

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Sandra PINTAR

**VPLIV TEMPERATURE IN VREDNOSTI pH NA  
AKTIVNOST NEVRAMINIDAZE  
BAKTERIJE *Ornithobacterium rhinotracheale***

DIPLOMSKO DELO  
Visokošolski strokovni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Sandra PINTAR

**VPLIV TEMPERATURE IN VREDNOSTI pH NA AKTIVNOST  
NEVRAMINIDAZE BAKTERIJE *Ornithobacterium rhinotracheale***

DIPLOMSKO DELO  
Visokošolski strokovni študij

**THE EFFECT OF TEMPERATURE AND pH VALUE ON THE  
NEURAMINIDASE ACTIVITY OF BACTERIA *Ornithobacterium  
rhinotracheale***

GRADUATION THESIS  
Higher professional studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek visokošolskega študija zootehnike na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Laboratorijsko delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za imunologijo in celične kulture na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani v Domžalah.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za zootehniko je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Mojco Narat.

Recenzent: znan. svet. dr. Dušan BENČINA

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Silvester ŽGUR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Mojca NARAT  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

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

Datum zagovora: 6. 7. 2009

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

Sandra PINTAR

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Vs
- DK UDK 597:636.5(043.2)=163.6
- KG mikrobiologija/bakterije/*Ornithobacterium rhinotracheale*/nevraminidaze/  
aktivnost/temperatura/pH/perutnina/bolezni dihal
- KK AGRIS L73
- AV PINTAR, Sandra
- SA NARAT, Mojca (mentorica)
- KZ SI -1230 Domžale, Groblje 3
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
- LI 2009
- IN VPLIV TEMPERATURE IN VREDNOSTI pH NA AKTIVNOST  
NEVRAMINIDAZE BAKTERIJE *Ornithobacterium rhinotracheale*
- TD Diplomsko delo (visokošolski strokovni študij)
- OP IX, 36 str., 9 pregl., 10 sl., 48 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Ena od bakterij, ki pri perutnini povzročajo boleznih dihal, je bakterija *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT). Živali se s to bakterijo okužijo preko dihal, njeni prenašalci pa so okužene divje ptice. Bolezenski znaki po okužbi z *Ornithobacterium rhinotracheale* se kažejo kot težko dihanje, neješčnost, sopenje, izcedek in v najslabšem primeru pogin. Bolezen ni nevarna za človeka (ni zoonoza). Izmed različnih bakterijskih molekul, ki sodelujejo pri okužbi in povzročajo škodo gostitelju je veliko beljakovin, med njimi tudi nekaj encimov. Nevraminidaza (sialidaza) je encim, ki cepi vez med sialično (nevraminsko) kislino in drugimi sladkorji, vezanimi na proteine ali lipide ali v oligosaharidih. Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, v katerem območju pH je encimska aktivnost nevraminidaze *Ornithobacterium rhinotracheale* najvišja in katera temperatura to aktivnost zmanjša oz. povsem ustavi. Vzorce z nevraminidazo ORT smo inkubirali pri različnih temperaturah: 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C in nato merili njihovo encimsko aktivnost. Uporabili smo kromogeni substrat BIN in merili čas do pojava pozitivne reakcije, ki se je pokazala, če se je vzorec modro obarval. Aktivnost smo preverjali tudi pri različnih vrednostih pH: od pH 1,35 do pH 11,5. Ugotovili smo, da encim ORT Koka deluje v območju pH od 6,4 do 7,5, ORT Pivka od pH 2,7 do 7,6, ter da se aktivnost encima v vzorcu ORT Koka zniža že pri temperaturi 35 °C, v vzorcu ORT Pivka pa se inaktivira pri 50 °C po 90 min inkubaciji.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Vs
- DC UDC 597:636.5(043.2)=163.6
- CX microbiology/bacteria/*Ornithobacterium rhinotracheale*/neuraminidase/activity/temperature/pH value/poultry/respiratory diseases
- CC AGRIS L73
- AU PINTAR Sandra
- AA NARAT, Mojca (supervisor)
- PP SI -1230 Domžale, Groblje 3
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science
- PY 2009
- TI THE EFFECT OF TEMPERATURE AND pH VALUE INFLUENCE ON THE NEURAMINIDASE ACTIVITY OF BACTERIA *Ornithobacterium rhinotracheale*
- DT Graduation thesis (higher professional studies)
- NO IX, 36 p., 9 tab., 10 fig., 48 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB One of the bacteria that causes a respiratory disease in birds is *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT). Animals are infected through respiratory organs. The main carriers are infected wild birds. The symptoms after the infection with ORT are breathlessness, loss of appetite, discharge and, in worst cases, death. The disease cannot affect humans (it is non-zoonotic). Among different bacterial molecules, participating in the infection and harming the host, there are many proteins, including some enzymes. Neuraminidase (sialidase) is an enzyme which disrupts the bond between the sialic (neuraminic) acid and other sugars bonding with proteins or lipids in oligosaccharides. The purpose of the research was to determine in which pH range the enzyme activity of neuraminidase from the ORT bacterium is the highest and what temperature decreases or completely stops the activity. Neuraminidase samples were prepared from isolates obtained from two different birds. Samples containing neuraminidase activity were incubated at different temperatures: 35° C, 40° C, 45° C, 50° C. After certain incubation time their enzyme activity was measured. We used the chromogenic substratum BIN and measured the time till a positive reaction appeared *i.e.* till the sample became blue. The activity was also tested at different pH values: from pH 1.35 to pH 11.5. It has been determined that the ORT Koka enzyme works in pH value from 6.4 to 7.5, ORT Pivka from pH 2.7 to 7.6 and that the enzyme in the ORT Koka sample is inactivated at the temperature of 35° C, and in the ORT Pivka sample at 50° C after 90 minutes incubation period.

## KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	IX
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA	2
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>3</b>
2.1 BAKTERIJA <i>Ornithobacterium rhinotracheale</i>	3
2.2 DELOVANJE ENCIMOV NEVRAMINIDAZE	6
2.3 IZBRUH BOLEZNI V SLOVENIJI	7
<b>3 MATERIALI IN METODE</b>	<b>8</b>
3.1 PRIPRAVA VZORCEV ZA TESTIRANJE NEVRAMINIDAZNE AKTIVNOSTI	8
<b>3.1.1 Izolacija ORT in priprava supernatanta, ki smo ga testirali</b>	<b>8</b>
<b>3.1.2 Priprava vzorcev za testiranje nevraminidazne aktivnosti pri različnih temperaturah</b>	<b>8</b>
<b>3.1.3 Priprava vzorcev za testiranje nevraminidazne aktivnosti pri različnih vrednostih pH</b>	<b>9</b>
3.2 PREVERJANJE NEVRAMINIDAZNE AKTIVNOSTI	10
3.3 VPLIV TEMPERATURE NA AKTIVNOST NEVRAMINIDAZE	10

<b>3.3.1</b>	<b>Inkubacija vzorcev ORT Koka ter ORT Pivka na različnih temperaturah</b>	<b>10</b>
3.4	VPLIV VREDNOSTI pH NA AKTIVNOST NEVRAMINIDAZE	11
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>12</b>
4.1	DOKAZOVANJE NEVRAMINIDAZNE AKTIVNOSTI PRI VZORCIH SUPERNATANT ORT	12
4.2	VPLIV TEMPERATURE NA NEVRAMINIDAZNO AKTIVNOST	14
4.3	VPLIV pH NA NEVRAMINIDAZNO AKTIVNOST	20
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>24</b>
5.1	RAZPRAVA	24
5.2	SKLEPI	<b>30</b>
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	<b>31</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	<b>32</b>
	<b>ZAHVALA</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Prikaz realnih vrednosti pH	11
Preglednica 2: Preverjanje aktivnosti encima nevraminidaze v vzorcih ORT Koka	12
Preglednica 3: Preverjanje aktivnosti encima nevraminidaze v vzorcih ORT Pivka	13
Preglednica 4: Reakcija vzorcev ORT Koka in ORT Pivka po inkubaciji pri 35 °C	14
Preglednica 5: Reakcija vzorcev ORT Koka in ORT Pivka po inkubaciji pri 40 °C	15
Preglednica 6: Reakcija vzorcev ORT Koka in ORT Pivka po inkubaciji pri 45 °C	16
Preglednica 7: Reakcija vzorcev ORT Pivka po inkubaciji pri 50 °C	17
Preglednica 8: Rezultati merjenja nevraminidaze ORT Koka pri različnih vrednostih pH	21
Preglednica 9: Rezultati merjenja nevraminidaze ORT Pivka pri različnih vrednostih pH	22



## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Značilen gost izcedek v pljučnem krilu	5
Slika 2: Prikaz obolelega in zdravega pljučnega tkiva	5
Slika 3: Strukturna formula sialične kisline	6
Slika 4: Reakcija encima, ki smo ga inkubirali pri 50 °C (90 min in 120 min, po dodajanju substrata BIN	18
Slika 5: Reakcija encima, ki smo ga inkubirali pri 50 °C (90 min in 120 min), po 30 minutnem opazovalnem času	18
Slika 6: Reakcija encima, ki smo ga inkubirali pri 50 °C (90 min in 120 min), po 60 minutnem opazovalnem času	18
Slika 7: Prikaz začetka reakcije encima ORT Pivka pri različnih temperaturah in dolžinah inkubacije	19
Slika 8: Reakcija encima na različnih vrednostih pH (pH 1, pH4, pH 9, pH 12), Po dodajanju substrata BIN	23
Slika 9: Reakcija encima, pri različnih vrednosti pH. ( pH1, pH 4, pH 9, pH12), po 30 minutnem opazovalnem času	23
Slika 10: Reakcija encima, pri različnih vrednosti pH. ( pH1, pH 4, pH 9, pH12 ), Po 60 minutnem opazovalnem času	23

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ORT *Ornithobacterium rhinotracheale*

BIN substrat, ki ga razgrajuje encim (5-Bromo-4chloro-3-indolyl  $\alpha$ -D-N-acetylneuraminic acid sodium salt  $\geq 90\%$  )

PBS fosfatni pufer (Phosphate Buffer Solution )

