 7: Ugotavljanje celokupnega števila virusnih delcev v vzorcih, očiščenih na monolitski koloni CIM® SO <sub>3</sub> z metodo NTA in testom hemaglutinacije. ....	30
Preglednica 8: Vpliv odtajanja in zamrzovanja nihanja na velikost in koncentracijo virusov influence.....	31
Preglednica 9: Vpliv uporabe vibracijskega mešala in ultrazvoka na velikost in koncentracijo agregiranih virusov.....	31
Preglednica 10: Analiza koncentratov in žetve, ki smo jih pripravili s tangencialno pretočno filtracijo, z metodo NTA. ....	34
Preglednica 11: Ugotavljanje koncentracije virusnih delcev v pitnih vodah z dodajanjem virusnega standarda (C <sub>ST</sub> = koncentracija standardnega dodatka ) .....	35

## KAZALO SLIK

Slika 1: Primer analize mikrotitrsko plošče pri EPD testu (Racainello, 2009).	7
Slika 2: Instrument NanoSight z računalnikom in enota LM10 s celico.	20
Slika 3: Optimizacija parametrov kamere pred snemanjem in pred analizo posnetka: a) optimalno nastavljena parametra ojačanje in zaklop; b) ustrezna razredčitev; c) neprimerenna razredčitev.	22
Slika 4: Funkcija porazdelitve velikosti in koncentracije lateksnih delcev ter njihove poti.	23
Slika 5: Mikrografija adenovirusov (foto: Tušek-Žnidarič M.).	25
Slika 6: Mikrografija virusov influence (foto: Tušek-Žnidarič M.).	29
Slika 7: Vpliv tretiranja žetve z ultrazvokom ter mešanja z vibracijskim mešalom na velikost in koncentracijo virusov.	32
Slika 8: Mikrografija lambda faga (foto: Tušek-Žnidarič M.).	33
Slika 9: Razviti plaki na agarni plošči.	34

## KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Primer poročila, ki smo ga pridobili s programsko opremo NTA, v katerem so razvidni izmerjeni in izračunani podatki.

## **OKRAJŠAVE IN SIMBOLI**

AsFFFF asimetrično frakcioniranje v tokovnem polju (angl. asymmetric field flow fractionation)

B svetlost (angl. brightness)

BL zamegljenost (angl. blur)

CDER Center za oceno zdravil in raziskave (angl. Center for Drug Evaluation and Research)

CMV Center veterinarske medicine (angl. Center for Veterinary Medicine)

CPU citopatogeni učinek

DNK deoksiribonukleinska kislina

DT prag zaznave (angl. detection threshold)

DLS dinamično razprševanje svetlobe (angl. dynamic light scattering)

EMA Evropska agencija za zdravila (angl. European Medicines Agency)

EPD test končne razredčitve (angl. end point dilution test)

FDA Urad za zdravila in prehrano (angl. Food and Drug Administration)

FFF frakcioniranje v tokovnem polju (angl. field flow fractionation)

FT flow through (angl. nevezni material)

G ojačanje (angl. Gain)

HA hemaglutinin

HPLC tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. high performance liquid chromatography)

KV koeficient variacije

MOI multipliciteta infektivnosti (angl. multiplicity of infection)

NA nevramidaza

NTA metoda sledenja nanodelcem (angl. Nanoparticle Tracking Analysis)

OD optična gostota

RNK ribonukleinska kislina

S zaklop (angl. shutter)

STDV standardni odklon

TCID<sub>50</sub> 50-odstotni infektivni odmerek na tkivni kulturi (angl. 50-percent Tissue culture infective dose)

TFF tangencialna pretočna filtracija (angl. tangential flow filtration)

WHO Svetovna zdravstvena organizacija (angl. World Health Organisation)

## 1 UVOD

Virusi so mikroskopsko majhni infektivni delci velikosti od 20 do 300 nm, ki nimajo sistemov za sintezo lastnih sestavin in za razmnoževanje potrebujejo gostiteljsko celico. Viruse uporabljamo kot vektorje pri prenosu genskega materiala v genski terapiji, pri pripravi cepiv in kot alternativo antibiotikom.

Preden lahko virusne delce namensko uporabimo, jih je potrebno namnožiti, očistiti in ovrednotiti. Ovrednotimo jih z različnimi metodami, s katerimi ugotavljamo število virusnih delcev in njihove lastnosti. Slabosti metod in bioprocесов so odstopanja med rezultati, torej neponovljivost. Zato je analitika virusnih delcev in izbira metod ključnega pomena. Tako se izognemo povišanju stroškov med proizvodnjo in čiščenjem virusnih delcev.

V diplomskem delu smo se osredotočili na metodo NTA, ki je primerna za ugotavljanje koncentracije in velikosti celokupnih virusnih delcev med pripravljalnimi in zaključnimi procesi. Prav tako je primerna za ugotavljanje velikosti virusnih agregatov. Koncentracijo in velikost virusnih delcev smo ugotavljali na podlagi Brownovega gibanja nanodelcev in merjenja spremenljivk, kot sta difuzijski koeficient in hidrodinamski premer iz Stokes-Einsteinove enačbe.

### 1.1 NAMEN RAZISKAVE

V diplomskem delu smo ovrednotili nespecifično metodo za sledenje koncentracije in velikosti virusnih delcev z instrumentom NanoSight®. Osredotočili smo se na tri skupine virusnih delcev in sicer adenoviruse, viruse influence in bakteriofage.

### 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Postavili smo naslednje hipoteze:

- Metoda NTA z instrumentom NanoSight® omogoča ugotavljanje koncentracije in velikost različnih virusnih delcev ter stanj agregiranosti le-teh.
- Metoda je primerna za analizo neznanih vzorcev, ki vsebujejo virusne delce.
- Metoda je primerna za analizo laboratorijskih in heterogenih okoljskih vzorcev.
- Metoda je primerna za analizo prisotnosti virusov v pitni vodi.
- Metoda je ponovljiva in robustna.
- Z metodo NTA lahko uspešno sledimo in nadziramo procese čiščenja virusov.

## 2 PREGLED OBJAV

Virusi so mikroskopsko majhni infektivni delci velikosti od 20 do 300 nm, ki nimajo sistemov za sintezo lastnih sestavin Lahko jih uporabljamo kot virusna cepiva, na področjih genske terapije ali kot protimikrobna sredstva (Koren, 2002). Pri uporabi v te namene je virusu potrebno namnožiti in nato očistiti z različnimi metodami, ki jih težko primerjamo med seboj, kljub temu, da analiziramo iste virusne delce (Lusky, 2005). Nekatere metode so primerne za ugotavljanje celokupnega števila virusnih delcev, nekatere pa za ugotavljanje števila infektivnih virusnih delcev (Aucoin in sod., 2008).

### 2.1 VIRUSI

Vsi virusi so sestavljeni iz nukleinske kisline ter proteinskega plašča oz. kapside. Nukleinski kislini sta DNK ali RNK, ki sta lahko enovijačni, dvovijačni, linearni, krožni ali segmentirani. Nekateri virusi so obdani z lipidno membrano, ki izhaja iz membrane gostiteljske celice in ob lipidih lahko vsebuje tudi gliko- in lipoproteine. Po obliki so lahko paličasti, poliedrični, spiralno zaviti ali kompleksno zgrajeni iz več delov (Debyser, 2003).

### 2.2 UPORABA VIRUSNIH DELCEV

Viruse uporabljamo kot cepiva, protimikrobna sredsta, za fagni prikaz in na področju genske terapije.

#### 2.2.1 Cepiva

Viruse so najprej uporabljali kot cepiva, ki jih po načinu izdelave v grobem delimo na živa in mrtva (inaktivirana) cepiva. Živa cepiva sestavljajo oslabljeni, nevirulentni virusni mutantni, ki se po vnosu v telo razmnožujejo in spodbujajo odziv imunskega sistema, pri tem pa ne povzročajo bolezenskih znakov. Najbolj razširjena so cepiva iz virusnih mutantov, oslabljenih z večkratnim zaporednim presajanjem v celičnih kulturah. V zadnjem času se za oslabitev virusov uporablja tudi tehnologija rekombinantne DNA (Koren, 2002).

Mrtva cepiva pridobivamo tako, da virulentne virusne obdelujejo s kemičnimi sredstvi, ki povzročijo, da virusi izgubijo sposobnost okuževanja celic, ostanejo pa imunogeni. V uporabi so tudi cepiva iz beljakovin virusne ovojnici in kapside, ki so dovolj imunogene, da sprožijo odziv imunskega sistema. Poznamo očiščena, sintetična in rekombinantna beljakovinska cepiva (Koren, 2002).

#### 2.2.2 Genska terapija

Osnova genske terapije je vnos novega ali popravljenega gena v tarčno celico s pomočjo vektorjev, med katere sodijo tudi virusi. Z vnosom genov v celico dosežemo ekspresijo novih funkcionalnih proteinov ali slabo izraženih proteinov, lahko pa popolnoma nadomestimo manjkajoči protein (Cull in sod., 1992; Pfeifer in Verma, 2001).

Virusi, ki so primerni za gensko terapijo, morajo uspešno prenesti vstavljeni genetski informaciji do tarčne celice brez pomnoževanja lastnega genetskega materiala, kar dosežemo s tehnologijo rekombinantne DNK (Berkowitz in Philo, 2007).

### **2.2.3 Protimikrobna sredstva**

Bakteriofagi so bakterijski virusi, ki specifično napadajo le eno bakterijsko vrsto. Njihov protimikrobn potencial so prepoznali že na začetku 20. stoletja in z njimi ozdravili številna mikrobna obolenja. Lahko jih uporabljamo za preprečevanje infekcij, ki so bakterijskega izvora, pri človeku, živalih in rastlinah (Clark in March, 2006; Hermoso in sod., 2007). Kljub temu pa bakteriofagi verjetno ne bodo nikoli zamenjali antibiotikov. Napredki na področju biotehnologije, mikrobiologije in infektologije omogočajo njihovo uporabo predvsem kot dopolnilo dosedanjim metodam zdravljenja (Clark in March, 2006; Bratkovič in Preželj, 2008).

### **2.2.4 Fagni prikaz**

Pri metodi fagnega prikaza se heterologni peptid ali protein izrazi na površini faga (Willats, 2002). Na področju imunologije metodo fagnega prikaza uporabljamo za identifikacijo epitopov na antigenih za razvoj novih cepiv. Več raziskav je pokazalo, da imunizacija z rekombinantnimi fagi izzove dober imunski odziv s sintezo protiteles (Yang in Shiuan, 2003). Tehnologija je uporabna tudi na področjih celične biologije, farmakologije ter pri odkrivanju novih zdravil (Willats, 2002).

## **2.3 PRIPRAVLJALNI PROCESI PROIZVODNJE VIRUSNIH DELCEV**

Ključnega pomena za ponovljiv in visoko produktiven proizvodni proces sta pravilna izbira celic, primernih za infekcijo, ter poznavanje lastnosti virusov. Poznati moramo celokupno število virusnih delcev in število infektivnih virusnih delcev (Kamen in Henry, 2004; Hussain in sod., 2010). Z omenjenima parametroma ocenujemo učinkovitost biprocesov in kakovost končnega produkta, na primer na področju genske terapije (Dormond in sod., 2003).

Procesi gojenja so za nekatere viruse precej zastareli, kot je na primer gojenje virusa gripe na oplojenih kokošjih jajcih, ki pa jih počasi izpodrivajo nove, enostavnejše in varnejše metode (Jones in sod., 2011). Mednje sodijo celične linije evkariontskih celic, kot sta MDCK in HEK 293, ki sta kompetentni za produkcijo adenovirusov in virusov gripe (Iyer in sod., 1999; Nadeau in Kamen, 2003; Hussain in sod., 2010). Celice za proizvodnjo virusov na laboratorijskem nivoju gojimo v plastičnih posodah s posebnim vratom in adhezivno površino (Iyer in sod., 1999), na nivoju pilotne in industrijske proizvodnje pa v bioreaktorjih.

Bakteriofage gojimo z infekcijo bakterijskih celic. Z infekcijo sprožimo lizo bakterij in sprostitev bakteriofagov v suspenzijo. Potez lize bakterijskih celic ocenujemo z metodo plakov (Adams, 1956).

## 2.4 ZAKLJUČNI PROCESI PROIZVODNJE VIRUSNIH DELCEV

Visoka stopnja čistosti virusnih delcev je v farmacevtskih in biotehnioloških postopkih ključnega pomena. Ključni so biotehniološki postopki, s katerimi odstranjujemo nečistoče, ki bi lahko povzročile neželene odzive pri uporabi v terapevtske namene. Hkrati pa lahko s postopki zaključnih procesov koncentriramo očiščene virusne delce do želene koncentracije. S tem olajšamo rokovanje s terapevtiki, ko le-ti zapustijo proizvodni obrat (Segura in sod., 2006).

### 2.4.1 Obarjanje s polietilenglikolom (PEG)

Obarjanje z visokomolekularnim PEG-om je učinkovita metoda za koncentriranje virusov, ker je hitra in ekonomična (Morenweiser, 2005). Virusi se ob dodatku PEG-a in soli počasi obarjajo pri nizkih temperaturah, kar jih varuje pred kemijsko in fizikalno denaturacijo. Obarjanje se ponavadi uporablja v začetnih stopnjah čiščenja, saj je veliko blažja metoda kot sta ultracentrifugiranje in ultrafiltracija. Pomanjkljivost te metode je neselektivno obarjanje (Morenweiser, 2005).

### 2.4.2 Ultracentrifugacija

Pogosto uporabljana metoda čiščenja virusov za terapevtske namene je ultracentrifugiranje. Virusi se od nečistoč ločijo zaradi razlik v hitrosti usedanja v medijih, kot sta saharoza in cezijev klorid. Lastnosti virusov, ki določata hitrost usedanja, sta gostota in morfologija delcev. Posamezni delci se v gradientu saharoze ali CsCl usedajo tako dolgo, dokler se njihova gostota ne izenači z gostoto medija (Morenweiser, 2005). Običajno se uporablja v začetnih stopnjah za koncentriranje virusnih delcev. Stopnja čistosti, ki jo dosežemo, dosega predpisane vrednosti, vendar so izgube virusnih delcev pri tem čiščenju velike, izkoristek procesa je lahko tudi 20 %. Za omenjene postopke so na voljo preparativne centrifuge, ki dosegajo visoke obrate.

### 2.4.3 Kromatografske metode čiščenja virusnih delcev

Visoke standarde glede čistosti terapevtskih produktov lahko dosegamo tudi z novejšimi metodami, kot je preparativna kromatografija. Osnova kromatografskega ločevanja je nosilec, na katerega so vezane funkcionalne skupine, ki se s tarčno molekulo vežejo specifično (afinitetna kromatografija) ali nespecifično, na primer ionska, hidrofobna in gelska kromatografija. Poznamo več tipov nosilcev, ki se med seboj razlikujejo po velikosti por. Nosilci z velikimi porami so primerni za čiščenje plazmidne DNA, koncentriranje rastlinskih in humanih virusov ter različnih virusnih vektorjev in virusom podobnih delcev, saj je kapaciteta vezave neodvisna od pretoka, kar omogoči hitro in učinkovito ločevanje virusnih delcev od nečistoč (Urbas, 2011).

Gelska kromatografija temelji na ločevanju molekul na osnovi njihovih razlik v velikosti. Manjše molekule se na nosilcu zadržijo dlje časa, ker difundirajo v pore, medtem ko se večje, naprimer virusi, ne zadržujejo, ker so prevelike, da bi prehajale v in iz por nosilca. Gre za zelo učinkovito metodo ločevanja virusov od manjših molekul, kot so proteini, DNA fragmenti in podobne. To je univerzalna metoda za vse vrste virusov in drugih velikih molekul. Postopek

ne omogoča ločevanja med delno sestavljenimi kapsidami, razgrajenimi delci ali virusnimi agregati (Gagnon, 2008; Barton, 1977; Kramberger, 2006).

Ionsko izmenjevalno kromatografijo, skupaj s hidrofobno in afinitetno kromatografijo, uvrščamo med adsorpcijske kromatografije. Ločevanje molekul pri tej metodi poteka na nosilcih, ki so lahko iz poroznih delcev, membran ali monolitov. Izmenjevalno površino pri nosilcih v obliki membran lahko predstavlja vlaknasta struktura z velikimi pretočnimi porami. Nosilci so primerni za procese, kjer zahteve po čistosti in koncentraciji produkta niso visoke (Gagnon, 2008; Gavin in Gagnon, 2006; Kramberger, 2006).

#### 2.4.4 Ultrafiltracija

Ultrafiltracija (UF) je vrsta membranske filtracije, pri kateri sile hidrostatičnega pritiska potiskajo tekočino skozi polprepustno membrano. Je metoda ločevanja snovi z uporabo membran z velikostjo por v razponu od 100 do 1000 kDa, ki temelji na osnovi navzkrižnega toka (Gao in sod., 2011). Z ultrafiltracijo lahko koncetriramo ali odstranjujemo viruse in mikroorganizme, snovi z visoko molekulsko maso, koloidne materiale, organske in anorganske polimerne molekule in ione kot sta na primer natrij in kalcij.

V člankih navajajo uporabnost ultrafiltracije kot alternativne metode za doseganje in zagotavljanje visoke stopnje kakovosti in varnosti pitnih vod (Gao in sod., 2011; Madaeni, 1999). Vaidya in sod. (2004) so iz pitne vode odstranjevali viruse hepatitis A. Ugotovili so, da v permeatu ni bilo virusov, kar so potrdili tudi z metodo RT-PCR.

Michalsky in sod. (2010) so uporabljali postopek ultrafiltracije za žetev rekombinantnih proteinov, izraženih v bakulovirusih. S postopkom so zniževali koncentracijo virusnih delcev v končnem produktu. Ugotovili so, da je lahko ultrafiltracija prva stopnja v procesu čiščenja virusnih delcev do končnega produkta.

Metoda je enostavna za uporabo, za izvedbo postopka ne potrebujemo posebnih kemikalij. (Kalbfuss in sod., 2006; Wickramasinghe in sod., 2005).

### 2.5 METODE ZA DETEKCIJO VIRUSNIH DELCEV V PROCESNI KONTROLI PRIPRAVLJALNIH IN ZAKLJUČNIH BIOPROCESOV

Procesna kontrola omogoča kontrolo kvalitete različnih komponent in korakov, ki so del proizvodnega procesa. Sledenje procesom na eni strani zagotavlja varnost in kvaliteto produkta, ki je namenjen uporabniku, bolniku, na drugi strani pa zmanjša možnost napak, ki proizvajalca drago stanejo. Odstopanja od predvidenega se tako odkrijejo dovolj zgodaj, preden ta postanejo problem. Procesna kontrola in sledljivost je tudi ena od ključnih stvari za registracijo produkta pri regulatornih telesih, kot sta FDA ali EMA.

Parametre kakovosti za viruse predpišejo regulatorna telesa in ti med drugimi zajemajo tudi število celokupnih virusnih delcev in število infektivnih virusnih delcev in prisotnost agregatov v virusnih pripravkih. Z različnimi metodami lahko omenjene parametre kvalitativno ali kvantitativno ovrednotimo.

## 2.5.1 Metode za detekcijo števila infektivnih virusnih delcev

Metode za detekcijo števila infektivnih virusnih delcev, ki jih najpogosteje uporabljamo, so metoda plakov, test končne razredčitve (EPD) in 50-odstotni infektivni odmerek na tkivni kulturi ( $TCID_{50}$ ).

### 2.5.1.1 Metoda plakov

Metoda plakov je standardna metoda za ugotavljanje koncentracije infektivnih virusnih delcev. V posodi za gojenje celičnih kultur inkubiramo kompetentne celice, dokler se ne vzpostavi konfluentni monosloj, ki ga nato okužimo z virusi. Suspenzijo z virusi in celicami primerno razredčimo in fiksiramo z agarjem. S tem omogočimo posamezno rast plakov in preprečujemo združevanje le-teh. Dulbecco (1952) je predpostavil, da pod temi pogoji en virus okuži eno celico. Pri tem upoštevamo, da je število plakov proporcionalno virusnemu titru.

Teunisa in sod. (2005) so ugotavljali titer poliovirusa tipa 1 in tipa 3 v človeškem blatu oziroma odpadni vodi. S to raziskavo so pokazali, da metoda ni primerena za identifikacijo virusov, ampak samo za določanje titra. Prav tako so ugotovili, da število plakov ni vedno proporcionalno virusnemu titru, če so v vzorcih prisotni virusni agregati.

