

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Špela KODRE

**IZRAŽANJE GENOV ZA IMUNOST V CELICAH
HD11 IN CEC-32 OB *in vitro* OKUŽBI Z BAKTERIJO
Mycoplasma synoviae IN PTIČJIM
PARAMIKSOVIRUSOM TIPA 1**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. Stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Špela KODRE

**IZRAŽANJE GENOV ZA IMUNOST V CELICAH HD11 IN CEC-32
OB *in vitro* OKUŽBI Z BAKTERIJO *Mycoplasma synoviae* IN PTIČJIM
PARAMIKSOVIRUSOM TIPA 1**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja

**IMMUNE GENE EXPRESSION IN *Mycoplasma synoviae* AND AVIAN
PARAMYXOVIRUS TYPE 1 *in vitro* INFECTED CEC-32 AND HD11
CELLS**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje Znanost o živalih. Delo je bilo opravljeno na Katedri za Genetiko animalno biotehnologijo in imunologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje Oddelka za zootehniko je za mentorja magistrskega 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

Član: 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:

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

Špela Kodre

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 577.27:575(043.2)=163.6
KG	imunologija/genetika/mikoplazme/perutnina/imunski geni/gensko izražanje/citokini/ <i>Mycoplasma synoviae</i> /kužni sinovitis/ptičji paramiksovirus tipa 1/atipična kokošja kuga/CEC-32/HD11
KK	AGRIS L50/6100
AV	KODRE, Špela, dipl. inž. kmet. zoot. (UN)
SA	NARAT, Mojca (mentorica)
KZ	SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2016
IN	IZRAŽANJE IMUNSKIH GENOV V CELICAH HD11 IN CEC-32 OB <i>in vitro</i> OKUŽBI Z <i>Mycoplasma synoviae</i> IN PTIČJIM PARAMIKSOVIRUSOM TIPA 1
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP	IX, 58 str., 6 pregl., 8 sl., 80 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	<i>Mycoplasma synoviae</i> in ptičji paramiksovirus tipa 1 (APMV-1) sta zelo pogosto prisotna patogeni mikroorganizma v intenzivni reji perutnine. Ker se <i>M. synoviae</i> prenaša tudi vertikalno preko valilnih jajc, je možno, da so z njo okuženi že piščanci, ki jih preventivno cepimo proti APMV-1. Sinergistični učinki na pojav resnejših kliničnih znakov so že bili dokazani, v poskusu <i>in vitro</i> pa smo preverili kako v takih primerih poteka imunski odziv. Uporabili smo tipski sev bakterije <i>M. synoviae</i> WVU 1853 in lentogeni sev APMV-1 La Sota. Njun učinek na izražanje nekaterih imunskih genov v celicah CEC-32 in HD11 smo preverili s qRT-PCR. Ugotovili smo, da okužba celic CEC-32 in HD11 z APMV-1 po predhodni okužbi z <i>M. synoviae</i> , vpliva na izražanje imunskih genov, vpletenih v vnetni odziv. V primerjavi s samostojno okužbo je zaporedna okužba v celicah CEC-32 vidnejše znižala izražanje gena za IFN- γ ter genov za vnetne citokine IL-1 β in IL-6 pri 6 urnem zamiku, spodbudila pa je izražanje genov za MIP-1 β , IL-8 in IL-1 β pri 24 urnem zamiku. V celicah HD11 je bilo po zaporedni okužbi zavrto izražanje genov za IL-1 β , IFN- γ , IL-8, in TGF- β 4, povišanje izražanja je bilo opaziti le pri genu za MIP-1 β .

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2

DC UDC 577.27:575(043.2)=163.6

CX immunology/genetics/*Mycoplasma*/poultry/immune genes/gene expression/
cytokines/*Mycoplasma synoviae*/infectious synovitis/Avian Paramyxovirus Type
1/Newcastle disease/CEC-32/HD11

CC AGRIS L50/6100

AU KODRE, Špela

AA NARAT, Mojca (supervisor)

PP SI-1230 Domžale, Groblje 3

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science

PY 2016

TI IMMUNE GENE EXPRESSION IN *Mycoplasma synoviae* AND AVIAN
PARAMYXOVIRUS TYPE 1 *in vitro* INFECTED CEC-32 AND HD11 CELLS

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)

NO IX, 58 p., 6 tab., 8 fig., 80 ref.

LA sl

AL sl/en

AB *Mycoplasma synoviae* and avian paramyxovirus type 1 (APMV-1) are common pathogens in the intensive rearing of poultry. Since *M. synoviae* can be vertically transmitted through eggs, it is possible that chickens are already infected when vaccinated with APMV-1. It has already been established that synergistic effects with these two pathogens can lead to more severe clinical signs, but very little is known about the course of immune response in such conditions. We used *M. synoviae* type WVU 1853 and the lentogenic APMV-1 La Sota with which we determined the effect on expression of certain immune genes in CEC-32 and HD11 cells by qRT-PCR. We have found that the addition of APMV-1 on ongoing infection with *M. synoviae* in CEC-32 and HD11 cells, affects the expression of immune genes involved in the inflammatory response. Compared with the individual infection with *M. synoviae* a sequential infection after 6 hours inhibited gene expression of *IFN-γ* and the proinflammatory cytokines *IL-1β* and *IL-6* in CEC-32 cells. Whereas the vaccine administered after 24 hours has stimulated the expression of *MIP-1β*, *IL-8* and *IL-1β* genes. In HD11 cells the sequential infection inhibited gene expression of *IL-1β*, *IFN-γ*, *IL-8*, and *TGF-β4*, a distinctive increase in expression was observed only for *MIP-1β* gene.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MIKOPLAZME	3
2.1.1 Taksonomska in filogenetska razdelitev	3
2.1.2 Osnovne značilnosti	4
2.1.3 Vpliv na celične funkcije gostitelja	5
2.1.4 Mikoplazme pri perutnini	7
2.1.4.1 <i>Mycoplasma synoviae</i>	8
2.2 PTIČJI PARAMIKSOVIRUS TIPA 1	9
2.2.1 Taksonomska in filogenetska opredelitev	9
2.2.2 Osnovne značilnosti	11
2.2.3 Okužba z APMV-1	13
2.3 IMUNSKÉ CELICE	14

2.3.1	Vnetni citokini	16
2.3.1.1	IL-6	16
2.3.1.2	IL-1 β	17
2.3.1.3	IFN- γ	17
2.3.2	Kemokini	18
2.3.2.1	MIP-1 β (CCL4)	18
2.3.2.2	IL-8 (CXCLi2)	18
2.3.3	Regulatorni citokin	18
2.3.3.1	TGF- β 4	18
3	MATERIAL IN METODE	20
3.1	CELIČNE KULTURE	20
3.1.1	Priprava kultur celic CEC-32 in HD11	20
3.1.2	Štetje celic	21
3.2	<i>Mycoplasma synoviae</i> IN PTIČJI PARAMIKSOVIRUS TIPA 1	22
3.3	IZVEDBA POSKUSA	22
3.3.1	Izolacija RNA	24
3.3.2	Tretiranje z DNAzo I	24
3.3.3	Obraten prepis RNA v cDNA	24
3.3.4	Kvantitativni PCR v realnem času	24
3.3.4.1	Časovno temperaturni profil qRT-PCR	25
3.3.4.2	Zaznavanje pomnoženih produktov	26
3.3.4.3	Izbor začetnih oligonukleotidov	27
3.3.4.4	Izvedba qRT-PCR	29
3.3.4.5	Obdelava podatkov	29
4	REZULTATI	31

4.1	STANDARDNE KRIVULJE	31
4.2	IZRAŽANJE GENOV	32
4.2.1	<i>IL-6</i>	32
4.2.2	<i>IL-1β</i>	34
4.2.3	<i>IFN-γ</i>	35
4.2.4	<i>MIP-1β</i>	37
4.2.5	<i>IL-8</i>	39
4.2.6	<i>TGF-β4</i>	41
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	43
5.1	RAZPRAVA	43
5.2	SKLEPI	49
6	POVZETEK	50
7	VIRI	52
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Taksonomska razvrstitev in glavne značilnosti razreda <i>Mollicutes</i>	4
Preglednica 2: Opis lastnosti serotipov APMV	10
Preglednica 3: Sestava gojitvenih medijev za celice CEC-32 in HD11	20
Preglednica 4: Primer načrta okuževanja za celice CEC-32	23
Preglednica 5: Lastnosti začetnih oligonukleotidov uporabljenih pri qRT-PCR	28
Preglednica 6: Značilnosti standardnih krivulj tarčnih in referenčnih genov	31

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Predstavnik razreda <i>Mollicutes</i> : <i>Acholeplasma laidlawii</i> in <i>Mycoplasma gallisepticum</i>	5
Slika 2: Sinergistično delovanje citokinov ob vnetnem odzivu	16
Slika 3: Izražanje gena <i>IL-6</i> in primerjava prikaza nelogaritmiranih vrednosti FC in logaritmiranih vrednosti FC na osnovo 2	33
Slika 4: Izražanje gena <i>IL-1β</i> v celicah CEC-32 in HD11 po okužbi z APMV-1 in <i>M. synoviae</i>	35
Slika 5: Izražanje gena <i>IFN-γ</i> v celicah CEC-32 in HD11 po okužbi z APMV-1 in <i>M. synoviae</i>	37
Slika 6: Izražanje gena <i>MIP-1β</i> v celicah CEC-32 in HD11 po okužbi z APMV-1 in <i>M. synoviae</i>	39
Slika 7: Izražanje gena <i>IL-8</i> v celicah CEC-32 in HD11 po okužbi z APMV-1 in <i>M. synoviae</i>	41
Slika 8: Izražanje gena <i>TGF-β4</i> v celicah CEC-32 in HD11 po okužbi z APMV-1 in <i>M. synoviae</i>	42

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AKK	atipična kokošja kuga
BLAST	algoritem za primerjavo informacij o primarnih bioloških zaporedjih (Basic logical alignment search tool)
bp	bazni pari, enota za dolžino nukleinskih kislin
cDNA	komplementarna DNA (Complementary DNA)
CEC-32	celična linija piščanjih fibroblastov (Chicken embryo cells)
CFU	število bakterij, ki so sposobne tvoriti kolonije (Colony forming units)
ChS	kokošji serum (Chicken Serum)
Cq	kvantifikacijski cikel (Quantification cycle)
DMEM	modificirano gojišče (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dsDNA	dvoverižna DNA (Double stranded DNA)
EDTA	kelator (2,2',2'',2'''-(etan-1,2-diildintrilo) tetraacetatna kislina)
EID50	srednji infektivni odmerek za zarodke (Embryo Infectious Dose)
ELISA	encimski imunoadsorpcijski test (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
FBS	fetalni goveji serum (Fetal Bovine Serum)
HBSS	pufer (Hank's balanced salt solution)
iNOS	inducibilna sintaza dušikovega oksida
kDa	kilodalton, enota za molekulsko maso
MOI	število bakterij, ki okužuje celico (Multiplicity of infection)
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
NDV	virus atipične kokošje kuge (Newcastle disease virus)
OIE	svetovna organizacija za zdravje živali
PBS	fosfatni pufer (Phosphate buffered saline)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (Polymerase Chain Reaction)
qRT-PCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času
RNA	ribonukleinska kislina
rpm	število obratov na minuto (Revolutions per minute)
RPMI	gojišče za celične kulture (Roswell Park Memorial Institute medium)

1 UVOD

Mikoplazme so najmanjši znani organizmi, ki so še zmožni samostojne rasti in razmnoževanja. Zaradi odsotnosti celične stene jih uvrščamo v razred *Mollicutes*, za katerega je značilna nizka vsebnost gvanina in citozina v genomu, velik delež lipoproteinov v membrani in omejena biosinteza. V naravi so mikoplazme zelo razširjene in kot obvezni paraziti naseljujejo ljudi in druge sesalce, plazilce, ribe, členonožce, žuželke ter rastline (Razin in sod., 1998). Zaradi svojih zahtevnih prehranskih potreb ponavadi naseljujejo točno določene gostitelje in so pogosto tkivno specifične (Rottem, 2003).

Okužbe z bakterijo *Mycoplasma synoviae* v intenzivni reji kokoši in pur povzročajo veliko ekonomsko škodo (Dufour-Gesbert in sod., 2005). Pri okuženih živalih se lahko razvijejo bolezni dihal ali kužni sinovitis, ki se kaže z oteklinami in vnetjem sklepov (Kleven in sod., 1972). Okužba se lahko prenaša vertikalno preko valilnih jajc, zato je možno, da so okuženi že novoizvaljeni piščanci (Kleven, 2008a).