## 1 UVOD

Bolezni dihal pri perutnini sodijo med najpomembnejše bolezni v farmski reji. Bolezni povzročajo različni virusi, bakterije in glivični povzročitelji. Leta 1994 je bila opisana nova vrsta bakterij, *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT). Znaki okužbe so se kazali kot vnetje sapnika, osrčnika, zračnih vrečk in sinusov ter pljučnica. Bakterija ORT okužuje dihalne organe pri perutnini, kot so piščanci, pure ter nekatere prosto živeče ptice, kot npr. vrane. Bolj dovzetne za okužbo so živali z oslabeлим imunskim sistemom, stare živali ter živali, ki so v stiku še z drugimi mikroorganizmi (Zdovc, 2000). Izmed različnih bakterijskih molekul, ki sodelujejo pri okužbi in povzročajo škodo gostitelju je veliko beljakovin, med njimi tudi nekaj encimov. Aktivnost encimov je odvisna od dejavnikov okolja, kot npr. od vrednosti pH in od temperature. Aktivnost nekega encima običajno s temperaturo narašča, vendar le do temperaturnega optimuma. Pri zelo povišani temperaturi se katalična sposobnost zmanjša, pri neki temperaturi pa pride do popolne inaktivacije aktivnosti. Podobno velja tudi za vpliv pH. V nekem območju je aktivnost optimalna, nad in pod tem območjem pa se zmanjšuje do končne inaktivacije (Encim, 2009). Enake zakonitosti veljajo za encim nevraminidaza, ki je bil predmet našega preučevanja. Nevraminidaza (sialidaza, N-acilnevraminozil glikohidrolaza) je encim eksoglukozidaza, ki katalizira hidrolizo z  $\alpha$ -glikozidno vezjo vezane sialične kisline.  $\alpha$ 2-3,  $\alpha$ 2-6 in  $\alpha$ 2-8 glikozidne vezi so na koncu ostankov sialične kisline oligosaharidov, glikoproteinov, glikolipidov, kolominske kisline in drugih sintetičnih substratov. Nevraminidazo najdemo pri mikroorganizmih, ki so patogeni in naseljujejo različne sluznice kot npr. *M. synoviae*, *M. gallisepticum* in *S. pneumoniae* v respiratornem traktu, v črevesju pa pri bakteriji *Vibrio cholerae* (Vimr in sod., 2004). Pri večini mikroorganizmov leži v genih *nan*, zapis za sintezo nevraminidze, ki so med mikroorganizmi porazdeljeni zelo neenakomerno. Razlike obstajajo celo med ozko sorodnimi vrstami. Za preživetje mikroorganizmov sinteza nevraminidaze najverjetneje ni nujna, vendar je lahko prednost pri pridobivanju hranil, pri patogenih bakterijah pa virulenčni dejavnik, ki omogoča uspešnejšo kolonizacijo tkiv (Corfield, 1992; Grobe in sod., 1998; Gaskell in sod., 1995). Veliko mikroorganizmov nevraminidazo, ki je vezana na membrano (*Actinomyces viscosus*) ali se nahaja znotraj celice (*Salmonella typhimurium*) izloča v gojišče. Nevramindaze so povečini monomerne, nekatere so dimere (*Clostridium chauvoei*) in celo

trimere (*Clostridium septicum*) (Roggentin in sod., 1993). Pri ORT genom še ni bil sekvenciran, prav tako pa ni bil opisan gen za nevraminidazo ali protein oz. encim nevraminidaza. V naši diplomski nalogi nevraminidazno aktivnost pri ORT opisujemo prvič.

## 1.1 NAMEN DELA

V diplomski nalogi smo ugotavljali aktivnost encima nevraminidaze bakterije *Ornithobacterium rhinotracheale* pri različnih temperaturah in različnih vrednostih pH. Ugotavljali smo, katera je optimalna temperatura, kjer je encim najbolj aktiven in pri kateri temperaturi encim ne deluje več oz. je inaktiviran. Aktivnost encima smo preizkušali tudi pri različnih vrednostih pH in ugotavljali pri kateri kislosti oziroma bazičnosti je encim aktiven in kje se njegova aktivnost preneha.

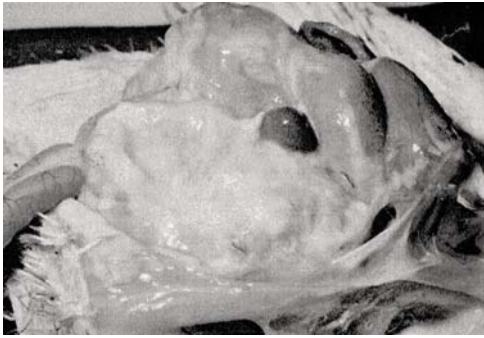
## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 BAKTERIJA *Ornithobacterium rhinotracheale*

Bolezni dihal pri perutnini povzročajo različni virusi ter bakterijski in glivični povzročitelji. Zelo pogosti bakterijski povzročitelji spadajo v rodove: *Pasteurella*, *Chlamydia*, *Haemophilus*, *Yersinia* in *Mycoplasma*. *Ornithobacterium rhinotracheale*, je bila kot nova bakterija opisana leta 1994, kot edina vrsta v tem rodu. Leta 1991 so poročali o bolezni pri brojlerjih v Južni Afriki. Glede na klinične znake ni bilo mogoče prepoznati nobene klasične bolezni dihal oz. nobenega od tedaj znanih povzročiteljev. O podobnih sumih so poročali tudi v Nemčiji leta 1991. Leta 1993 pa so iz Kalifornije poročali o izolaciji 14 sevov ploemorfnih, gram negativnih, paličastih bakterij, ki so jih imenovali le opisno in sicer PGNR ( pleomorphic gram-negative rods) (Zdovc, 2000). Leta 1994 je belgijski znanstvenik Vandamme s svojimi sodelavci izbral 21 sevov bakterij, ki so bile izolirane iz dihalnih organov piščancev, puranov, vran in jerebic. Pri vseh teh živalih je bilo ugotovljeno vnetje sapnika, osrčnika, zračnih vrečk in prisotna pljučnica. Po raziskovalnem delu so prišli do nove ugotovitve in sicer, da vsi sevi pripadajo, do tedaj (še) neznani vrsti bakterije, za katero so predlagali ime *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) (Vandamme in sod., 1994). Leta 1994 je bila prvič opisana nova bakterija *Ornithobacterium rhinotracheale*. Pred letom 1994 se je bakterija imenovala *Pasteurella*, *Kingella*, pa tudi ime TAXON 28 je bilo uporabljeno. ORT je pleomorfna (lahko menja svojo obliko) bakterija, paličaste oblike, počasi rastoča, po Grammu negativna in sodi v nov rod (Van den Bosch, 2004). Sorodna je rodovom *Cytophaga*, *Rimerella*, *Flavobacterium*, *Weeksella*, *Sporocytophaga* in *Capnocytophaga* (Van Empel in sod., 1999). Živali se z bakterijo okužijo preko dihal. Glavni prenašalci so divje ptice (vrane, krokarji, fazani) (Zdovc, 2000). Bolezen se prenaša horizontalno (ob stiku z okuženo živaljo) in vertikalno (iz matere na potomca) (Van Empel in sod., 1999). Klinični znaki obolenja se kažejo kot zelo težko dihanje, neješčnost, sopenje, nosni izcedek ter vnetje sinusov. Pojavi se tudi splošna oslabeledost živali ter depresija. Močno se zniža tudi telesna teža ter proizvodnja jajc pri nesnicah.

Pri pitanih purah se bolezen pojavi po drugem tednu starosti, vendar so za okužbo dovzetni starejši samci. Pri brojlerjih se bolezen pojavi med 3. in 4. tednom starosti

(Zorman-Rojs in sod., 2000). Po okužbi z ORT je umrljivost pri puranih 1- 15 %, nastopi pa med 7. in 8. dnem po okužbi. Pri brojlerjih je umrljivost od 0- 10 %, nastopi pa med 5. in 8. dnem po okužbi (Van Empel in Hafez, 1999). Trajanje bolezni in umrljivost sta zelo spremenljiva in pod vplivom številnih dejavnikov okolja. Dejavniki, ki vplivajo na okužbo, so neustrezno prezračevanje, prevelika gostota naselitve živali in slabe higienske razmere. Znano je tudi, da so živali z oslabljenim imunskim sistemom bolj dovzetne za bolezen. Velik pomen pa ima tudi prehrana in starost (Van den Bosch, 2004). Bolezen, ki jo povzroča ORT ni zoonoza, torej ni nevarna za človeka (Zdovc, 2000). Zelo značilen je gost izcedek v pljučnem delu, ki spominja na jogurt (Slika 1), pojavi pa se tudi cianoza glave (pomodritev kože zaradi pomanjkanja kisika v krvi). Za ugotavljanje diagnoze so klinični znaki in patološka slika premalo specifični, da bi se lahko natančno določila vrsta povzročitelja bolezni, zato se vsak sum potrdi z laboratorijskimi preiskavami. Za preiskavo ORT se odvzame bris iz pljuč in dihalnih vrečk. Za 100% diagnozo je potrebno dokazati prisotnost bakterije ORT v brisu. Ker so bakterijski sevi različno občutljivi na antibiotike, zdravljenje poteka na podlagi antibiograma. Uspešno zdravljenje je dokazano z amoksicilinom (v odmerku 225 ppm v času od 3 do 7 dni) ter s klortetraciklinom (v odmerku 500 ppm v vodi za pitje, v času od 4 do 5 dni). Če zdravljenje živali ni uspešno izvedeno, se poveča stopnja umrljivosti, to pa vodi v veliko gospodarsko izgubo (Van den Bosch, 2004). Preventiva proti pojavu bolezni je dobra higiena okolice kjer se živali nahajajo ter cepljenja, vendar pa ta predstavljajo velik strošek (McMullin, 2004).



Slika 1: Značilen gost izcedek v pljučnem krilu (De Herdt in sod., 2001)

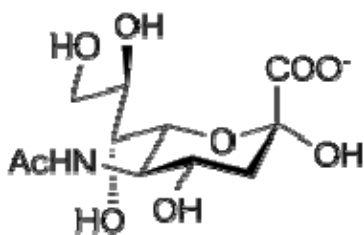


Slika 2: Prikaz obolelega in zdravega pljučnega tkiva (Hafez, 2003)

## 2.2 DELOVANJE ENCIMOV NEVRAMINIDAZE

Za razvoj bolezni in spremembe oz. poškodbe gostiteljevega tkiva so odgovorne različne molekule, ki so na površini bakterijske membrane ali molekule, ki jih bakterije izločajo v okolje. Nevraminidaza je encim, ki ga izdelujejo virusi in bakterije. Nahaja se na površini bakterije. Njegova terciarna struktura mu daje obliko izbokline na membrani. Nevraminidaza cepi vez med sialično kislino na sluznici (nevraminsko kislino = substrat), pri tem pa nastanejo produkti. Encim se po reakciji ne spreminja, ostane v isti obliki in je sposoben ponovnega cepljenja vezi (Batis, 1994). Sialična kislina je kislinski sladkor, ki ga najdemo na koncu glicinske verige glikoproteinov in glikolipidov na celični površini (Sialic acid, 2009b).