Kljub temu, da je metoda plakov standardna za ugotavljanje števila infektivnih virusnih delcev, sta Zhu in Yin (2007) ugotovila, da v nekaterih primerih ni dovolj občutljiva. Boljša občutljivost metode sta dosegla tako, da sta namesto agarnega sloja dodala tekočega. Namesto plakov so se tvorili kometi.

Metoda plakov bi bila lahko primerena za oceno učinkovitosti tehnik, s katerimi izboljšujejo kakovost vode z inaktivacijo virusov in za oceno izkoristka metod za detekcijo virusov v vodi, hrani in okolju (Cromeans in sod., 2008).

### 2.5.1.2 Test končne razredčitve (EPD test)

Test končne razredčitve se je uporabljal pred razvojem metode plakov. Primeren je predvsem za tiste viruse, ki ne tvorijo plakov. EPD test se izvaja tako, da se pripravijo serije razredčitev, ki se nanesajo na mikrotitrsko ploščo (plošča, ki se najpogosteje uporablja, ima 96 luknjic) s celično kulturo. Po nekajdnevni inkubaciji opazujemo citopatogeni učinek (CPU) celični kulturi posameznih razredčitev virusov, in sicer z invertnim mikroskopom.

Primer:

Razredčitev	Citopatogeni učinek										
$10^{-2}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$10^{-3}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$10^{-4}$	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
$10^{-5}$	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+
$10^{-6}$	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
$10^{-7}$	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=

Slika 1: Primer analize mikrotitrsko plošče pri EPD testu (Racainello, 2009).

Deset luknjic na mikrotitrski plošči je bilo okuženih z razredčitvijo virusa, ki je označena na skrajni levi (Slika 1). Oznaka s + pomeni, da je v vdolbinici opažen citopatogeni učinek. Pri visokih razredčitvah kultura ni okužena, ker ni prisotnih virusnih delcev. Ravno obratno je pri nizkih razredčitvah. Pri razredčitvi  $1,00 \times 10^{-5}$  je 50 % celic, pri katerih smo opazili citopatogeni učinek (Slika 1). Vrednost se lahko izrazi kot 50-odstotni infektivni odmerek/ml. Statistično metodo sta leta 1938 razvila Reed in Muenich. (Reed in Muenich, 1938). Uporabljala sta jo pri testih umrljivosti živali, ki sta jih okužila z različnimi virusnimi razredčitvami.

Avtorji več člankov navajajo uporabnost EPD testa pri adenovirusih, bakulovirusih, virusu influence in bakteriofagih. Matindoost in sod. (2012) so ugotovili, da je EPD test za bakuloviruse natančnejši kot metoda plakov. Kitts in Green (1999) sta razvila EPD test v kombinaciji z imunološkim testom tako, da sta v test vklopila uporabo protiteles, ki so specifična za glikoproteine na virusni ovojnici. Citopatogeni učinek sta opazovala z uporabo barvila, ki se je vezalo na neokužene celice.

Pri odčitavanju rezultatov lahko pride do napake, saj citopatogeni učinki niso vedno izrazito izraženi. Zato je ocena rezultata lahko subjektivna. EPD test ni primeren za detekcijo virusov, ki ne povzročajo omenjenega učinka Borisevich in sod. (2008).

DiStefano in sod. (1995) so EPD test za rotaviruse prilagodili tako, da so za oceno citopatskega efekta uporabili komercialno barvilo tetrazolin. Metodo so poimenovali kolorimetrični EPD test. Titer infektivnih virusnih delcev so določili na podlagi absorbance, s čimer so se izognili subjektivni oceni operaterja.

#### 2.5.1.3 Metoda 50-odstotni infektivni odmerek na tkivni kulturi ( $TCID_{50}$ )

Metoda  $TCID_{50}$  je različica EPD testa. Z metodo ugotavljamo tisto razredčitev virusa, ki je potrebna, da okuži 50 % inokulirane celične kulture (Schmidt in Lannette, 1961). Uporablja se za določanje titra tistih virusov, ki jih gojimo na evkariontskih celičnih kulturah. Pozitivni rezultat je citopatogeni učinek na opazovanih tarčnih celicah.

## 2.5.2 Metode in tehnike za detekcijo celokupnega števila virusnih delcev

Najbolj pogoste metode za detekcijo celokupnega števila virusnih delcev so metoda dinamičnega razprševanja svetlobe (DLS), test hemaglutinacije, opazovanje virusnih delcev s presevnim elektronskim mikroskopom (TEM), encimskoimunski test (ELISA), frakcioniranje v tokovnem polju (FFF), kromatogranske tehnike, kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (qPCR) in metoda za sledenja nanodelcem (NTA).

### 2.5.2.1 Detekcija virusnih delcev z metodo dinamičnega razprševanja svetlobe (DLS)

Metoda dinamičnega razprševanja svetlobe je primerna za ugotavljanje velikosti, oblike in strukture bioloških makromolekul ter nanodelcev. Sistem za merjenje dinamično razpršene svetlobe je sestavljen iz laserja (ponavadi He-Ne ali Ar-laser), ki je usmerjen v optično celico s cilindrično obliko. Laserska svetloba potuje skozi vzorec, kjer se ob trku z delci razprši. Delci se gibajo po principu Brownovega gibanja. Merimo intenziteto razpršene svetlobe v odvisnosti od časa. S pomočjo programov iz prej omenjenih podatkov, posredno preko translacijskega difuzijskega koeficienta in Stokes-Einsteinove enačbe, izračunamo hidrodinamski premer delca (Murphy, 1997).

Metoda je primerna za ugotavljanje velikosti virusnih delcev in ugotavljanje stopnje agregiranosti. Visoka usposobljenost opraterja za izvajanje metode ni potrebna. Hkrati je primerna za »on-line« detekcijo pri separacijskih tehnikah (Lespes in Gigault, 2011).

Pred uporabo sistema je potrebna kalibracija instrumenta. Če je vzorec heterogen (veliki in majhni delci), intenziteta razpršene svetlobe večjih delcev prekrije intenziteto razpršene svetlobe majhnih delcev, kar je slabost opisane metode (Gallego-Urrea in sod., 2011).

### 2.5.2.2 Test hemaglutinacije

Test hemaglutinacije temelji na reakciji, ki poteka med eritrociti in hemaglutininom. Hemaglutinin se nahaja na lipidni ovojnici virusa influence in aglutinira eritrocite, pri čemer prihaja do nastanka mrežaste tvorbe. Virusni titri so definirani kot recipročne vrednosti največje redčitve virusnega vzorca, ki povzročijo popolno aglutinacijo eritrocitov in so izraženi v HA enotah (Wolff in Reichl, 2008). Pozitiven rezultat hemaglutinacije pomeni, da je prišlo do aglutinacije oziroma zlepljanja eritrocitov (Hierholzer in sod., 1969).

Metoda je primerna za določanje vsebnosti virusnih delcev v različnih korakih zaključnih procesov (Wolff in Reichl, 2008). Metoda je ponovljiva znotraj enega dneva, medtem ko se rezultati med posameznimi dnevi med sabo razlikujejo (Urbas, 2011). Prav tako rezultati med sabo niso nujno primerljivi, kadar gre za različne seve virusov (Hierholzer in sod., 1969).

### 2.5.2.3 Detekcija virusnih delcev z opazovanjem na transmisijskem elektronskem mikroskopu (TEM)

Delovanje transmisijskega elektronskega mikroskopa je podobno delovanju svetlobnega mikroskopa, le da ima večjo ločljivost. Začetki TEM segajo v leto 1938, ko je Von Borries prvi prikazal sliko (Tiekotter in Ackermann, 2009). Slika nastane zaradi različnega sipanja elektronov na atomih z različnimi atomskimi števili, ki so na različnih mestih v preparatu

(Bene, 1999). Filament (katoda) na vrhu kolone mikroskopa je vir elektronov. Elektrone pospešuje visoka napetost med katodo in anodo. Snop elektronov usmerjamo s sistemom elektromagnetnih leč do vzorca in zaslona. Na zaslolu se pojavi monokromatska slika vzorca, ki ustreza elektronski gostoti preparata (Kladnik, 2006). Uporablja se za detekcijo in identifikacijo virusnih delcev ter opazovanje ultrastruktur celice. Najbolj pogosta tehnika za pripravo vzorca je negativno kontrastiranje. Priprava je relativno hitra, za razliko od konvencionalne priprave vzorca, ki zahteva nekaj dni (Zechmann in Zelling, 2009). TEM je prav tako primeren za diagnosticiranje virusnih obolenj. Velikost in značilne ultrastrukture virusov so specifične za posamezne skupine (Harris, 2007; Wild, 2008).

Konvencionalno kontrastiranje preparata zajema fiksacijo vzorca z glutaraldehydom ali osmijevim tertraoksidom, spiranje z etanolom ali acetonom, utrjevanje vzorca, rezanje in nalaganje vzorca na mrežice. Vzorec se lahko pripravi tudi s hitrim zamrzovanjem vzorca, ki se ga po zamrzovanju lomi in nato napareva s težkimi kovinami (Hall in Hawes, 1991; Bozzola in Russell, 1999; Kuo, 2007). Oba omenjena načina priprave ponavadi potekata nekaj dni.

Cromeans in sod. (2008) so TEM uporabljali za štetje virusov. Najprej so jih fiksirali s paraformaldehydom. Posneli so med 30 in 50 izbranih območij – kvadratov na preparatu. Koncentracijo celokupnih virusnih delcev so podali kot povprečno število virusnih delcev, preštetih v posameznem kvadratu. Število pogosto variira zaradi enakomerne ali pa lokalizirane razporeditve virusov. Če bi žeeli natačnejše podatke, bi morali izbrati veliko več območij, kar posledično zahteva veliko časa in potrebljivosti operaterja (Mayhew in sod., 2009).

#### 2.5.2.4 Encimskoimunski test (ELISA)

Encimskoimunski test je biokemijska metoda, ki se uporablja za detekcijo protiteles ali antigenov v virusnem vzorcu. Za določanje protiteles se uporablja indirektna ELISA, direktna ali sendvič ELISA pa je prirejena za določanje antigenov (virusni proteini). Pri obeh načinu izvedbe testa ELISA se na zadnje dodano protitelo veže encim. Vezan encim omogoči spremembo barve substrata. Izmeri se absorbanca pri določeni valovni dolžini, preko katere se preračuna koncentracija virusnih delcev.

Ponavadi so na voljo komercialni kompleti, ki temeljijo na merjenju absorbance različnih razredčitev virusa. Izmerjene absorbance razredčitev morajo biti v območju umeritvene krivulje po navodilih proizvajalca. Prednost metode je ta, da visoka stopnja čistosti virusnega materiala ni nujno potrebna. Faktor, ki lahko vpliva na končni rezultat, je višja koncentracija soli v vzorcu (Grimm in sod., 1999).

ELISA se lahko izvaja tudi za analizo pridelkov metode PCR. Ponavadi se pridelke okarakterizira z agarozno elektroforezo, ki velikokrat ni dovolj občutljiva. Moteči faktorji so tudi pogosto prisotni neželeni pomnoženi odseki DNA. ELISA ima spodnjo mejo detekcije  $10^{-4}$  ng virusne DNA, kar je stokrat večja občutljivost kot pri agarozni elektroforezi (Rola in Kuzmak, 2002; Aini in sod., 2008). V primerjavi z drugimi metodami, s katerimi se analizira PCR pridelek, je ELISA enostavno izvedljiva saj omogoča analizo večjega števila vzorcev hkrati. Absorbanca se meri s čitalniki, ki so prirejeni za mikrotitrske plošče. S tem je

izključena napaka subjektivne interpretacije rezultatov v primerjavi z agarozno elektroforezo (Rola in Kuzmak, 2002).

Pheasey in sod. (2006) so poročali, da za identifikacijo nekaterih virusov raje izvajajo metodo ELISA kot pa metodo plakov, saj je primerna za identifikacijo živih in inaktiviranih virusnih delcev. V poglavju metoda plakov je omenjeno, da izvedba analize lahko traja več dni.

#### 2.5.2.5 Detekcija virusnih delcev s frakcioniranjem v tokovnem polju (FFF)

Frakcioniranje v tokovnem polju je analitska metoda, ki omogoča ločevanje in karakterizacijo virusnih delcev. Omogoča ločevanje delcev velikih od 1 nm do 100 (Yohannes in sod., 2011). Metoda je primerna za ugotavljanje celokupnega števila virusnih delcev (Balch in sod., 2002). Difuzija virusnih delcev poteka skozi prazen tanek kanal. Pri tem se ustvarja laminarni parabolični tokovni profil z naraščajočo gostoto (Fraunhofer in Winter, 2004). Delci, ki difundirajo hitreje, se tudi eluirajo hitreje. Princip ločevanja je podoben kot pri kromatografiji. Prednost metode je odsotnost stacionarne faze. S tem se izognemo izgubi vzorca, ker ni adsorbcije na nosilec (Messaoud in sod., 2009).

Najbolj pogosta tehnika FFF je asimetrično tokovno frakcioniranje v tokovnem polju (AsFFFF). S tehniko je mogoče slediti delcem, ki so veliki od 1 nm do 50 µm (Williams in sod., 2000). Yohannes in sod. (2011) so ločevali virusne delce in virusom podobne delce. Analizirali so različne frakcije, ki so vsebovale fragmente, monomere, dimere, oligomere in agregate.

Metoda FFF se izvaja tudi v kombinaciji z detektorji, s katerimi lahko spremljamo ločevanje »on-line« in »off-line«. Detektorji so lahko UV-VIS (ultra violet and visible) detektor, detektor občutljiv na razpršeno svetlobo pod različnimi koti (angl. Multi Angle Light Scattering - MALS) ali detektor občutljiv na magnetno resonanco (angl. Nuclear Magnetic Resonance - NMR). Brez predhodnega ločevanja s FFF bi z detektorji pridobili samo povprečne vrednosti, zato je kombinacija z njimi neizbežna (Basile in sod., 2005).

Tako kot Wei in sod. (2007) so tudi Loisy in sod. (2004) metodo FFF-MALS primerjali s PCR metodo. Razlika v celokupnem številu delcev je bila zanemarljiva, kar so potrdili tudi s TEM, ki omogoča tudi vizualizacijo vzorca. Prav tako z ločevanjem z FFF metodo ne prihaja do velike izgube vzorca, ne potrebujemo standardnih vzorcev, ekonomsko je lahko dostopna.

#### 2.5.2.6 Ugotavljanje celokupnega števila virusnih delcev s kromatografskimi tehnikami in spektrofotometrično detekcijo

Analitske kromatografske metode se uporabljo za preverjanje čistosti in vsebnosti komponent, tako med posameznimi procesi čiščenja (medprocesna kontrola), kot tudi v končnih proizvodih.

Najpogosteje uporabljana kromatografska tehnika za ugotavljanje celokupnega števila virusnih delcev, v kombinaciji z UV-VIS detektorjem, je ionsko-izmenjevalna kromatografija.

Maizel in sod. (1968) so pripravili umeritveno krivuljo, za katero so uporabili divji tip očiščenega adenovirusa. Merili so absorbanco virusne DNA pri 260 nm.

Aucoin in sod. (2008) so ugotavljali celokupno število adenovirusom podobnih virusnih delcev. Ugotovili so, da so rezultati pridobljeni z ionsko-izmenjevalno kromatografijo primerljivi z rezultati testa ELISA. Metodama je skupno tudi to, da z njima ne moremo ločiti praznih in polnih kapsid. Tako število praznih kapsid načeloma ostaja neznanka in je za kakovost končnega produkta kritično.

Pri ugotavljanju celokupnega števila virusnih delcev s kromatografskimi tehnikami in spektrofotometrično detekcijo se lahko spremlja celoten proces čiščenja in oceni kakovost končnega produkta. Slabost te metode je ta, da je potrebno imeti za vsako skupino virusov svoj standard. Ponavadi se pridobljene frakcije analizirajo z nadaljnimi metodami, kot so PCR, ELISA in/ali elektroforeza. To pomeni, da moramo za potrditev končnega rezultata vedno izvajati več metod. Zato je delo dolgotrajno in zahtevno, kompleksno ter ekonomsko neugodno.

#### 2.5.2.7 Ugotavljanje celokupnega števila virusnih delcev s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo (qPCR)

Različica PCR metode, pri kateri se določa absolutna ali relativna koncentracija virusne DNA v vzorcu, je kvantitativna PCR metoda ali metoda PCR v realnem času. Postopek pomnoževanja nukleinskih kislin je enak kot pri klasični metodi PCR. Vzporedno s tarčnim odsekom virusnega genoma se pomnožuje tudi pomnoževalni standard. To je posebno pritejen manjši odsek nukleinske kisline, katerega zaporedje in koncentracija sta znana. Namnoženi PCR pridelki virusnega genoma se dokazujejo in ločujejo s hibridizacijo z dvema različnima lovkkama. Ena lovka je značilna za virusni genom, druga pa za pomnoževalni standard. Lovki sta vezani na steno vdolbinic mikrotitrskih ploščice. Na tem mestu poteka avidin peroksidazni test, s katerim se dokazujejo nastali hibridizacijski kompleksi. Po merjenju jakosti spektrofotometričnega signala obeh hibridizacijskih reakcij se preračuna koncentracija virusnih delcev v vzorcu. Če je virusni genom sestavljen iz enoverižne RNA, jo je potrebno prepisati v komplementarno DNA. To različico kvantitativne PCR se imenuje reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo v realnem času (RT-qPCR) (Poljak, 2002).

Metoda je zelo učinkovita, natančna in občutljiva. Uporabljati moramo izredno čiste pripravke virusne DNA. Dormond in sod. (2003) so izpostavili pomanjkljivosti omenjene metode kljub njeni natančnosti. S koncentracijo, podano v enotah virusni genom/ml, ne izražamo točnega števila celokupnih virusnih delcev. V virusnih pripravkih je lahko delež praznih kapsid, ki ne vsebujejo virusnega genoma, od 5 do 25 % (Vellekamp in sod., 2001).

#### 2.5.2.8 Detekcija virusnih delcev z metodo sledenja nanodelcem (NTA)

Metoda se izvaja z instrumentom NanoSight, ki je sestavljen iz svetlobnega mikroskopa, CCD kamere (angl. coupled charge device), LM10 enote (mesta, kamor vbrizgamo vzorec) z izvorom laserske svetlobe in računalnika s programsko opremo, ki nam omogoča analizo sledenja nanodelcem (angl. Nanoparticle Tracking Analysis).

CCD kamera je naprava s svetlobno občutljivim detektorjem, na katerem so v dveh dimenzijah porazdeljene točke (angl. pixel). LM10 enota je sestavljena iz celice, kamor vbrizgamo vzorec, katerega volumen je približno 300  $\mu\text{l}$ . Laserski žarek valovne dolžine 655 nm je usmerjen v LM10 enoto. Ob trku z delci se razprši. Za delce tega velikostnega razreda je značilno, da gravitacijska sila nima vpliva na njihovo gibanje. Gibajo se po principu Brownovega gibanja.

Brownovo gibanje je naključno gibanje delcev v raztopini in velja za delce submikrometerskih dimenzij. Leta 1827 je to gibanje poimenoval Robert Brown (Einstein, 1905). Po letu 1905 sta Albert Einstein in Smolichowski ločeno raziskovala ozadje Brownovega gibanja in razvila fizikalno teorijo. S teorijo so se ukvarjali tudi drugi znanstveniki. Skupk njihovih del je pripeljal do izpeljave Stokes-Einsteinove enačbe, ki definira tridimensionalno Brownovo gibanje sferičnih delcev v območju nizkega Reynoldsovega števila.

$$D_t = \frac{K_B T}{6\pi\eta r_h} \quad \dots(1)$$

$D_t$  je difuzijski koeficient delcev,  $K_B$  Boltzmanova konstanta,  $T$  absolutna temperatura,  $\eta$  viskoznost medija in  $r_h$  hidrodinamski premer. Hidrodinamski premer je definiran kot premer, pri katerem se delci obnašajo enako kot analizirani delci (Gallego-Urrea in sod., 2011).

Zgoraj definiran difuzijski koeficient se navezuje tudi na enačbo, ki opisuje gibanje v dvodimenzionalnem prostoru, kateremu lahko sledimo s snemanjem s CCD kamero (Gallego-Urrea in sod., 2011).

$$\overline{(x, y)^2} = \frac{2K_B T}{3r_h\pi\eta} \quad \dots(2)$$

$\overline{(x, y)^2}$  je hitrost delca,  $T$  temperatura medija,  $\eta$  viskoznost medija,  $r_h$  hidrodinamski premer in  $K_B$  Boltzmanova konstanta.