Ptičji paramiksovirus tipa 1 (APMV-1) spada v rod *Avulavirus*, ki ga sestavlja 11 serotipov. Okužba z visoko virulentnimi sevi APMV-1 povzroča ogromno ekonomsko škodo po vsem svetu (Alexander, 2009). Virulentni sevi APMV-1 povzročajo atipično kokošjo kugo (AKK), ki se odvisno od starosti živali in poti okužbe odraža z različnimi kliničnimi znaki (Alexander in Senne, 2008). Lahko prizadane živčevje ali povzroča različno huda obolenja dihal, čemur sledi zmanjšan prirast, slabša konverzija, slabša nesnost in slabša plodnost živali (Gallili in Ben-Nathan, 1998). Ker lahko AKK povzroči celo do 100 % pogin, je za preprečevanje širjenja bolezni poleg dobre biološke varnosti nujno tudi cepljenje (Alexander in Senne, 2008). Možno je, da so piščanci, ki jih preventivno cepimo proti atipični kokošji kugi predhodno že okuženi z *M. synoviae* zaradi vertikalnega prenosa preko valilnih jajc. Ker potek imunskega odziva v takih primerih še ni dobro raziskan, smo v naši raziskavi ugotavljali ali ima zaporedna *in vitro* okužba celic na molekularnem nivoju drugačne značilnosti kot posamična okužba. Preverili smo, ali *in vitro* okužba celic HD11 in CEC-32 z *M. synoviae* in APMV-1 povzroči drugačno izražanje nekaterih imunskih genov kot *in vitro* okužba celic s posameznim patogenim mikrobom. V analizah smo uporabili lentogeni sev APMV-1 La Sota, ki se pogosto uporablja za cepljenje perutnine ter tipski sev bakterije *M. synoviae* WVU 1853. Njun

učinek na izražanje genov v celicah smo preverili s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qRT-PCR).

Pričakovali smo, da bo prisotnost APMV-1 spremenila potek imunskega odziva na predhodno okužbo z *M. synoviae* predvsem v smislu nastanka hujših vnetnih reakcij ter napredovanja bolezni, ki jih povzroča *M. synoviae*.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MIKOPLAZME

Mikoplazme so prokariontski mikroorganizmi, ki jih taksonomsko, zaradi odsotnosti celične stene, uvrščamo v razred *Mollicutes* (lat. *mollis*–mehak, *cutis*–koža). Imajo majhen genom, običajno velik od 0,6 do 1,4 Mbp, kar naj bi bila posledica reduktivnega evolucijskega razvoja iz po Gramu pozitivnih bakterijskih prednikov. Za njihov genom je značilna tudi nizka vsebnost gvanina in citozina (predstavniki debela *Firmicutes* kot so *Clostridium spp.* in *Bacillus spp.*). V naravi so zelo razširjene in kot obvezni paraziti naseljujejo ljudi in druge sesalce, plazilce, ribe, členonožce, žuželke ter rastline (Razin in sod., 1998; Sasaki, 2006).

2.1.1 Taksonomska in filogenetska razdelitev

Razred *Mollicutes* spada v deblo *Tenericutes* kraljestva bakterij. Glede na karaketrizacijo zaporedja 16S rRNA predstavnike razreda *Mollicutes* filogenetsko delimo na 5 skupin - anaeroplazme, asteroplazme, spiroplazme, hominis in pneumoniae, ki so nadaljnje razdeljene na gruče in podgruče. Taksonomsko pa razred sestavlja 5 družin - *Acholeplasmatales*, *Anaeroplasmatales*, *Entomoplasmatales*, *Haloplasmatales* in *Mycoplasmatales* ter 9 rodov. Večina predstavnikov razreda *Mollicutes*, razen nekaj iz rodu *Acholeplasma*, so obvezni paraziti v specifičnih gostiteljih. Predstavniki rodov *Entomoplasma*, *Mesoplasma*, *Spiroplasma* in *Phytoplasma* naseljujejo rastline in žuželke, predstavniki rodov *Anaeroplasma* in *Asteroleplasma* so anaerobi, ki naseljujejo goveji vamp, predstavniki rodov *Mycoplasma* in *Ureaplasma* iz družine *Mycoplasmataceae* pa naseljujejo različne gostitelje, kot so ribe, ptice in sesalci (Sasaki, 2006). Predstavnike razreda *Mollicutes* v družine in rodove razvrščamo glede na karakterizacijo zaporedja 16S rRNA in glede na fenotipske lastnosti (Brown in sod., 2007). Pred uporabo genskega sekvenciranja so jih razvrščali predvsem s pomočjo seroloških metod in specifičnih antiserumov (Razin, 2006).

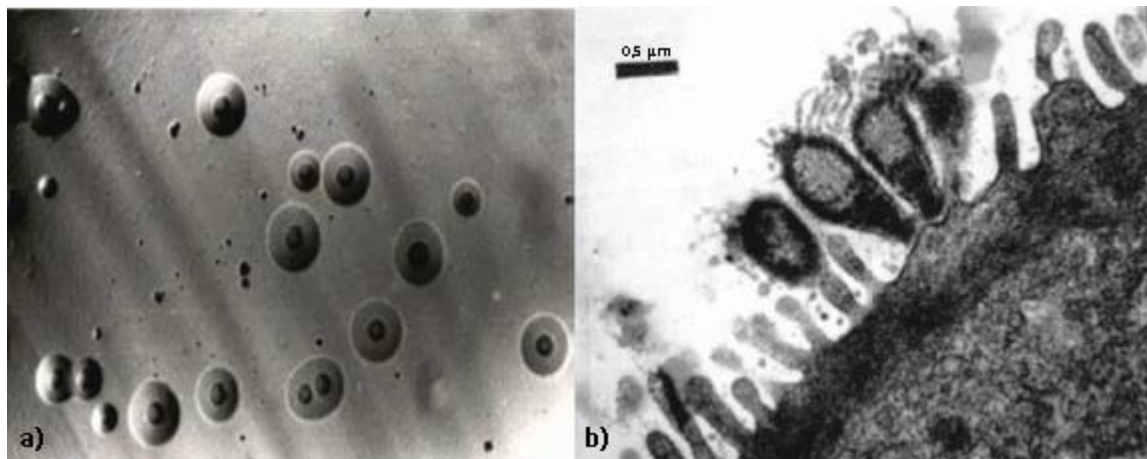
Preglednica 1: Taksonomska razvrstitev in glavne značilnosti razreda *Mollicutes* (Razin, 2006; NCBI, 2015)

Razvrstitev	Št. poznanih vrst	Vel. genoma (kbp)	Vsebnost G+C	Potrebe po holesterolu	Gostitelj
Družina <i>Mycoplasmataceae</i>					
Rod <i>Mycoplasma</i>	147	580–1350	23-40	Da	Ljudje in živali
Rod <i>Ureaplasma</i>	8	760–1170	27-30	Da	Ljudje in živali
Družina <i>Entomoplasmataceae</i>					
Rod <i>Entomoplasma</i>	6	790–1140	27-29	Da	Žuželke in rastline
Rod <i>Mesoplasma</i>	11	870–1100	27-30	Ne	Žuželke in rastline
Družina <i>Spiroplasmataceae</i>					
Rod <i>Spiroplasma</i>	38	780–2220	24-31	Da	Žuželke in rastline
Družina <i>Acholeplasmataceae</i>					
Rod <i>Acholeplasma</i>	15	1500–1650	26-36	Ne	Živali in površina rastlin
Družina <i>Anaeroplasmataceae</i>					
Rod <i>Anaeroplasma</i>	3	1500–1600	29-34	Da	Goveji in ovčji vampi
Rod <i>Asteroleplasma</i>	1	1500	40	Ne	
Nedefiniran taksonomski status (zaenkrat ni možno gojenje <i>in vitro</i>)					
Rod <i>Phytoplasma</i>	Ni določeno	530–1185	23-29	Ni določeno	Žuželke in rastline

2.1.2 Osnovne značilnosti

Popolna odsotnost celične stene določa mnoge posebnosti predstavnikov razreda *Mollicutes*. Občutljivi so na osmotski šok in detergente, odporni so na penicilin in ostale antibiotike, ki zavirajo sintezo celične stene, njihove kolonije pa tvorijo obliko, ki spominja na ocvrto jajce (Slika 1a). Po Gramu se zaradi odsotnosti celične stene barvajo negativno, čeprav so sorodni Gram pozitivnim bakterijam. V osnovi celico gradijo le trije organeli, in sicer, celična membrana, ribosomi ter krožna dvovertična DNA. Celice so večinoma okrogle oblike, kar nekaj pa jih najdemo tudi v obliki hruške ali steklenice s filamenti različnih dolžin in oblik, kar namiguje na prisotnost citoskeleta. Posamezne celice so velike od 0,2 do 0,5 μm . Večina je negibljivih, vendar so nekatere sposobne drsenja po vlažnih, trdnih površinah, mehanizem takega gibanja je še vedno nepoznan. Spiroplazme

so morfološko najbolj posebni predstavniki razreda *Mollicutes*, saj so vijajčne oblike in se gibljejo z vrtenjem okoli svoje osi (Razin in sod., 1998; Razin, 2006).



Slika 1: Predstavniki razreda *Mollicutes*: *Acholeplasma laidlawii* in *Mycoplasma gallisepticum*. a) Kolonije bakterije *Acholeplasma laidlawii* na agarju, kjer vidimo značilno obliko ocvrtega jajca (50 × povečava). b) Celice *M. gallisepticum* pritrjene na kokošje epitelne celice sapnika 7 dni po okužbi (Razin, 2006)

V osnovi se predstavniki razreda *Mollicutes*, kot ostali prokarionti, razmnožujejo z binarno delitvijo. Pri tipični binarni delitvi mora biti delitev citoplazme popolnoma usklajena s podvajanjem genoma. Pri njih pa delitev citoplazme lahko zaostaja za podvajanjem genoma (Razin, 2006).

Mikoplazme so zaradi svojih zahtevnih prehranskih potreb relativno težavne za gojenje v pogojih *in vitro*, saj rastejo zelo počasi. Ponavadi potrebujejo z beljakovinami bogat medij z dodatkom 10–15 % živalskega seruma. Za preprečevanje bakterijskih in glivičnih okužb, se v gojišče pogosto doda še ustrezen antibiotik, največkrat penicilin in talijev acetat. *M. synoviae* za rast potrebuje še prisotnost nikotinamid adenin dinukleotida (NAD). Kolonije se razvijejo na agarju pri 37 °C po 3–10 dneh, pri nekaterih vrstah (*M. gallinarum* in *M. gallinaceum*), pa se te lahko izoblikujejo že po enem dnevu. Tipične kolonije so majhne (0,1–1 mm), gladke in okrogle z navadno vbočenim centralnim delom (oblika ocvrtega jajca) (Kleven, 2008b).

2.1.3 Vpliv na celične funkcije gostitelja

Zaradi omejene biosinteze so predstavniki razreda *Mollicutes* po večini paraziti z značilnimi gostitelji in so pogosto tudi tkivno specifični. Najpogosteje naseljujejo respiratorni in urogenitalni trakt, mlečne žleze in sklepe. V primernem gostitelju so

sposobni preživeti zelo dolgo, saj so kljub majhnosti njihovega genoma razvili različne molekularne mehanizme za spopadanje z gostiteljevo imunsko obrambo (Rottem, 2003; Rosengarten in sod., 1999).

Nekaterim živalskim mikoplazmam kolonizacijo in okuževanje evkariontskih celic omogoča poseben organel za pritrjevanje (Slika 1b). Ta se nahaja na koncu posebne strukture mikoplazemskih celic v obliki hruške oz. steklenice in predstavlja njihov glavni virulentni dejavnik. Poleg škode, ki jo povzročijo s pritrjevanjem na celice, z gostiteljem tekmujejo tudi za prekurzorje, ki jih porabljajo za sintezo makromolekul, kar lahko v gostitelju prizadane sintezo proteinov, rast in delitev celic, povzroči poškodbe kromosov ali vodi celo v celično smrt. Mikoplazme so zmožne tudi zlitja z evkariontsko celico, kjer »izlijejo« svojo vsebino vanjo, s čimer lahko močno prizadanejo celične funkcije. Mikoplazme vsebujejo različne hidrolitične encime, ki lahko poškodujejo celico, med drugim tudi nukleaze, ki lahko razgradijo gostiteljevo celično DNA. Prav tako ob zlitju prihaja do vstavljanja delov mikoplazemske membrane v gostiteljevo membrano, kar lahko spremeni prepoznavna mesta receptorjev ali pa lahko vpliva na izražanje citokinov, kar prizadane signalizacijo med celicami v okuženem tkivu (Rottem, 2003).

Sposobnost izogibanja imunskemu sistemu gostitelja je ključna za preživetje mikoplazem. Eden izmed mehanizmov, ki so ga razvile je molekularno posnemanje antigenskih epitopov gostitelja, ki jih gostitelj ne prepozna kot tuje in ne aktivira imunske obrambe. Sčasoma proti takim mikoplazemskim epitopom, ki so strukturno zelo podobni gostiteljevim, nastanejo specifična protitelesa, ki za gostitelja predstavljajo avtoprotitelesa, zaradi katerih telo začne napadati lastne celice. Do takšnega spreminjanja membranskih proteinov oz. lipoproteinov lahko prihaja zaradi signala iz okolice, ali pa zgolj zaradi naključnega spreminjanja izražanja genov. Mikoplazemska populacija lahko z relativno veliko frekvenco spontano oziroma naključno sintetizira določen lipoprotein z več antigenskimi fenotipi. Gostiteljev imunski sistem bo sprva uničil mikoplazme, ki izražajo prvotne antigenske fenotipe, specifičnim protitelesom pa bo »ušla« populacija mikoplazem, ki je spremenila svoje površinske proteine oz. antigenske epitope (Rottem, 2003).