Sialična kislina z molekularno formulo  $C_{11}H_{19}NO_9$



Slika 3: Strukturna formula sialične kisline (Sialic acid, 2009a)

Encimi so proteini oz. beljakovine, ki imajo določeno kemično zgradbo in svojo funkcijo. Bakterijska celica sama sintetizira številne encime. Bakterijski encimi se od drugih encimov, ki se nahajajo v celicah ne razlikujejo. Temperatura nad 70 °C jih uniči, prav tako pa njihovo aktivnost uničijo tudi ultravijolični žarki (Batis, 1984). Vsak encim ima svoje aktivno mesto, ki mora biti nepoškodovano, da lahko razgradi substrat. Vendar je za potek reakcije pomembno tudi okolje, v katerem se nahaja oz. dejavniki, ki vplivajo na njegovo aktivnost. Dejavniki so temperatura, pH okolja in količina substrata. Vsak encim ima svoj temperaturni optimum, maksimum in minimum. Aktivnost encima narašča z naraščanjem temperature, vendar le do temperaturnega optimuma. Ker so encimi beljakovine, se zaradi visoke temperature začnejo spreminjati in izgubijo svojo sposobnost in aktivnost, koagulirajo in izgubijo svoje lastnosti. Encim in substrat sta kot



ključ in ključavnica - ko se združita poteče reakcija, vendar to izvemo šele, ko zaznamo produkte (Encim, 2009).

### 2.3 IZBRUH BOLEZNI V SLOVENIJI

Zaradi okužbe z ORT je bolezen izbruhnila tudi v Sloveniji junija leta 1999. Izbruh se je pojavil v dveh ločenih jatah pur. Farma je bila sestavljena iz osmih hlevov, s kapaciteto 3500 živali. Samci in samice so bili ločeni. Pure so bile v starosti 18 do 40 dni cepljene proti atipični kokošji kugi z živimi vakcinami preko pitne vode. Klinični znaki so izbruhnili pri samcih samo dve uri pred smrtjo. Znaki so bili: kihanje, kašljanje, dušenje, nekatere ptice so izločale krvavo sluz. Čez tri dni so bili znaki opaženi tudi pri samicah, čeprav so bile ločene oz. v drugem hlevu. Velik delež živali je poginil, kmalu po zdravljenju pa se je pogin umiril. Mrtve živali so bile pripeljane na Veterinarsko fakulteto v Ljubljano, kjer so opravili obdukcijo. ORT je bila izolirana kot čista kultura iz trahej ptic. Preizkusni test je pokazal prisotnost protiteles proti ORT v puranjih serumih iz obeh okuženih jat. Pri večini samcev so bile opažene hude poškodbe pljuč, sapnika ter zračnih vrečk. Kri, vranico in jetra so naselili na gojišča za bakterije in te kulture inkubirali 46 ur na 37 °C za bakteriološke raziskave. Rezultati obdukcije so pokazali zelo povečana, zamašena in s krvjo napolnjena pljuča, v zračnih vrečkah pa se je pojavila jogurtu podobna snov. Pri nekaterih je bilo opaziti madežno krvavitev na osrčnem predelu, povečana jetra in vranico. Pri nekaterih živalih je bila prisotna tudi pljučnica (Zorman – Rojs in sod., 2000).

### **3 MATERIALI IN METODE**

#### **3.1 PRIPRAVA VZORCEV ZA TESTIRANJE NEVRAMINIDAZNE AKTIVNOSTI**

##### **3.1.1 Izolacija ORT in priprava supernatanta, ki smo ga testirali**

Kulture ORT so bile izolirane na Veterinarski fakulteti v Ljubljani na agarskem gojišču s 5% ovčjo krvjo (Zorman-Rojs in sod., 2000). Kolonije ORT (premera 1-3 mm) so bile sprane z agarskega gojišča s PBS (pH 7.2) in vzorci centrifugirani (10 000 x G, 10 min). Celice ORT (sediment) so bile zamrznjene in hranjene več let pri -20°C na Oddelku za zootehniko, Biotehniške fakultete. Po odmrznenju in centrifugiranju je bilo ugotovljeno, da je nevraminidazna aktivnost pri dveh kulturah ORT močnejša v supernatantu kot v celičnem sedimentu (Benčina, 2009a). Taki supernatanti so bili vključeni v testiranje v spodaj opisanih poskusih. Testirali smo dva različna seva bakterije ORT, ki smo ju poimenovali: ORT Koka in ORT Pivka. Vzorec ORT Koka je bil pridobljen iz pljuč kokoši, iz starševske jate Koka, (Varaždin, Hrvaška), kjer je okužba z ORT leta 2000 povzročila pogin mnogih kokoši. Vzorec ORT Pivka pa je bil pridobljen iz sapnikov puranov, ki so bili z ORT okuženi na farmi v Sloveniji (Zorman-Rojs in sod., 2000).

##### **3.1.2 Priprava vzorcev za testiranje nevraminidazne aktivnosti pri različnih temperaturah**

Potrebovali smo vzorec supernatanta z nevraminidazo ORT Koka oz. ORT Pivka, substrat BIN za dokaz nevraminidazne aktivnosti, plastične mikrocentrifugirke (0,6 ml), pipete, nastavke, vodno kopel. Vzorčki so bili vedno pripravljene na sledeči način: v mikrocentrifugirke smo odpipetirali 10 µl supernatanta vzorca ORT Koka oz. ORT Pivka ter jih inkubirali v vodni kopeli pri različnih temperaturah: pri 35 °C, 40 °C, 45 °C, ORT Pivka tudi pri 50 °C. Inkubirali smo 30 min, 60min, 90 min, 120 min. Po končani inkubaciji smo vzorcem dodali 10 µl substrata BIN-a (koncentracija 0,5 mg/ml) in opazovali nastanek modre barve, ki pomeni pozitivno reakcijo. Vedno smo imeli tudi kontrolo. V kontrolni mikrocentrifugirki je bilo 10 µl vzorca ORT Koka oz. ORT Pivka in 10 µl BIN-a, le da je bila ves čas na sobni temperaturi. Kontrolna mikrocentrifugirka nam je služila za kontrolo aktivnosti encima oziroma za primerjavo z reakcijami, ki so potekale pri različnih temperaturah.

### 3.1.3 Priprava vzorcev za testiranje nevraminidazne aktivnosti pri različnih vrednostih pH

Potrebovali smo sledeči material:

Vzorci ORT Koka oz ORT Pivka, fosfatni pufer (PBS) pH 7,4, 37 % HCl (solna kislina), NaOH (natrijev hidroksid), čaše, mešalo, merilec pH, pipete, žličko in magnetne paličice za mešalo. V čašo smo nalili PBS in jo položili na mešalo skupaj z magnetno paličico. V čašo smo potopili pH meter ter odčitali vrednost pH (okoli 7). Ko smo pripravljali kislno raztopino smo dodajali HCl (kislina) do željenega pH. Ko smo prišli do željene vrednosti pH smo si odvzeli 10 ml te kisle raztopine in nadaljevali z dodajanjem HCl do naslednje višje vrednosti pH. Enak postopek je bil tudi pri pripravi bazične raztopine, le da smo v PBS dodajali NaOH (baza), do željenega pH. Vzorci (supernatanti, katerim smo nameravali izmeriti nevraminidazno aktivnost), so bili v puferški raztopini PBS, s pH vrednostjo okoli 7. Da bi tem vzorcem spremenili pH, smo jim nameravali dodajati pufer s pH večjimi ali manjšimi vrednostmi in sicer tako, da bi 10  $\mu$ l vzorcu dodali 10  $\mu$ l PBS s pH 7,4. pH vrednost ne spreminja linearno, ampak v odvisnosti od puferških kapacitet prisotnih raztopin, zato je treba vrednosti pH izmeriti. Ker 20  $\mu$ l ne moremo izmeriti vrednosti pH, smo to storili z večjimi volumni, ki smo jih mešali v enakih razmerjih, kot kasneje vzorce. Po vsaki pripravi določenega pH, smo izmerili njegovo dejansko vrednost. Npr. pripravili smo pufer pH 1. pH 1 smo zmešali s PBS v razmerju 1:1 in sicer 10 ml pH 1 smo dodali 10 ml PBS. Čašo smo položili na mešalo in s pH metrom odčitali dejansko vrednot tega pH, ki je bila v tem primeru 1,35. Dejanska vrednost pH nam pove, kakšno je bilo realno okolje v mikrocentrifugirkah, kjer smo testirali aktivnost nevraminidaze.

### 3.2 PREVERJANJE NEVRAMINIDAZNE AKTIVNOSTI

Nevraminidazno aktivnost smo preizkušali z vzorcema ORT Koka ter z ORT Pivka. Ker sta bila oba vzorca zamrznjena, smo ju odmrznili in naredili preizkus aktivnosti in sicer v nerazredčenem vzorcu in v vzorcih v razredčinah 1:2, 1:4, 1:8 v PBS. V testne mikrocentrifugirke smo najprej dali vzorce in sicer: v prvo (poz. kontrola) 10 µl vzorca ORT Koka. V naslednjih mikrocentrifugirkah smo pripravili po 10 µl razredčine vzorcev in sicer 2-kratno, 4-kratno in 8-kratno razredčitev vzorca v PBS. 10-im µl takih vzorcev smo nato dodali 10 µl substrata BIN (0,5 mg/ml) in opazovali razvoj modre barve ter zabeležili čas, ko se je barva pojavila. Enako smo testirali tudi vzorce za ORT Pivka.

### 3.3 VPLIV TEMPERATURE NA AKTIVNOST NEVRAMINIDAZE

Ko smo imeli vzorčke v mikrocentrifugirkah pripravljene, smo jih inkubirali različno dolgo v vodni kopeli na različnih temperaturah, da bi ugotovili pri kateri temperaturi encim ni več aktiven.