Proivajalec navaja, da je detekcija delcev, ki so večji od 600 nm, lahko problematična. Za delce, ki so večji od omenjene velikosti, je značilno, da je intenziteta razpršene svetlobe ob trku z njimi večja. Posledično prihaja do prekrivanja razpršene svetlobe med posameznimi delci. Hkrati navajajo tudi to, da je za delce, večje od 600 nm, Brownovo gibanje upočasnjeno. To pomeni, da delcem težje sledimo, zato tudi hidrodinamski premer ni nujno natančen. Premer 600 nm je tako zgornja meja za natančno in ponovljivo ugotavljanje premera oziroma velikosti delcev (Carr in Malloy, 2007).

Fillipe in sod. (2010) so ugotavljali, kakšne so slabosti in prednosti metode NTA v primerjavi z metodo dinamičnega razprševanja svetlobe (DLS). Z metodo NTA lahko uspešno sledimo in detektiramo proteinske agregate v vzorcih. Poslužujemo se lahko programske aplikacije, ki se imenuje razširjeno dinamično območje (angl. extended dynamic range). Aplikacija omogoča simultano analizo delcev dveh velikostnih razredov. Metoda DLS tega ne omogoča, ker je bolj primerna za homogene vzorce (Fillipe in sod., 2010). Prav tako so ocenili, da je metoda

NTA bolj natančna in bi lahko postala alternativa metodi DLS. Prav tako je izredno pomembna usposobljenost operaterja, kar bi lahko označili kot slabost. Fillipe in sod. (2010) so ocenili, da je metoda primerna za analize na področju zdravil in cepiv. Stopnja agregacije je izredno pomembna, ker vpliva na infektivnost (Jones in sod. 2011; Patois in sod., 2011).

Gallego-Urea in sod. (2011) so ugotovili, da je metoda NTA primernejša kot transmisijska elektronska mikroskopija za ugotavljanje celokupnega števila virusnih delcev. Z metodo NTA lahko analiziramo večje število virusnih delcev, hkrati pa se izognemo nerepresentativnim območjem, ki so značilna pri analizah na TEM. Prav tako ni potrebna posebna predpriprava vzorca kot je to potrebno pri transmisijski elektronski mikroskopiji. Metoda naj bi se redkeje uporabljala za oceno toksičnosti nanodelcev v okolju ali pa za sledenje nanodelcem v živilskih vzorcih. Mnenja so, da je potrebno narediti še več raziskav (Gallego-Urrea in sod., 2011).

Le in sod. (2008) so metodo DLS primerjali z metodo NTA. Želeli so ugotoviti, ali bi lahko bila metoda NTA primerna kot potencialna tehnika za analize na različnih področjih mlekarstva. Metodi so uporabljali pri ugotavljanju vpliva topotnih efektov na kazeinske micle v mleku. Ugotovili so, da je bila standardna deviacija velikosti kazeinskih micel pri metodi DLS 1 %, medtem ko je bila pri metodi NTA 10 %. Do razlik standardnih deviacij prihaja zaradi različne priprave vzorca in merjenja velikosti delcev. Na podlagi teh podatkov, so tako kot ostali raziskovalci kot prednost metode izpostavili predvsem vizualizacijo delcev.

Montes-Burgos in sod. (2010) so metodo NTA uporabili kot orodje za določanje velikosti delcev in lastnosti prevlek kot predstopnjo za izvajanje nanotoksikološkega testa. Ugotavljali so, kakšne so interakcije nanodelcev zlata, ki so jih dodali v plazmo.

Domingos in sod. (2009) so ugotavljali velikost delcev titanijevega oksida, za katerega je značilno, da je toksičen za človeka. Titanijev oksid je uporaben nanomaterial, ki ima protimikrobne učinke. Uporabljajo ga v kozmetičnih izdelkih, za zgoščevanje zdravil, za večjo obstojnost živil, itd. Previsoke koncentracije titanijevega oksida povzročajo oksidativne poškodbe celic in izzovejo imunski odziv (ZZV MS, 2012b).

## 2.6 VIRUSI V PITNI VODI

Uživanje ustekleničene vode je vedno bolj množičen pojav. Deset do sto norovirusnih delcev je dovolj, da povzročijo gastrointestinalna obolenja (WHO/FAO, 2008). V svetovnem merilu se ocenjuje, da so norovirusi povzročitelji od 30 % do 90 % gastrointestinalnih obolenj (Vinje in sod., 1997). Število obolenj je vedno večje, kar povzroča splošno zaskrbljenost prebivalstva (Koopmans in sod., 2002). Beuret (2003) navaja, da so na trgu izsledili ustekleničene vode, ki so bile kontaminirane z norovirusi. Prisotnost virusov je lahko posledica napačnega rokovanja proizvajalca kot tudi potrošnika.

V Pravilniku o pitni vodi (2004) virusi niso izrecno omenjeni, so pa zajeti v 3. členu, kjer je navedeno, da je pitna voda zdravstveno ustrezna, kadar ne vsebuje mikroorganizmov, parazitov in njihovih razvojnih oblik v številu, ki lahko predstavlja nevarnost za zdravje ljudi.

## 2.6.1 Metode za ugotavljanje virusov v pitnih vodah

Ker je koncentracija virusov v pitni vodi zelo nizka, se pojavi problem praga detekcije. Metoda za detekcijo virusov mora biti lahko dostopna, učinkovita in dovolj občutljiva. Splošna metoda za detekcijo enteričnih virusov je verižna reakcija s polimerazo (Fong in Lipp, 2005). Mnogo let so se uporabljale metode za razmnoževanje virusov na celičnih kulturah za detekcijo le – teh v hrani in vodi. Ugotovili so, da HAV redko povzroči citopatske efekte (Cromeans in sod., 1989; Cromeans in sod., 1987; Gosert in sod., 2000; Venuti in sod., 1985), medtem ko NoV ni možno razmnoževati s pomočjo celičnih linij (Duizer in sod., 2004). Pogosta metoda za detekcijo virusov iz pitnih vod je verižna reakcija z reverzno transkriptazo v realnem času (Butot in sod., 2007).

Z večino metod ponavadi analiziramo vsebino platenke, medtem ko interakcije med embalažo in virusi ponavadi zanemarimo. Zadnje študije so pokazale, da interakcije niso zanemarljive, saj imajo virusi sposobnost vezave na hidrofobne površine (Huguet in sod., 2012). Virus hepatitisa A se veže na stene platenk, ki so iz polietilena (PET) (Boutot in sod., 2007), poliovirus 1 (PV1) se veže na polipropilen (PP) in PET (Gassilloud in Gantzer, 2005; Gassilloud in sod. 2007). Boutot in sod. (2007) so analizo virusov v ustekleničeni vodi razdelili na dva dela, in sicer analizo vsebine platenke in analizo površine platenke. Gassoilloud in sod. (2007) so viruse, vezane na površino platenke, eluirali, kar so dosegli z dodajanjem površinsko aktivnih snovi. Nato so jih koncentrirali na pozitivno nabiti membrani. Glede na rezultate so predlagali, da lahko viruse, glede na sposobnost adhezije, razdelimo v tri skupine: virusi z visoko adsorbcjsko kapaciteto (HAV); virusi ki se ne adsorbirajo na hidrofobne steklenice (norovirus) in virusi, ki se adsorbirajo zaradi bivalentne lastnosti (PV1) (Huguet in sod., 2012).

Kovač in sod. (2009) so iz ustekleničenih vod koncentrirali viruse hepatitisa A in kalcivirus. Na CIM QA® monolitni koloni so skoncentrirali 1,5 l ustekleničene vode (COOP, Bologna, Italija) do končnega volumna 15 ml, katerega so še dodatno koncentrirali z ultracentrifugiranjem. Vzporedno so po metodi Gilgena in sod. (1997) skoncentrirali 1,5 l ustekleničene vode iste serije kot v prej omenjem eksperimentu. Uporabljali so elektropozitivno membrano in eksperiment nadaljevali z ultrafiltracijo. Oba eksperimenta so ovrednotili z metodo RT-qPCR. Ugotovili so, da so bili izkoristki koncentriranja v prvem primeru višji kot v drugem.

Kadar so koncentracije virusnih delcev nizke, jih je potrebno pred detekcijo koncentrirati (humani virusi v pitni vodi). Obstojče in najbolj učinkovite metode temeljijo na adsorbciji virusov na elektropozitivne membrane in njihovem spiranju po adsorbciji (Beuret, 2003; Fout in sod., 2003; Gilgen in sod., 1997). Viruse nato kvantificiramo s polimerazno verižno reakcijo v realnem času. Navedena metoda je še posebej primerna za viruse, ki jih ne moremo gojiti in razmnoževati na celičnih kulturah (humani norovirus) (Fout in sod., 2003; Haramoto in sod., 2004; Kukkula in sod., 1999).

### 3 MATERIALI IN METODE

V diplomskem delu smo uporabljali različne materiale, aparature in izvajali metode za ugotavljanje celokupnega števila virusnih delcev in števila infektivnih virusnih delcev ter njihove velikoti.

#### 3.1 MATERIALI

Pri izvajanju eksperimentalnega dela diplome smo uporabljali spodaj naštete materiale za namnoževanje adenovirusov s transfekcijo celične linije HEK 293, čiščenje virusnega materiala na CIM® monolitnih kolonah, ugotavljanje števila celokupnih in infektivnih virusnih delcev, pri tangencialni pretočni filtraciji (TFF) in transmisijski elektronski mikroskopiji (TEM).

Pri izvajanju vseh metod smo uporabljali plastiko TPP® (Technical plastic product).

##### 3.1.1 Materiali za namnoževanje adenovirusov s transfekcijo celične linije HEK 293

- celice HEK 293 (DSMZ, Braunschweig, Nemčija (ACC 305))
- NUNC
  - Večpladenjski sistem Nunclon TM Δ Cell factory-CF (140004)

##### 3.1.2 Materiali za čiščenje virusnega materiala na CIM® monolitnih kolonah

- Bia Separations d. o. o.
  - CIM® QA monolitni disk (210.5113)
  - CIM® SO<sub>3</sub> monolitni disk (211.6157)

##### 3.1.3 Materiali za ugotavljanje števila infektivnih virusnih delcev

V diplomskem delu smo za ugotavljanje števila infektivnih virusnih delcev uporabljali spodaj naštete materiale pri metodi plakov in testu končne razredčitve.

###### 3.1.3.1 Metoda plakov

- GOLIAS
  - Sterilne petrijevke s premerom 96 mm
- Sigma Aldrich
  - Luria Broth gojišče (LB gojišče) (51208)
- Biolife
  - Tehnični agar (401810)
- BRAND- Duran
  - 50 ml erlenmajerice (92817)

### 3.1.3.2 Test končne razredčitve (EPD)

- IWAKI
  - Mikrotitrskie plošče s 96 luknjicami z ravnim dnom (3860-069)

## 3.1.4 Materiali za ugotavljanje celokupnega števila virusnih delcev

V diplomskem delu smo pri ugotavljanju celokupnega števila virusnih delcev uporabljali spodaj naštete materiale pri testu hemaglutinacije in metodi NTA.

### 3.1.4.1 Test hemaglutinacije

- GOLIAS
  - Mikrotitrskie plošče s 96 luknjicami z dnom v obliki črke U
- Eritrociti (Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Rodica)
- Cambrex
  - DPBS (Dulbecco's phosphate buffer saline (17-512F))

### 3.1.4.2 Metoda NTA

- Cambrex:
  - DPBS (Dulbecco's phosphate buffer saline (17-512F))
- Eppendorf
  - Safe-Lock epice 1ml (0030121.023)

## 3.1.5 Materiali, uporabljeni pri tangencialni pretočni filtraciji

- Millipore
  - membrana PELLICON XL 10000kD NMWC
  - membrana HOLLOW fiber 1750000 kD NMWC

## 3.1.6 Materiali, uporabljeni pri transmisijski elektronski mikroskopiji

- Bakrena mrežica, Athene Thin Bar Grids, 400 mesh, 3.05mm O.D., Copper

## 3.1.7 Aparature

V diplomskem delu smo uporabljali naštete aparature za namnoževanje adenovirusa, pri metodi NTA, in pri kromatografskem čiščenju na HPLC sistemu.

### 3.1.7.1 Aparature za namnoževanje adenovirusa s transfekcijo celic HEK 293

- IBS Integra Biosciences
  - Vacusafe – posoda za odstranjevanje gojišča ali pufra iz posode za gojenje celičnih kultur in infekcijo le-teh

- Sanyo
  - CO<sub>2</sub> inkubator, ki zagotavlja konstantno temperaturo 37 °C, primerno vlažnost in 5 % CO<sub>2</sub> v atmosferi

### 3.1.7.2 Aparature za sistem HPLC

- HPLC sistem Knauer (Berlin, Nemčija)
- UV-VIS detektor K-2500
- črpalka K-500

### 3.1.7.3 Aparature za izvedbo metode NTA

- Nanosight® instrument
- Računalnik s programsko opremo
- Ultrazvočna kopel
- Vibracijsko mešalo
- Biološka brezprašna komora

## 3.1.8 Kemikalije

- Antek/ Krka
  - Virkon prašek
- Merck (Calbiochem®)
  - Etansulfonska kislina - hepes (391340)
  - Natrijev korid (1.06404.1000)
  - Magnezijev diklorid (442615)
  - Tris (648310)
  - Etanol (1009831000 )

## 3.1.9 Lateksni delci

Uporabljali smo lateksne delce s premerom 120 nm (Christine Gröpl, Tulln, Avstrija, Polystyrene latex, R=0,120 µm; s130-1) s koncentracijo 1,05 x 10<sup>12</sup> delcev/ml.

## 3.1.10 Ustekleničena pitna voda

Vzorce pitne ustekleničene vode smo kupili v trgovini. Izbrali smo produkte petih različnih slovenskih proizvajalcev.

## 3.1.11 Virusni delci

Uporabljali smo adenoviruse Ad5, viruse influence H1N1, viruse influence F140 in bakteriofage λ (Bia Separations, Ljubljana).

## 3.2 METODE

Z različnimi metodami smo predpripravljali virusni material in ugotavljal koncentracijo celokupnih in infektivnih virusnih delcev ter njihovo velikost.

### 3.2.1 Metode za predpripravo virusnega materiala

Z metodami za prepripravo virusnega materiala smo namnoževali adenoviruse s transfekcijo celične linije HEK 293, kromatografsko čistili virusni material na različnih nosilcih, namnoževali viruse influence in bakterifage in jih koncentrirali.

#### 3.2.1.1 Namnoževanje adenovirusov s transfekcijo celične linije HEK 293

Adenovirus smo pomnoževali s transfekcijo celične linije HEK 293. Celice smo nasadili na večpladenjski sistem (CF) proizvajalca Nunc (Nunclon<sup>TM</sup>Δ Nunclon Cell factory). Ko so celice dosegle predkonfluentno rast (skoraj preraščena površina pladnja s celicami, ki smo jo opazovali z invertnim mikroskopom), smo dodali virusno suspenzijo z multipliciteto infekcije (MOI) 10 in 50. Po nekajdnevni inkubaciji v CO<sub>2</sub> inkubatorju, pri temperaturi 37 °C, smo spremljali citopatogeni učinek (CPU) na celice z opazovanjem z invertnim mikroskopom. Žetev smo opravili, ko je bil vizualno ocenjen CPU med 80 % in 100 % na predkonfluentni rasti celic. Z metodo NTA in EPD testom smo ovrednotili razmerje med celokupnim številom virusnih delcev in infektivnimi virusnimi delci.

Gojišče z okuženimi celicami smo zamrznili na -100 °C, jih odmrznili na sobni temperaturi in ponovno zamrznili na -100 °C. Z nizko temperaturo smo mehansko poškodovali celice in povzročili sprostitev virusov, nato pa gojišče z virusi in mehansko poškodovanimi celicami centrifugirali. Supernatant smo odstranili, pelet (virusni delci) pa raztopili v ustreznom delovnem pufru.

Preden smo očistili pripravek adenovirusa na sistemu za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti, smo dodajali encim nukleazo. Suspenzijo virusnega pripravka z nukleazo smo inkubirali 2 uri na vodni kopeli pri temperaturi 37 °C. Z metodo NTA smo ovrednotili razliko med žetvijo brez dodane nukleaze in z dodano nukleazo.

#### 3.2.1.2 Čiščenje adenovirusov na CIM<sup>®</sup> QA monolitni koloni

Za čiščenje žetve smo uporabljali gradientni Knauer HPLC sistem (Berlin, Nemčija). Sestavljen je bil iz dveh črpalk K-500, UV-VIS detektorja K-2500, ki je meril absorbanco pri 280 nm, značilno za detekcijo proteinov. K sistemu smo dodali tudi detektor prevodnosti (GE Healthcare, Uppsala, Švedska). Vse komponente so bile povezane s PEEK kapilarami s premerom 0,75 mm. Adenovirus smo očistili na močnem anionskem izmenjevalcu CIM<sup>®</sup> QA monolitni koloni (Bia Separations, Ljubljana). Uporabljali smo 50 mM Tris pufer, ki je vseboval 2 mM MgCl<sub>2</sub> in 0,4 M NaCl s pH 8,0.

### 3.2.1.3 Namnoževanje virusov influence

Uporabljali smo virusni sev A/Salomon Islands/3/2006, oziroma sev H1N1. Virusi influence so bili gojeni v kokošjih jajcih in inaktivirani z  $\beta$ -propionlaktonom. Nato so bili očiščeni s konškim centrifugiranjem v saharoznem gradientu in pred nalaganjem na kromatografski nosilec filtrirani skozi 0,45  $\mu\text{m}$  filter. Žetev smo ovrednotili s testom hemaglutinacije in metodo NTA.

### 3.2.1.4 Čiščenje virusov influence na CIM<sup>®</sup> SO<sub>3</sub> monolitni koloni

Za čiščenje žetve smo uporabljali gradientni Knauer HPLC sistem (Berlin, Nemčija). Sestavljen je bil iz dveh črpalk K-500, UV-VIS detektorja K-2500, ki je bil nastavljen na absorbanco 280 nm, značilno za detekcijo proteinov. K sistemu smo dodali tudi detektor prevodnosti (GE Healthcare, Uppsala, Švedska). Vse komponente so bile povezane s PEEK kapilarami, ki so imele premer 0,75 mm. Virus influence smo očistili na močnem kationskem izmenjevalcu (CIM<sup>®</sup> SO<sub>3</sub> monolitna kolona; Bia Separations, Ljubljana). Uporabljali smo pufer 50 mM hepes s pH 7,5.

### 3.2.1.5 Namnoževanje bakteriofagov

V tekoče gojišče LB smo inokulirali bakterije rodu *E. coli* (DSMZ, Braunschweig, Nemčija). Suspenzijo smo namestili v stresalnik s 120 obrati/min pri 37 °C. Ko je bila koncentracija bakterij v gojišču  $5,0 \times 10^7$  bakterij/ml, smo dodali še inokulum bakteriofagov  $\lambda$  (DSMZ, Braunschweig, Nemčija) s koncentracijo  $1,0 \times 10^8$  bakteriofagov/ml. Suspenzijo smo ponovno namestili v stresalnik s 120 obrati/min pri 37 °C. Ko je potekla liza, smo brozgo centrifugirali in opravili žetev. Žetev smo nato skoncentrirali s tangencialno pretočno filtracijo.

### 3.2.1.6 Koncentriranje bakteriofagov s tangencialno pretočno filtracijo (TFF)

Za koncentriranje smo uporabili 50mM Tris pufer (Merck) in dva tipa membran: PELLICON XL 10000kD NMWC (spiralni modul) in HOLLOW fiber 1750000 kD NMWC (modul z votlimi vlakni). Oba koncentrata smo ovrednotili z metodo plakov in metodo NTA.

## 3.2.2 Metode za ugotavljanje celokupnega števila virusnih delcev

V diplomskem delu smo s testom hemaglutinacije in metodo NTA ugotavljalci celokupno število virusnih delcev. Z opazovanjem pod presevnim elektronskim mikroskopom smo ugotavljalci velikost virusnih delcev, ki smo jo v nadaljevanju diplomskega dela prevzeli kot referenčno.