2.1.4 Mikoplazme pri perutnini

Pri pticah najdemo več kot 20 različnih vrst mikoplazem, od tega 12 vrst pri kokoših in purah. Le 4 od njih pa povzročajo večjo ekonomsko škodo v intenzivni reji zaradi slabšega prirasta in nesnosti. Glavna povzročitelja bolezni pri kokoših in purah sta *M. gallisepticum* in *M. synoviae*, medtem ko *M. iowae* in *M. meleagridis* povzročata bolezni predvsem pri purah. Okužbe z *M. iowae* povzročajo povišan pogin zarodkov, *M. meleagridis* pa poleg lažjih bolezni dihal lahko povzroča še skeletne nepravilnosti in manjši prirast. Bolezni dihal pri kokoših in purah povzroča tudi *M. imitans*, bližnja sorodnica *M. gallisepticum* (Kleven, 1998; Kleven, 2008a).

Ker se vse patogene mikoplazme, ki okužujejo perutnino, lahko prenašajo vertikalno preko valilnih jajc je za preprečevanje širjenja okužb najpomembnejše, da se zagotovijo vzrejne matične jate, ki so proste mikoplazem. Okužbe se lahko preprečujejo tudi z zdravljenjem in cepljenjem. Zdravljenje pomaga zmanjševati ekonomsko škodo, vendar ne zagotavlja dolgoročne rešitve. Tako rešitev lahko dosežemo s cepljenjem proti najbolj razširjenima *M. gallisepticum* in *M. synoviae*, kar je najbolj koristno takrat, ko ne moremo zagotoviti neokuženih matičnih jat. Pri sami reji lahko širjenje okužbe preprečujemo z izvajanjem načela popolne izpraznitve obrata pred ponovno naselitvijo (sistem »all in - all out«), z dobro biološko varnostjo na obratu in z doslednim programom nadzora (Kleven, 2008a).

Med relativno enostavne, poceni in občutljive teste za detekcijo mikoplazem spada test hitre serumske aglutinacije, ki je primeren za uporabo kot presajalni test. Slaba stran tega testa so pogoste navzkrižne reakcije, posebno pri detekciji okužbe nekaj tednov po cepljenju s cepivi z oljno emulziskimi adjuvansi. Namesto njega se lahko odločimo tudi za encimsko imunoabsorpcijsko preiskavo ali test *ELISA* (ang.: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Rezultate po obeh metodah lahko preverimo z metodo inhibicije hemaglutinacije, saj imajo *M. gallisepticum*, *M. synoviae* in *M. meleagridis* uporabno lastnost, da zlepljajo kokošje ali purje eritrocite. V uporabi sta med drugim še encimsko imunski test DIBA, s katerim dokazujemo specifična proitelesa, in dokazovanje specifične DNA s PCR (Kleven, 2008a, b).

2.1.4.1 *Mycoplasma synoviae*

M. synoviae spada med štiri najpomembnejše patogene mikoplazme, ki okužujejo perutnino. Največ ekonomske škode povzroči pri pitovnih piščancih (brojlerjih) (Dufour-Gesbert in sod., 2005), čeprav tudi škoda pri nesnicah ni zanemarljiva (Feberwee in sod., 2009).

M. synoviae dokazano invadira kokošje celice, kar ji omogoča širjenje po gostitelju in izmikanje imunskemu odzivu (Dušanić in sod., 2009). Glavni imunogen bakterije je membranski lipoprotein in hemaglutinin VlhA, ki se pri večini sevov cepi v N-terminalni del oz. lipoprotein MSPB in C-terminalni del oz. MSPA in pri kokoših spodbudi močan lokalni in sistemski protitelesni odziv, posebno MSPB (Narat in sod., 1998; Noormohammadi in sod., 1999). Vendar pa se *M. synoviae* takemu odzivu uspe izmikati z od časa odvisno diverzifikacijo gena za VlhA (Slavec in sod., 2011). Ko je protitelesna imunska obramba gostitelja že aktivirana, se *M. synoviae* brani tudi s pomočjo cisteinske proteaze CysP, ki razgradi kokošji IgG na Fab in Fc (Cizelj in sod., 2011).

M. synoviae najpogosteje povzroča okužbe zgornjih dihal, ki so pogosto subklinične in večinoma potekajo brez izraženih bolezenskih znakov, vseeno pa prizadanejo splošno zdravje živali. Če bolezen napreduje in preraste v sistemsko okužbo, prizadane številne organe, kot so bursa, jetra, vranica, možgani ter živci in skeletne mišice. Takrat se bolezen lahko razvije v kužni sinovitis, ki se kaže predvsem kot vnetje sklepov. Po cepljenju živali s cepivi proti kužnemu bronhitisu ali atipični kokošji kugi (AKK) je možen tudi pojav vnetja zračnih vrečk (Buim in sod., 2011; Kleven in sod., 1972).

Prvi znaki, ki jih lahko opazimo pri živali s kužnim sinovitisom so bleda barva grebena, šepanje in zaostanek v rasti. Ko bolezen napreduje, perje postaja vse grše, se viha, greben pa se skrči. Sklepi zatekajo in na prsih so pogosti žulji. Žival postane brezvoljna, dehidrirana in shujšana. Pogosto je opaziti zeleno obarvanje iztrebkov, ki vsebujejo veliko sečne kisline. Akutnim znakom sledi počasno okrevanje, vendar lahko kužni sinovitis vztraja v jati in pri nekaterih živalih preraste v kronično obolenje (Kleven in Ferguson-Noel, 2008).

Pri kokoših je pogin zaradi kužnega sinovitisa 2-75 %, najpogosteje med 5 in 15 %. Bolezni dihal zaradi okužbe z *M. synoviae* so navadno subklinične, vendar je lahko okuženih 90-100 % ptic. Pogin je redek in ponavadi nižji od 1 %. Pri purah je pogin ponavadi zelo nizek in znaša od 1 do 20 % (Kleven in Ferguson-Noel, 2008).

Če okužba z *M. synoviae* preko krvnega obtoka napreduje do jajcevodov lahko povzroči deformacije na koničastemu delu jajca ali t.i. sindrom EAA (eggshell-apex-abnormalities). Zanj je značilen pojav grobe površine lupine, ki je precej tanjša, prosojna ter poka in se lomi, na predelu do približno 2 cm od konice jajca. Delež deformiranih jajc je različen med jatami, vendar lahko znaša tudi do 25 % (Feberwee in sod., 2009).

2.2 PTIČJI PARAMIKSOVIRUS TIPA 1

Virulentni sevi ptičjega paramiksovirusa tipa 1 (APMV-1) povzročajo atipično kokoško kugo, ki povzroča ogromno ekonomsko škodo po vsem svetu. Pred pandemijo virusa gripe H5N1 je bil ekonomski učinek APMV-1 daleč največji od vseh perutninskih bolezni in verjetno tudi od vseh živalskih virusov nasploh (Alexander, 2009).

Prvi izbruh AKK je bil leta 1926 zabeležen v Indoneziji. Eno leto kasneje se je bolezen pojavila tudi v Angliji v mestu Newcastle, po katerem je virus dobil tudi prvo ime - Newcastle disease virus (NDV), ki je bilo najprej mišljeno le kot začasno. Ime je še danes v splošni uporabi in označuje virulentne seve APMV-1, ki povzročajo AKK (Alexander, 2009).

V Sloveniji smo večji izbruh atipične kokoške kuge zabeležili leta 1966 na območju takratne občine Ptuj, manjši pa še leta 1991. Atipična kuga je tudi edina posebno nevarna bolezen živali, proti kateri v Sloveniji izvajamo preventivno cepljenje kokoši (Državna ocena..., 2012).

2.2.1 Taksonomska in filogenetska opredelitev

APMV-1 spada v družino *Paramyxoviridae* reda *Mononegavirales* kraljestva virusov. Družino *Paramyxoviridae* delimo na dve poddružini, *Pneumovirinae* in *Paramyxovirinae*, ki jo sestavlja 5 rodov. *Rubulavirus* vključuje virus mumpsa in viruse parainfluence tipa 2 in 4, *Respirovirus* vključuje viruse parainfluence tipa 1 in 3, v rod *Morbillivirus* spadajo

virusi ošpic ter goveje in pasje kuge, v *Henipavirus* uvrščamo viruse Hendra in Nipah, rod *Avulavirus* pa sestavljajo ptičji paramiksovirusi. Poznamo 11 serotipov ptičjih paramiksovirusov, od APMV-1 do APMV-11. Med njimi je APMV-1 najpomembnejši povzročitelj bolezni pri perutnini, APMV-2, APMV-3, APMV-6 in APMV-7 tudi okužujejo domačo perutnino, preostali pa ponavadi okužujejo prostoživeče ptice.

Preglednica 2: Opis lastnosti serotipov APMV (Alexander, 2009; Miller in sod., 2010; Briand in sod., 2012; Terregino in sod., 2013)

<i>Serotip</i>	<i>Običajni gostitelji</i>	<i>Drugi možni gostitelji</i>	<i>Povzročena obolenja pri perutnini</i>
APMV-1	Domače vrste perutnine	Zelo številni (241 vrst iz 27 redov ptic)	Izraženi bolezenski znaki so dvisni od seva in gostitelja
APMV-2	Pure, ptice selivke	Kokoši, papige, turalice	Milejše bolezeni dihal, manjši vpliv na nesnost
APMV-3	Pure	Ptice selivke, turalice	Milejše bolezeni dihal, manjša nesnost pri purah
APMV-4	Race	Gosi	Ni znano
APMV-5	Skobčevke		Ne povzroča kliničnih znakov
APMV-6	Race	Gosi, turalice, pure	Milejše bolezeni dihal, večji pogin pri purah
APMV-7	Golobi	Pure, noji	Milejše bolezeni dihal pri purah
APMV-8	Race, gosi		Ni znano
APMV-9	Race		Asimptomatske okužbe gojenih rac
APMV-10	Čopasti pingvini		Ni znano
APMV-11	Kozica (močvirska ptica)		Ni znano
APMV-12	Navadna žvižgavka (raca)		Ni znano

Za razvrščanje sevov APMV-1 je v splošni uporabi genotipiziranje glede na protein F, ki je pomemben virulenten dejavnik seva. Glede na filogenetske analize sevov APMV-1, lahko seve razdelimo v dva razreda, razred I in II. Razred I naj bi vseboval samo 1 genotip,

razred II pa je razdeljen na 16 genotipov in vključuje večino sevov, ki okužujejo perutnino po vsem svetu (Diel in sod., 2012). Imena novih sevov so sestavljena iz serotipa, vrste oz. pasme ptice iz katere je bil izoliran, geografske lokacije izolacije, referenčne številke ali imena in leta izolacije (Alexander, 2009).

2.2.2 Osnovne značilnosti

Kot za vse predstavnike redu *Mononegavirales* je tudi za APMV-1 značilna enoverižna nesegmentirana negativno polarna molekula RNA, ki je obdana z nukleokapsido. Genom je velik približno 15,2 kbp in nosi zapis za 6 strukturnih proteinov: nukleokapsidni protein (NP), fosforilacijski protein (P), matrični protein (M), fuzijski protein (F), hemaglutinin nevraminidazni protein (HN) in veliki protein (L), ki je od RNA odvisna RNA polimeraza ter 2 nestrukturna proteina, ki nastajata s transkripcijskim urejanjem gena, ki kodira protein P. Virusni delci so navadno pleomorfni, oziroma okrogli s premerom 100-500 nm. Lahko pa so nitasti in široki približno 100 nm ter različnih dolžin. Površina delcev je pokrita s proteini HN in F, ki se kažejo kot približno 8 nm dolge strukture, ki sodelujejo pri vezavi in vstopanju virusa v gostiteljsko celico (Alexander, 2009; Cardenas-Garcia in sod., 2015).

Ena izmed značilnih bioloških lastnosti APMV-1 je sposobnost aglutinacije eritrocitov, ki je posledica vezave proteinov HN na njihove površinske receptorje. Lastnost aglutinacije in specifične inhibicije aglutinacije se izkorišča pri diagnostiki. APMV-1 lahko povzroči tudi celično zlitje in hemolizo, ki potekata v bistvu po enakem postopku. Po pritrditvi virusa na celične receptorje s pomočjo proteinov HN sledi zlitje celične in virusne membrane ter vstop nukleokapside v celico s pomočjo proteina F. Pri rdečih krvničkah zaradi toge membrane, vstopu viriona ponavadi sledi liza. Encim nevraminidaza, ki je sestavni del proteina HN, poskrbi še za eno biološko značilnost. Poleg tega, da povzroča postopno izpiranje aglutiniranih eritrocitov, naj bi imela funkcijo tudi pri razmnoževanju virusa, kjer naj bi odstranjevala virusne receptorje z gostiteljske celice in tako preprečila ponovno pritrdjevanje sproščenih virusnih delcev po brstenju (Alexander, 2009).