#### 3.3.1 Inkubacija vzorcev ORT Koka ter ORT Pivka na različnih temperaturah

Vzorce ORT Koka in ORT Pivka smo testirali pri temperaturah 35 °C, 40 °C, 45 °C, ORT Pivka pa tudi pri temperaturi 50 °C. Zaprte mikrocentrifugirke smo položili na plavajoči podstavek, tako da so bile konice, kjer se je nahajal encim, izpostavljene temperaturi. Pri temperaturah 35 °C, 40 °C, 45 °C smo vedno inkubirali po dva vzorčka. Npr. ORT Koka smo inkubirali pri 35 °C: prvo mikrocentrifugirko 30 minut, drugo mikrocentrifugirko 60 minut. Enako pri 40 °C in 45 °C. Tudi ORT Pivka smo inkubirali na enak način, po dva vzorčka v kopeli na 35 °C. Prvo mikrocentrifugirko za 30 min in drugo mikrocentrifugirko za 60 min. Enako pri 40 °C in 45 °C. Ker je ORT Pivka bolj termostabilen od ORT Koka, smo čas inkubacije pri temperaturi 50 °C podaljšali. Inkubirali smo štiri vzorčke: 30 minut, 60 minut, 90 minut in 120 minut.

### 3.4 VPLIV VREDNOSTI pH NA AKTIVNOST NEVRAMINIDAZE

V laboratoriju smo si pripravili različne vrednosti pH, s katerimi smo ugotavljali aktivnost nevraminidaze. Pripravili smo različne pH, od zelo bazičnega do zelo kislega okolja. Za vzorce ORT Koka smo pripravili raztopine pH 3, pH 4, pH 5, pH 9, pozitivno kontrolo in negativno kontrolo. Za pozitivno kontrolo smo odpipetirali 10 $\mu$ l BIN-a, 10 $\mu$ l vzorčka in 10 $\mu$ l PBS-a, ter ustvarili optimalno okolje pH 7,2 kjer encim vedno reagira. S to kontrolo smo ugotovili, da je encim normalno aktiven, saj je v takem okolju reagiral že po 10-ih minutah. Negativna kontrola nam je služila le za primerjavo odtenkov. Za negativno kontrolo smo odpipetirali 10 $\mu$ l BIN-a in 10 $\mu$ l PBS-a. Ker ni bilo dodanega encima nevraminidaze, se vzorec ni mogel obarvati v modro. Za vzorec ORT Pivka smo pripravili sledeče vrednosti pH: pH 1, pH 2, pH 4, pH 9, pH 10, pH 12, pozitivno in negativno kontrolo. V mešanici vzorca in PBS so bile realne vrednosti pH, kot so prikazane v preglednici 1.

Preglednica 1: Prikaz realnih vrednosti pH

	<b>10 ml PBS + pH</b>	<b>dejanska pH vrednost</b>
ORT Pivka	1	1,35
	2	2,7
	4	6,5
	9	7,5
	10	7,6
	12	11,5
ORT Koka	3	6,4
	4	6,5
	5	6,54
	9.5	7,5

## 4 REZULTATI

### 4.1 DOKAZOVANJE NEVRAMINIDAZNE AKTIVNOSTI PRI VZORCIH SUPERNATANTOV ORT

Vzorci ORT Koka so se postopoma začeli obarvati v modro v različnih intenzivnostih. Ugotovili smo, da je encim, kljub temu, da je bil zamrznjen, še vedno aktiven. Ker je bil encim v različnih razredčinah, se je tudi aktivnost encima pokazala v različnih časih: pri bolj razredčenih vzorcih kasneje.

Preglednica 2: Preverjanje aktivnosti encima nevraminidaze v vzorcih ORT Koka

Čas opazovanja (min)	0	razredčine		
	pozitivna kontrola	1:2	1:4	1:8
5	-	-	-	-
10	+	+	-	-
20	+	+	-	-
30	+	+	-	-
40	+	+	+	-
50	+	+	+	-
60	+	+	+	-

Opomba: + = modra barva / pozitivna reakcija  
 - = brezbarven vzorec / negativna reakcija  
 0 = pozitivna kontrola je neredčen vzorec

Tudi pri ugotavljanju aktivnosti vzorca ORT Pivka, so se vzorčki začeli postopoma obarvati v modro v različnih intenzivnostih glede na njihovo redčenje. Tako smo ugotovili, da je encim kljub temu, da je bil zamrznjen, še vedno aktiven. Ker je bil encim v različnih razredčinah, se je tudi aktivnost encima pokazala v različnih časih: pri bolj razredčenih vzorcih kasneje.

Preglednica 3: Preverjanje aktivnosti encima nevraminidaze v vzorcu ORT Pivka

Čas opazovanja (min)	0	razredčine		
	pozitivna kontrola	1:2	1:4	1:8
5	-	-	-	-
10	-	-	-	-
20	+	-	-	-
25	+	+	-	-
30	+	+	-	-
40	++	+	-	-
45	++	++	+	-
50	++	++	+	-
60	+++	++	+	+

Opomba: + = modra barva / pozitivna reakcija  
 - = brezbarven vzorec / negativna reakcija  
 0 = pozitivna kontrola je neredčen vzorec

Encim je bil vedno aktiven, vendar, če je koncentracija encimov večja, reakcija poteče prej, če je koncentracija manjša (razredčeni vzorci) pa reakcija poteče kasneje. Reakcija poteče vedno, če je encim aktiven in nepoškodovan. Odvisno od redčenja, so se vzorci v enakem času različno intenzivno obarvali. Npr.: po 40 min smo opazili močno obarvanost pri neredčenem encimu (++), manj obarvanosti pri 2 kratni redčitvi (+) in brezbarvno vsebino v mikrocentrifugirki, kjer je bila 4 kratna ali 8 kratna redčitev encima.

#### 4.2 VPLIV TEMPERATURE NA NEVRAMINIDAZNO AKTIVNOST

Povišana temperatura inaktivira delovanje encimov, vendar je to odvisno tudi od časa inkubacije pri neki temperaturi.

Ker smo vzorce ORT Koka in ORT Pivka inkubirali pri istih temperaturah so rezultati primerljivi.

Preglednica 4: Reakcije vzorcev ORT Koka in ORT Pivka po inkubaciji pri 35 °C

Čas opazovanja (min)	Inkubacija pri 35 °C					
	ORT Koka			ORT Pivka		
	K	30 min	60 min	K	30 min	60 min
5	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	+	-	-
15	+	-	-	+	-	-
20	+	-	-	+	+	+
30	+	-	-	+	+	+
40	+	-	-	+	+	+
45	ND	ND	ND	++	++	++
50	+	-	-	++	++	++
60	++	-	-	++	++	++
90	++	+	-	+++	+++	+++

Opomba :     +     = modra barva / pozitivna reakcija  
               -     = brezbarven vzorec / negativna reakcija  
               K     = pozitivna kontrola (sobna temperatura)  
               ND    = ni določeno

Ugotovili smo, da je na temperaturi 35 °C bolj termostabilna ORT Pivka kot ORT Koka saj smo reakcijo zaznali že po 20 minutah inkubacije. Vzorčki so bili po 20 minutah obarvani svetlo modro, intenzivnost pa se je stopnjevala in po eni uri so bili vzorčki obarvani temno modro. Vzorčki ORT Koka se niso obarvali niti po eni uri, temveč šele po 90 min, kar pomeni, da se zgodila zakasnjena reakcija.

Temperaturo vodne kopeli smo zvišali na 40 °C in naredili enak preizkus encimov.



Preglednica 5: Rezultati inkubacije ORT Koka in ORT Pivka pri 40 °C

Čas opazovanja (min)	Inkubacija pri 40 °C					
	ORT Koka			ORT Pivka		
	K	30 min	60 min	K	30 min	60 min
5	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	+	-	-
15	+	-	-	+	-	-
20	+	-	-	+	+	+
30	+	-	-	+	+	+
40	+	-	-	+	+	+
45	ND	ND	ND	++	++	++
50	++	-	-	++	++	++
60	++	-	-	++	++	++
150	+++	+	-	ND	ND	ND

Opomba:     +       = modra barva / pozitivna reakcija  
               -       = brezbarven vzorec / negativna reakcija  
               K       = pozitivna kontrola (sobna temperatura)  
               ND      = ni določeno

Rezultati inkubacije vzorčkov nevraminidaze na 40 °C so pokazali, da je po pričakovanju ORT Koka, na višji temperaturi skorajda inaktiven. Za ORT Pivka pa je 40 °C še vedno prenizka temperatura za inaktivacijo encima, saj se je aktivnost zopet pokazala po 20 minutah opazovanja.

Temperaturo vodne kopeli smo zvišali na 45 °C in naredili enak preizkus encimov.

Preglednica 6: Reakcija vzorcev ORT Koka in ORT Pivka po inkubaciji pri 45 °C

Čas opazovanja (min)	Inkubacija pri 45 °C					
	ORT Koka			ORT Pivka		
	K	30 min	60 min	K	30 min	60 min
5	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	+	-	-
15	+	-	-	+	-	-
20	+	-	-	+	-	-
30	+	-	-	+	+	+
40	+	-	-	++	+	+
50	++	-	-	++	+	+
55	ND	ND	ND	++	++	++
60	++	-	-	+++	++	++
120	+++	-	-	ND	ND	ND

Opomba:     +       = modra barva / pozitivna reakcija  
               -       = brezbarven vzorec / negativna reakcija  
               K       = pozitivna kontrola (sobna temperatura)  
               ND      = ni določeno

Po 30 minutni in 60 minutni inkubaciji vzorčkov v toplotni kopeli na 45 °C smo, po pričakovanjih dobili rezultat za ORT Koka, ki je ostal negativen, torej encim ni deloval. Po inkubaciji ORT Pivka na 45 °C pa se je začetek aktivnosti malo zakasnil, tako da se je obarvanost vzorčkov pokazala po 30 minutah.

Ker je ORT Pivka bolj termostabilen, smo temperaturo inkubacije dvignili na 50 °C

Preglednica 7: Reakcija vzorca inkubacije ORT Pivka po inkubaciji pri 50 °C

Čas opazovanja (min)	Inkubacija pri 50 °C				
	K	30 min	60 min	90 min	120 min
5	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-
15	+	-	-	-	-
20	+	-	-	-	-
25	+	-	-	-	-
30	+	-	-	-	-
35	+	-	-	-	-
40	+	-	-	-	-
45	+	+	-	-	-
50	+	+	-	-	-
55	+	+	+	-	-
60	+	+	+	-	-
65	+	+	+	+	-
70	++	+	+	+	-
75	++	+	+	+	+
80	++	+	+	+	+

Opomba: + = modra barva / pozitivna reakcija  
 - = brezbarven vzorec / negativna reakcija  
 K = pozitivna kontrola (sobna temperatura)

S podaljševanjem inkubacije pri 50 °C, se je aktivnost nevraminidaze zmanjševala, vendar je bila zakasnela pozitivna reakcija ugotovljena, tudi če je bil vzorec pregrevan 2 uri. ORT Pivka smo inkubirali v 4 paralelkah, na temperaturi 50 °C, po dve mikrocentrifugirki za vsak čas inkubacije. Prvi vzoreček 30 minut, drugi vzoreček 60 minut skupaj, ter tretji vzoreček 90 minut in četrti vzoreček 120 minut skupaj. Po končani inkubaciji smo dodali 10µl BIN-a ter opazovali reakcijo encima, ter pri tem beležili čas do pojava barve (oz. reakcije).