### 3.2.2.1 Test hemaglutinacije

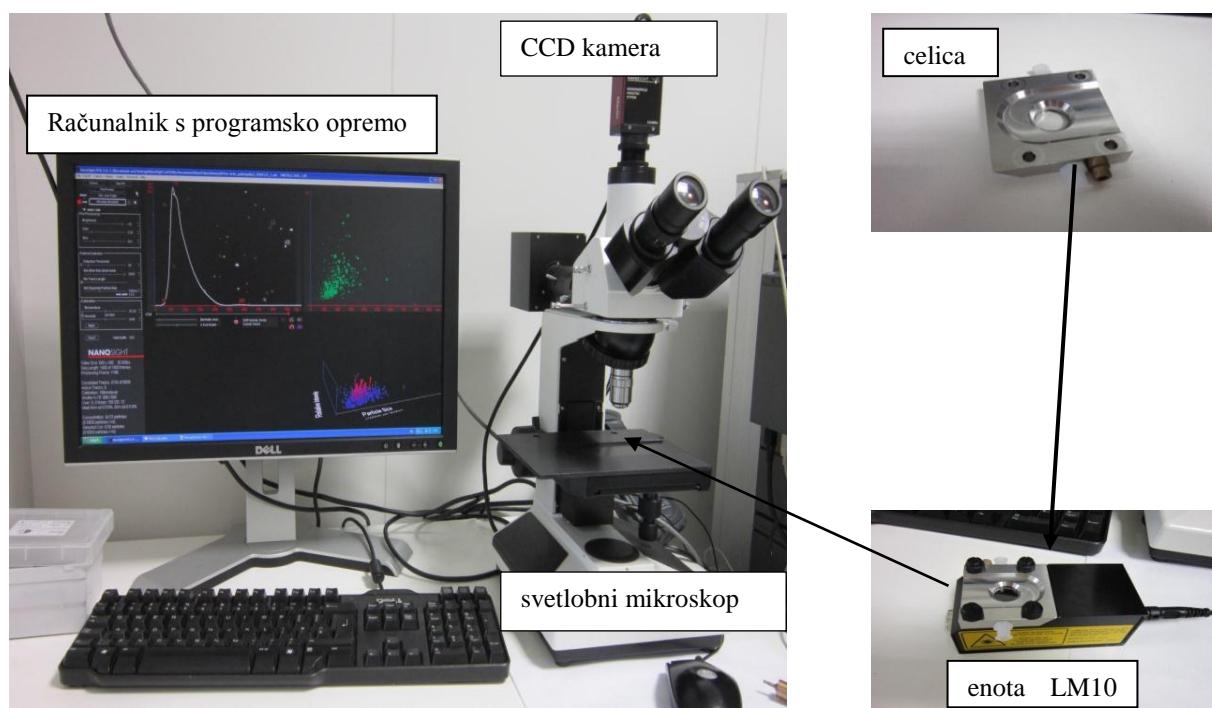
Število infektivnih virusnih delcev smo določili s testom hemaglutinacije (HA). Kot indikator prisotnosti virusa smo uporabljali kokošje eritrocite s standardno koncentracijo. Pripravili smo serijo naraščajoče razredčitvene vrste virusnega pripravka. Znan volumen smo prenesli na mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami v obliki črke U. Nato smo dodali raztopino eritrocitov in mikrotitrsko ploščo inkubirali 60 min. Pozitiven rezultat hemaglutinacije pomeni, da je

prišlo do aglutinacije oziroma zlepjanja eritrocitov, ki imajo na svoji površini določene antogene, s specifičnimi protitelesi (Hierholzer in sod., 1969).

### 3.2.2.2 Metoda sledenja nanodelcem (NTA)

Z metodo smo ugotavljali velikost in koncentracijo virusnih delcev. Metodo smo izvedli z instrumentom NanoSight LM10 (NanoSight, Amesbury, Velika Britanija), ki je sestavljen iz svetlobnega mikroskopa, CCD kamere (angl. coupled charge device), enote LM10 (mesto, kamor vbrizgamo vzorec) z izvorom laserske svetlobe in računalnika s programsko opremo 2.0 Analytical software, release version build 0.125 NTA (angl. Nanoparticle Tracking Analysis) (Slika 2)

Na mikroskopu je nameščena posebna zaklopka, ki omogoča prikaz vidnega polja pod objektivom na računalniškem ekranu. S CCD kamero smo posneli gibanje delcev. Videoposnetek je bil dolg 60 s. S pomočjo zgoraj omenjenega programa smo posnetek gibanja delcev analizirali (Slika 2).



Slika 2: Instrument NanoSight z računalnikom in enoto LM10 s celico.

Celico smo pred začetkom uporabe in po končanem delu 10 min inkubirali v 1% raztopini virkona. Nato smo jo sprali z destilirano vodo, 70 % etanolom in počakali, da se enota posuši. Sušenje smo pospešili z uporabo krpic. Zatem smo celico prepihalo z zrakom, da smo odstranili morebitne ostanke nečistoč. Po tem postopku smo z brizgo injicirali vzorec v celico.

Med samim delom smo celico, v zgoraj omenjem vrstnem redu, intenzivno spirali pred vsakim ponovnim injiciranjem. Kadar smo pripravljali razredčitve virusnih pripravkov, smo delo opravljali v biološko varni komori.

Pripravili smo najmanj dve različni razredčitvi vzorca in vsako analizirali dvakrat. Vzorce smo pripravljali s pufrom 1x DPBS (virusni delci) ali pa z destilirano vodo (lateksni delci). Vsak vzorec smo dobro premešali na vibracijskem mešalu, vsaj 20 sekund. Razredčitve smo pripravljali po principu naraščajoče razredčitvene vrste.

### **3.2.3 Elektronska mikroskopija**

Z opazovanjem virusnih pripravkov pod elektronskim mikroskopom smo ugotavljali velikost virusnih delcev in prisotnost virusnih agregatov.

#### **3.2.3.1 Priprava mrežice za presevni elektronski mikroskop**

Na bakreno mrežico (Athene Thin Bar Grids, 400 mesh, 3,05 mm O.D., Copper) smo nanesli 10-15  $\mu\text{l}$  virusnega pripravka. Mrežico z nanesenim pripravkom smo inkubirali 5-10 min, da se je del virusnih delcev usedel. Odvečno količino virusnega pripravka smo odstranili s filtrnim papirjem. Nato smo dodali 3-4 kapljice 1% vodne raztopine uranil acetata in odvečni volumen ponovno odstranili s filtrnim papirjem. Vzorce so analizirali na Nacionalnem inštitutu za biologijo v Ljubljani.

### **3.2.4 Metode za ugotavljanje števila infektivnih virusnih delcev**

S testom končne razredčitve in metodo plakov smo ugotavljali število infektivnih virusnih delcev.

#### **3.2.4.1 Test končne razredčitve (EPD)**

Z metodo smo določili koncentracijo infektivnih virusnih delcev. Znan volumen razredčenega adenovirusa smo prenesli v mikrotitrsko ploščo s 96 luknjicami, z ravnim dnom. Nato smo dodali še indikator. Po petdnevni inkubaciji smo s svetlobnim mikroskopom opazovali citopatogeni učinek. Po statistični metodi smo izračunali titer infektivnih virusov (Munich in Reed, 1938).

#### **3.2.4.2 Metoda plakov**

Metoda plakov je postopek, s katerim smo ugotavljali število bakteriofagov oziroma njihovo koncentracijo (PFU/ml). Pripravili smo mehki agar (Tehnični agar Biolife; c = 6 g/l in LB tekoče gojišče; c = 25 g/l), ki smo ga inkubirali na vodni kopeli pri temperaturi 50 °C. V 7 ml mehkega agarja smo dodali 50  $\mu\text{l}$  kulture *E. coli* in enak volumen ustrezno razredčenega faga. Suspenzijo smo nežno premešali in jo enakomerno prenesli v petrijevko s trdim agarjem (Tehnični agar Biolife; c = 15 g/l in LB tekoče gojišče; c = 25 g/l). Plošče smo inkubirali preko noči pri temperaturi 37 °C (Dulbecco, 1952).

## 4 REZULTATI

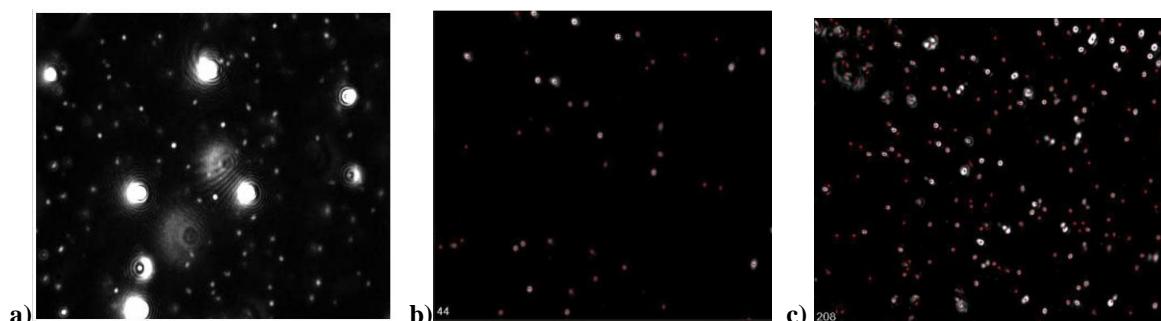
Ovrednotili smo nespecifično metodo sledenja nanodelcem za ugotavljanje koncentracij in velikosti različnih virusnih delcev, skladno z delovnimi hipotezami. Delo je bilo opravljeno v obdobju od 21.09.2009 do 21.06.2010 in je predstavljeno kot sledi v naslednjih poglavjih.

### 4.1 OPTIMIZACIJA NASTAVITEV INSTRUMENTA NTA Z UGOTAVLJANJEM VELIKOSTI IN KONCENTRACIJE LATEKSNIH DELCEV

Osnovne nastavitev naprave smo optimizirali z referenčnimi lateksnimi delci s koncentracijo  $1,05 \times 10^{12}$  delcev/ml in velikostjo 120 nm (Christine Gröpl, Tulln, Avstrija). V nadaljevanju diplomskega dela smo želeli ugotoviti, ali je metoda NTA primerna za ugotavljanje koncentracij in velikosti različnih virusnih delcev v posameznih fazah gojenja in čiščenja s kromatografskimi tehnikami. Uporabljali smo adenoviruse, viruse influence in bakteriofage. Poleg tega smo želeli preizkusiti, ali je metoda NTA primerna za ugotavljanje prisotnosti virusov v ustekleničenih vodah.

#### 4.1.1 Optimizacija nastavitev kamere

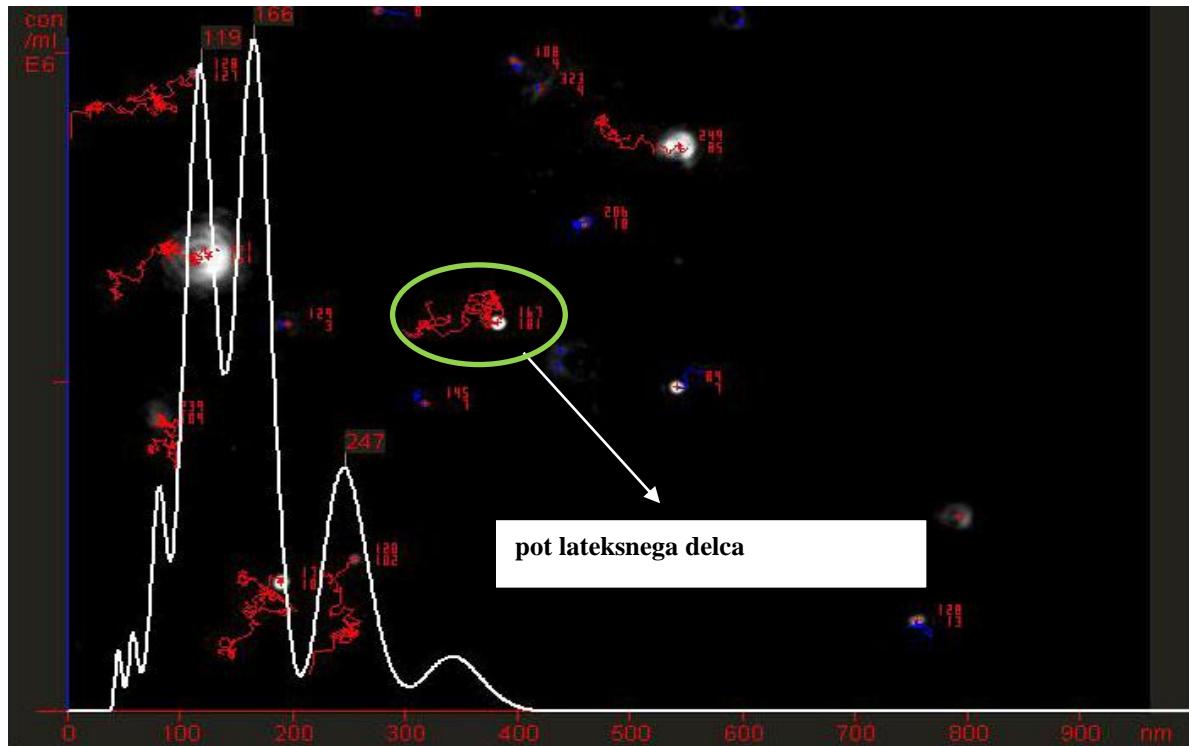
Pripravili smo pet različnih razredčitev (Preglednica 1) in jih injicirali v analizno celico. Sliko gibajočih se lateksnih delcev smo izostrili s sprememanjem ojačanja in zaklopa (Slika 3). Posneli smo videoposnetek, ki je trajal 60 s.



Slika 3: Optimizacija parametrov kamere pred snemanjem in pred analizo posnetka: a) optimalno nastavljena parametra ojačanje in zaklop; b) ustrezna razredčitev; c) neprimerna razredčitev.

#### 4.1.2 Ugotavljanje koncentracije in velikosti lateksnih delcev

Vsako razredčitev smo analizirali v treh ponovitvah (Preglednica 1). Z analizo okvirjev smo ugotovili povprečno število delcev, število poti (Slika 4), velikost lateksnih delcev, koncentracijo lateksnih delcev in porazdelitveno funkcijo velikosti ter koncentracije lateksnih delcev (Slika 3 in Slika 4). Podatke smo shranili v obliki poročila, ki smo ga pridobili z orodjem programske opreme NTA (priloga A).



Slika 4: Funkcija porazdelitve velikosti in koncentracije lateksnih delcev ter njihove poti.

Na podlagi rezultatov programske analize smo izračunali povprečno koncentracijo lateksnih delcev, meritveni faktor, teoretični faktor in razmerje med obema. Meritveni faktor smo definirali kot razmerje med povprečno izmerjeno koncentracijo lateksnih delcev manjše razredčitve in povprečno izmerjeno koncentracijo lateksnih delcev večje razredčitve. Teoretični faktor smo definirali kot razmerje med višjim razredčitvenim faktorjem in nižjim razredčitvenim faktorjem (Preglednica 1).

Upoštevali smo tiste koncentracije in velikosti lateksnih delcev, pri katerih je bilo povprečno število delcev med 20 in 60, število zaključenih poti nad 200, razmerje med teoretičnim in meritvenim faktorjem pa med 0,8 in 1,2. Povprečno število delcev in število zaključenih poti sta bila kriterija, zastavljena s strani proizvajalca, ki sta morala biti izpolnjena za ustrezno meritev.

Ugotovili smo, da je bila koncentracija lateksnih delcev  $1,06 \times 10^{12}$  delcev/ml, povprečna velikost lateksnih delcev pa 124 nm. Koncentracijo smo izračunali kot povprečje koncentracij lateksnih delcev pri razredčitvah 1 : 1500, 1 : 2000 in 1 : 3000. Omenjene razredčitve izpolnjujejo kriterije, ki so bili število zaključenih poti, povprečno število delcev in razmerje med teoretičnim in merityenim faktorjem (Preglednica 1).

**Preglednica 1: Meritve koncentracije in velikosti lateksnih delcev.**

		NASTAVITVE KAMERE						NASTAVITVE PARAMETROV PRED NTA PROGRAMSKO ANALIZO						PODATKI NTA PROGRAMSKE ANALIZE OKVIRJEV						IZRAČUNANI REZULTATI			
R	P	S	G	B	D <small>T</small>	BL	N	$\bar{N}$	Število poti	Velikost delcev (nm)	C (delci/ml) - razredčitev ni upoštevana	$\bar{C}$ (delci/ml)	TF	MF	TF/ MF								
1000	1	1334	428	-15	2	30	3 x 3	58	63	2080	112	1,02 x 10 <sup>9</sup>											
	2	1334	428	-15	2	30	3 x 3	83	67	2120	113	1,09 x 10 <sup>9</sup>											
	3	1334	428	-15	2	30	3 x 3	88	70	2186	122	1,13 x 10 <sup>9</sup>											
1500	1	920	302	-15	2	30	3 x 3	48	39	1055	123	6,33 x 10 <sup>8</sup>											
	2	920	302	-15	2	30	3 x 3	53	44	1100	131	7,05 x 10 <sup>8</sup>											
	3	920	302	-15	2	30	3 x 3	52	50	1271	122	8,09 x 10 <sup>8</sup>	7,16 x 10 <sup>8</sup>	1,07 x 10 <sup>12</sup>	1,5	1,5	1,0						
2000	1	920	302	-15	2	30	3 x 3	31	37	1073	157	5,90 x 10 <sup>8</sup>											
	2	920	302	-15	2	30	3 x 3	32	31	812	137	5,07 x 10 <sup>8</sup>											
	3	920	302	-15	2	30	3 x 3	29	21	655	112	3,41 x 10 <sup>8</sup>	4,79 x 10 <sup>8</sup>	9,59 x 10 <sup>12</sup>	1,5	1,3	0,9						
3000	1	920	326	-15	2	30	3 x 3	23	24	835	108	3,80 x 10 <sup>8</sup>											
	2	920	326	-15	2	30	3 x 3	20	24	533	106	3,84 x 10 <sup>8</sup>											
	3	920	326	-15	2	30	3 x 3	26	24	694	123	3,84 x 10 <sup>8</sup>	3,83 x 10 <sup>8</sup>	1,15 x 10 <sup>12</sup>	1,3	1,5	1,2						
10000	1	1000	450	-15	2	30	3 x 3	12	13	318	118	2,12 x 10 <sup>8</sup>											
	2	1000	450	-15	2	30	3 x 3	14	13	400	134	2,03 x 10 <sup>8</sup>											
	3	1000	450	-15	2	30	3 x 3	23	13	256	205	2,18 x 10 <sup>8</sup>	2,11 x 10 <sup>8</sup>	2,11 x 10 <sup>12</sup>	1,8	3,0	1,8						

R= razredčitev  
P= ponovitev  
S= zaklop  
G= ojačanje  
B= svetlost  
DT= prag zaznave  
BL= zameglenost

N= število delcev  
 $\bar{N}$ = povprečno število delcev  
C= koncentracija  
 $\bar{C}$ = povprečna koncentracija  
MF= meritveni faktor  
TF= teoretični faktor  
TF/MF= razmerje med teoretičnim  
in meritvenim faktorjem

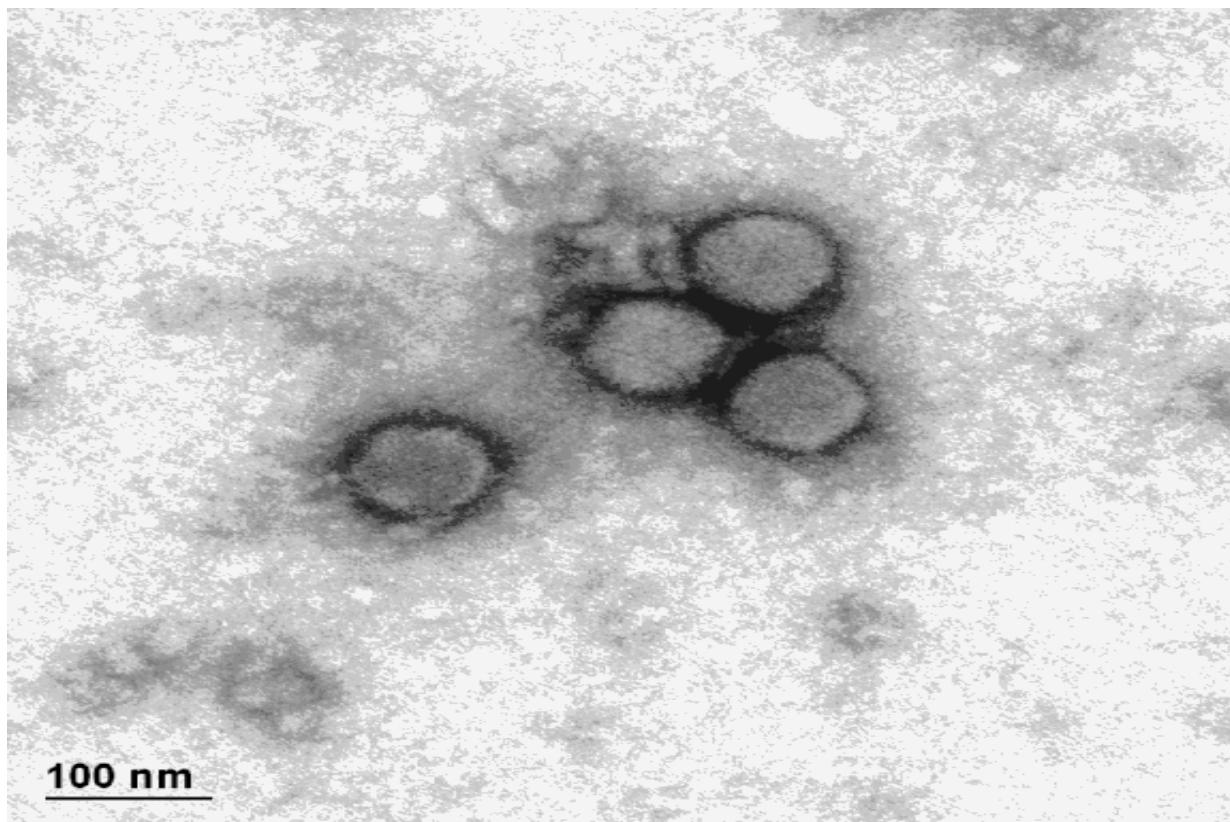
Opomba: Okrepljene vrednosti v Preglednici 1 predstavljajo ponovitve dveh razredčitev, ki jih nismo upoštevali. Pri razredčitvi v razmerju 1 : 1000 je povprečno število delcev več kot 60, pri razredčitvi 1 : 10000 pa je število zaključenih poti manjše kot 200 (Preglednica 1).