Pri razmnoževanju APMV-1, pritrditvi virusa na celične receptorje in vstopu nukleokapside v celico sledi znotrajcelično razmnoževanje virusa, ki v celoti poteka znotraj citoplazme. Ker je njihova RNA negativno polarna, od RNA odvisna RNA polimeraza najprej naredi komplementarno pozitivno polarno RNA, ki služi kot matrica za

nastanek nove negativno usmerjene genomske RNA za potomce. Pred prepisovanjem genomske RNA se ustvarijo še transkripti mRNA molekule, ki določajo virusne proteine (Alexander, 2009). Novi virioni se sestavijo v citoplazmi in zapustijo celico s pomočjo brstenja skozi celično membrano (Sinkovics in Horvath, 2000).

Med razmnoževanjem APMV-1 se funkcijsko pomemben protein F sintetizira kot prekursorski glikoprotein F0, ki se mora cepit na F1 in F2 podenoti, da bi na novo nastali virusni delci postali infektivni. To posttranslacijsko cepljenje omogočijo gostiteljeve proteaze. Če do cepitve ne pride, nastali delci niso zmožni nadaljne okužbe, saj ne morejo vstopati v gostiteljeve celice. Zmožnost okuževanja neinfektivnih virusnih delcev se lahko povrne, če pri *in vitro* gojenju dodajamo tripsin, ki cepi vse proteine F0 APMV-1 (Alexander, 2009).

Virulenco APMV-1 določa predvsem aminokislinsko zaporedje cepnega mesta proteina F, saj se je izkazalo, da so gostiteljeve proteaze, ki cepijo proteine F virulentnih sevov, prisotne v večih tkivih in celicah kot tiste, ki cepijo proteine F manj virulentnih sevov. To pomeni, da se bolj virulentni sevi lahko razširijo v številne organe, manj virulentni pa so zaradi pomanjkanja specifičnih proteaz omejeni le na določen tip celic in gostitelju ne prizadanejo tolikšne škode. Razlike pa vseeno obstajajo tudi pri sevih, ki nosijo enak zapis za cepno mesto F, k čemer naj bi prispeval predvsem protein HN (de Leeuw in sod., 2005).

Zmožnost okuževanja in posledično izražanje kliničnih znakov je močno odvisno tudi od gostitelja, starosti živali, okoljskih dejavnikov in okužbe z drugimi organizmi. Načeloma velja, da mlajša kot je kokoš, hitreje bo potekala okužba in hujši bodo klinični znaki (Alexander, 2009).

APMV-1 se navadno goji v kokošjih zarodkih in v celičnih kulturah. Vse ptičje paramiksovirusse lahko razmnožujemo v oplojenih kokošjih jajcih. Ker je to dostopna metoda in zagotavlja velik izplen, se ponavadi uporablja za izolacijo in razmnoževanje virusa ter za pridobivanje cepiv. V večini celičnih kultur je rast APMV-1 slaba, zato se v praksi ta način gojenja načeloma ne uporablja za namnoževanje virusa (Alexander, 2009).

2.2.3 Okužba z APMV-1

Svetovna organizacija za zdravje živali (OIE) definira atipično kokošjo kugo kot okužbo ptic s katerimkoli APMV-1, ki izpolnjuje vsaj enega od dveh kriterijev. Prvi je intracerebralni indeks patogenosti, ki mora pri dan starih piščancih znašati vsaj 0,7. Drugi pa se nanaša na cepno mesto proteina F, ki mora na C-terminalnem koncu F2 proteina vsebovati vsaj tri argininske ali lizinske ostanke med 113. in 116. mestom ter na 117. mestu N-terminalnega konca F1 proteina aminokislino fenilalanin (Newcastle disease ..., 2012).

Različni sevi APMV-1 povzročajo zelo različne klinične znake in so različno virulentni. Zato jih glede na povprečen čas pogina kokošjih zarodkov po okužbi z minimalno letalno dozo virusa razdelimo na tri skupine. Zelo virulentni so velogeni sevi, pri katerih povprečen čas znaša manj kot 60 ur. Delimo jih na viscetropne, ki povzročajo hude krvavitve črevesja in nevrotropne, ki povzročajo huda obolenja dihal. Tiste seve, ki pogin povzročijo v 60 do 90 urah uvrščamo med mezogene. Ti so manj virulentni in ponavadi povzročajo milejše dihalne bolezni, včasih lahko prizadanejo celo živčevje, vendar ponavadi do pogina pride le pri mlajših živalih. Lentogeni sevi so najmanj virulentni in lahko povzročijo le blage bolezni dihal. Ponavadi jih uporabljajo za izdelavo živih cepiv (Gallili in Ben-Nathan, 1998; de Leeuw in sod., 2005).

Poleg različnih sevov na razvoj bolezni vplivajo tudi drugi dejavniki. Eden izmed njih je gostitelj. Enaki sevi lahko pri različnih živalih povzročijo različno močne klinične znake. Pomembna je tudi količina virusa, način okužbe in starost živali. Praviloma so klinični znaki hujši in pogin pogostejši pri mlajših živalih. Pri naravni poti okužbe, skozi kljun in oči, naj bi bil bolj pogost razvoj bolezni dihal, med tem ko naj bi v eksperimentalnih pogojih intramuskularne, intravenozne in intracerebralne okužbe povzročale predvsem nevrološke znake (Alexander in Senne, 2008).

Pri pticah, ki prebolijo bolezen, lahko opazimo zmanjšan prirast, slabšo konverzijo krme, slabšo nesnost in nepravilnosti na lupini jajc. Prizadeta je tudi plodnost in odstotek izvaljenih jajc. Če se zgodi, da se z APMV-1 okuži človek, lahko pride do vnetja očesne veznice, ki lahko vodi do poškodb vida, pogosti so tudi glavoboli, slabše počutje in mrzlica (Gallili in Ben-Nathan, 1998).

Živali se lahko okužijo z vdihavanjem virusnih delcev iz dihalnega trakta okuženih živali ali prašnih delcev iz iztrebkov. Ena izmed glavnih poti okužbe je zauživanje z virusom okuženih iztrebkov, ki jih živali med okužbo izločajo. O vertikalnem prenosu okužbe, iz kokoši na zarodek, skorajda ne moremo govoriti, saj to v veliki večini primerov privede do odmrta zarodka. Lahko pa se zgodi, da se jajce okuži z lentogenimi sevi iz cepiv, kar ponavadi ni usodno. Novo izvaljeni piščanci se tako najpogosteje okužijo skozi poškodovano lupino ali z ostanki okuženih iztrebkov na njej (Alexander in Senne, 2008).

AKK se lahko širi z vetrom, kontaminirano vodo in krmo, s perutninskimi proizvodi, z ljudmi in opremo, preko drugih živalskih vrst, ki same ne zbolijo in s premiki divjih ptic, okrasnih ptic in tekmovalnih golobov. Če pride do nepopolne inaktivacije ali kontaminacije cepiv oz. inštrumentov za cepljenje, je za širjenje lahko krivo tudi cepljenje. Pri nizkih temperaturah lahko virus v iztrebkih ali vodi ohrani svojo infektivnost več tednov, v zamrznjenem mesu pa preživi tudi leta (Atipična kokošja ..., 2015).

Ker lahko atipična kokošja kuga pri kokoših povzroči do 100 % pogin, je nujno, da rejci skrbijo za dobro biološko varnost na svojih farmah. Za preprečevanje širjenja bolezni pa je nujno tudi cepljenje (Alexander in Senne, 2008). V uporabi so heterologna cepiva z živimi oslabljenimi ali mrtvimi virusi, ki živali ščitijo pred pojavom resnejših kliničnih znakov pri okužbah z večino APMV-1 v obtoku. Ne zagotavljajo pa popolne imunosti in ne preprečujejo razmnoževanja virusa, le zmanjšajo ga. Zato Cardenas-Garcia in sod. predlagajo, da bi se začela uporabljati homologna cepiva, ki zaradi tega, ker vsebujejo viruse z enakim genotipom, ki kroži, zagotavljajo precej boljšo imunost, manjši pogin in zmanjšujejo širjenje okužbe (Cardenas-Garcia in sod., 2015).

2.3 IMUNSKÉ CELICE

Ptiči in sesalci si delijo mnoge značilnosti imunskega sistema, razvili pa so tudi mnogo posebnosti (Davison, 2008). Razlike lahko najdemo tako na ravni genov, molekul, celic in organov vpletenih v imunski sistem, kot pri funkcionalnih mehanizmihi, ki so jih razvili (Kaiser, 2010). Na virusne, bakterijske in parazitske okužbe se kokoši in sesalci odzovejo podobno, prisotna je tako prirojena, kot pridobljena imunost z zmožnostjo celično posredovanega in humoralnega odziva ter imunskega spomina. Vendar pa je pot po kateri

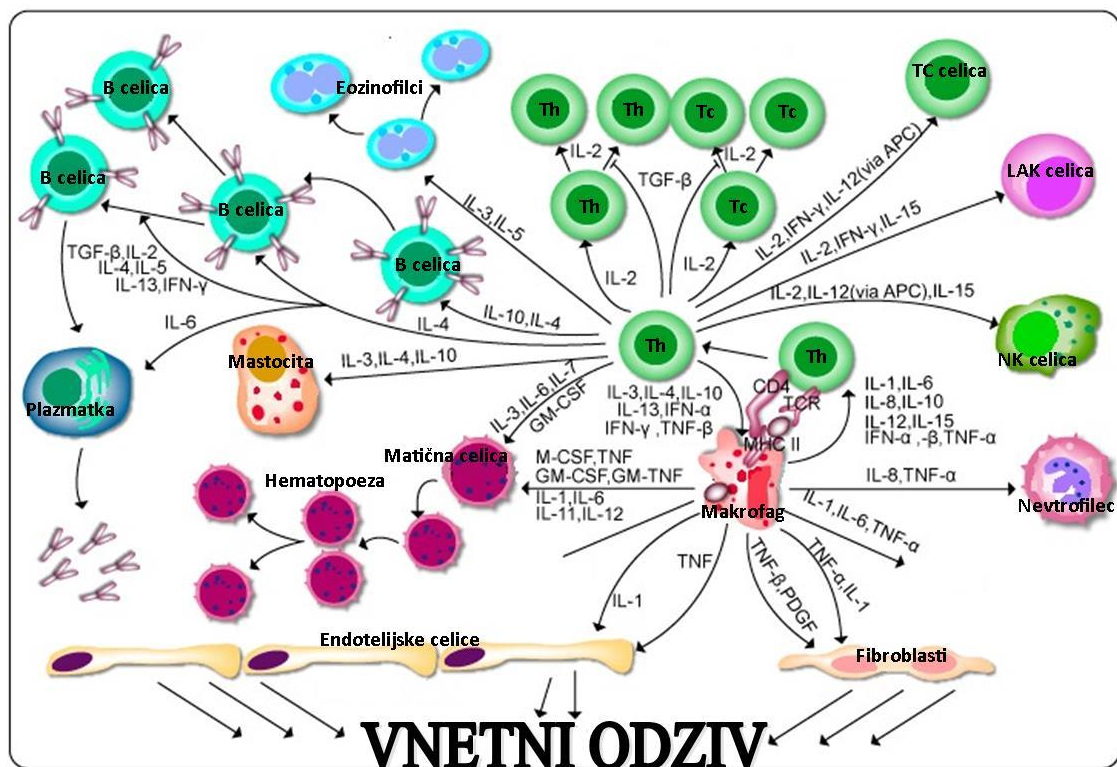
dosežejo imunski odziv različna in pri kokoših v mnogih pogledih poenostavljena (Kaiser, 2012).

Vdor mikroorganizmov v telo v okuženem tkivu povzroči vnetje, zaščitni odziv na okužbo s strani imunskega sistema, ki poskuša omejiti razmnoževanje patogenega organizma. Akutno vnetje je pomemben del imunskega odziva, ki lahko, če se razvije v kronično vnetje, povzroči tudi poškodbe tkiva in avtoimunske motnje. Imunske celice, ki sodelujejo v vnetnem odzivu, usklajujejo citokini (Roitt in sod., 2001).

Citokini so topni regulatorni proteini, z molekulsko maso manjšo od 30 kDa (Kaiser in Stäheli, 2008). So pomembne sporočilne molekule, ki nadzorujejo in koordinirajo imunske celice med nespecifičnim in specifičnim imunskim odzivom, kot tudi med razvojem in vzdrževanjem homeostaze (Kaiser, 2010). Lahko jih izločajo zelo različni celični tipi in se ponavadi ne izločajo konstantno, ampak kot odziv na prisotnost antigenov, vnetnih posredovalcev, tkivnih poškodb in prisotnost samih citokinov (Kapczynski in Kogut, 2008). Glede na funkcijo, ki jo opravljajo in celice, ki jih izločajo, citokine razdelimo na interlevkine (IL), interferone (IFN), transformirajoče rastne faktorje (TGF), dejavnike tumorske nekroze (TNF), kolonijsko stimulirajoče faktorje (CSF) in kemokine. Kokošji citokini si z ortologi pri sesalcih delijo 25-35 % aminokislinskega zaporedja in imajo manj predstavnikov različnih skupin citokinov kot sesalci (Kaiser in Stäheli, 2008).