Slika 4: Opazovanje reakcije encima ORT Pivka, ki smo ga inkubirali pri 50 °C (90 min in 120 min)

Slika prikazuje mikrocentrifugirke v prvih minutah po dodajanju substrata BIN, v kateri še ni potekla reakcija.



Slika 5: Opazovanje reakcije encima ORT Pivka, ki smo ga inkubirali pri 50 °C (90 min in 120 min)

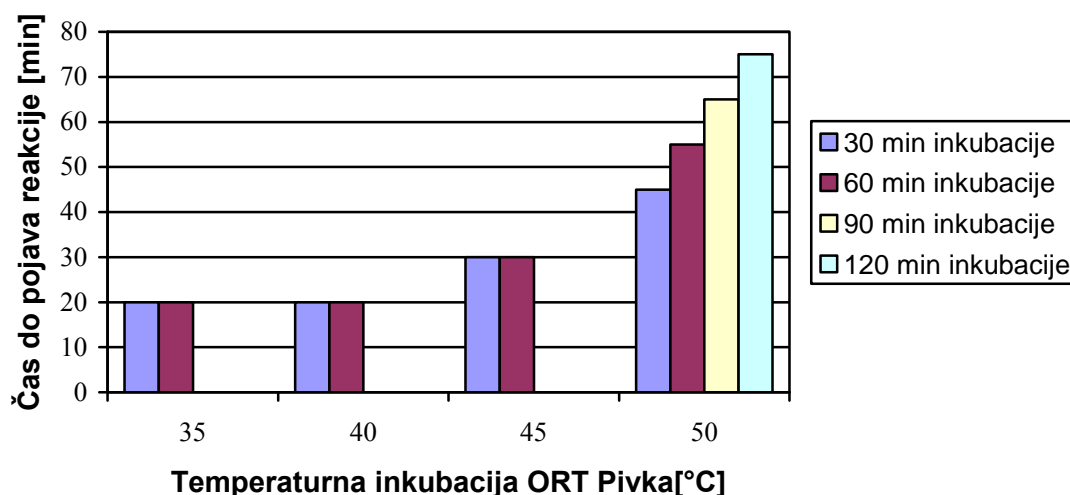
Slika prikazuje mikrocentrifugirke po 90 min in 120 min inkubaciji po 30 min opazovanju.



Slika 6: Opazovanje reakcije encima, ki smo ga inkubirali pri 50 °C (90 min in 120 min)

Slika prikazuje reakcijo v 60. min po dodatku BIN

Po enournem opazovanju je bilo opaziti rahlo obarvanost pri vzorčku, ki je bil inkubiran 90 min. Pri encimu, ki smo ga inkubirali 120 min, pri 50 °C po eni uri opazovanja, ni bilo zaznati aktivnosti. Šele kasneje se je zgodila zakasnela pozitivna reakcija. 10 µl ORT Pivka, ki smo ga uporabili za kontrolo, je bil ves ta čas, ko so se vzorčki inkubirali, na sobni temperaturi (23-24 °C). Reakcija (modra obarvanost vzorčka) se je pri kontroli pokazala po 15 minutah. Pri vzorčku, ki smo ga inkubirali 30 minut, je bilo zaznati reakcijo po 45 minutah opazovanja. Pri vzorčku, ki smo ga inkubirali 60 minut, je bilo zaznati reakcijo po 55 minutah opazovanja. Pri vzorčku, ki smo ga inkubirali 90 minut, je bilo zaznati reakcijo po 65 minutah opazovanja. Pri vzorčku, ki smo ga inkubirali 120 minut, je bilo zaznati reakcijo po 75 minutah opazovanja. Lahko zaključimo, da 50 °C zniža nevraminidazno aktivnost vzorca ORT Pivka, vendar je tudi 2 urna izpostava tej temperaturi ne uniči.



Slika 7: Vpliv temperaturne inkubacije na hitrost reakcije nevraminidaze iz ORT Pivka

Pri temperaturi 35 °C smo inkubirali vzorec 30 min in 60 min. Prva obarvanost se je pokazala pri 20. minuti opazovanja. Pri inkubaciji 40 °C smo inkubirali vzorec 30 min in 60 min. Prva obarvanost se je ravno tako pokazala pri 20. minuti opazovanja. Pri inkubaciji 45 °C smo inkubirali vzorec 30 min in 60 min. Prva obarvanost se je pokazala pri 30. minuti opazovanja. Pri inkubaciji 50 °C smo inkubirali vzorec 30 min, 60 min, 90 min ter 120 min. Pri vzorcu, ki je bil inkubiran 30 min se je obarvanost pokazala pri 45. minuti opazovanja, pri vzorcu, ki je bil inkubiran 60 min, se je obarvanost pokazala pri 55. minuti opazovanja, pri vzorcu, ki je bil inkubiran 90 min, se je obarvanost pokazala pri 65. minuti opazovanja, pri vzorcu, ki je bil inkubiran 120 min, se je obarvanost pokazala pri 75. minuti opazovanja.

Ugotovimo lahko, da je aktivnost z naraščanjem temperature padala.

#### 4.3 VPLIV pH NA NEVRAMINIDAZNO AKTIVNOST

Testiranja vpliva na aktivnost pH ORT Koka in ORT Pivka so bila pri različnih vrednostih pH, zato podatki niso primerljivi. Rezultati so prikazani v ločenih preglednicah (preglednica 8 in 9).

Preglednica 8: Rezultati merjenja nevraminidaze ORT Koka pri različnih vrednostih pH

Čas opazovanja (min)	P	pH 6,4	pH 6,5	pH 6,54	pH 7,5	N
5	-	-	-	-	-	-
10	+	+	+	-	-	-
15	+	+	+	-	+	-
20	+	+	+	+	+	-
25	+	+	+	+	+	-
30	+	+	+	+	+	-
35	+	++	+	+	+	-
40	++	++	+	+	+	-

Opomba: + = modra barva / pozitivna reakcija  
 - = brezbarven vzorec / negativna reakcija  
 P = pozitivna kontrola / vzorec ORT v PBS pH 7,2  
 N = negativna kontrola / le PBS

Po testiranju z različnimi vrednostmi pH smo ugotovili, da je encim v kislem okolju pH 3 (pH 6,4) in pH 4 (pH 6,5) aktiven že po 10. minutah opazovanja. Pri vrednosti pH 5 (pH 6,5), pa se njegova aktivnost zmanjša. Pri vrednosti pH 9,5 (pH 7,5) je podobno aktiven kot pri pH 3 (6,4 pH) in pH 4 (pH 6,5). Pozitivna kontrola je vsebovala 10 $\mu$ l PBS-a, 10 $\mu$ l BIN-a, 10 $\mu$ l ORT Koka. Negativna kontrola je vsebovala 10 $\mu$ l BIN-a in 10 $\mu$ l PBS-a. Pri negativni kontroli ni nikoli prišlo do obarvanosti. Mikrocentrifugirko s PBS (brez nevraminidaze) smo imeli le zato, da smo videli, da BIN ni reagiral, ker ni bil dodan vzorec, ki ima aktivnost nevraminidaze.

Preglednica 9: Rezultati merjenja nevraminidaze ORT Pivka pri različnih vrednostih pH

Čas opazovanja (min)	K	pH 1,35	pH 2,7	pH 6,5	pH 7,5	pH 7,6	pH 11,5	N
5	-	-	-	-	-		-	-
10	-	-	-	-	-		-	-
15	-	-	-	-	-		-	-
20	-	-	+	-	-	+	-	-
25	+	-	+	+	+	+	-	-
30	+	-	+	+	+	+	-	-
35	+	-	+	+	+	+	-	-
40	+	-	++	+	+	++	-	-
45	+	-	++	++	+	++	-	-
50	+	-	++	++	+	++	-	-
55	++	-	++	++	++	++	+	-
60	++	-	+++	++	++	+++	+	-

Opomba: + = modra barva / pozitivna reakcija

- = brezbarven vzorec / negativna reakcija

K = pozitivna kontrola / vzorec ORT v PBS pH 7,2

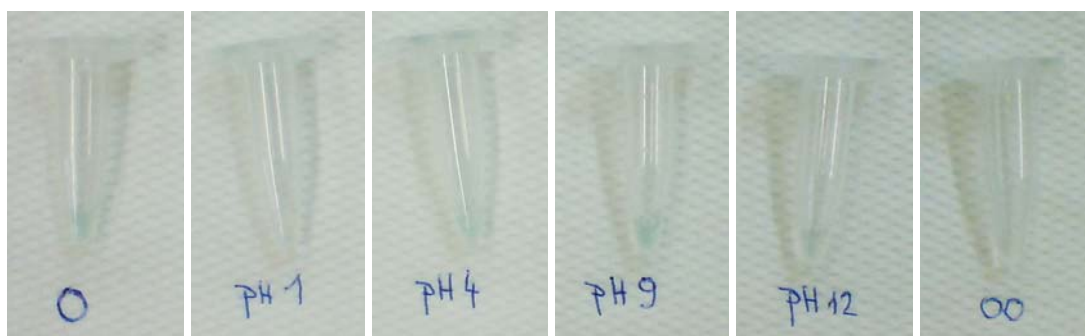
N = negativna kontrola / le PBS

S testom smo ugotovili, da encim ORT Pivka ni reagiral v zelo kislem okolju pH 1 (pH 1,35), v bazičnem okolju pH 12 (pH 11,5) pa je bila aktivnost močno zmanjšana. Pri vrednostih pH 2 (pH 2,7), pH 4 (pH 6,5), pH 9 (pH 7,5) in pH 10 (pH 7,6) je bil encim aktiven po cca 20-ih do 25-ih minutah. Pozitivna kontrola je vsebovala 10 $\mu$ l PBS-a, 10 $\mu$ l BIN-a, 10 $\mu$ l ORT Pivka. Negativna kontrola je vsebovala 10 $\mu$ l BIN-a in 10 $\mu$ l PBS-a. Pri negativni kontroli ni nikoli prišlo do obarvanosti, saj ni bilo prisotnega encima.