## 4.2 UGOTAVLJANJE VELIKOSTI IN KONCENTRACIJE ADENOVIRUSOV

Z metodo NTA smo ugotavljali razmerje med celokupnim številom virusnih delcev in številom infektivnih adenovirusov, njihovo velikost in koncentracijo v fazi gojenja in čiščenja. Za primerjavo smo velikost virusnih delcev ugotavljali na podlagi mikrografij z opazovanjem pod elektronskim mikroskopom. Z EPD testom smo ugotavljali število infektivnih virusnih delcev.

### 4.2.1 Ugotavljanje velikosti in koncentracije celokupnih in infektivnih virusnih delcev

Velikost in stanje agregiranosti adenovirusov smo ugotavljali z elektronskim mikroskopom. Na podlagi mikrografij smo ugotovili, da je bila velikost adenovirusnega delca, ki smo ga analizirali, v razponu med 90 in 100 nm (Slika 5). Podobne podatke navajajo tudi Renteria in sod. (2010).



Slika 5: Mikrografija adenovirusov (foto: Tušek-Žnidarič M.).

Z metodo NTA smo ugotavljali koncentracijo celokupnega števila adenovirusov, ki smo jih namnožili s transfekcijo celic HEK 293. Število infektivnih adenovirusov smo ugotavljali z EPD testom. Razmerje med celokupnim številom in številom infektivnih virusnih delcev je

namreč pomemben parameter kakovosti v proizvodnji cepiv in na področju genske terapije (Dormond, 2003). Izračunali smo, kakšna so bila razmerja med celokupnim številom virusnih delcev in številom infektivnih virusnih delcev.

Z namenom optimizacije namnoževanja smo ugotavljali število celokupnih virusnih delcev z metodo NTA in število infektivnih virusnih delcev z EPD testom pri dveh različnih multiplicitetah infektivnosti (MOI). Pri MOI 50 je bila koncentracija celokupnega števila adenovirusov  $3,1 \times 10^{11}$  virusnih delcev/ml, koncentracija infektivnih pa  $2,5 \times 10^9$  virusnih delcev/ml. Pri MOI 10 je bila koncentracija celokupnega števila adenovirusov  $1,7 \times 10^{11}$  virusnih delcev/ml, koncentracija infektivnih pa  $4,0 \times 10^9$  virusnih delcev/ml. Razmerja med celokupnimi in infektivnimi delci so bila pri testiranih MOI različna (Preglednica 2).

**Preglednica 2: Koncentracije in razmerje med celokupnim številom adenovirusov in številom infektivnih adenovirusov.**

	C (virusni delci/ml)		Razmerje med celokupnimi in infektivnimi virusnimi delci
	metoda NTA (celokupno število virusnih delcev)	test EPD (število infektivnih virusnih delcev)	
<b>MOI 50</b>	$3,1 \times 10^{11}$	$2,5 \times 10^9$	120 : 1
<b>MOI 10</b>	$1,7 \times 10^{11}$	$4,0 \times 10^9$	42 : 1

#### **4.2.2 Ugotavljanje koncentracije virusnih delcev v žetvi z dodajanjem standardnega dodatka**

Z metodo standardnega dodatka smo ugotavljali napako merjene koncentracije virusnih delcev v žetvi. Kot standardni dodatek smo uporabljali lateksne delce s koncentracijo  $5,25 \times 10^8$  delcev/ml in velikostjo 120 nm. Koncentracija virusnih delcev v žetvi je bila  $3,4 \times 10^8$  delcev/ml na podlagi meritev z metodo NTA (Preglednica 3).

Nato smo žetvi dodali standardni dodatek in izmerili koncentracijo žetve s standardnim dodatkom  $7,8 \times 10^8$  delcev/ml. Razliko med koncentracijo žetve s standardnim dodatkom in koncentracijo žetve brez standardnega dodatka smo poimenovali izračunan standardni dodatek. Ugotovili smo, da je bila koncentracija izračunane standardne dodatke žetve  $4,4 \times 10^8$  delcev/ml (Preglednica 3).

Koncentracijo izračunane standardne dodatke smo primerjali s teoretično koncentracijo standardnega dodatka. Ugotovili smo, da smo naredili 16 % napako (preglednica 3), ki smo jo izračunali s pomočjo enačbe:

$$\text{Ocena napake} = 100 \% - \left( \frac{C_{ST \text{izračunano}}}{C_{ST \text{teoretično}}} \right) * 100 \quad \dots(3)$$

**Preglednica 3: Ocena napake pri ugotavljanju koncentracije adenovirusov v žetvi ( $C_{ST}$  = koncentracija standardnega dodatka).**

	C (delci/ml)	C <sub>z ST</sub> (delci/ml)	C <sub>ST izračunano</sub> (delci/ml)	Ocena napake (%)
<b>ŽETEV</b>	$3,4 \times 10^8$	$7,8 \times 10^8$	$4,42 \times 10^8$	16

#### 4.2.3 Ugotavljanje koncentracije in velikosti adenovirusov med kromatografskim čiščenjem

Adenoviruse, ki smo jih pripravili s transfekcijo celic, smo nadalje procesirali in očistili na kromatografskih kolonah. Analizirali smo žetev, kateri smo dodali nukleazo in jo primerjali z analizo žetve, kjer nukleaze nismo uporabljali. Želeli smo ugotoviti, ali dodajanje deoksiribonukleaze vpliva na agregacijo virusnih delcev. Izmerili smo, da je bila povprečna koncentracija virusnih delcev v žetvi brez dodane nukleaze  $3,4 \times 10^{10}$  virusnih delcev/ml, v žetvi z dodano nukleazo pa  $1,9 \times 10^{10}$  virusnih delcev/ml. Povprečna velikost virusnih delcev je bila v žetvi brez dodane nukleaze 120 nm, v virusnem pripravku z dodano nukleazo pa 114 nm (Pregledanica 4).

Preglednica 4: Predpriprava vzorca z nukleazo.

	C (virusni delci/ml)	Velikost virusnih delcev (nm)
Žetev brez nukleaze	$3,5 \times 10^{10}$	120
	$3,2 \times 10^{10}$	119
Žetev z nukleazo	$1,6 \times 10^{10}$	113
	$2,1 \times 10^{10}$	115

Čiščenje žetve smo nadaljevali na močnem anionskem izmenjevalcu, in sicer na monolitni koloni CIM® QA. Z metodo NTA smo ugotavljali prisotnost in koncentracijo celokupnih adenovirusov v pobranih frakcijah, medtem ko smo z EPD testom ugotavljali koncentracijo infektivnih adenovirusov. Prav tako smo ovrednotili učinkovitost kromatografskega čiščenja. Analizirali smo žetev, nevezni virusni material (FT) in elucijo, v kateri smo pričakovali največ adenovirusov (Preglednica 5).

Ugotovili smo, da je bila koncentracija celokupnih adenovirusov v žetvi  $3,7 \times 10^{11}$  virusnih delcev/ml, v FT  $4,1 \times 10^9$  virusnih delcev/ml, v eluciji pa  $2,1 \times 10^{11}$  virusnih delcev/ml. Na podlagi pridobljenih meritev smo izračunali učinkovitost kromatografskega čiščenja, ki je znašala 59 %. Z EPD testom smo ugotovili, da je bila koncentracija infektivnih adenovirusov v žetvi  $3,6 \times 10^9$  virusnih delcev/ml, v FT  $2,6 \times 10^4$  virusnih delcev/ml in v eluciji  $2,4 \times 10^9$  virusnih delcev/ml. Izkoristek čiščenja je bil 66,7 % (Preglednica 5).

Preglednica 5: Analiza frakcij z metodo NTA in EPD testom, pridobljenih s kromatografskim čiščenjem.

		EPD			NTA		
Frakcija	V (ml)	PFU/ml	PFU	Y (%)	VP/ml	VP	Y (%)
Žetev	36,0	$1,0 \times 10^8$	$3,6 \times 10^9$		$1,0 \times 10^{10}$	$3,7 \times 10^{11}$	
FT	26,0	$1,0 \times 10^3$	$2,6 \times 10^4$	0,0	$1,6 \times 10^8$	$4,1 \times 10^9$	1,1
Elucija	1,2	$2,0 \times 10^9$	$2,4 \times 10^9$	66,7	$1,8 \times 10^{11}$	$2,1 \times 10^{11}$	57,9
				<b>Σ66,7</b>			<b>Σ59,0</b>

#### 4.2.4 Vpliv odtajanja in zamrzovanja na velikost in koncentracijo adenovirusov

Zaradi verjetnosti agregacije pri razvoju proizvodnega procesa adenovirusov smo proučevali vpliv zamrzovanja in odtajanja. Kromatografsko očiščene adenoviruse smo shranili na -80 °C. V začetku delovnega dneva smo jih oddtajali, izmerili koncentracijo in velikost ter jih ponovno zamrznili na -80 °C. Meritev smo izvajali enkrat na dan. Postopek smo ponovljali štiri dni (Preglednica 6).

Ugotovili smo, da je bila povprečna koncentracija  $1,30 \times 10^8$  virusnih delcev/ml, koeficient variacije pa 14,1 %. Povprečna velikost virusnih delcev je bila 133 nm in koeficient variacije 6 % (Preglednica 6). Velikost virusnih delcev se je v štirih dnevih nekoliko povečala, koncentracija pa je ostala približno enaka.

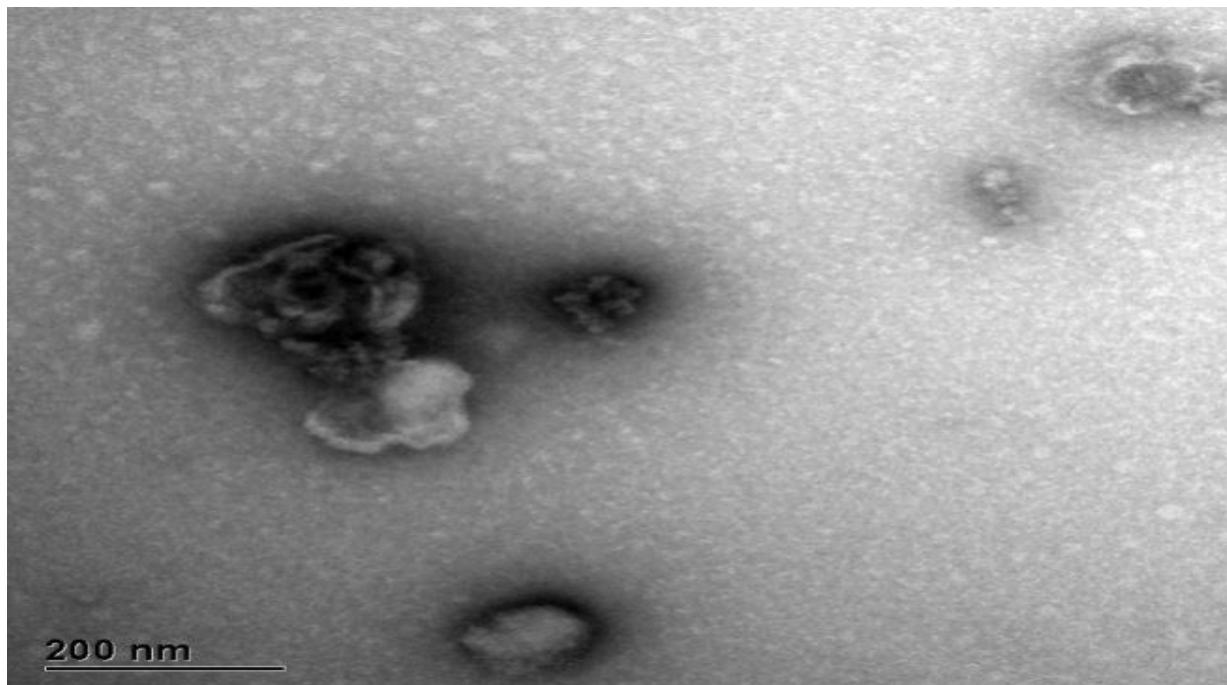
Preglednica 6: Vpliv odtajanja in zamrzovanja na velikost in koncentracijo adenovirusov.

	C (virusni delci/ml)	$\bar{C}$ (virusni delci/ml)	Velikost virusnih delcev (nm)	Povprečna velikost virusnih delcev (nm)
DAN 1	$1,2 \times 10^{10}$	$1,3 \times 10^{10}$	127	133
DAN 2	$1,5 \times 10^{10}$		125	
DAN 3	$1,4 \times 10^{10}$		140	
DAN 4	$1,1 \times 10^{10}$		140	
STDV	$1,8 \times 10^9$		8	
KV (%)	14,1		6	

### 4.3 UGOTAVLJANJE VELIKOSTI IN KONCENTRACIJE VIRUSOV INFLUENCE

Ugotavljeni smo koncentracijo in velikost virusov influence. Nagojili smo jih v kokošjih jajcih in inaktivirali z  $\beta$ -propionlaktonom. Nato smo jih očistili z ultracentrifugiranjem v saharoznem gradientu in pred nalaganjem na kromatografski nosilec filtrirali skozi 0,45  $\mu\text{m}$  filter. Žetev smo ovrednotili s testom hemaglutinacije in metodo NTA.

Z elektronskim mikroskopom smo analizirali žetev. Ugotovili smo, da je bila velikost virusnega delca influence 200 nm (Slika 6). V literaturi navajajo, da je velikost virusov influence med 80 in 120 nm (Urbas, 2011). Razlika glede na literurne podatke je precejšnja.



Slika 6: Mikrografija virusov influence (foto: Tušek-Žnidarič M.).

#### 4.3.1 Ugotavljanje koncentracije in velikosti virusov influence med kromatografskim čiščenjem

Žetev smo nadalje očistili na močnem kationskem izmenjevalcu, in sicer monolitski koloni CIM® SO<sub>3</sub>. Z metodo NTA in testom hemaglutinacije smo analizirali žetev. Analizirali smo frakcije kromatografskega čiščenja, ki so naslednje: FT je bila frakcija, v kateri so bile komponente žetve, ki se niso vezale na nosilec, v eluciji E1 smo pričakovali očiščen virus, v eluciji E2 pa morebitne sledove virusa in nečistoče, kot je DNA. Iz pridobljenih podatkov smo izračunali izkoristke čiščenja celotnega procesa in izkoristke v posameznih frakcijah glede na žetev (Preglednica 7).

**Preglednica 7: Ugotavljanje celokupnega števila virusnih delcev v vzorcih, očiščenih na monolitski koloni CIM® SO<sub>3</sub> z metodo NTA in testom hemaglutinacije.**

		NTA				HA		
		Velikost virusnih delcev (nm)	C (delci/ml)	Število delcev	Y (%)	HA (HA/ml)	Število HA	Y (%)
	V(ml)							
<b>Žetev</b>	1,5	184	$6,0 \times 10^9$	$9,1 \times 10^9$		128	192	
<b>FT</b>	2,9	138	$4,1 \times 10^8$	$1,2 \times 10^9$	<b>13,1</b>	<1	<1	<1
<b>E1</b>	1,0	167	$5,8 \times 10^9$	$5,8 \times 10^9$	<b>64,5</b>	128	128	<b>66,7</b>
<b>E2</b>	1,2	228	$1,5 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$	<b>1,9</b>	4	4,8	<b>2,4</b>
					<b>Σ 79,5</b>			<b>Σ 69,1</b>

Izkoristek procesa je pri metodi NTA je znašal 79,5 %, izkoristek procesa pri testu hemaglutinacije pa 69,1 %. Izkoristek FT je bil, glede na žetev, v FT 13,1 %, v eluciji E1 pa 64,5 %. Izkoristke smo ovrednotili na podlagi meritov z metodo NTA. S testom hemaglutinacije smo ovrednotili izkoristek E1, ki je bil 66,7 %, v FT pa virusa nismo zaznali. Izkoristka elucij E2 sta bila pri obeh metodah minimalna (Preglednica 7).

Hkrati smo z metodo NTA ugotavljali tudi velikost virusov influence v posameznih frakcijah. Velikost virusov influence je bila v žetvi 184 nm, v 1FT1 138 nm, v 1E1 167 nm in v 1E2 228 nm (Preglednica 7).

#### 4.3.2 Vpliv odtajanja in zamrzovanja na velikost in koncentracijo virusov influence

Žetev influence smo tako kot adenoviruse shranjevali na -80 °C. Virusni pripravek smo pred vsakim začetkom dela odtajali. Po končanem delu smo jih ponovno zamrznili na -80 °C. Ugotavljali smo, kako temperaturno nihanje vpliva na velikost in koncentracijo virusnih delcev. Meritve smo izvajali enkrat na dan (Preglednica 8).

Ugotovili smo, da je bila povprečna koncentracija  $1,4 \times 10^{10}$  virusnih delcev/ml, koeficient variacije pa 50 %. Povprečna velikost virusnih delcev je bila 190 nm in koeficient variacije 67 % (Preglednica 8).

**Preglednica 8: Vpliv odtajanja in zamrzovanja nihanja na velikost in koncentracijo virusov influence.**

	C (virusni delci/ml)	$\bar{C}$ (virusni delci/ml)	Velikost virusnih delcev (nm)	Povprečna velikost virusnih delcev (nm)
DAN 1	$1,0 \times 10^{10}$	$1,4 \times 10^{10}$	182	190,5
DAN 2	$9,4 \times 10^9$		209	
DAN 3	$2,1 \times 10^{10}$		184	
DAN 4	$1,5 \times 10^{10}$		187	
STDV		$5,2 \times 10^9$		12,5
KV (%)		50		67

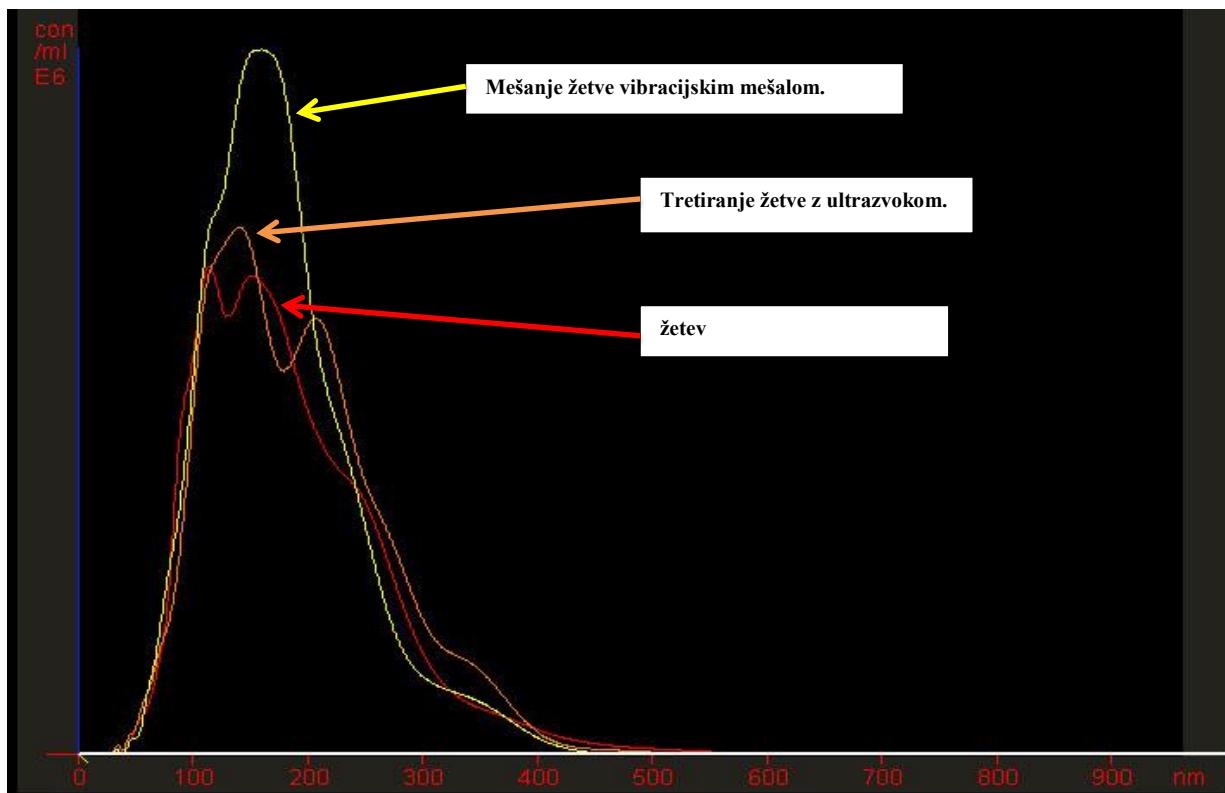
#### 4.3.2.1 Vpliv uporabe ultrazvočne kopeli in vibracijskega mešala na koncentracijo in velikost virusov influence

Podatki v literaturi navajajo, da je velikost virusov influence od 80 do 120 nm. Izmerili smo, da je bila povprečna velikost virusov 190 nm. Razlike med našimi meritvami in vrednostmi v literaturi smo razlagali kot možnost agregacije. Žetev smo tretirali z ultrazvokom in z mešanjem na vibracijskem mešalu.