Nekateri citokini, kot IL-6 in TNF spodbujajo vnetni odziv, medtem ko drugi delujejo na specifične imunske celice. Katere celice bodo sodelovale pri odzivu, je odvisno od narave patogenega mikroorganizma. Pri bakterijskih okužbah prvo obrambo zagotavljajo makrofagi in ostale fagocitirajoče celice. Makrofagi spodbujajo vnetni odziv nevtrofilcev, fibroblastov in endotelijskih celic z izločanjem IL-1 in TNF. IL-1 in TNF sta pirogena citokina, ki sta sposobna povečati telesno temperaturo in povzročiti vročino. Ob njuni prisotnosti fibroblasti in endotelijske celice na mesto okužbe posredujejo večje število imunskih celic. Makrofagi so tudi antigen predstavitvene celice, ki predstavijo antigen celicam T pomagalkam, ki igrajo ključno vlogo pri uravnavanju imunskega odziva s spodbujanjem klonalne ekspanzije T celic, ki začnejo izločati IL-2, glavni mediator pri proliferaciji in aktivaciji T celic. Kot negativni regulator proliferacije v različnih celicah deluje TGF- β , ki zavira vnetni odziv. Pri virusnih okužbah in pojavu tumorskih celic IL-2

skupaj z drugimi citokini stimulira citotoksično aktivnost naravnih celic ubijalk (celice NK). Celice T pomagalkе so pomembne tudi pri aktivaciji B celičnega odziva. Z izločanjem IL-10, IL-4 in ostalih citokinov regulirajo klonalno namnoževanje in diferenciacijo antigen specifičnih B celic v plazmatke, ki izločajo velike količine protiteles in v spominske celice (Roitt in sod., 2001).



Slika 2: Sinergistično delovanje citokinov ob vnetnem odzivu. (Cytokines and..., 2015)

2.3.1 Vnetni citokini

2.3.1.1 IL-6

IL-6 je večfunkcijski citokin, ki sodeluje pri imunski regulaciji, reakciji akutne faze in hematopoezi. Izločajo ga različni tipi celic in vpliva na razmnoževanje in diferenciacijo B in T celic, hepatocitov, krvotvornih matičnih celic in celic živčnega sistema (Nishimichi in sod., 2005). Je tudi eden izmed glavnih posredovalcev vročine, saj je sposoben preiti krvno možgansko bariero in posredno povišati nastavljeno točko telesne temperature (Prakasam in sod., 2013). Začne se izločati hitro po okužbi, saj je aktivator akutne faze in stimulira razvoj limfocitov. Igra tudi pomembno vlogo pri preklopu imunskega odziva iz nespecifičnega v specifičen in spodbuja nastajanje protiteles (Jones, 2005). IL-6 pri

kokoših kodira gen *IL-6*, ki je po strukturi podoben sesalskemu, obsega 445 aminokislin in si deli 40 % aminokislinskega zaporedja s homologi pri sesalcih (Nishimichi in sod., 2005).

2.3.1.2 IL-1 β

IL-1 pri sesalcih izločajo številni tipi celic, glavni pa so aktivirani makrofagi. Lahko povzroči vročino, poviša raven kortikosteronov v serumu in z aktivacijo ostalih citokinov sproži odgovor akutne faze v jetrih in aktivacijo žilnega endotelija. Stimulira tudi proliferacijo T celic preko indukcije IL-2 in spodbuja dozorevanje B celic in nastajanje protiteles (Weining in sod., 1998). Pri ljudeh gensko družino IL-1 sestavlja 11 predstavnikov. Devet jih leži na 2. kromosomu, IL-18 in IL-33 pa na 11. in 9. kromosomu. Pri kokoših je bilo odkritih precej manj predstavnikov in sicer, ligandi IL-1 β , IL-1RN, IL-36RN in IL-18 ter dva receptorja za IL-1RI in ST2. Najbolj raziskan predstavnik te družine pri kokoših je gen *IL-1 β* , ki se pri kokoših nahaja na 4. kromosomu. Kodira 267 aminokislin in si deli 25 % aminokislinskega zaporedja s človeškim ortologom (Gibson in sod., 2014). Po strukturi je kokošji gen zelo podoben človeškemu, ima pet eksonov in pet intronov v kodirajoči regiji, vendar je za tri četrtine manjši (Wigley in Kaiser, 2003). Gensko izražanje *IL-1 β* je povišano pri bakterijskih, virusnih ali parazitskih okužbah, saj igra vlogo takojšnjega vnetnega posredovalca (Gibson in sod., 2014). Lahko inducira izražanje drugih vnetnih posredovalcev, TNF- α in IL-6. TNF- α pozitivno vpliva na izražanje IL-1 β in IL-6, medtem ko IL-6 zavira izražanje IL-1 β in TNF- α (Kaiser in Stäheli, 2008).

2.3.1.3 IFN- γ

Je značilni citokin celično posredovane imunosti. IFN- γ pri sesalcih v prvi vrsti izločajo limfociti T in celice NK. Aktivira protimikrobno delovanje makrofagov, poveča procesiranje antigenov in poviša izražanje molekul glavnega histokompatibilnega kompleksa II na makrofagih in ostalih celicah. Vpleten je tudi v preklapanje težkih verig imunoglobulinskih razredov. IFN- γ pri kokoših kodira gen *IFN- γ* sestavljen iz 164 aminokislin, ki predstavljajo 16,8 kDa velik protein. Gen je podobno strukturiran kot človeški, ima podobno intronsko in eksonske sestavo in se nahaja na kromosomu 1. Delita si 32 % aminokislinskega zaporedja (Wigley in Kaiser, 2003).

2.3.2 Kemokini

Kemokini ali kemotaktični citokini so majhne sekretorne beljakovine, ki igrajo ključno vlogo v številnih bioloških procesih. Sodelujejo pri vnetnih procesih, kjer omogočajo transport in aktivacijo levkocitov, nadzorujejo premikanje limfocitov, dendritičnih celic in makrofagov ter vzdržujejo nekatere procese homeostaze. Veliki so 8–14 kDa in jih glede na zgradbo delimo na dve večji, CC in CXC, ter dve manjši skupini, XC in CX3C (Yadav in sod., 2010). Bolj pomembna pa je delitev po funkciji, ki jo opravljajo, delitev na vnetne in homeostatske kemokine. Vnetni citokini in njihovi receptorji so razdeljeni na multigenske družine. V družino CXCL spada npr. IL-8 (CXCLi2), v družino CCL pa makrofagni vnetni proteini (MIP) in monocitni kemoatraktivni proteini (MCP) (Kaiser, 2012).

2.3.2.1 MIP-1 β (CCL4)

Gen za kokošji MIP-1 β (*MIP-1 β*) je sestavljen iz 69 aminokislin in ima 75–80 % homologijo s človeškim oziroma mišjim *MIP-1 β* (Lam in DaMassa, 2000). Protein izločajo aktivirani makrofagi, limfociti in fibroblasti. Deluje kot kemoatraktant za celice T, stimulira nastanek monocitov in granulocitov ter inhibira negativni učinek MIP-1 α na matične celice (Sick in sod., 2000).

2.3.2.2 IL-8 (CXCLi2)

Je vnetni kemokin, ki pri sesalcih predstavlja glavni aktivator nevtrofilcev, spodbuja fagocitozo, deluje na žilni sistem ter posredno omogoča celjenje ran. Izločajo ga makrofagi in različne tkivne celice ob prisotnosti drugih vnetnih dejavnikov (Baggiolin in Clark-Lewis, 1992). Tako pri sesalcih, kot pri kokoših se gen za IL-8 (*IL-8*) nahaja na 4. kromosomu. Med ljudmi in kokošmi je podobnost aminokislinskega zaporedja za ta kemokin 59 % (Kaiser in sod., 1999).

2.3.3 Regulatorni citokin

2.3.3.1 TGF- β 4

Družina TGF je skupina multifunkcijskih citokinov, ki nadzira rast, diferenciacijo in apoptozo celic, s pomembno vlogo med embrionalnim razvojem. Pri sesalcih poznamo 3 izoforme, TGF- β 1–3. Pri kokoših obstajajo 3 oz. 4 oblike TGF (Kaiser in Stäheli, 2008).

TGF- β 4 ima pri kokoših enako biološko vlogo kot TGF- β 1 pri sesalcih. Proteina si delita 82 % aminokislinskega zaporedja (Pan in Halper, 2003). Družina TGF- β ima ključno vlogo pri uravnavanju vnetnih procesov. Pri sesalcih je TGF- β 1 protivnetni citokin, ki ima lahko pod določenimi pogoji tudi vnetne značilnosti (Kaiser in Stäheli, 2008). Tudi kokošji TGF- β 4 uvrščamo med protivnetne citokine (Swaggerty in sod., 2004), kodira pa ga gen *TGF- β 4*.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 CELIČNE KULTURE

3.1.1 Priprava kultur celic CEC-32 in HD11

Poskus smo opravili na dveh trajnih linijah kokošjih celic, in sicer na CEC-32 in HD11. CEC-32 izvira iz kokošjih embrionalnih celic, ki so morfološko fibroblastoidne celice (Kaaden in sod., 1982), HD11 pa iz kokošjih hematopoetskih celic kostnega mozga, po morfologiji pa so celice podobne makrofagom (Beug in sod., 1979). Obe celični liniji sta bili prijazno darilo prof. Bernda Kaspersa (Münchenska univerza, München, Nemčija) Imunološkemu in celičnemu laboratoriju Oddelka za Zootehniko in sta bili uporabljani tudi v predhodnih študijah (Dušanić in sod., 2012; Lavrič in sod., 2007, 2008).

Celice, ki so bile hranjene v tekočem dušiku v celični zbirki Genske banke (BF, Oddelek za zootehniko), smo odtajali v vodni kopeli na 37 °C. V sterilno centrifugirko z 10 ml ogretega gojitvenega medija smo dodali celice, centrifugirali 10 minut pri 900 rpm in odsesali supernatant. Celično usedlino smo resuspendirali v 5 ml gojitvenega medija ter suspenzijo prenesli v gojitveno plastenko T-75 (Sigma-Aldrich, 90076) in jo dali v inkubator s 37 °C in 5 % CO₂.

Preglednica 3: Sestava gojitvenih medijev za celice CEC-32 in HD11

	CEC-32	HD11:	Kratica	Proizvajalec
Osnovni medij	DMEM (D5648)	RPMI 1640 (R8755)		Sigma-Aldrich
Fetalni goveji serum	8 %	8 %	FBS	Sigma-Aldrich, F6178
Kokošji serum	2 %	2 %	ChS	Sigma-Aldrich, C5405
Gentamicin	0,1 %	0,1 %		Krka

Ko je bilo gojišče izrabljeno, smo celice premestili v novo gojišče. Kot indikator, kdaj je bil medij izrabljen, je služilo barvilo fenol rdeče, ki ob znižanju pH spremeni barvo iz rožnato-rdeče v oranžno-rumeno. Ker sta obe celični kulturi, tako CEC-32 kot HD11, adherentni kulturi, smo celice pri presajanju tripsinizirali. Najprej smo odstranili gojišče,

nato smo celice spirali dvakrat s po 5 ml HBSS (Sigma-Aldrich, 55021C), ki smo ga nato odstranili. Dodali smo 1-2 ml tripsina (Trypsin-EDTA, Sigma-Aldrich, T4049) s koncentracijo 0,125 g/ml, ki je v minuti do dveh odlepil celice z dna gojitvene plastenke. Celice smo nato s pipeto resuspendirali in jim dodali približno 10 ml gojitvenega medija, ki je ustavil aktivnost tripsina. Suspenzijo smo centrifugirali 10 minut pri 900 rpm in celice prenesli v sveže gojišče in nove gojitvene plastenke. Če smo celice samo vzdrževali, smo naprej gojili približno 1/3 celic, če pa smo celice že nasajali za poskus, smo jih nasadili v določeni koncentraciji v 6 lukenjskih ploščah.

3.1.2 Štetje celic

Da bi uspešno vzdrževali celični kulturi in zagotovili potrebno koncentracijo celic za poskuse, smo celice pri vsakem presajanju tudi prešteli in naredili test viabilnosti. 20 µl celične suspenzije smo v razmerju 1:1 zmešali z 0,4 % raztopino barvila tripan modro (Trypan Blue, Sigma-Aldrich, T8154), ki prodre le v mrtve celice. Te se obarvajo modro in jih zato lahko ločimo od živih. 20 µl celične suspenzije s tripanskim modrilom smo prenesli pod krovno steklo Bürker-Türkove števne komore (Assistent, 445/2) prešteli žive in mrtve celice v vseh štirih števnih poljih in koncentracijo celic v izhodnem vzorcu ter njihovo viabilnost izračunali po spodnjih dveh formulah. Glede na prešteto število celic v gojitveni platenki smo celice razdelili v več plastenk, običajno po $1,5 \times 10^6$ celic/platenko.