Slika 8 : Opazovanje reakcije encima ORT Pivka, v prvih minutah po dodajanju substrata BIN, za različne vrednosti pH. (pH1, pH 4, pH 9, pH 12)



Slika 9: Opazovanje reakcije encima ORT Pivka pri različnih vrednosti pH. (pH 1, pH 4, pH 9, pH 12), po 30. minutnem opazovanju.



Slika 10: Opazovanje reakcije encima ORT Pivka pri različnih vrednosti pH. (pH 1, pH 4, pH 9, pH 12), po 60. minutnem opazovanju.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Bakterija *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) je bila prvič opisana kot nova vrsta bakterije leta 1994. Pred tem letom se je imenovala *Pasturella*, *Kingela* in TAXON 28. *Ornithobacterium rhinotracheale* je pleomorfna bakterija, kar pomeni, da menja svojo obliko. Je počasi rastoča, po Grammu negativna vrsta bakterije, paličaste oblike (Van den Bosch, 2004) in okužuje divje in domače ptice.

Ko pride do okužbe gostitelja, sta trajanje bolezni in umrljivost zelo spremenljiva in pod vplivom številnih dejavnikov okolja. Dejavniki, ki vplivajo na okužbo so neustrezno prezračevanje, prevelika gostota naselitve in slabe higienske razmere (Van den Bosch, 2004). Živali se s to bakterijo okužijo preko dihal, kot glavni prenašalci pa so divje ptice (Zdovc, 2000). Bolezen se lahko prenaša horizontalno in vertikalno. Bolezen ni nevarna za človeka (Van Empel in Hafez, 1999).

Nevraminidaza je bila dokazana pri patogenih bakterijah, ki so bile izolirane iz poškodovanih tkiv njihovih gostiteljev. Pri teh bakterijah je bila njihova nevraminidazna aktivnost močna, šibkejšo so ugotovili pri nepatogenih bakterijah, ki naseljujejo prebavni in respiratorni trakt ter druge površine sluznic svojih gostiteljev in z njim živijo v simbiozi. Vendar pa življenje v gostiteljih ni pogoj za prisotnost gena za nevraminidazo v genomu bakterije oz. nevraminidazno aktivnost bakterije. Nevraminidazo so našli tudi pri bakteriji *Micromonospora viridifaciens*, ki živi v zemlji in pri bakteriji *Arhrobacter sp.* (Colfield, 1992). Nevraminidazo sintetizira veliko patogenih mikroorganizmov. Tako je pomemben virulenčni dejavnik, ki omogoča širjenje mikroorganizmov v gostitelju (Taylor, 1996; Soong in sod., 2006; Severi in sod., 2007).

Sialična kislina, katera se nahaja na sluznici traheje in v celotnem respiratornem traktu, večinoma predstavlja končni ostanek zapletenejšega glikozilacijskega vzorca sladkornih ostankov oligosaharidov, glikoproteinov, glikolipidov in gangliozidov ter jih ščiti pred hidrolizo po odcepitvi sialične kisline, z nevraminidazami pa postanejo tarča za nadaljno

razgradnjo z različnimi encimi (King in sod., 2006). Prepustnost veznega tkiva se poveča, viskoznost telesnih tekočin se zmanjša, vse našteto pa omogoča lažje širjenje bakterij in njihov tesnejši stik z gostiteljevimi celicami (Ponnuraj in Jedrzejcas, 2000). Zaradi depolimerizacije zunajceličnega matriksa ta ni več rezervoar citokinov in encimov, vpletenih v signalno transdukcijo (Ernst in sod., 1995). Nevraminidaze spremenijo strukturo celične membrane in posledično celično fiziologijo. Spremembe vodijo do povečane fagocitoze, hemaglutinacije in zmanjšanja agregacije celic (Gesner in Thomas, 1966).

Nevraminidaze naj bi bile vpletene tudi v avtoimunski odziv, ki nastane med okužbo. Zaradi desializacije gostiteljevih glikonjugatov nastajajo novi antigeni, ki jih gostiteljev imunski sistem prepozna kot tujek (Kahane in sod., 1990) ali pa bakterija gostiteljevo odcepljeno sialično kislino vstavi v svojo celično površino in se s tem zamaskira z gostiteljevimi molekulami, ki jih imunski sistem gostitelja ne prepozna kot tujke (Severi in sod., 2007). Bakterije lahko s svojo nevraminidazno aktivnostjo poškodujejo tudi sialično kislino serumskih imunoglobulinov in jim onemogočijo njihovo funkcijo.

### **Povezava nevraminidazne aktivnosti ORT z nevraminidazno aktivnostjo bakterij *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma synoviae* in *Mycoplasma gallisepticum* in drugimi ptičjimi mikoplazmami**

Najbližje sorodne gene hipotetičnih genov za nevraminidazo *M. synoviae* in *M. gallisepticum* imajo *Clostridium perfringens*, *Bacteroides fragilis*, *Mycoplasma alligatoris*, *Pasteurella multocida* in *Salmonella typhimurium*. Vasconcelos in sodelavci so leta 2005 določili, da sta gena za hipotetično nevraminidazo MS\_0199 in MGA\_0329 najbolj podobna tistemu *nanH*, ki kodira znotrajcelično nevraminidazo pri klostridiju *Clostridium perfringens*. Poravnava zaporedja genov MS\_0199 in MGA\_0329 pa kaže največje ujemanje z genom *nanB* bakterije *Pasteurella multocida*. V uvodu pa sem že opisala, da je bila ORT zaradi svojih značilnosti najprej poimenovana *Pasteurella*. Na nevraminidazo kot virulenčni dejavnik bi lahko kazala tudi sorodnost teh bakterij, od katerih vse naseljujejo sluznice, v katerih je veliko sialične kisline, prav tako kot *M. gallisepticum* in *M. synoviae* pa tudi ORT in *Pasteurella multocida* naseljujeta respiratorni trakt.

Nevraminidazna aktivnost je bila do sedaj opisana pri sedmih ptičjih mikoplazmah, ki spadajo v različne skupine: pri štirih patogenih ptičjih mikoplazmah *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. iowae*, *M. corogypsi* (izolirani iz podplatnega abscesa ameriškega črnega jastreba) in treh nepatogenih vrstah: *M. anseris*, *M. pullorum* in *M. cloacale* (May in Brown, 2007;2008; Berčič in sod., 2008). Na redkost nevraminidazne aktivnosti pri mikoplazmah kaže tudi podatek, da so jo do sedaj potrdili le v skupini *hominis*, gruča *M. synoviae* pri *M. alligatoris* (ki pri gostitelju aligatorju povzroča akutno vnetje in nekrozo v številnih telesnih organih, še posebej pljučih, čemur sledi smrt) (Brown in sod., 2004) ter pasjih mikoplazmah *M. canis*, *M. cynos* in *M. molare* (May in Brown, 2008).

Očitne razlike nevraminidazne aktivnosti smo opazili tudi med sevoma ORT Koka in ORT Pivka. Prav tako so različne nevraminidazne aktivnosti odkrili pri različnih sevih *M. gallisepticum* ter pri različnih kulturah, ki so izhajale iz istega seva. Na primer, pri kulturah seva S6 *M. gallisepticum*, čeprav so bile kulture primerljive glede *in vitro* pasaž in razmer rasti (kot je bilo tudi pri naših vzorcih ORT), so pri nekaterih kulturah S6 opazili nizko nevraminidazno aktivnost (Berčič in sod., 2008). To lahko pojasni, zakaj Glasgow in Hill (1980) nevraminidazne aktivnosti pri sevu S6 nista mogla dokazati. O podobnih vzrokih za razlike v delovanju nevraminidaze bi lahko sklepali tudi pri preiskanih sevih ORT v tej raziskavi. Zanimivo je, da so imele nizke pasaže ( $R_{LOW}$ ) kultur seva R *M. gallisepticum* relativno visoko nevraminidazno aktivnost, visoke pasaže ( $> 160$ ,  $R_{HIGH}$ ) pa nizko, pri čemer so nizke pasaže visoko invazivne, visoke pasaže pa niso invazivne (Winner in sod., 2000; Much in sod., 2003). Nadaljnje raziskave bodo pokazale, ali velja podobno tudi za ORT. Prav tako pa bo potrebno za potrditev, da je reakcija nevraminidazne aktivnosti pri ORT res posledica aktivnosti encima nevraminidaze, določiti gen za nevraminidazo.

Poleg tega, da smo dokazali, da ima ORT nevraminidazno aktivnost, smo opisali tudi, da sta imela seva ORT Koka in ORT Pivka nevraminidazo, ki je bila različno občutljiva na temperaturo. Najustreznejši pH za delovanje bakterijskih nevraminidaz je sicer med 5 in 7, najustreznejša temperatura, pri kateri deluje večina nevraminidaz, pa je 35-40 °C (Abrashev in Dulguerova, 2000). Nevraminidazi bakterij *Arthrobacter ureafaciens* in

*Micromonospora viridifaciens* imata največjo aktivnost pri 50-58 °C (Uchida in sod., 1979; Aisaka in sod., 1991). Za optimalno aktivnost potrebujejo Ca<sup>2+</sup> ione nevraminidaze *Corynebacterium ulcerans* (Vertiev in Ezepchuk, 1981), *Clostridium chauvoei* (Heuermann in sod., 1991), streptokoki skupine A in B (Davis in sod., 1979; Brown in Straus, 1987) ter *Vibrio cholerae* (Vimr in sod., 1988).

Delovanje nevraminidaze bakterije *M. canis* inaktivira temperatura 55 °C, tiste pri *M. gallisepticum* pa 70 °C (Sethi in Müller, 1972; Zakrajšek, 2008). Raziskave različnih sevov *M. synoviae* so tudi pokazale, da so imeli bolj invazivni sevi, ki so lahko povzročili nastanek bolezni, *in vitro* večjo nevraminidazno aktivnost (May in sod., 2007; Berčič in sod., 2008).