Ugotovili smo, da je bila koncentracija virusov v žetvi  $5,7 \times 10^{10}$  virusnih delcev/ml. Koncentracija se je po tretiranju z ultrazvokom povečala za 24 % in velikost za 3 %, medtem ko se je koncentracija po mešanju z vibracijskim mešalom povečala za 37 %, velikost pa zmanjšala za 1 % (Preglednica 9 in Slika 7).

**Preglednica 9: Vpliv uporabe vibracijskega mešala in ultrazvoka na velikost in koncentracijo agregiranih virusov.**

	C (virusni delci/ml)	Velikost virusnih delcev (nm)
žetev	$5,7 \times 10^{10}$	189
tretiranje z ultrazvokom	$7,1 \times 10^{10}$	195
mešanje z vibracijskim mešalom	$7,8 \times 10^{10}$	187



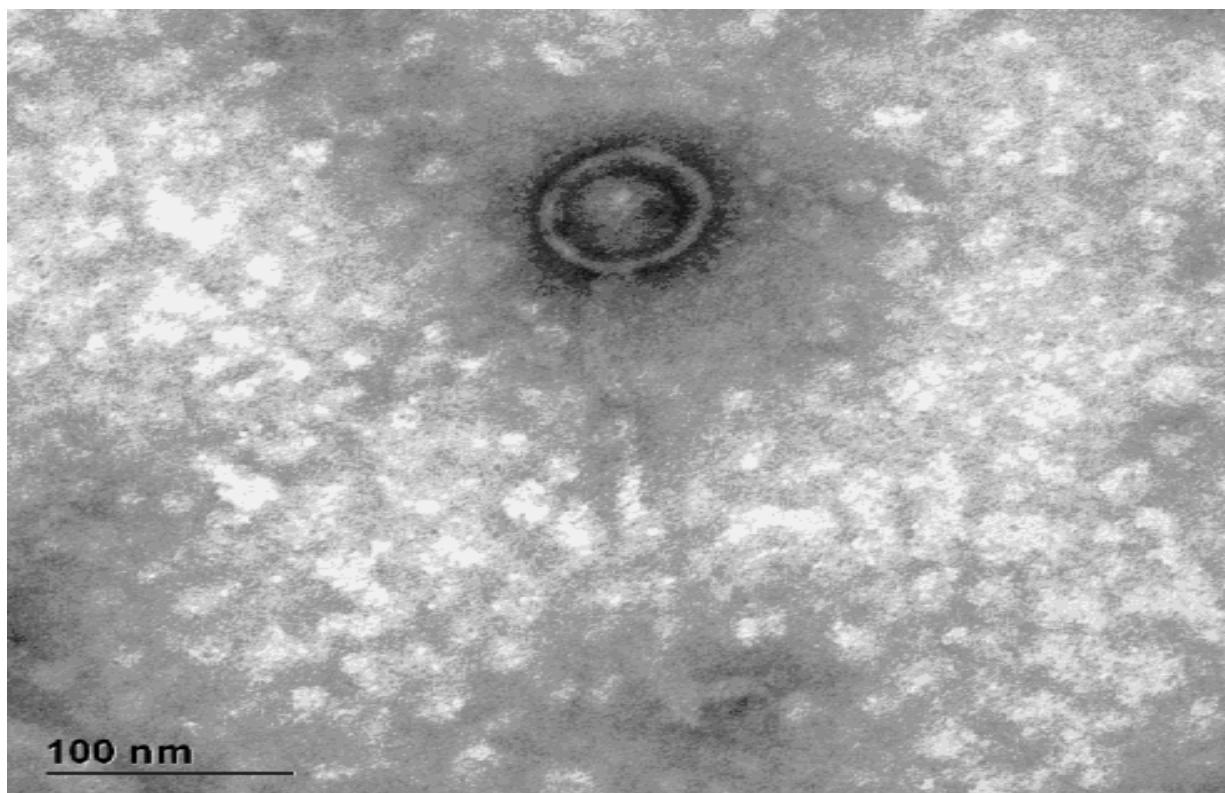
Slika 7: Vpliv tretiranja žetve z ultrazvokom ter mešanja z vibracijskim mešalom na velikost in koncentracijo virusov.

#### 4.4 UGOTAVLJANJE VELIKOSTI IN KONCENTRACIJE BAKTERIOFAGOV

Bakteriofagi so sestavljeni iz kapside, ki vsebuje virusni genom, in repka, s katerim se pritrjuje na bakterijsko celico.

Z metodo NTA smo ugotavljali celokupno število virusnih delcev v bakterijskem lizatu, ki smo ga koncentrirali s postopkom tangencialne filtracije. Pri analizi bakteriofagov smo uporabljali alternativno osvetlitev in s tem povečali prag zaznave, saj smo samo tako lahko analizirali bakteriofage. Z metodo plakov smo ugotavljali, kakšno je število infektivnih virusnih delcev.

Z elektronskim mikroskopom smo merili velikost bakteriofagov. Ugotovili smo, da je bila velikost glave 90 nm, dolžina repa pa 180 nm (Slika 8). Z metodo NTA smo ugotovili, da je bila povprečna velikost bakteriofaga 104 nm (Preglednica 10).

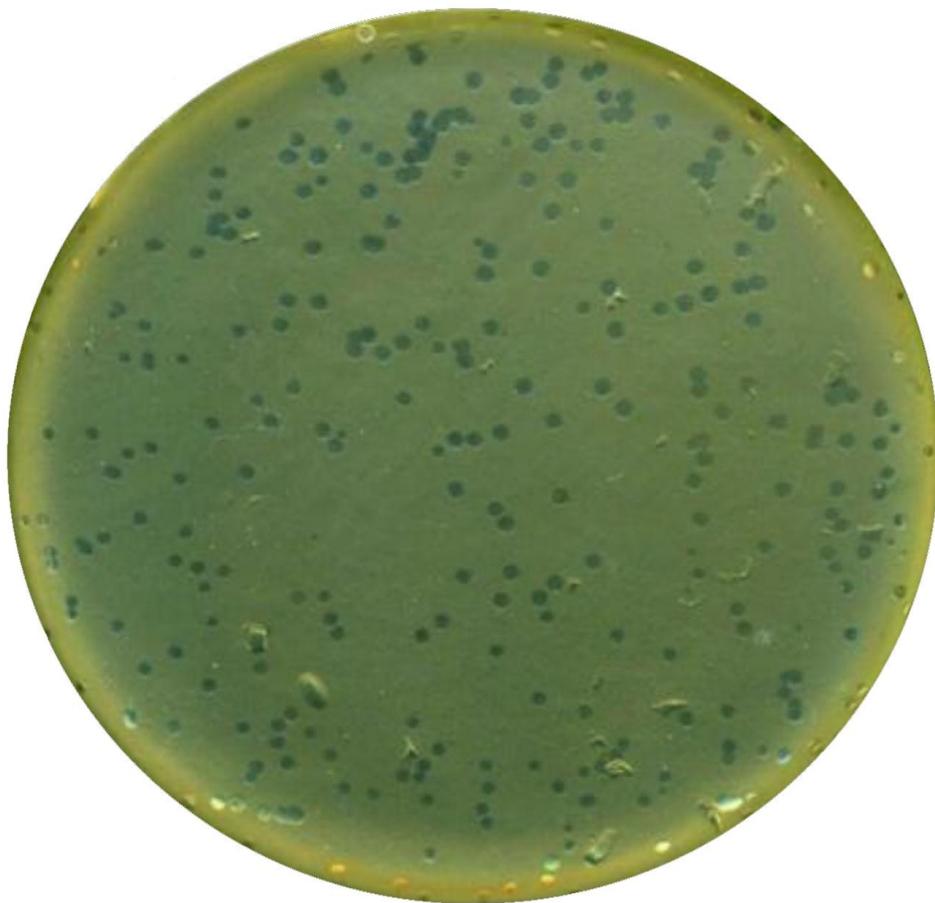


Slika 8: Mikrografija lambda faga (foto: Tušek-Žnidarič M.).

Žetev smo filtrirali skozi kombinacijo 0,8 in 0,45 µm filtra (Sartopore 2 300; 0.8/0.45 µm, PES). S tangencialno pretočno filtracijo smo bakterijski lizat koncentrirali na dveh tipih membran; Pellicon XL 10.000 NMWC (spiralni modul) in Hollow Fiber, 750.000 NMWC (modul z votlimi vlakni). Volumen bakterijskega lizata smo koncentrirali iz 250 na 26,5 ml. Celokupno število virusnih delcev smo ugotavljali z metodo NTA, število infektivnih virusnih delcev pa z metodo plakov. Na podlagi pridobljenih rezultatov obeh metod smo ocenili tudi izkoristke koncentriranja.

Ugotovili smo, da je bilo celokupno število delcev v koncentratu, pripravljenem na membrani Pellicon XL 10.000 NMWC,  $3,02 \times 10^9$  virusnih delcev/ml, v koncentratu, pripravljenem na membrani Hollow Fiber, 750.000 NMWC, pa  $2,92 \times 10^9$  virusnih delcev/ml (Preglednica 10). Izkoristek koncentriranja na membrani Pellicon XL 10.000 NMWC je bil 95 %, na membrani Hollow Fiber 750.000 NMWC pa 91 %. Koncentracija bakteriofagov je bila v koncentratih desetkrat večja kot v žetvi.

Število infektivnih bakteriofagov smo ugotavljali z metodo plakov. Izražali smo ga v enotah PFU/ml. Enota pomeni število izraženih plakov na trdnem gojišču. Upoštevali smo tiste plošče, na katerih smo opazili od 30 do 300 plakov (Slika 9).



Slika 9: Razviti plaki na agarni plošči

Koncentracija infektivnih virusnih delcev je bila v žetvi  $4,7 \times 10^9$  PFU/ml, v koncentratu, pripravljenem na membrani Pellicon XL 10.000 NMWC,  $6,1 \times 10^{10}$  PFU/ml, v koncentratu, pripravljenem na membrani Hollow Fiber 750.000 NMWC, pa  $3,7 \times 10^{10}$  PFU/ml (Preglednica 10). Izkoristka metode plakov sta bila 146 % in 82 % (Preglednica 10). Velikost bakteriofagov je v koncentratih nekoliko narasla.

**Preglednica 10:** Analiza koncentratov in žetve, ki smo jih pripravili s tangencialno pretočno filtracijo, z metodo NTA.

	NTA		Povprečna velikost (nm)	PA	
	Celokupni delci (virusni delci/ml)	Izkoristek (%)		Infektivni delci (PFU/ml)	Izkoristek (%)
Žetev	$3,4 \times 10^{10}$		103	$4,7 \times 10^9$	
Koncentrat (Pellicon XL membrana)	$3,0 \times 10^{11}$	95	108	$6,6 \times 10^{10}$	146
Koncentrat (Hollow fiber membrana)	$2,9 \times 10^{11}$	91	107	$3,7 \times 10^{10}$	82

Izračunali smo tudi razmerje med celokupnimi in infektivnimi bakteriofagi. Razmerje delcev v žetvi je bilo 7 : 1, v koncentratu, pripravljenjem na Pellicon XL membrani, 5 : 1 in v koncentratu, pripravljenem na Hollow Fiber membrani, 7 : 1.

#### 4.5 UGOTAVLJANJE VELIKOSTI IN KONCENTRACIJE VIRUSNIH DELCEV V USTEKLENIČENI VODI

Naključno smo izbrali pet različnih znamk ustekleničenih vod, v plastični embalaži, in ugotavljali koncentracijo virusnih delcev v vodi z metodo NTA. V vzorcih nismo zaznali virusnih delcev. Zato smo izbrali le enega in mu dodali virusni standard s koncentracijo  $2,78 \times 10^{10}$  virusnih delcev/ml, da bi ugotovili morebitno napako meritve (Preglednica 11).

20 µl virusnega standarda smo dodali v 980 µl vode in izmerili koncentracijo  $5,51 \times 10^8$  virusnih delcev/ml. Teoretična koncentracija virusnega standarda je bila  $5,6 \times 10^{10}$  virusnih delcev/ml. Pri meritvi virusnega standarda smo naredili samo 10 % napako (Preglednica 11), ki smo jo ovrednostili s pomočjo enačbe:

$$Ocena\ napake = 100\% - \left( \frac{C_{ST\ izmerjeno}}{C_{ST\ teoretično}} \right) * 100\% \quad \dots(4)$$

**Preglednica 11:** Ugotavljanje koncentracije virusnih delcev v pitnih vodah z dodajanjem virusnega standarda ( $C_{ST}$  = koncentracija standardnega dodatka ).

	$C_{vzorca}$ (delci/ml)	$C_{ST\ teoretično}$ (delci/ml)	$C_{ST\ izmerjeno}$ (delci/ml)	Ocena napake (%)
Voda	$0,00 \times 10^8$	$5,6 \times 10^8$	$5,1 \times 10^8$	10

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Skladno z namenom diplomskega dela, ki je bil ovrednotiti nespecifično metodo za ugotavljanje koncentracije in velikosti različnih virusnih delcev, smo merili velikost in koncentracijo lateksnih delcev, adenovirusov, virusov influence in bakteriofagov.

### 5.1 RAZPRAVA

Kontrola bioloških procesov skoraj vedno vključuje biološke tehnike, ki imajo večjo variabilnost kot fizikalno-kemijske spremenljivke, zato je v proizvodnji bioloških produktov še posebej pomembna kontrola vseh faz procesa. Razpoložljive metode so običajno tudi zelo dolgorajne. Zato je v proizvodnji bioloških produktov še posebej pomembna medprocesna kontrola, saj določene pomanjkljivosti bioloških procesov ne morejo biti razvidne iz končnega produkta (Withington, 2001).

Metoda, ki jo najpogosteje uporabljam za ugotavljanje celokupnega števila virusnih delcev, je metoda z dinamičnim razprševanjem svetlobe (Boyd in sod., 2011), kjer merimo gostoto razpršene svetlobe delcev. Pri nehomogenem vzorcu je gostota razpršene svetlobe delcev, ki jih je največ, večja od gostote razpršene svetlobe delcev, ki jih je manj. Posledično prihaja do napake pri končnem rezultatu. Nasprotно pri metodi NTA sledimo posameznim delcev in se izognemo napaki, ki je pogosta pri metodi DLS.

#### 5.1.1 Optimizacija metode NTA z uporabo lateksnih delcev

Z metodo smo ugotavljali velikost in celokupno število različnih virusnih delcev. Velikost smo ugotavljali na podlagi referenčnih lateksnih delcev. Parametre instrumenta Nanosight® smo prilagajali po navodilih proizvajalca, ki je zastavil dva kriterija za ustrezno meritve, in sicer število delcev v prvem okvirju, ki je moralo biti med 20 in 60, in število zaključenih poti, ki je moralo presegati 200 (Preglednica 1). Za doseganje omenjenih kriterijev smo prilagajali zaklop, svetlost, ojačanje, zamegljenost in prag zaznave (Slika 4), od česar je v veliki meri odvisen končni rezultat, kar so potrdili tudi Fillipe in sod. (2011).

Zastavili smo tudi tretji kriterij, ki smo ga upoštevali pri ustreznosti meritve, in sicer razmerje med teoretičnim ter meritvenim faktorjem. Teoretični faktor smo definirali kot količnik med višjo in nižjo razredčitvijo, medtem ko smo meritveni faktor definirali kot količnik med koncentracijama nižje in višje razredčitve (Preglednica 1).

Med seboj smo primerjali koncentraciji lateksnih delcev pri razredčitvah 2000 in 3000. Koncenracija je bila pri razredčitvi  $2000 \text{ } 4,8 \times 10^8 \text{ delcev/ml}$ , pri razredčitvi  $3000 \text{ pa } 3,8 \times 10^8 \text{ delcev/ml}$ . Teoretični faktor smo izračunali kot količnik med 3000 in 2000, meritveni faktor pa kot količnik koncentracij  $4,8 \times 10^8 \text{ delcev/ml}$  in  $3,8 \times 10^8 \text{ delcev/ml}$ . Razmerje med njima je znašalo 1,2 (Preglednica 1).

Na podlagi faktorjev smo ugotavljali, kakšna je korelacija med posameznimi razredčitvami istega vzorca lateksnih delcev in kasneje virusnih delcev. Za območje razmerja, ki je med 0,8 in 1,2, smo se odločili na podlagi priporočil FDA, CDER in CMV (FDA, 2001). Končni rezultat je bil povprečje dveh razredčitev, če so razmerja ustrezala priporočenemu območju

(Preglednica 1). Omenjeno območje razmerij med teoretičnim in razredčitvenim faktorjem smo upoštevali tudi pri izračunih izkoristkov procesov čiščenja posameznih metod in pri dodajanju standardnega dodatka, s katerim smo ocenjevali napako posamezne meritve.

Na podlagi meritve z metodo NTA smo ugotovili, da je bila povprečna velikost lateksnih delcev 124 nm in njihova koncentracija  $1,06 \times 10^8$  delcev/ml (Preglednica 1). Odstopanje od velikosti in koncentracije, ki jo je določil proizvajalec, je bilo zanemarljivo.

Nastavitev, ki jih je predlagal proizvajalec, so bile ustrezne. Zaradi povečanja zanesljivosti pri izboru ustrezne koncentracije, smo uvedli še tretji kriterij, in sicer razmerje med teoretičnim in meritvenim faktorjem.

### 5.1.2 Ugotavljanje koncentracije in velikosti adenovirusov

Podobne nastavitev NTA instrumenta smo uporabljali pri ugotavljanju velikosti in koncentracije adenovirusov, virusov influence in bakteriofagov. Velikost adenovirusov smo najprej ovrednotili z elektronskim mikroskopom in ugotovili, da je bila povprečna velikost med 90 in 100 nm (Slika 5), kar je v skladu z literurnimi podatki (Renteria in sod., 2010).

#### 5.1.2.1 Vpliv MOI na koncentracijo adenovirusov

Multipliciteta infektivnosti je parameter, s katerim lahko vplivamo na optimizacijo namnoževanja adenovirusov (Brand, 1999) Primerjali smo koncentracije celokupnih in infektivnih virusnih delcev pri MOI 10 in MOI 50, ki smo jih ovrednotili z EPD testom. Koncentracija infektivnih adenovirusov je bila pri MOI 10 večja kot pri MOI 50. Razmerje med koncentracijama celokupnih in infektivnih virusnih delcev je bilo 42 : 1 (Preglednica 2). V literaturi se pojavljajo različna razmerja, ki so odvisna od postopkov čiščenja in smernic, ki določajo kakovost produkta. Dormond in sod. (2003) so poročali, da mora biti razmerje med celokupnim številom virusnih delcev in infektivnih virusnih delcev manjše od 30:1. Če je temu tako, potem je virusni material potencialno primeren za uporabo v klinične namene.