Formula za izračun koncentracije celic

$$c_{celic} = a \times R \times V \times 10^4 \quad \dots[1]$$

c_{celic} – koncentracija celic v izhodnem vzorcu

a – povprečno število celic v enem števnem polju

R – redčitveni faktor

V – volumen izhodnega vzorca

Formula za izračun viabilnosti celic

$$\%Z = \frac{n_z}{n_m} \times 100 \quad \dots[2]$$

$\%Z$ – odstotek živih celic

n_z – število živih celic

n_m – število mrtvih celic

3.2 *Mycoplasma synoviae* IN PTIČJI PARAMIKSOVIRUS TIPA 1

Za okuževanje celic v pogojih *in vitro* smo uporabili tipski sev *M. synoviae* WVU 1853 v logaritski fazi rasti. Število bakterij, ki tvorijo kolonije (CFU - ang. colony forming units) je bilo določeno po standardni metodi redčenja in nasajanja na agarne plošče (Rodwell in Whitcomb, 1983).

Virus APMV-1, sev La Sota (Pestikal La Sota SPF, Genera), ki smo ga uporabili, je bil liofilizirano cepivo, ki se uporablja za cepljenje piščancev, kokoši in pur proti AKK. Po navodilih proizvajalca smo iz cepiva pripravili enake vzorce cepiva razredčenega s fiziološko raztopino, ki smo ga do okuževanja celic hranili na -70°C.

3.3 IZVEDBA POSKUSA

Izvedli smo dva ločena poskusa. V prvem poskusu smo okužili samo celice CEC-32 pri drugem poskusu pa celice CEC-32 in celice HD11. Načrt okuževanja je bil v obeh ponovitvah poskusa in za obe celični liniji enak. Vse poskusne skupine so bile sestavljene iz treh vzorcev, ki smo jih pri izolaciji RNA združili skupaj.

Za vsako celično linijo smo za okuževanje pripravili 150 luknjic (na 12 lukenjskih ploščah) s celicami, in sicer 5×10^5 celic/ml na luknjo. Okuževanje in vzorčenje celic je potekalo, kot je prikazano v preglednici 4, kjer je prikazan primer za celice CEC-32.

V času 0 smo celice v poskusnih skupinah CM, CMV in CMV* okužili z 0,4 ml kulture *M. synoviae* WVU 1853 s približno 10^7 - 10^8 CFU/ml (MOI je bila 10-100 mikoplazemskih celic na eno evkariontsko celico). Ustreznim kontrolnim skupinam, CF, CFA in CFA*, smo namesto *M. synoviae* dodali enak volumen Freyvega gojišča. Po 6ih urah smo poskusno skupino CV okužili z 0,4 ml 10^3 EID₅₀ (0,001 cepna doza) APMV-1 La Sota na 5×10^5 celic. Prav tako smo takrat izvedli tudi zaporedno okužbo skupine CMV z enako količino APMV-1. Kontrolnim skupinam CA in CMV smo dodali fiziološko raztopino. Po 24ih urah smo zadnji korak ponovili pri skupinah CV* in CMV* ter kontrolah CA* in CFA*. Celice so bile med poskusom v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO₂.

Za vzorčenje celic za izolacijo RNA smo gojišče odstranili, celice sprali s sterilnim PBS (pH 7,4), jih odstranili s površine posamezne luknje gojitvene plošče s plastičnim strgalom,

centrifugirali 10 min pri 900 rpm in iz usedlin celic osamili celokupno RNA po navodilih proizvajalca komercialnega kompleta PureLink™ RNA Mini Kit (Applied Biosystems, 12183-018A).

Preglednica 4: Primer načrta okuževanja za celice CEC-32

<i>Trajanje koinkubacije celic CEC-32 in MS</i>	0h Inokulacija ²	6h	12h	18h	24h	30h	36h	48h	54h	72h
<i>Trajanje koinkubacije celic CEC-32, MS in virusa</i>		0h Inokulacija	6h	12h		24h		48h		
<i>Poskusne skupine¹</i>										
CF	inokulacija F	x ³	x	x	x	x	x	x	x	x
CM	inokulacija MS	x	x	x	x	x	x	x	x	x
CA		inokulacija A	x	x		x			x	
CV		inokulacija V	x	x		x			x	
CFA	inokulacija F	inokulacija A	x	x		x			x	
CMV	inokulacija MS	inokulacija V	x	x		x			x	
<i>Trajanje koinkubacije celic CEC-32, MS in virusa*</i>					inokulacija	6h	12h	24h		48h
CA*¹					inokulacija A	x	x	x		x
CV*¹					inokulacija V	x	x	x		x
CFA*¹	inokulacija F				inokulacija A	x	x	x		x
CMV*¹	inokulacija MS				inokulacija V	x	x	x		x

¹ CF - kontrola okužbe z *M. synoviae*, dodano Freyevo gojišče; CM - okužba celic z *M. synoviae*; CA - kontrola okužbe z APMV-1 La Sota, dodana fiziološka raztopina; CV - okužba celic z APMV-1 La Sota; CFA - kontrola zaporedne okužbe z *M. synoviae* in APMV-1 La Sota, dodano Freyevo gojišče in fiziološka raztopina; CMV - zaporedna okužba celic z *M. synoviae* in APMV-1 La Sota; CA* - CA s časovnim zamikom 24h; CV* - CV s časovnim zamikom 24h; CFA* - CFA s časovnim zamikom 24h; CMV* - CMV s časovnim zamikom 24h.

² Okužba celic z *M. synoviae* (inokulacija MS), APMV-1 La Sota (inokulacija V) ali dodajanje kontrole – Freyevo gojišče (inokulacija F), fiziološka raztopina (inokulacija A).

³ Vzorčenje celic za izolacijo RNA

3.3.1 Izolacija RNA

Za izolacijo RNA iz celic smo uporabili PureLink™ RNA Mini Kit in pri delu sledili priloženemu protokolu. Po končani izolaciji smo izmerili še koncentracijo RNA (NanoVue, GE Healthcare) pri 260 nm in določili čistost s pomočjo 260:280 nm razmerja.

3.3.2 Tretiranje z DNazo I

Da izolirana RNA ne bi vsebovala kakršne koli genomske DNA, ki bi motila nadaljnje delo, smo vzorce tretirali z DNazo I (Fermentas, EN0521). Ta endonukleaza razgradi enojne in dvojne vijačnice DNA s hidrolizo fosfodiesterских vezi, kar vodi v nastanek mono in oligo deoksiribonukleotidov s 5'-fosfatno in 3'-OH skupino. Encimska aktivnost je strogo odvisna od Ca^{2+} ionov, aktivirajo pa jo Mg^{2+} ali Mn^{2+} ioni. Ob prisotnosti Mg^{2+} DNaza I cepi vsako vijačnico dsDNA neodvisno in naključno. Če pa so prisotni Mn^{2+} ioni cepi encim obe vijačnici na približno istem mestu.

Koncentracija RNA v 10 μl reakciji je znašala 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, zato smo vse vzorce ustrezno redčili z destilirano vodo. Dodali smo še po 1 μl reakcijskega pufru z MgCl_2 in DNazo I in reakcijsko zmes inkubirali v toplotnem stresalniku (Eppendorf, Thermomixer comfort) 30 minut na 37 °C. Nato smo dodali po 1 μl 50 mM EDTA in inkubirali še 10 minut na 65 °C.

3.3.3 Obraten prepis RNA v cDNA

Obraten prepis (obratno transkripcijo) RNA smo opravili s pomočjo komercialnega kompleta z visoko zmogljivo cDNA transkriptazo in RNA inhibitorjem (Applied Biosystems, 4374967). Uporabili smo 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNA in sledili navodilom proizvajalca. Pridobljeno cDNA smo do analiz s kvantitativnim PCR v realnem času hranili na -70 °C.

3.3.4 Kvantitativni PCR v realnem času

Kvantitativni PCR v realnem času (qRT-PCR), je široko uporabljena metoda, ki temelji na klasičnem PCR, kjer lahko spremljamo podvojevanje DNA, ko se le ta dejansko dogaja (Valasek in Repa, 2005). Metoda je enostavna, zelo občutljiva, natančna, z njo je možno zaznati že majhne spremembe v genskem izražanju in s pravilno normalizacijo zagotavlja zanesljive in hitre rezultate (Pfaffl, 2001).

Pri qRT-PCR spremljamo eksponentno podvajanje DNA s pomočjo fluorescentne tehnologije, ki nam omogoča tudi kvantifikacijo pomnoženega produkta. Pri tem se izkorišča dejstvo, da večje kot je število kopij tarčne nukleinske kisline, hitreje opazimo povečanje fluorescentnega signala. Z upoštevanjem povečanja fluorescence glede na število cikla programska oprema izriše krivulje podvojevanja, ki nam podajo celovito sliko o poteku PCR podvojevanja. Program poda tudi vrednosti C_q za vsak vzorec posebej, ki povedo, kdaj intenziteta fluorescentnega signala barvil preseže nastavljeni prag. S C_q vrednostjo nato po eni od dveh metod določimo raven izražanja genov. Pri absolutni kvantifikacijski metodi količino tarčne sekvence določimo s pomočjo standardne krivulje, ki smo jo naredili s serijo redčitev standardnega vzorca z znano koncentracijo. Pri relativni kvantifikaciji pa izražanje v tarčnem vzorcu primerjamo z izražanjem v kontrolnem ali kalibratorskem vzorcu in rezultat podamo kot razliko v izražanju (FC - ang. fold change) (Dušanić in sod., 2012).

Še več informacij o pomnoženem produktu lahko pridobimo, če ga podvržemo naraščajoči temperaturi in določimo kdaj se dvojna vijačnica produkta »tali«. Točka taljenja je unikatna lastnost, ki je oodvisna od dolžine produkta in njegove nukleotidne sestave. Programska oprema izmerjene temperature predstavi s krivuljo taljenja (Valasek in Repa, 2005).

3.3.4.1 Časovno temperaturni profil qRT-PCR

Reakcijo qRT-PCR sestavljajo trije osnovni koraki. Prvi korak je denaturacija, kjer je dvoverižna DNA podvržena temperaturi od 94 °C do 98 °C, kar povzroči, da se vijačnica odpre in loči na dve enoverižni DNA matrici. V koraku naleganja, ki sledi, se temperatura reakcije zniža na 45–65 °C, kar ustvari pogoje za naleganje začetnih oligonukleotidov na enoverižno DNA matrico. Pri zadnjem koraku, koraku podaljševanja, je temperatura zopet malo višja, od 65 °C do 75 °C. DNA polimeraza v tem koraku sintetizira novo verigo s pomočjo kratkih, sekvenčno specifičnih oligonukleotidov, ki jih dodajamo v reakcijo da služijo kot začetniki za novonastalo dvoverižno DNA. Ta tristopenjski proces se običajno ponavlja 40 ciklov, vendar pa se DNA podvaja le dokler se reaktanti ne porabijo in aktivnost encima upade ter reakcija doseže »plato«. Podatki po tej fazi niso več uporabni

za kvantifikacijo, zato količino nastalega produkta merimo le v eksponentni fazi in ne v času vseh 40 ciklov reakcije (Invitrogen, 2008; Valasek in Repa, 2005).

Pri analizah v sklopu naših raziskav je denaturacija potekala 10 minut pri 95 °C, temperaturo nadaljnjih dveh korakov pa smo prilagodili vsakemu preiskovanemu genu posebej, glede na talilno temperaturo izbranih začetnih oligonukleotidov, kar je razvidno iz preglednice 5. Na koncu smo dodali še korak za analizo disociacijske krivulje, ki je potekal najprej 1 minuto pri 95 °C, nato 30 sekund pri talilni temperaturi specifični za vsak začetni oligonukleotid in nazadnje še 30 sekund pri 95 °C.

3.3.4.2 Zaznavanje pomnoženih produktov

Uporabili smo reagent SYBR Green, ki je široko uporabljeno barvilo za qRT-PCR. To barvilo odda 1000 krat večji fluorescentni signal, ko se veže na mali žleb dvovertične DNA, kot takrat, ko je v raztopini (Pfaffl, 2001; Valasek in Repa, 2005). SYBR Green, kot tudi ostala interkalirajoča barvila, ki so v uporabi (YOYO-1, TOTO-1, BEBO), se vežejo neodvisno od nukleotidnega zaporedja in se zato uporabljajo za nespecifično zaznavo produktov (Valasek in Repa, 2005).

Za specifično zaznavo točno določenih sekvenc, se uporabljajo sonde, ki se komplementarno vežejo s tarčnim zaporedjem med oba začetna oligonukleotida. Sonde so sestavljene iz poročevalca (ang. reporter) in dušilca (ang. quencher), ki medsebojno sodelujeta pri oddajanju signala. Ko sta oba dela sonde na začetku po vezavi na tarčno zaporedje skupaj, dušilec absorbira signal poročevalca in tako fluorescentnega signala ni možno zaznati. Med sintezo verige DNA polimeraza s 5' nukleazno aktivnostjo razcepi sonde, ki se med podaljševanjem oddaljujeta druga od druge in ko se dovolj oddaljita, da dušilec ni več zmožen absorbirati signala, lahko poročevalski signal zaznamo in izmerimo z detektorjem (Valasek in Repa, 2005).

Obe metodi sta primerljivo natančni, je pa metoda s sondami bolj specifična, saj izmerimo samo količino produkta sekvenčno specifičnega podvojevanja. Večjo specifičnost pri uporabi interkalirajočih barvil dosežemo z uporabo disociacijske krivulje in določitvijo talilne temperature pomnoženega produkta (Valasek in Repa, 2005), česar smo se poslužili tudi mi.