Zmerno nevraminidazno aktivnost so odkrili tudi pri *Mycoplasma neurolyticum*, ki pa je znotraj njenih klonov močno variirala. Po 30 minutni inkubaciji na 50 °C so celice *M. neurolyticum* NEAC izgubile. Leta 1967 je Thomas (cit. po Berčič, 2008) opisal domnevni toksin *M. neurolyticum*, ki ga je prav tako inaktivirala 30-minutna inkubacija na 50 °C, njegova molekulska masa, določena s kromatografijo na Sephadex G-200, pa je bila večja od 200 kDa. Ugotovili so, da je 30-60 minutna inkubacija na 50-60 °C prav tako uničila delovanje nevraminidaz *M. gallisepticum* (sev R), *M. synoviae*, *M. corogypsi*, *M. anseris*, *M. canis*, *M. cynos* in *M. molare*. Pri inkubaciji na 50-55 °C sta se kot najbolj stabilni izkazali nevraminidazi *M. gallisepticum* in *M. synoviae*, vendar se je njuna nevraminidazna aktivnost pri inkubaciji na 55 °C vseeno nekoliko znižala. Najbolj občutljiva se je izkazala nevraminidaza *M. corogypsi*, ki jo je popolnoma inaktivirala že inkubacija na 50 °C. O nevraminidazi bakterije ORT ni nobenih znanstvenih podatkov, najbrž tudi zato ne ker je bila bakterija opisana šele pred petnajstimi leti in so bile raziskave usmerjene v zdravljenje bolezni in razvoj vakcin.

Da ORT ima nevraminidazno aktivnost je bilo ugotovljeno šele pred kratkim (2007), ko so bili v Sloveniji poleg ptičjih vrst mikoplazem (Berčič in sod., 2008) na nevraminidazno aktivnost preiskane tudi nekatere bakterije vključno z ORT (Benčina, 2009b).

V naši nalogi smo želeli ugotoviti pH optimum in temperaturno občutljivost tega encima. Testirali smo dva seva te bakterije, ki sta bila izolirana iz dihal kokoši ali puranov. Zanju se je izkazalo, da se aktivnost njunih nevraminidaz razlikuje. Ugotovili smo, da smo prišli do različnih rezultatov aktivnosti nevraminidaze. ORT Koka je bila močno znižan že pri 35 °C, pri ORT Pivka pa šele pri 50 °C po 90 min inkubaciji. Pri testiranju pH optimuma, smo ravno tako ugotovili drugačno občutljivost, saj je ORT Koka v vseh testiranih vrednostih pH ostal normalno aktiven, ORT Pivka pa je bil inaktiviran v zelo kislem okolju pH 1,35 in v bazičnem okolju pH 11,5.

V imunološkem laboratoriju Biotehniške fakultete na oddelku za zootehniko, smo izvedli preizkus aktivnosti nevraminidaze ORT, pri različnih temperaturah in različnih vrednostih pH. Preverjali smo vzorec ORT Koka, ki je bil pridobljen iz dihal kokoši iz starševske jate, ki je poginila na Hrvaškem leta 2000 ter vzorec ORT Pivka, ki je bil pridobljen iz puranovega sapnika. Ugotovili smo, da povišana temperatura inaktivira delovanje encima. Pri inkubaciji 35 °C smo ugotovili, da je temperatura močno zniža reakcijo encima ORT Koka, ORT Pivka pa je bolj termostabilen. Po testiranju pri temperaturi 40 °C, smo ugotovili da je ORT Pivka tudi pri tej temperaturi stabilen, ORT Koka pa, kot smo pričakovali, skorajda inaktiviran. Po inkubaciji pri 45 °C, smo še vedno ugotovili termostabilnost nevraminidaze ORT Pivke in neaktivnost ORT Koka. Povišali smo temperaturo na 50 °C in testirali le ORT Pivka, ki smo ga različno dolgo inkubirali. Ugotovili smo, da nevraminidaza ORT Pivka postane skoraj inaktiviran po 90 minutni inkubaciji pri 50 °C. Ugotavljali smo tudi vpliv vrednosti pH na nevraminidazno aktivnost. Po testiranju z različnimi vrednostmi pH smo ugotovili, da je encim ORT Koka v raztopinah pH 6,4, pH 6,5, pH 6,54, pH 7,5 normalno aktiven. ORT Pivka smo testirali pri vrednostih pH 1,35, pH 2,7, pH 6,5, pH 7,5, pH 7,6, pH 11,5 in ugotovili, da je encim neaktiven pri vrednosti pH 1,35, pri vrednosti pH 11,5 pa je bila aktivnost močno zmanjšana. V naših raziskavah smo nevraminidazno aktivnost z BIN dokazali v suspenzijah spranih celic sevov ORT Koka in ORT Pivka v PBS, tudi pri večjih redčitvah vzorcev. V tekočem gojišču dveh sevov ORT, ki je predstavljal supernatant, dobljen po centrifugiranju tekočih celičnih kultur, smo dokazali močnejšo nevraminidazno aktivnost kot v celičnem sedimentu (Benčina, 2009c). Sklepamo, da ORT sintetizira protein nevraminidazo, ki se razen v redkih primerih ne izloča v rastni medij, ampak je njegova

aktivnost vezana na membrano. Močno izločanje ali sproščanje nevraminidaze v gojišče so na primer opisali tudi pri *M. corogypsi* (Berčič in sod., 2008). Prav tako sta May in Brown (2009) to opisala še za *M. canis*, *M. cynos* in *M. molare* (May in Brown, 2009).

## 5.2 SKLEPI

- Pri testiranju termostabilnosti encima nevraminidaze smo ugotovili, da je optimum za ORT Pivka med 35 °C in 45 °C.
- Za nevraminidazo ORT Koka nismo določali optimuma, ker se je aktivnost zmanjšala že pri 35 °C.
- Ker je nevraminidaza ORT Pivka bolj termostabilna, se je inaktivacija encima pokazala po 90 minutah temperaturne inkubacije pri 50 °C.
- Nevraminidaza ORT Pivka je bila aktivna pri vrednostih pH 2,7, pH 6,5, pH 7,5 in pH 7,6. ORT Koka ima optimalno aktivnost pH pri vrednostih pH 6,4, pH 6,5, pH 6,54, in pH 7,5.
- Pri ORT Koka ni bilo inaktivacije nevraminidaze pri vrednostih pH od 6,4 do 7,5.
- Pri vrednostih pH 1,35 je bil encim ORT Pivka inaktiviran, pri vrednosti pH 11,5 pa je bila aktivnost močno zmanjšana.



## 6 POVZETEK

Bolezen dihal pri perutnini povzročajo različni virusi, bakterije in glivični povzročitelji. Leta 1994 je bila opisana nova vrsta bakterija *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT). ORT je pleomorfna, počasi rastoča, po Grammu negativna vrsta bakterije paličaste oblike. Živali se z bakterijo okužijo preko dihal, glavni prenašalci so divje ptice. Bolezen se prenaša horizontalno in vertikalno. Klinični znaki obolenja se kažejo kot težko dihanje, neješčnost, sopenje ter vnetje sinusov. Pri okuženih nesnicah se zmanjša njihova teža ter proizvodnost jajc. Pri pitanih purah se bolezen pojavi med 3. in 4. tednom starosti. Pri purah je umrljivost 1-15 % in nastopi med 7. in 8. tednom po okužbi. Pri brojlerjih je umrljivost 0-10 % in nastopi med 5. in 8. tednom po okužbi. Trajanje bolezni in umrljivost je odvisna tudi od različnih dejavnikov okolja. Zelo dobra preventiva pred nezaželeno okužbo živali je ustrezno prezračevanje, primerna gostota naselitve ter ustrezno higiensko vzdrževanje. Ker so bakterijski sevi različno občutljivi na antibiotike, zdravljenje poteka na podlagi antibiograma. Uspešno zdravljenje je dokazano z amoksicilinom ter klortetraciklinom. Namen naše naloge je bil, ugotoviti aktivnost encima nevraminidaza bakterije ORT, pri različnih temperaturah in različnih vrednostih pH. Ugotavljali smo, katera je tista temperatura, ko encim preneha s svojo aktivnostjo in ugotovili, da povišana temperatura inaktivira delovanje, vendar je le to odvisno od časa inkubacije pri določeni temperaturi. Vzorčke ORT Koka in ORT Pivka smo inkubirali pri temperaturah 35 °C, 40 °C, 45 °C, ORT Pivka tudi pri 50 °C. Po inkubaciji vzorca pri 35 °C, smo ugotovili, da 30 min in 60 min že močno zmanjša aktivnost encima ORT Koka, pri ORT Pivka pa je še vedno aktiven. Po inkubaciji pri 40 °C, 30 min in 60 min, aktivnost ORT Koka ostane zelo nizka, encim ORT Pivka pa je še vedno aktiven. Temperaturo smo povišali na 45 °C in po pričakovanjih je encim ORT Koka ostal skoraj inaktiviran, encim ORT Pivka pa je tudi pri tej temperaturi še vedno termostabilen. ORT Pivka smo inkubirali še pri višji temperaturi 50 °C in sicer 30 min, 60 min, 90 min, 120 min. S podaljševanjem inkubacijskega časa je aktivnost encima vidno upadala. Prišli smo do ugotovitve, da pri temperaturi 50 °C, 90 min inkubacija inaktivira encim. Encim ORT Koka in ORT Pivka smo preverjali tudi z različnimi pH vrednostmi in ugotavljali pri kateri vrednosti pH encim postane inaktiviran. ORT Koka smo preizkušali na vrednostih pH: pH 6,4, pH 6,5, pH 6,5, pH 7,5. Ugotovili smo, da je encim ORT Koka pri vseh

vrednostih pH aktiven. ORT Pivka smo preizkušali na vrednostih pH 1,35, pH 2,7, pH 6,5, pH 7,5, pH 7,6, pH 11,5. Ugotovili smo, da encim ORT Pivka ni reagiral pri vrednosti pH 1,35 pri vrednosti pH 11,5 pa je bila aktivnost močno zmanjšana.