#### 5.1.2.2 Spremljanje kromatografskega čiščenja adenovirusov z metodo NTA

Z metodo NTA smo ugotovili, da je bila povprečna velikost adenovirusov v žetvi 120 nm, koncentracija pa  $3,4 \times 10^{10}$  virusnih delcev/ml (Preglednica 3). Iz Slike 5 je razvidno, da je bila velikost adenovirusov med 80 in 90 nm, kar navajajo tudi Renteria in sod. (2010). Razliko v velikostih lahko razlagamo kot posledico ostankov celičnih nukleinskih kislin, zaradi česar se poveča hidrodinamski premer ali pa kot možnost nastanka agregatov. Prav tako smo preverili morebitno napako pri ugotavljanju koncentracije adenovirusov, in sicer z dodanjem standardnega dodatka. Napaka meritve je znašala 16 % (Preglednica 3), kar je bilo prav tako sprejemljivo glede na priporočila FDA (FDA, 2001).

Preden smo žetev očistili na močnem anionskem izmenjevalcu, smo virusni pripravek tretirali z nukleazo. S tem smo predhodno zagotovili možnost večje stopnje čistosti v končnem produktu (Merck, 2012). Ugotovili smo, da je bila povprečna velikost adenovirusov v žetvi po tretiranju z nukleazo 115 nm (Preglednica 4). Po pričakovanjih bi se koncentracija celokupnih virusnih delcev v žetvi z dodano nukleazo morala povečati, velikost virusnih delcev pa

zmanjšati. Nukleaza učinkuje tako, da razgrajuje ostanke nuleinskih kislin, ki se lahko vežejo na kapside adenovirusov in tvorijo komplekse (Renteria in sod., 2010). Pri naših eksperimentih se je velikost virusa zmanjšala za 5 %, kar smo izračunali na podlagi podatkov iz Preglednice 4. Nepričakovano pa se je znižala tudi koncentracija celokupnih virusnih delcev (Preglednica 4). Znižana koncentracija je lahko posledica razgradnje virusov in/ali adhezije na površino materiala, v katerem smo hrани virus in ga tudi mešali (Huguet, 2012; Renteria in sod., 2010). Tudi porazdelitvena krivulja koncentracije in velikosti, je po dodajanju nukleaze, nakazovala trend večje homogenosti. Za potrditev domneve so potrebni dodatni eksperimenti.

Po očiščenju žetve adenovirusa s kromatografsko metodo smo na podlagi rezultatov, ki smo jih pridobili z metodo NTA in EPD testom, ocenili učinkovitost metode. Metodi sta različni, zato smo ju med seboj lahko primerjali le posredno. Tudi delež eluiranega virusa je bil v omenjeni frakciji najvišji, kar je bilo v skladu s pričakovanji (Preglednica 5).

#### 5.1.2.3 Vpliv zamrzovanja in odtajanja na koncentracijo in velikost adenovirusov

Ugotovili smo, da sta se v postopku zamrzovanja in odtajanja velikost in koncentracija nekoliko spreminali. Velikost se je povečala za 10 %, koncentracija znižala za 10 % (Preglednica 6). Opazili smo trend, ki nakazuje na morebitno začetno stanje agregacije. Vendar pa so to domneve, ki bi jih bilo potrebno še raziskati in potrditi.

### 5.1.3 Ugotavljanje velikosti in koncentracije virusov influence

Na podlagi mikrografije žetve virusov influence smo ugotovili, da je njihova velikost 200 nm (Slika 6). Z metodo NTA smo ugotovili, da je bila povprečna velikost 190 nm (Preglednica 7). Velikosti, ki smo ju ugotovili na podlagi zgoraj omenjenih metod, sta med seboj primerljivi. Glede na literaturne podatke je razlika v velikostih precejšnja, saj navajajo velikost med 80 in 120 nm (Urbas, 2011). Odstopanje v velikostih je lahko posledica inaktivacije z  $\beta$ -propionlaktonom, saj se virus med tem poškoduje.

#### 5.1.3.1 Spremljanje kromatografskega čiščenja virusov med kromatografskim čiščenjem z metodo NTA

Virusni pripravek smo očistili na močnem kationskem izmenjevalcu in med seboj primerjali izkoristke procesa in vsebnost virusov v frakcijah (Preglednica 7). Primerjali smo rezultate dveh različnih metod, in sicer metode NTA ter testa hemaglutinacije. Z obema smo ugotovljali celokupno število virusnih delcev (Preglednica 7).

V elucijah E1 in E2 so bili izkoristki glede na žetev pri obeh metodah skoraj enaki. Največja razlika v izkoristkih se je pojavila v FT frakciji. Na podlagi podatkov, ki smo jih pridobili z metodo NTA, smo izračunali izkoristek, ki je znašal 13 %, medtem ko smo na podlagi podatkov, pridobljenih s testom hemaglutinacije ugotovili, da virusa nismo zaznali (Preglednica 7).

Vzrok za odsotnost virusa je lahko posledica občutljivosti testa hemaglutinacije. Jia in sod. (2008) so v članku navajali, da je občutljivost testa hemaglutinacije odvisna od dodajanja

vrste eritrocitov. Pri našem eksperimentu smo uporabljali kokošje eritrocite, medtem ko so Jia in sod. (2008) uporabljali eritrocite konjev. Dokazali so, da so z dodajanjem konjskih eritrocitov povečali občutljivost testa hemaglutinacije. Predlagali so, da bi lahko bila uporaba omenjenih eritrocitov standardna.

Velikost virusnih delcev se je v postopku kromatografskega čiščenja spreminja. V FT frakciji so bili virusi najmanši, in sicer 138 nm (Preglednica 7). Lahko bi sklepali, da so bili virusi razgrajeni. Omenjen dejavnik inhibira aglutinacijo. V frakciji E1 so bili delci največji, in sicer 228 nm, kar nakazuje na možnost agregacije (Preglednica 7). Vse domneve in ugotovitve smo zapisali neposredno s pomočjo rezultatov metode NTA. Na podlagi rezultatov, ki smo jih pridobili s testom hemaglutinacije, to ni bilo mogoče, kar nakazuje na prednost metode NTA.

Na podlagi pridobljenih rezultatov smo metodi lahko primerjali, posredno, z izračunanimi izkoristki elucij. Izkoristek elucije, ki smo ga izračunali na podlagi pridobljenih rezultatov z metodo NTA, je bil višji kot pri testu hemaglutinacije. Zato bi lahko koncentracijo virusnih delcev v vzorcih ugotavljal z metodo NTA in s se s tem izognili večkratnemu pipetiranju. Prav tako bi se izognili vizualnemu odčitavanju pozitivnih rezultatov in preračunavanju titra.

#### 5.1.3.2 Vpliv odtajanja in zamrzovanja na velikost in koncentracijo virusov influence

Tako kot adenovirusi so tudi virusi influence podvrženi k agregaciji, tako v proizvodnih postopkih kot zaključnih procesih. Svetovna zdravstvena organizacija (WHO, 2002) je poročala, da temperatura vpliva na fiziološko stanje virusnega pripravka. Z dodajanjem ciklodekstrinov v proizvodnji virusnih cepiv zmanjšujejo oziroma preprečujejo agregiranje virusnih delcev. Tudi v našem primeru je zamrzovanje in odtajanje vplivalo na velikost in koncentracijo virusov influence (Preglednica 9). Razlike v koncentracijah in velikostih so se pojavile med posameznimi dnevi. Najbolj izstopa DAN 2. Velikost virusov je glede na ostale dneve največja, hrati pa je koncentracija najmanjša. Ostali dnevi so med seboj dokaj primerljivi. Koeficiente variacije in velikosti sta precej višja kot pri adenovirusih. Lahko bi sklepali, da so virusi influence bolj nagnjeni k agregaciji kot adenovirusi. K temu bi lahko pripomogla tudi inaktivacija virusov influence z  $\beta$ -propionlaktonom, vendar bi morali eksperiment načrtovati drugače in bolj kompeksno.

#### 5.1.3.3 Vpliv uporabe ultrazvočne kopeli in vibracijskega mešala na koncentracijo in velikost virusov influence

Virusi influence so bili med proizvodnjo inaktivirani z  $\beta$ -propionlaktonom, pri čemer prihaja do deformacije virusov in spremembe njihove velikosti. Ugotovili smo tudi, da zamrzovanje in odtajanje vpliva na koncentracijo in velikost. Prav tako je bila razlika v velikosti virusov influence, glede na literaturne podatke, velika. Želeli smo ugotoviti, kako na velikost in koncentracijo vpliva tretiranje z ultrazvokom in mešanje na vibracijskem mešalu. Velikost virusov se v obeh primerih ni bistveno spremenila, povečala pa se je koncentracija (Preglednica 9). Na Sliki 7 smo prikazali spremenjanje porazdelitvene funkcije velikosti in koncentracije virusnih delcev. V primeru uporabe vibracijskega mešala je razvidna večja homogenost virusnih delcev v žetvi. Porazdelitvena krivulja (rumena črta, Slika 7) je brez prevojev in ima samo en maksimum, medtem ko je pri žetvi, ki smo jo tretirali z ultrazvokom,

porazdelitvena krivulja s prevojem in dvema maksimumoma (oranžna črta, Slika 7). Uporaba vibracijskega mešala pripomore k večji homogenosti raztopine z virusi, vendar bi bilo za pojasnitve mehanizmov potrebno izvesti dodatne raziskave.

### **5.1.4 Ugotavljanje velikosti in koncentracije bakteriofagov**

Ugotovili smo, da je bila povprečna velikost  $\lambda$  bakteriofagov 104 nm, kar smo ovrednotili z metodo NTA (Preglednica 10). Velikost glave bakteriofaga na mikrografiji je bila 80 nm, velikost repa pa 150 nm (Slika 8). Do razlike v velikostih prihaja zaradi tega, ker z metodo NTA določimo hidrodinamski premer, ki je teoretični premer delca, če bi bil sferične oblike (Gallego-Urreain sod., 2011).

#### **5.1.4.1 Spremljanje velikosti in koncentracije bakteriofagov v postopku koncentriranja**

V diplomskem delu smo ugotavljali koncentracijo fagov v mediju tekom koncentriranja s tangencialno pretočno filtracijo. Uporabljali smo dva različna membranska modula, in sicer ploščni modul ter spiralni modul. Z metodo NTA smo ugotavljali, ali prihaja do razlik med koncentracijami v pripravljenih koncentratih. Postopek koncentriranja smo ovrednotili tako, da smo analizirali žetev in koncentrat, ki smo ju pripravili na dveh tipih membran. V obeh koncentratih je bila koncentracija virusnih delcev večja skoraj desetkrat, kar smo izračunali na podlagi podatkov v preglednici 10. Začetni volumen žetve smo zmanjšali desetkrat, in sicer iz 250 ml na 26,5 ml. Na podlagi pridobljenih podatkov smo primerjali izkoristka metod, ki sta bila oba okrog 90 % (Preglednica 10).

Z metodo plakov smo ugotavljali delež infektivnih virusnih delcev. Nato smo izračunali izkoristke metode in ugotovili, da je bil izkoristek pri koncentratu pripravljenem na Pelicon XL membrani 146 %, pri koncentratu, pripravljenem na Hollow fiber membrani pa 81 % (Preglednica 10). V primeru koncentrata, ki smo ga pripravili na Pelicon XL membrani, je izkoristek metode previsok, kar kaže na slabosti metode. Izboljšanje bi dosegli z velikim številom ponovitev in hkrati izjemno inetnativnim delom. Prav tako je tudi vizualno odčitavanje razvitih plakov posledica subjektivne presoje (Slika 9). V tem primeru je ključnega pomena, da imamo na voljo metodo, s katero lahko, v relativno kratkem času, primerjamo metodo plakov, v našem primeru z metodo NTA.

### **5.1.5 Odkrivanje virusov v ustekleničeni vodi**

Virusi, ki so prisotni v pitni vodi, so bolj rezistentni na dezinfekcijska sredstva kot bakterija rodu *E. coli*. Parameter odsotnosti *E. coli* ni zanesljiv pokazatelj odsotnosti ali prisotnosti virusov v pitni vodi. Zaradi večje rezistence so bili kot boljši indikatorji za prisotnost virusov v pitni vodi predlagani enterokoki in spore bakterij *Clostridium perfringens* (ZZV MS, 2012a).

Obstoječe metode za detekcijo virusov v pitni vodi temeljijo na principih molekularnega nivoja. V pregledu literature smo omenili, da je detekcija virusnih delcev problematična, ker so v mediju prisotni v nizkih koncentracijah. Zato smo želeli ugotoviti, ali je metoda NTA primerna za kvantifikacijo virusov v ustekleničenih vodah. V petih naključno izbranih vzorcih pitne vode nismo zasledili virusov (Preglednica 11). Da bi lahko potrdili naše domneve, smo

naključno izbrani ustekleničeni vodi dodali virusni standard. Ocenili smo, da smo naredili 10 % napako, kar je bilo v območju intervala, ki ga je priporočila FDA.

Sklepali smo, da bi bila metoda NTA primerna za ugotavljanje koncentracije in velikosti virusnih delcev, če bi bila koncentracija le-teh okrog  $3,80 \times 10^8$  delcev/ml, kar je spodnja meja detekcije z metodo NTA. Proizvajalec je definiral spodnjo mejo detekcije pri  $5 \times 10^7$  delcev/ml vendar pa pri tej koncentraciji ne izpolnjujemo treh kriterijev, ki smo jih zastavili za ustrezno izbrano koncentracijo. Podatki so navedeni v Preglednici 1, v kateri smo z meritvami koncentracij lateksnih delcev, definirali spodnjo in zgorno mejo detekcije metode.

## 5.2 SKLEPI

Na podlagi našega dela lahko sklepamo slednje:

- Metoda NTA z instrumentom NanoSight® omogoča ugotavljanje koncentracije in velikosti različnih virusnih delcev in stanj agregiranosti le-teh.
- Metoda ni primerna za analizo neznanih vzorcev, ki vsebujejo virusne delce.
- Metoda bi bila primerna za analizo prisotnosti virusov v pitni vodi, če bi koncentracija virusnih delcev v vodi presegala  $3,80 \times 10^8$  virusnih delcev/ml.
- Metoda je primerna za analizo laboratorijskih vzorcev, ni pa primerna za analizo okoljskih heterogenih vzorcev.
- Metoda je ponovljiva in robustna, kar je bilo potrjeno z našim delom in tudi s strani proizvajalca.
- Z metodo NTA lahko uspešno sledimo in kontroliramo procese čiščenja virusov.

## 6 POVZETEK

Virusi so mikroskopsko majhni infektivni delci, ki so veliki od 20 do 300 nm in nimajo sistemov za sintezo lastnih sestavin. Njihovo razmnoževanje lahko poteka le znotraj gostiteljske celice. Uporabljajo se kot vektorji pri prenosu genskega materiala v genski terapiji, pri pripravi cepiv in protimikrobnih sredstev ali tudi kot alternativa antibiotikom (bakteriofagi). V proizvodnji bioloških produktov je še posebej pomembna medprocesna kontrola, saj je ponovljivost bioloških procesov načeloma slaba, zaradi česar znanstveniki in biotehnološka podjetja neprestano stremijo k izboljšanju metod, tehnik in procesov čiščenja ter detekcije virusnih delcev. Kvantifikacija celokupnih in infektivnih virusnih delcev ter agregiranih virusnih delcev je v vsaki fazi procesa gojenja in čiščenja izredno pomembna in kritična. Najbolj pogoste metode za ugotavljanje števila infektivnih virusnih delcev so: metoda plakov, test končne razredčitve in metoda 50-odstotnega infektivnega odmerka na tkivni kulturi. Metode, ki jih najpogosteje uporabljamo za ugotavljanje celokupnega števila virusnih delcev, so: metoda dinamičnega razprševanja svetlobe, test hemaglutinacije, opazovanje pod presevnim elektronskim mikroskopom, encimskoimunski test, frakcioniranje v tokovnem polju, kromatografske tehnike in spektrofotometrična detekcija, kvantitativna verižna reakcija s polimerazo in metoda sledenja nanodelcem (NTA). V diplomskem delu smo ovrednotili metodo NTA in sledili velikosti ter koncentraciji različnih virusnih delcev. Z metodo smo ugotavljali celokupno število virusnih delcev in njihovo velikost. Za optimizacijo metode smo najprej analizirali referenčne lateksne delce, ki so bili veliki 120 nm, njihova koncentracija pa je bila  $1,05 \times 10^{12}$  delcev/ml. Zastavili smo tri kriterije, ki smo jih upoštevali pri končni izračunani koncentraciji virusnih delcev in velikosti: število delcev je moralo biti v prvem okvirju med 20 in 60, število zaključenih poti nad 200, odstopanje med rezultati pa do 20 %. Spodnja meja detekcije je pri koncentraciji  $3,80 \times 10^{12}$  delcev/ml, zgornja pa pri  $9,9 \times 10^{12}$  delcev/ml. Napake meritev smo preverjali z dodajanjem standardnega dodatka. Metoda NTA je primerna za ugotavljanje različnih virusnim delcev, in sicer adenovirusov, virusov influence ter bakteriofagov. Ugotavljali smo razmerja med celokupnimi in infektivnimi adenovirusi. Z metodo EPD smo določili koncentracijo infektivnih virusnih delcev, ki je bila manjša od koncentracije celokupnih. Razmerje se uporablja kot parameter za oceno kakovosti virusnega materiala. Z dodajanjem standardnega dodatka smo ocenili napako meritve, ki je znašala okrog 15 %. Prav tako smo ovrednotili celoten postopek čiščenja žetve virusov influence. Izkoristek procesa smo izračunali na podlagi podatkov iz metode NTA in testa hemaglutinacije in je znašal okoli 70 %, zaradi česar bi lahko metoda NTA bila alternativa testu hemaglutinacije. Število celokupnih virusnih delcev je bilo pričakovano višje od števila infektivnih virusnih delcev. Število infektivnih bakteriofagov smo ugotavljali z metodo plakov. Izkoristki celotnega procesa so bili okoli 90 %. Končni volumen pripravka smo zmanjšali na desetino začetnega. Temu primerno se je povečala tudi koncentracija bakteriofagov, in sicer desetkratno. Metoda bi bila lahko primerna za analizo prisotnosti virusov v pitni vodi, če bi bila koncentracija virusnih delcev v vodi najmanj  $3,80 \times 10^{12}$  virusnih delcev/ml. Metoda je primerna za analizo heterogenih vzorcev, ki vsebujejo virusne delce, tako na področju živil, zdravil in okolja. Če so virusni delci sferične oblike, je primerna tudi za ugotavljanje njihove velikosti in ne samo koncentracije.