3.3.4.3 Izbor začetnih oligonukleotidov

Dobro načrtovani začetni oligonukleotidi so zelo pomemben parameter za uspešen PCR v realnem času. Pri načrtovanju moramo upoštevati, da naj bi bila dolžina pomnoženega odseka dolga med 80 in 250 bp, saj se daljši produkti ne podvojujejo tako učinkovito. Sami oligonukleotidni začetniki naj bi bili dolgi med 18 in 24 nukleotidov, specifični za tarčno sekvenco in ne bi smeli vsebovati notranjih sekundarnih struktur. Pomembno je tudi, da ima par začetnih oligonukleotidov podobno temperaturo taljenja, odstopanja so lahko $<5^{\circ}\text{C}$ (Invitrogen, 2008).

Uporabili smo oligonukleotidne začetnike, ki so že bili načrtovani za predhodne raziskave (Bolha in sod., 2013). Specifični začetni oligonukleotidi za tarčne in referenčne gene so bili oblikovani z uporabo programske opreme IDT PrimerQuest ali pa so bili podatki o sekvencah pridobljeni iz literature in nato sintetizirani pri IDT (Integrated DNA Technologies). Specifičnost načrtovanih začetnih oligonukleotidov in pomnožkov je bila preverjena z analizo BLAST (Altschul in sod., 1990).

Preglednica 5: Lastnosti začetnih oligonukleotidov uporabljenih pri qRT-PCR (Bolha in sod., 2013)

Gen ¹	Sekvenca začetnega oligonukleotida ²	Vel. (bp) ³	Referenčna št. ⁴	T _m ⁵	Program ⁶
<i>IL-1β</i> ⁷	F: 5' ATGACCAAACTGCTGCGGAG 3' R: 5' GTCGCTGTCAGCAAAGTCCC 3'	51	NM_204524.1	58	D: 20 s, A: 30 s, E: 30 s.
<i>IL-6</i> ⁷	F: 5' CAGGACGAGATGTGCAAGAAG 3' R: 5' CCCTCACGGTCTTCTCCATA 3'	421	NM_204628.1	56	D: 15 s, A: 20 s, E: 30 s.
<i>IFN-γ</i> ⁷	F: 5' TGATGGCGTGAAGAAGGTG 3' R: 5' GACTGGCTCCTTTCTCTTTG 3'	150	NM_205149.1	55	D: 20 s, A: 30 s, E: 30 s
<i>IL-8</i> ⁷	F: 5' AAGCACAATGGGTCTCCCTGTTC 3' R: 5' AGCTTGCCGTTTCATGGTTAGGAGT 3'	117	AJ009800.1	62	D: 15 s, A: 1 min.
<i>MIP-1β</i> ⁷	F: 5' CCCTCATGCTGGTGTGTGTTTCAT 3' R: 5' CATCCCTGGTGCATCAGTTCAGTT 3'	119	AJ243034.1	62	D: 15 s, A: 1 min.
<i>TGF-β4</i> ⁷	F: 5' TGGCGCTGTACAACCAACACAA 3' R: 5' CACATTCCGGCCACGTAGTAAAT 3'	104	JQ423909.1	62	D: 15 s, A: 1 min.
<i>GAPDH</i> ⁹	F: 5' ATGGCATCCAAGGAGTGAGC 3' R: 5' AACAAAGGGTCCTGCTTCCC 3'	66	NM_204305.1	57	D: 15 s, A: 20 s, E: 20 s.
<i>YWHAZ</i> ⁹	F: 5' TCCACCACGACAGACCA 3' R: 5' CCAGCCTTCCAACCTCC 3'	358	NM_001031343.1	60	D: 15 s, A: 1 min.
<i>RPL4</i> ⁹	F: 5' TTATGCCATCTGTTCTGCC 3' R: 5' GCGATTCTCATCTTACCCT 3'	235	NM_001007479.1	62	D: 15 s, A: 1 min.
<i>HPRT1</i> ⁹	F: 5' ACTGGCTGCTTCTTGTTG 3' R: 5' GGTTGGGTTGTGCTGTT 3'	245	NM_204848.1	60	D: 15 s, A: 1 min.

¹IL - Interleukin; IFN - Interferon; MIP-1β (CCL4) - Makrofagni vnetni protein 1β; TGF-β4 - Transformirajoči rastni faktor β4; GAPDH - Glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaza; YWHAZ - Tirozin 3-monooksigenaza; RPL4 - Ribosomski protein L4; HPRT1 - Hipoksantin gvanin fosforibozil transferaza 1

²F - smiselni oligonukleotidni začetnik (ang. forward primer); R - protismiselni oligonukleotidni začetnik (ang. reverse primer)

³Velikost pomnožka

⁴Referenčna številka za dostopanje do sekvence v podatkovni bazi GenBank

⁵T_m - Talilna temperatura za začetne oligonukleotide [°C]

⁶Uporabljen program pri qRT-PCR. Uporabili smo dvo ali tro stopenjske programe (D -denaturacija pri 95°C; A - naleganje pri T_m; E - podaljševanje pri 72°C)

⁷Tarčni gen.

⁹Referenčni gen

3.3.4.4 Izvedba qRT-PCR

Kvantitativni PCR v realnem času smo izvedli na inštrumentu Viia 7 (Applied Biosystems). Deset mikrolitrsk reakcije so vsebovale 3,5 μ l vode, po 0,25 μ l posameznega oligonukleotidnega začetnika, 5 μ l reagenta SYBR Green (FastStart Universal SYBR Green Master (Rox), Roche, 04913914001) in 1 μ l cDNA. Vzorce smo na optično ploščo formata 384 nanašali v duplikatih, vedno pa smo dodali še 3 kontrole brez cDNA (NTC – ang. no template control), kjer smo namesto 1 μ l cDNA dodali 1 μ l vode. Ploščico smo po nanosu prelepili s folijo in jo centrifugirali 15 minut pri 2.000 rpm, da smo se znebili morebitnih zračnih mehurčkov.

Da bi zagotovili večjo specifičnost in preverili, če je pri reakciji qRT-PCR prišlo do kontaminacije ali nastanka dimerov oligonukleotidnih začetnikov, smo po vsaki analizi uporabili tudi analizo disociacijske krivulje (ang. melting-curve). Na talilno temperaturo nukleinske kisline vpliva dolžina, vsebnost parov GC in prisotnost bazne neusklajenosti. Različne produkte PCR običajno lahko ločimo glede na temperaturo taljenja zato nam uporaba krivulje taljenja olajša delo, saj nam reakcijskih produktov ni potrebno več preverjati z gelsko elektroforezo (Invitrogen, 2008).

Za vsak tarčni in referenčni gen smo naredili standardno krivuljo. Iz 60 μ l celokupne cDNA smo naredili redčitveno vrsto, in sicer smo redčili v razmerju 1:2, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000 in 1:10000. Za izris standardnih krivulj smo uporabili logaritemske vrednosti relativnih koncentracij v redčitveni vrsti, ki smo jih nanegli na abscisno os in pripadajoče Cq vrednosti, ki smo jih nanegli na ordinatno os (Invitrogen, 2008). Vrednost Cq računalniški program izračuna glede na nastavljeno linijo praga (ang. threshold), ki smo jo pri vseh genih nastavili na 0,3, zaradi lažjega primerjanja rezultatov. Z naklonom krivulje smo določili učinkovitost podvojevanja (E - ang. efficiency), ki je 100 % pri naklonu -3,32. Presečišče z y osjo odraža teoretično mejo zaznave. Prileganje krivulje pa nam opišeta koeficient korelacije (r) in koeficient determinacije (R^2), ki predstavljata mero prileganja idealni oz. linearni premici.

3.3.4.5 Obdelava podatkov

Podatke, ki smo jih pridobili s programsko opremo Viia 7 smo obdelali v programu Microsoft Excel.

Za vsak gen, ki smo ga preiskovali, smo opravili začetno analizo Cq vrednosti, ki nam jih je podal program Viia 7 in izločili podatke, kjer je bil standardni odklon prevelik in kjer smo pri disociacijski krivulji opazili odstopanja zaradi kontaminacije našega produkta oz. nastanka dimerov začetnih oligonukleotidov. Nato smo pri vsakem vzorcu izračunali geometrijsko povprečje dveh tehničnih ponovitev, ki smo ga uporabili za izračun ΔCq . Vrednost ΔCq predstavlja razliko med Cq vrednostjo pri vzorčni (npr. poskusna skupina CM) in kontrolni skupini (npr. poskusna skupina CF). Na enak način smo izračunali referenčno ΔCq vrednost, le da smo uporabili geometrijsko povprečje Cq vrednosti vseh referenčnih genov skupaj (GAPDH, YWHAZ, RPL4 in HPRT1) za vsak vzorec posebej ali t.i. endogeno referenco (Pfaffl, 2001).

$$\Delta Cq_{tarčna} = Cq_{kontrola} - Cq_{vzorec} \quad \dots[3]$$

Učinkovitost podvojevanja (E) smo izračunali po spodnji enačbi (Rasmussen, 2001).

$$E = 10^{(-1 \div \text{naklon std.krivulje})} \quad \dots[4]$$

S pomočjo E za tarčne in referenčne gene smo nato izračunali razmerje relativne stopnje izraženosti gena (R – ang. relative expression ratio ali relative fold change ratio) po postopku, ki ga je opisal Pfaffl (2001).

$$R = \frac{(E_{tarč.})^{\Delta Cq_{tarč.}}}{(E_{ref.})^{\Delta Cq_{ref.}}} \quad \dots[5]$$

Izračunane vrednosti relativnih stopenj izraženosti genov, ki smo jih predstavili v odvisnosti od časa smo zaradi boljše preglednosti logaritmirali z osnovo 2, zaradi česar lažje razločimo ali je bilo izražanje gena po okužbi povišano ali znižano glede na kontrolne skupine saj vrednosti nad abscisno osjo pomenijo višje, pod njo pa nižje vrednosti od kontrole.

Statistično primerjavo med vzorci različnih poskusnih in kontrolnih skupin smo naredili s Studentovim t-testom, kjer je bila p-vrednost manjša od 0,05 upoštevana kot statistično značilna.

4 REZULTATI

4.1 STANDARDNE KRIVULJE

Standardne krivulje smo izdelali po postopku, ki je opisan v točki 3.3.4.4. Z uporabo naklona krivulje smo izračunali učinkovitost podvojevanja, ki smo ga uporabili za izračun relativne stopnje izraženosti genov. Z dobljenim koeficientom korelacije smo izvedeli ali naši podatki ustrezajo linearni premici in z determinacijskim koeficientom ugotovili koliko variance smo pojasnili z njo. V preglednici 6 so predstavljeni podatki, ki smo jih pridobili.

Preglednica 6: Značilnosti standardnih krivulj tarčnih in referenčnih genov

Gen	Naklon standardne krivulje	E ²	E [%] ³	(R ²) ⁴	(r) ⁵
<i>IL-1β</i>	- 3.5837	1.90	90	0.9925	- 0.9963
<i>IL-6</i>	- 3.6178	1.89	89	0.9888	- 0.9944
<i>IFN-γ</i>	-3,5569	1,91	91	0,9791	-0,9895
<i>IL-8</i>	- 3.5489	1.91	91	0.9961	- 0.9980
<i>MIP-1β (CCL4)</i>	- 3.1803	2.06	106	0.9905	- 0.9952
<i>TGF-β4</i>	- 3.3263	2.00	100	0.9941	- 0.9970
<i>GAPDH</i>	- 3.5134	1.93	93	0.9978	- 0.9989
<i>YWHAZ</i>	- 3.4830	1.94	94	0.9957	- 0.9978
<i>RPL4</i>	- 3.2546	2.03	103	0.9950	- 0.9975
<i>HPRT1</i>	- 3.3906	1.97	97	0.9891	- 0.9945
Endogena referenca¹	- 3.4395	1.95	95	0.9867	- 0.9933

¹ Endogena referenca predstavlja geometrijsko povprečje izbranih vrednosti referenčnih genov GAPDH, YWHAZ, RPL4 in HPRT1

² Učinkovitost PCR podvojevanja

³ Učinkovitost PCR podvojevanja izražena v %

⁴ Koeficient determinacije

⁵ Pearsonov korelacijski koeficient. Negativen predznak predstavlja orientacijo krivulje

Naklon standardnih krivulj se je gibal med -3,62 in -3,25, kar pomeni, da je bila učinkovitost podvojevanja med 89 in 103 odstotki. Korelacijski koeficienti so povsod znašali več kot 0,979, kar pomeni, da so se naši podatki dobro prilegali. Pri vseh preiskovanih genih in endogeni referenci smo pojasnili več kot 98 odstotkov variance.

4.2 IZRAŽANJE GENOV

Pri vsakem od analiziranih genov smo spremljali njegovo izražanje v primeru okužbe z *M. synoviae*, z APMV-1 ter z obema hkrati, pri čemer smo obravnavali dve možnosti: okužba APMV-1 se je začela 6 ali pa 24 ur po začetku okužbe z *M. synoviae*. Izražanje genov smo opazovali v dveh tipih celic, v CEC-32 in HD11, razen pri *IL-6*, kjer smo podatke pridobili samo za celice CEC-32 in pri *TGF- β 4*, kjer smo jih pridobili samo za HD11, ker nam kljub uporabi različnih oligonukleotidnih začetnikov ni uspelo doseči učinkovitega pomnoževanja. Rezultati, ki so prikazani predstavljajo povprečje 2 poskusov.