## 7 VIRI

- Abrashev I., Dulguerova G. 2000. Neuraminidases (sialidases) from bacterial origin. *Experimental Pathology Parasitology*, 4: 35-40
- Aisaka K., Igarashi A., Uwajima T. 1991. Purification, crystallization and characterization of neuraminidase from *Micromonospora viridifaciens*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55, 4: 997-1004
- Batis J. 1994. Mikrobiološki slovar. 1. izdaja. Ljubljana, Slovensko mikrobiološko društvo: 168 str.
- Batis J. 1984. Mikrobiologija za veterinarje. Ljubljana, VTOZD za veterinarstvo Biotehnične fakultete: 50, 51, 66
- Benčina D. 2009a. »Priprava vzorcev«. Domžale, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko (osebni vir, januar 2009)
- Benčina D. 2009b. »Aktivnost nevraminidaze«. Domžale, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko (osebni vir, junij 2009)
- Benčina D. 2009c. »Dokazovanje aktivnosti nevraminidaze«, Domžale, Biotehniška fakulteta. Oddelek za zootehniko (osebni vir, junij 2009)
- Berčič R.L., Slavec B., Lavric M., Narat M., Zorman-Rojs O., Dovc P. Bencina D. 2008. A survey of avian *Mycoplasma* species for neuraminidase enzymatic activity. *Veterinary Microbiology*, 130: 391-397
- Brown J.G., Straus D.C. 1987. Characterization of neuraminidase produced by various serotypes of group B *Streptococci*. *Infection and Immunity*, 55: 1-6
- Brown D.R., Zacher L.A., Fermerie W.G. 2004. Spreading factors of *Mycoplasma alligatoris*, a flesh-eating mycoplasma. *Journal of Bacteriology*, 186,12: 3922-3927
- Corfield T. 1992. Bacterial sialidases-roles in pathogenicity and nutrition. *Glycobiology*, 2: 509- 521
- Davis L., Baig M., Ayoub E. 1979. Properties of extracellular neuraminidase produced by group A *Streptococcus*. *Infection and Immunity*, 34: 780-786
- De Herdt P., Cauwerts K., Vorvloesem J., Ducatelle R. 2001. The relevance and efficacy of *Ornithobacterium rhinotracheale* control in chickens. *World Poultry*, 17, 10: 32-33
- Encim. Wikipedija, prosta enciklopedija (23. mar. 2009).  
<http://sl.wikipedia.org/wiki/Encim> (13. apr. 2009)

- Ernst S., Langer R., Cooney C. L., Sasisekharan R. 1995. Enzymatic degradation of glycosaminoglycans. *Critical reviews Biochemistry and Molecular Biology*, 30, 5: 387-444
- Gaskell A., Crennell S., Taylor G. 1995. The three domains of bacterial sialidase: a beta-propeller, an immunoglobulin module and a galactose-binding jelly-roll. *Structure*, 3: 1197-1205
- Gesner B., Thomas L. 1966. Sialic acid binding sites; role in hemagglutination by *Mycoplasma gallisepticum*. *Science*, 151: 590-591
- Glasgow L.R., Hill R.L. 1980. Interactions of *Mycoplasma gallisepticum* with sialyl glycoproteins. *Infection and Immunity*, 30: 353-361
- Grobe K., Sartori B., Traving C., Schauer R., Roggentin P. 1998. Enzymatic and molecular properties of the *Clostridium tertium* sialidase. *Journal of Biochemistry*, 124, 6: 1101-1110
- Hafez M. 2003. Emerging and re-emerging diseases in poultry. *World Poultry*, 19: 25
- Heuermann D., Roggentin P., Kleinidam R., Schauer R. 1991. Purification and characterization of a sialidase from *Clostridium chauvoei* NC08596. *Glycoconjugate Journal*, 8, 2: 95-101
- Kahane I., Reisch-Saada A., Almagor M., Abeliuck P., Yatziv S. 1990. Glycosidase activities of Mycoplasmas. *Zentralblatt für Bakteriologie = International Journal of Medical Microbiology*, 273, 3: 200-2005
- King S.J., Hippe K.R., Weiser J. N. 2006. Deglycosilation of human glycoconjugates by the sequential activities of exoglycosidase expressed by *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 59: 961-974
- McMullin P. 2004. A pocket guide to: poultry health and disease. The Poultry Site. <http://www.thepoultrysite.com/diseaseinfo/106/ornithobacterium-infection-ort>. (23. apr. 2009)
- May M., Brown D. R. 2007. Sialidase activity in *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases*, 51, 4: 829-833
- May M., Brown D.R. 2008. Genetic variation in sialidase and linkage to *N*-acetylneuraminic acid catabolism in *Mycoplasma synoviae*. *Microbial Pathogenesis*, 45: 38-44
- May M., Brown D. R. 2009. Secreted sialidase activity of canine mycoplasmas. *Veterinary Microbiology*, 139: 380-383

- Much P., Winner F., Stipkovits L., Rosengarden R., Citti C. 2003. *Mycoplasma gallisepticum*: influence of cell invasiveness on the outcome of experimental infection in chickens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 34: 181-186
- Ponnuraj. K., Jedrzjas M. J. 2000. Mechanism of hyaluronan binding and degradation: Structure of *streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase in complex with hyaluronic acid disaccharide at 1.7Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 229, 4: 885-895
- Roggentin P., Schauer R. Hoyer L. L. Vimr E. R. 1993. The sialidase superfamily and its spread by horizontal gene transfer. *Molecular Microbiology*, 9, 5: 915-921
- Sethi K. K. Müller H. E. 1972. Neuraminidase activity in *Mycoplasma gallisepticum*. *Infection and Immunity*, 5, 2: 260-262
- Severi E., Hood D. W., Thomas G. H. 2007. Sialic acid utilization by bacterial pathogens. *Microbiology*, 153: 2817-2822
- Sialic acid. 2009a. Wikipedia, The Free Encyclopedia (20. april 2009)  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Sialic\\_acid](http://en.wikipedia.org/wiki/Sialic_acid) (6. maj 2009)
- Sialic acid. Glossary. 2009b (20. apr. 2009)  
[http://www.nature.com/nrg/journal/v4/n1/glossary/nrg981\\_glossary.html](http://www.nature.com/nrg/journal/v4/n1/glossary/nrg981_glossary.html) (6. maj 2009)
- Soong G., Muir A., Gomez M. I., Walks J., Reddy B., Planet P., Singh P. K., Kaneko Y., Wolfgang M. C., Hsiao Y. S., Tong L., Prince A. 2006. Bacterial neuraminidase facilitates mucosal infection by participating in biofilm production. *Journal of Clinical Investigation*, 116, 8: 2297-2305
- Taylor, G. 1996. Sialidases: structures, biological significance and therapeutic potential. *Current Opinion in Structural Biology*, 6: 830-837
- Uchida Y. Tsukada Y. Sugimori T. 1979. Enzymatic properties of neuraminidases from *Aerobacter ureafaciens*. *Journal of Biochemistry*, 86, 5: 1573-1585
- Vandamme P., Segers P., Vancanneyt M et. Al. *Ornithobacterium rhinotracheale* gen. nov., sp. nov., Isolated from the Avian respiratory tract. *International Journal of Systematic and Evolutionary*, 1994; 44: 24-37
- Van den Bosch G. 2004. *Ornithobacterium rhinotracheale*: the current status.  
<http://www.poultry-health.com/fora/turkhelth/turtec24/vdbosch.htm> (10. apr. 2009)
- Van Empel P.C.M., Hafez H. M. 1999. *Ornithobacterium rhinotracheale*: a review. *Avian Pathology*, 28, 1: 217-227

- Vasconcelos A.T., Ferreira H.B., Bizarro C.V., Bonatto S.L., Carvalho M.O., Pinto P.M., Almeida D.F., Almeida L.G., Almeida R., Alves-Filho L., Assuncao E.N., Azevedo V. A., Bogo M. R., Brigido M.M., Brocchi M., Burity H.A., Camargo A.A., Camargo S.S., Carepo M.S., Cararro D.M., De Mattos Cascardo J.C., Castro L.A., Cavalcanti G., Chemale G., Collevatti R.G., Cunha C.W., Dallagiovanna B., Dambos B.P., Dellagostin O.A., Falcao G., Fantinatti-Garboggini F., Felipe M.S., Fiorentin L., Franco G.R., Freitas N.S., Frias D., Grangeiro T.B., Grisard E.C., Guimares C.T., Hungria M., Jardim S.N., Kreiger M.A., Laurino J.P., Lima L.F., Lopes M.I., Loreto E.L., Madeira H.M., Manfio G.P., Maranhao A.Q., Martinkovich C.T., Medeiros S.R., Moreira M.A., Neiva M., Ramalho Neto C.E., Nicolas M. F., Oliveira S.C., Paixao R.F., Pedrosa F.O., Pena S.D., Pereira M., Pereira-Ferarri L., Piffer I., Pinto L.S., Potrich D.P., Salim A.C., Santos F.R., Smitt R., Schneider M. P., Schrank A., Schrank I.S., Schuck A.F., Seuanez H.N., Silva D.W., Silva R., Silva S.C., Soares C.M., Souza K.R., Souza R.C., Staats C.C., Steffens M.B., Teixeira S.M., Urmenyi T.P., Vainstein M.H., Zuccherato L.W., Simpson A.J., Zaha A. 2005. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two stains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a stain of *Mycoplasma synoviae*. *Journal of Bacteriology*, 187: 5568-5577
- Vimr E., Lawrisuk L., Galen J., Kaper J. 1988. Cloning and Expression of the *Vibrio cholerae* neuraminidase gene nanN in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 170: 1495-1504
- Vimr E.R., Kalivoda K.A., Deszo E.L., Steenbergen S.M. 2004. Diversity of microbial sialic acid metabolism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 1: 132-153
- Vertiev Y. Ezepchuk Y. 1981. Purification and characterization of some enzymatic properties of neuraminidase from *Corynebacterium ulcerans*. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 362: 1339-1344
- Winner F. Rosengarten R. Citti C. 2000. In vitro cell invasion of *Mycoplasma gallisepticum*. *Infection Immunology*, 68: 4238-4244
- Zakrajšek T. 2008. Nevraminidazna aktivnost bakterije *Mycoplasma canis*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta Oddelek za mikrobiologijo: 33-50
- Zdovc I. 2000 Bakterija *Ornithobacterium rhinotracheale*- povzročitelj respiratornih obolenj pri perutnini. *Veterinarske novice*, 26: 243-252
- Zorman-Rojs O. Zdovc I. Benčina D. Mrzel I. 2000 Infection of turkeys with *Ornithobacterium rhinotracheale* and *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases*, 44: 1017 – 1022

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se svoji mentorici prof. dr. Mojci Narat za vodenje in pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se znanstvenemu svetniku dr. Dušanu Benčini za vodenje in pripravo vzorcev za testiranje v laboratoriju.

Zahvaljujem se Ani Zanjковиč za pomoč in vodenje pri delu v laboratoriju ter Rebeki Berčič za pomoč pri literaturi.

Zahvaljujem se tudi svojemu fantu Roku Čamru, za tehnično pomoč pri oblikovanju diplomske naloge.

Zahvala tudi sošolki Teji Podoreh za njeno podporo in vzpodbudo.

Posebna zahvala pa gre mojim staršem, ki so mi omogočili študij, me vsa ta leta podpirali in verjeli vame. Hvala!