## 7 VIRI

- Adams M. H. 1956. Bacteriophages. London, Interscience Publishers Ltd.: 14 – 14
- Aini H.H., Omar A.R., Hair-Bejo M., Aini I. 2008. Comparison of Sybr Green I, ELISA and conventional agarose gel-based PCR in the detection of infectious bursal disease virus. Microbiological Research, 163, 5: 556 – 563
- Aucoin M.G., Perrier M., Kamen A. A. 2008. Critical assessment of current adeno-associated viral vector production and quantification methods. Biotechnology Advances, 26: 73 – 88
- Barton R. J. 1977. An examination of permeation chromatography on columns of controlled pore glass for routine purification of plant viruses. Journal of General Virology, 35: 77 – 78
- Basile F., Kassalainen G. E., Williams S.K.R. 2005. Interface for direct and continuous sample – matrix deposition onto MALDI probe for polymer analysis for thermal field-flow fractionation and off –line MALDI-MS. Analytical Chemistry, 77: 3008 – 3012
- Balch W. M., Aughn J., Novotny J., Drapeau D. T., Vaillancourt R., Lapierre J., Bancroft C. T., Parslow T. G. 2002. Evidence for segment-nonspecific packaging of the influenza a virus genome. Journal of Virological Methods, 76: 7133 – 7139
- Bene J. 1999. Mikrobiološke metode dela in njihov pomen za razvoj. Seminarska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije: 8 – 9
- Berkowitz S., Philo S. J. 2007. Monitoring the homogeneity of adenovirus preparations (a gene therapy delivery system) using analytical ultracentrifugation. Analytical Biochemistry, 362, 2: 16 – 37
- Beuret C. 2003. A simple method for isolation of enteric viruses (noroviruses and enteroviruses) in water. Journal of Virological Methods, 107: 1 – 8
- Borisevich V., Nistler R., Hudman D., Yamshchikov G., Seregin A., Yamshchikov V. 2008. A highly sensitive and versatile virus titration assay in the 96-well microplate format. Journal of Virological Methods, 147: 197 – 205
- Boyd R. D., Pichaimuthu S. K., Cuenat A. 2011. New approach to inter-technique comparisons for nanoparticle size measurements; using atomic force microscopy, nanoparticle tracking analysis and dynamic light scattering. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 387: 35 – 42
- Bozzola J. J., Russell D. 1999. Electron microscopy: Principles and techniques for biologist. Boston, Jones and Barlett Learning: 654 str.
- Brand K., Klocke R., Possling A., Paul D., Strauss M. 1999. Induction of apoptosis and G2/M arrest by infection with replication-deficient adenovirus at high multiplicity of infection. Gene Therapy, 6, 6:1054 – 1063

Bratkovič T., Preželj A. 2008. Zdravljenje bakterijskih okužb z bakteriofagi. Farmacevtski vestnik, 59, 3: 129 – 134

Brüssow H. 2005. Phage therapy: the *Escherichia coli* experience. Microbiology, 151, 7: 2133 – 2140

Butot, S., Putallaz, T., Croquet, C., Lamothe, G., Meyer, R., Joosten, H., Sanchez, G. 2007. Attachment of enteric viruses to bottles. Applied and Environmental Microbiology, 73: 5104–5110

Carr B., Malloy A. 2007. Nanoarticle tracking analysis – The NANOSIGHT system. Amesbury, NanoSight Ltd.: 55 str.  
[www.nanosight.co.uk](http://www.nanosight.co.uk), (junij, 2011)

Clark J. R., March J. B. 2006. Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. Trends of Biotechnology, 24: 212 – 218

Cromeans T.L., Fields H. A., Sobsey M. D. 1989. Replication kinetics and cytopathic effect of hepatitis A virus. Journal of General Virology, 70: 2051–2062

Cromeans T.L., Lu X., Erdman D.D., Humprey D.C., Hill V.R. 2008. Development of plaque assays for adenoviruses 40 and 41. Journal of Virological Methods, 151: 140 – 145

Cromeans T.L., Sobsey M. D., Fields H. A. 1987. Development of a plaque assay for a cytopathic, rapidly replicating isolate of hepatitis A virus. Journal of General Virology, 22: 45–56

Cull M. G., Miller J. F., Schatz P. J. 1992. Screening for receptor ligands using large libraries of peptides linked to the C terminus of the lac repressor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 89:1865–1869

Debyser Z. 2003. A short course in virology, vectoriology, gene therapy. Current Gene Therapy, 3: 495 – 499

DiStefano D. J., Gould L. S., Munshi S., Robinson D. K. 1995. Titration of human-bovine rotavirus reassortants using a tetrazolium-based calorimetric end point dilution assay. Journal of Virological Methods, 55: 199 – 208

Dormond E., Peirrer M., Kamen A. 2003. From the first to the third generation adenoviral vector: What parameters are governing the purification yield? Biotechnology Advances, 27: 133–144

Domingos R. F., Baalousha Y., Ju-Nam M. M., Reid N., Tufenkji J. R., Lead G. G., Leppard K. J., Wilkinson K. J. 2009. Characterizing manufactured nanoparticles in the environment: multimethod determination of particle sizes. Environmental Science & Technology, 43, 19: 7277 – 7284

- Duizer E., Schwab K. J., Neill F. H., Atmar R. L., Koopmans M. P., Estes M.K. 2004. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *Journal of General Virology*, 85: 79–87
- Dulbecco R. 1952. Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 38: 747–752
- Einstein A. 1905. Investigations on the theory of Brownian movement. New York, Dover Publications: 18 str.
- EMA. 2006. Guideline on similar medicinal products containing biotechnology derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues. London, EMEA European Medicines Agency: 8 str.  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC5\\_00003920.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC5_00003920.pdf) (maj, 2010)
- FDA. 2001. Guidance for industry. Rockville, Food and Drug Administration, U. S. Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM): 25 str.  
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070107.pdf> (10.06.2012)
- Fillipe V., Hawe A., Jiskoot W. 2010. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharmaceutical Research*, 27: 796 – 810
- Fong T. T., Lipp E. K. 2005. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: Health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69, 2: 357 – 371
- Fout G. S., Moyer M. N. V., Dahling D. R. 2003. A multiplex reverse transcription-PCR method for detection of human enteric viruses in groundwater. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 3158 – 3164
- Fraunhofer W., Winter G. 2004. The use of asymmetrical flow field-flow fractionation in pharmaceuticals and biopharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50: 369 – 383
- Gallego-Urrea J. A., Tuiriniemi J., Hassellöv M. 2011. Applications of particle-tracking analysis to the determination size distributions and concentrations of nanoparticles in environmental, biological and food samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 30, 3: 473 – 483
- Gagnon P. 2008. The emerging generation of chromatography tools for virus purification. *BioProcess International*, 6, 6: 20 – 23
- Gao W., Liang H., Jun Ma J., Han M., Chen Z., Han Z., Gui-bai Li G. 2011. Membrane fouling control in ultrafiltration technology for drinking water production: A review. *Desalination*, 272, 1–3: 1–8

- Gassilloud B., Gantzer C. 2005. Adhesion–aggregation and inactivation of Poliovirus 1 in groundwater stored in a hydrophobic container. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 912–920
- Gassilloud B., Huguet L., Maul A., Gantzer C. 2007. Development of a viral concentration method for bottled water stored in hydrophobic support. *Journal of Virological Methods*, 142: 98–104
- Gavin D., Gagnon P. 2006. Building process control into chromatographic purification of viruses part 1: Qualification of critical manufacturing components. *BioProcess International*, 4,10: 22 – 30
- Gilgen M., Germann D., Lüthy J., Hübner P. 1997. Tree-step isolation method for sensitive detection of enterovirus, rotavirus, hepatitis A virus, and small round structured viruses in water samples. *International Journal of Food Microbiology*, 37: 189 – 199
- Gosert R., Egger D., Bienz K. 2000. A cytopathic and a cell culture adapted hepatitis A virus strain differ in cell killing but not in intracellular membrane rearrangements. *Journal of Virology*, 266: 157–169
- Grimm D., Kern A., Rittner K., Kleinschmidt J. A. 1999. Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors. *Human Gene Therapy*, 9: 2745–60
- Hall J.L., Hawes C. (eds.). 1991. Electron microscopy of plant cells. Harcourt, Academic Press: 432 str.
- Haramoto E., Katayama H., Utagawa E., Ohkagi S. 2008. Development of sample storage methods for detecting enteric viruses in environmental water. *Journal of Virological Methods*, 151, 1: 1 – 6
- Harris J. R. 2007. Negative staining of thinly spread biological samples. V: Methods in molecular biology: Electron microscopy, methods and protocols. Kuo J. (ed.). Totowa, Humana Press: 107–142
- Hermoso J. A., García J.L., García P. 2007. Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Current Opinion in Microbiology*, 10, 5: 461 – 472
- Hierholzer J. C., Killington R. A., Mahy B. W. J., Kangro H. O. 1969. Virology methods manual. San Diego, Academic Press: 25 – 44
- Huguet L., Carteret C., Gantzer C. 2012. A comparison of different concentration methods for detection of viruses present in bottle waters and those absorbed to water bottle surfaces. *Journal of Virological Methods*, 181, 1: 18 – 24

- Hussain A. I., Cordeiro M., Sevilla E., Liu J. 2010. Comparison of egg and high yeilding MDCK cell – derived live attenuated influenza virus for commercial production of trivalent konetcs in permissive and semi – permissive cells. *Vaccine*, 28: 3848 – 3855
- Iyer P., Ostrove J. M., Vacante D. 1999. Comparison of manufacturing techniques for adenovirus production. *Cytotechnology*, 30: 169 – 172
- Jia N., Wang S., Liu Y., Zhang P., Zuo S., Lin-Zhan, Dang R., Ma Y., Zhang C., Lu Zhang L., Lu S., Cao W. 2008. Increased sensitivity for detecting avian influenza-specific antibodies by a modified hemagglutination inhibition assay using horse erythrocytes. *Journal of Virological Methods*, 153, 1: 43 – 48
- Jones J. C., Settles E. W., Brandt C. R., Schultz-Cherry S. 2011. Virus aggregation peptide enhances in the cell-mediated response to influenza virus vaccine. *Vaccine*, 29: 7696 – 7703
- Kalbfuss B., Genzel Y., Wolff M., Zimmermann A., Morenweiser R., Reichl U. 2006. Harvesting and concentration of human influenza A virus produces in serum-free mammalian cell culture for the production of vaccines. *Biotechnology and Bioengineering*, 97, 1: 73–85
- Kamen A., Henry O. 2004. Decelopment and optimization of an adenovirus production process. *Journal of Gene Medicine*, 6, Suppl. S1: S184 – S192
- Kitts P. A., Green G. 1999. An immunological assay for determination of baculovirus titers in 48 hours. *Analytical Biochemistry*, 268: 173–178
- Kladnik A. 2006. Presevni elektronski mikroskop. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 1str.  
<http://web.bf.uni-lj.si/bi/mikroskopija/mikroskop-tem.php#more> (avgust, 2012)
- Koopmans M. G. P., von Bonsdorff C. H., Vinje J., De Medici D., Monroe S. S. 2002. Foodborne viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 26: 187 – 205
- Koren S. 2002. Virusna cepiva in imunski serumi. V: Splošna medicinska virologija. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 130 – 137
- Kovač K., Gutierrez-Aguirre, Banjac M., Peterka M., Poljšak-Prijatelj M., Ravnikar M., Zimšek Mijovski J., Schultz C. A., Raspor P. 2009. A novel method for concentrating hepatitis A virus and caliciviruses from bottled water. *Journal of Virological Methods*, 162: 272 – 275
- Kramberger P. 2006. Razvoj tehnologije za koncentriranje in čiščenje rastlinskih virusov z monolitnimi kromatografskimi nosilci. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 135 str.

- Kukkula M., Maunula L., Silvennoinen E., von Bonsdorff C. H., Jaatinen P. 1997. Outbreak of gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like viruses. *Journal of Infectious Diseases*, 180: 1771 – 1776
- Kuo, J., 2007. Processing plant tissues for ultrastructural study. V: Methods in molecular biology: electron microscopy, methods and protocols. Kuo J. (ed.). Totowa, Humana Press: 35–45
- Le T. T., Saveyn P., Hoa D. H., P. van der Meeren. 2008. Determination of heat-induced effects on the particle size distribution of casein micelles by dynamic light scattering and nanoparticle tracking analysis. *International Diary Journal*, 18: 1090 – 1096
- Lespes G., Gigault J. 2011. Hyphehened analytical techniques for multidimensional characterization of submicron particles: A review. *Analytica Chimica Acta*, 692: 26 – 41
- Loisy F., Atmar R. L., Guillon P., Le Cann P., Pommeuy M., La Guyader F. S. 2004. Real-time RT-PCR for norovirus screening shelfish. *Journal of Virological Methods*, 123: 1 – 7
- Lusky M. 2005. Good manufacturing practise production of adenoviral vectors for clinical trials. *Human Gene Therapy*, 16, 3: 281 – 191
- Madaeni S.S. 1999. The application of membrane technology for water disinfection. *Water Research*, 33: 301–308
- Maizel J. V. J., White D. O. Scharff M.D. 1968. The polypeptides of adenovirus: Evidence for multiple protein components in the virion and comparison of types 2, 7A and 12. *Virology*, 36, 1: 115 – 125
- Matindoost L., Leslie C. L., Qi M. Y., Nielsen L. K., Reid S. 2012. Suspension culture titration: A simple method for measuring baculovirus titers. *Journal of Virological Methods*, 183: 201 – 209
- Mayhew M. T., Muhlfeld C., Vanhecke D., Ochs M. 2009. A review of recent methods for efficiently quantifying immunogold and other nanoparticles using TEM sections through cells, tissues and organs. *Annals of Anatomy*, 191: 153 – 170
- Merck. 2012. Benzonase® endonuclease. Darmstadt, Merck: 32 str.  
<http://www.bioneer.dk/files/Files/Benzonase1.pdf> (junij, 2012)
- Messaoud F. A., Sanderson R. D., Runyon J. R., Otte T., Pasch H., Williams S. K. R. 2009. An overview on field – flow fractionation techniques and their applications in te separations and characterization of polymers. *Progress in Polymer Science*, 34: 351 – 368
- Michalsky R., Passarelli L. A. Pfromm P. H., Czermak P. 2010. Concentration of the baculovirus *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus AcMNPV by ultrafiltration. *Desalination*, 250, 3, 1125 – 1127

- Montes-Burgos I., Walczyk. D., Hole P., Smith J., Lynch I., Dawson K. 2010. Characterisation of nanoparticle size and state prior to nanotoxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research*, 12, 1: 47 – 53
- Morenweiser R. 2005. Downstream processing of viral vectors and vaccines. *Gene Therapy*, 12: 103 – 110
- Murphy R. M. 1997. Static and dynamic light scattering of biological macromolecules: what we can learn. *Current Opinion in Biotechnology*, 8: 25 – 30
- Nadeau I., Kamen A. 2003. Production of adenovirus vector for gene therapy. *Biotechnological Advances*, 20, 7-8: 475 – 489
- Patois E., Chapelle M. A. H., Gurny R., Arvinte T. 2011. Stability of seasonal influenza vaccines investigated by spectroscopy and microscopy methods. *Vaccine*, 29, 43: 7404 – 7413
- Pfeifer A., Verma I. M. 2001. Gene therapy: promises and problems. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2: 177 – 211
- Pheasey N., John J., Love C., Coffin R., Ward J.M., Boushaba R., Hoare M., Levy M.S. 2006. A capillary cytometer method to quantitate viable virus particles based on early detection of viral antigens and cellular events within single cells. *Journal of Virological Methods*, 137: 213–218
- Poljak M. 2002. Molekularno dokazovanje virusov. V: Splošna medicinska virologija. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 137 – 140
- Pravilnik o pitni vodi. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 35: 4037 – 4156
- Racainello V. 2009. Measurement of viruses by end-point dilution assay. New York, Columbia University: 1 str.  
<http://www.virology.ws/2009/07/13/measurement-of-viruses-by-end-point-dilution-assay/>  
(maj, 2010)
- Reed L.J. in Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene*, 27: 493 – 497
- Renteria S. S., Clemens C. C., Croylea M. A. 2010. Development of a nasal adenovirus based vaccine: Efect of concentracion and formulation on adenovirus stability and infectious titer during actuation from two delivery devices. *Vaccine*, 28: 2137 – 2148
- Rola M., Kuzmak J. 2002. The detection of bovine leukemia virus proviral DNA by PCR-ELISA. *Journal of Virological Methods*, 99: 33 – 40
- Segura M. M., Kamen A., Garnier A. 2006. Downstream processing of oncoretroviral and lentiviral gene therapy vectors. *Biotechnology Advances*, 24: 321–337

- Schmidt N. J., Lennette E. H. 1961. Virology on the bookshelf. Application of tissue culture techniques to diagnostic virology in the public health laboratory. American Journal of Public Health, 51, 4: 511 – 516
- Teunisa P. F. M., Lodderb W. J., Heisterkamp S. H., Roda Husmanb A. M. 2005. Mixed plaques: Statistical evidence how plaque assays may underestimate virus concentrations. Water Research, 39: 4240 – 4250
- Tiekotter K. L., Ackermann H. W. 2009. High-quality virus images obtained by transmission electron microscopy and charge coupled device digital camera technology. Journal of Virological Methods, 159, 87 – 92
- Urbas L. 2011. Razvoj monolitnih kolon in metod za odstranjevanje proteinov iz bioloških vzorcev in določevanje virusnih delcev. Doktorska disertacija. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 106 str.
- Vaidya S. R., Kharul K. U., Chitambar D. S., Wanjale S. D., Bhole Y. S. 2004. Removal of hepatitis A virus from water by polyacrylonitrile-based ultrafiltration membranes. Water Research, 199, 1: 7 – 9
- Vellekamp G., Porter F.W., Sutjipto S., Cutler C., Bondoc L., Liu H.Y. 2001. Empty capsules in column-purified recombinant adenovirus preparations. Human Gene Therapy, 15, 12: 1923 – 1936
- Venuti A., Russo C., Del Grosso N., Patti A. M., Ruggeri F. M., DeStasio R., Martiniello M. G., Pagnotti P., Degener M., Midulla M., Panà A., Perez-Bercoff R. 1985. Isolation and molecular cloning of a fast-growing strain of human hepatitis A virus from its double-stranded replicative form. Journal of Virology, 57: 579–598
- Vinje J., Altena S. A., Koopmans M. P. 1997. The incidence and genetic variability of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. Journal of Infectious Disease, 176: 1374 – 1378
- Wei Z., Mcevoy M., Razinkov V., Polozova A., Li E., Casas-Finet J., Tous G. I., Balu P., Pan A. A., Mehta H., Schenerman M. A. 2007. Biophysical characterization of influenza virus subpopulations using field flow fractionation and multiangle light scattering: Correlations of particle counts, size distribution and infectivity. Journal of Virological Methods, 144, 1 – 2: 122 – 132
- WHO. 2002. Guideline for establishing or improving primary and intermediate vaccine stores. Geneva, World Health Organisation, Department of Vaccines and Biologicals: 66 str.  
<http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF02/www715.pdf>
- WHO/FAO. 2008. Viruses in food: Scientific advise to support risk management activities: Meeting report. Geneva, World Health Organization: 58 str.  
[http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241563772\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241563772_eng.pdf)

- Wickramasinghe S. R., Kalbfuss B, Zimmermann A., Thom V., Reichl U. 2005. Tangential flow microfiltration and ultrafiltration for human influenza A virus concentration and purification. *Biotechnology and Bioengineering*, 92, 2: 199–208
- Wild P., 2008. Electron microscopy of viruses and virus–cell interactions. *Methods in Cell Biology*, 88: 497–524.
- Willats W. G. T. 2002. Phage display: practicalities and prospects. *Plant Molecular Biology*, 50: 837 – 854
- Williams S. K. R. 2000. A field flow fractionation handbook. New York, Wiley-Interscience: 17 – 17
- Withington R. 2001. Regulatory issues for phage – based clinical products. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 76: 1583 – 1586
- Wolff M. W., Reichl U. 2008. Downstream processing: From egg to cell culture-derived influenza virus particles. *Chemical Engineering & Technology*, 31: 846 – 857
- Yang W., Shiuan D. 2003. Plaque reduction test: an alternative method to assess specific antibody response to pIII-displayed peptide of filamentous phage M13. *Journal of Immunological Methods*, 276: 175 – 183
- Yohannes G., Jussila M., Hartonen K., Riekkola M. L. 2011. Asymmetrical field-flow fractionation technique for separation and characterization of polymers and bioparticles. *Journal of Chromatography A*, 1218: 4104 – 4116
- Zechmann B., Zelling G. 2009. Rapid diagnosis of plant virus diseases by transmission electron microscopy. *Journal of Virological Methods*, 162: 163 – 169
- Zhu Y., Yin J. 2007. A quantitative comet assay: Imaging and analysis of virus plaques formed with a liquid overlay. *Journal of Virological Methods*, 139: 100 – 102
- ZZV MS. 2012a. Mikrobiologija pitne vode. Murska Sobota, Zavod za zdravstveno varstvo: 3 str.  
<http://www.zzv-ms.si/si/pitna-voda/mikrobiologija-pitne-vode.htm> (junij, 2012)
- ZZV MS. 2012b. Nanotehnologija in živila. Murska Sobota, Zavod za zdravstveno varstvo: 3str.  
<http://www.zzv-ms.si/si/ekologija-higiena-hrane/documents/nanotehnologija.pdf> (april, 2012)

## ZAHVALA

Najlepša hvala.

Podjetju Bia Separations d. o. o., ki je omogočilo nastanek pričujočega diplomskega dela.

Mentoru prof. dr. Petru Rasporju, somentorju dr. Matjažu Peterki in recenzenti prof. dr. Sonji Smole Možina za strokovne razlage, pomoč pri pisanju in pregled diplomskega dela.

Mojici Garantini za lektoriranje diplomskega dela.

Petri Kramberger za zabavno izvajanje eksperimentalnega dela diplome in ideje.

Moji družini in prijateljem ter Urošu, ki so verjeli vame, ko sem že skoraj obupala. Brez Vas mi ne bi uspelo.

## PRILOGE

Priloga A : Primer poročila, ki smo ga pridobili s programsko opremo NTA, v katerem so razvidni izmerjeni in izračunani podatki.