Pri vseh genih smo rezultate na koncu logaritmizirali z osnovo 2, zaradi česar lažje vidimo ali je bilo izražanje gena po okužbi povišano ali znižano glede na kontrolne skupine, kjer smo spremljali isti gen v neokuženih celicah. Tako vrednosti nad abscisno osjo pomenijo višje, pod njo pa nižje vrednosti od izražanja istega gena v netretiranem kontrolnem vzorcu. Kontrole na grafih niso predstavljene, so bile pa vse vrednosti relativnih stopenj izraženosti genov posameznih poskusnih skupin izračunane glede na kontrolne, kar pomeni, da so vse vrednosti relativnih stopenj izraženosti genov znotraj kontrolnih skupin vedno znašale 1. Ko to logaritmiziramo z osnovo 2, vrednosti kontrolnih skupin znašajo 0. Za razumevanje te ponazoritve, je na sliki 3 predstavljena primerjava nelogaritmiziranih vrednosti FC (a in b) in logaritmiziranih z osnovo 2 (c in d).

Statistično značilnost smo izračunali glede na netretirano kontrolo pri vseh preučevanih skupinah (p vrednosti $<0,05$ so na slikah označene z *), glede na samostojno okužbo z *M. synoviae* pri zaporednih okužbah z APMV-1 (p vrednosti $<0,05$ so na slikah označene z +) in glede na samostojno okužbo z APMV-1 prav tako pri zaporednih okužbah z APMV-1 (p vrednosti na slikah niso predstavljene, saj so povsod znašale $<0,05$).

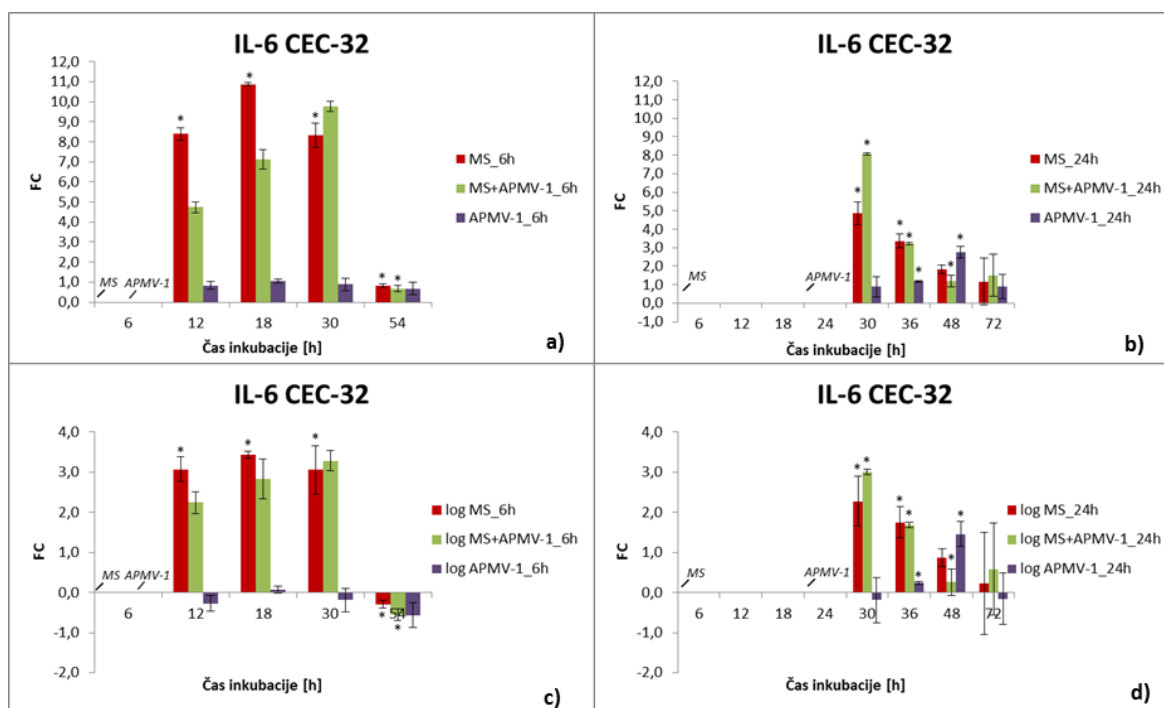
4.2.1 *IL-6*

Na sliki 3c, kjer je predstavljen vpliv zaporedne okužbe celic CEC-32 z *M. synoviae* in APMV-1 po 6ih urah, lahko opazimo naraščanje izražanja *IL-6* po okužbi z *M. synoviae* v prvih 18ih urah, čemur sledi precejšnji padec 30 do 54 ur po okužbi. Izražanje je bilo v vseh časovnih točkah statistično značilno glede na netretirano kontrolo ($p < 0,05$). Pri zaporedni okužbi opazimo trend naraščanja vpliva na gensko izražanje do 30 ur po začetku inkubacije, nato vpliva skoraj ni. V primerjavi s samostojno okužbo z *M. synoviae* je

zaporedna okužba zavrla izražanje v začetni fazi, po 30ih urah povzročila večje izražanje, po 54 urah pa je bil učinek enak. Samostojna okužba z APMV-1 skoraj ni imela vpliva na gensko izražanje, glede na kontrolo ga je povečala manj kot za enkrat.

Pri 24 urnem zamiku (slika 3d) se izražanje *IL-6* pri okužbi z *M. synoviae* zmanjšuje s časom inkubacije. Učinek zaporedne okužbe je po 30ih urah od začetka inkubacije večji kot pri samostojni okužbi z *M. synoviae*, nato pa se izražanje zmanjšuje in med obema okužbama skoraj ni razlik. Gensko izražanje po okužbi z APMV-1 narašča do 48 ur po začetku inkubacije, kjer je glede na kontrolo 2 krat večje ($p < 0,01$), nato izražanje pade.

Zaporedna okužba s 6 urnim zamikom vpliva na naraščanje genskega izražanja s časom do 24 ur po dodatku cepiva, kjer tudi povzroči močnejše izražanje gena *IL-6*, kot samostojna okužba z *M. synoviae*. Pri zaporedni okužbi s 24 urnim zamikom je trend obraten. Izražanje s časom pada in je v začetni fazi večje kot pri samostojni okužbi z *M. synoviae*, po 24ih urah od dodatka cepiva pa je manjše.



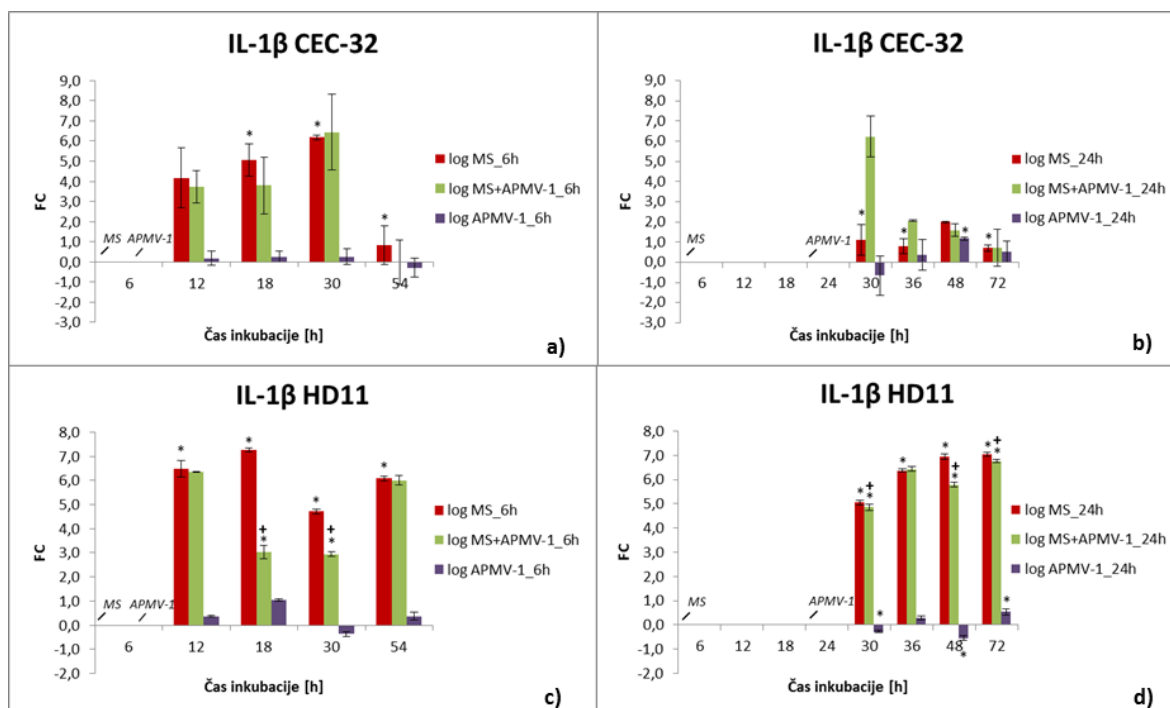
Slika 3: Izražanje gena *IL-6* in primerjava prikaza nelogaritmiranih vrednosti FC in logaritmiranih vrednosti FC na osnovo 2. Nelogaritmirane vrednosti FC za izražanje *IL-6* po 6 (a) in 24 urnem zamiku (b) okužbe z APMV-1 v celicah CEC-32 okuženih z *M. synoviae* in vrednosti FC logaritmirane z osnovo 2 za izražanje *IL-6* po 6 (c) in 24 urnem zamiku (d) okužbe z APMV-1 v celicah HD11 okuženih z *M. synoviae*. Stolpci kažejo povprečne vrednosti in standardno napako iz dveh ločenih poskusov. Statistično značilne vrednosti glede na netretirano kontrolo s $p < 0,05$ so označene z *. Statistično značilne vrednosti glede na samostojno okužbo z *M. synoviae*, kjer so vrednosti $p < 0,05$ so označene s +.

4.2.2 *IL-1 β*

Pri CEC-32 (Slika 4a), vpliva samostojne okužbe z APMV-1 na izražanje gena za *IL-1 β* skoraj ni zaznati. Po samostojni okužbi z *M. synoviae* izražanje *IL-1 β* narašča do 30 ur po začetku inkubacije, kjer je povečano za 6 krat v primerjavi s kontrolo. Učinek zaporedne okužbe sledi gibanju učinka samostojne okužbe z *M. synoviae*, vendar je ta manjši in ni statistično značilen glede na samostojno okužbo z *M. synoviae*. Pri 24 urnem zamiku (Slika 4b) izstopa vpliv zaporedne okužbe pri 30ih urah po začetku inkubacije, kjer je izražanje gena povečano za 6 krat v primerjavi s kontrolo. Ta nato pada in je od 48 ur naprej manjši od vpliva samostojne okužbe z *M. synoviae*, vendar ni statistično značilen.

Pri 6 urnem zamiku okužbe celic HD11 (Slika 4c) je vpliv zaporedne okužbe manjši kot vpliv samostojne okužbe z *M. synoviae*, predvsem med 18. in 30. urami po začetku inkubacije, kjer je ta razlika tudi statistično značilna ($p < 0,001$). Pri 24 urnem zamiku okužbe (Slika 4d) ima zaporedna okužba malo manjši vpliv kot samostojna okužba z *M. synoviae*. Razlika je statistično značilna pri 30, 48 in 72 urah po začetku inkubacije ($p < 0,001$). Samostojna okužba z APMV-1 zavre gensko izražanje, do povečanja pride le na koncu, pri 72ih urah.

Pri celicah HD11 se *IL-1 β* po samostojni okužbi z *M. synoviae* ali po zaporedni okužbi izraža bolj konstantno, kot pri celicah CEC-32. Vpliv zaporedne okužbe pri obeh tipih celic povzroči manjše izražanje *IL-1 β* kot pri samostojni okužbi, izpostavimo lahko le 5 krat večje izražanje pri zaporedni okužbi s 24 urnim zamikom pri celicah CEC-32, v primerjavi s samostojno okužbo z *M. synoviae*, vendar pa razlika med njima ni bila statistično značilna ($p = 0,09$), velika je tudi standardna napaka ($\pm 1,01$).



Slika 4: Izražanje gena *IL-1β* v celicah CEC-32 in HD11 po okužbi z APMV-1 in *M. synoviae*. Izražanje *IL-1β* po 6 (a) in 24 urnem zamiku (b) okužbe z APMV-1 v celicah CEC-32 okuženih z *M. synoviae* in izražanje *IL-1β* po 6 (c) in 24 urnem zamiku (d) okužbe z APMV-1 v celicah HD11 okuženih z *M. synoviae*. Statistično značilne vrednosti glede na netretirano kontrolo s $p < 0,05$ so označene z *. Stolpci kažejo povprečne vrednosti in standardno napako iz dveh ločenih poskusov. Statistično značilne vrednosti glede na samostojno okužbo z *M. synoviae*, kjer so vrednosti $p < 0,05$ so označene s +.

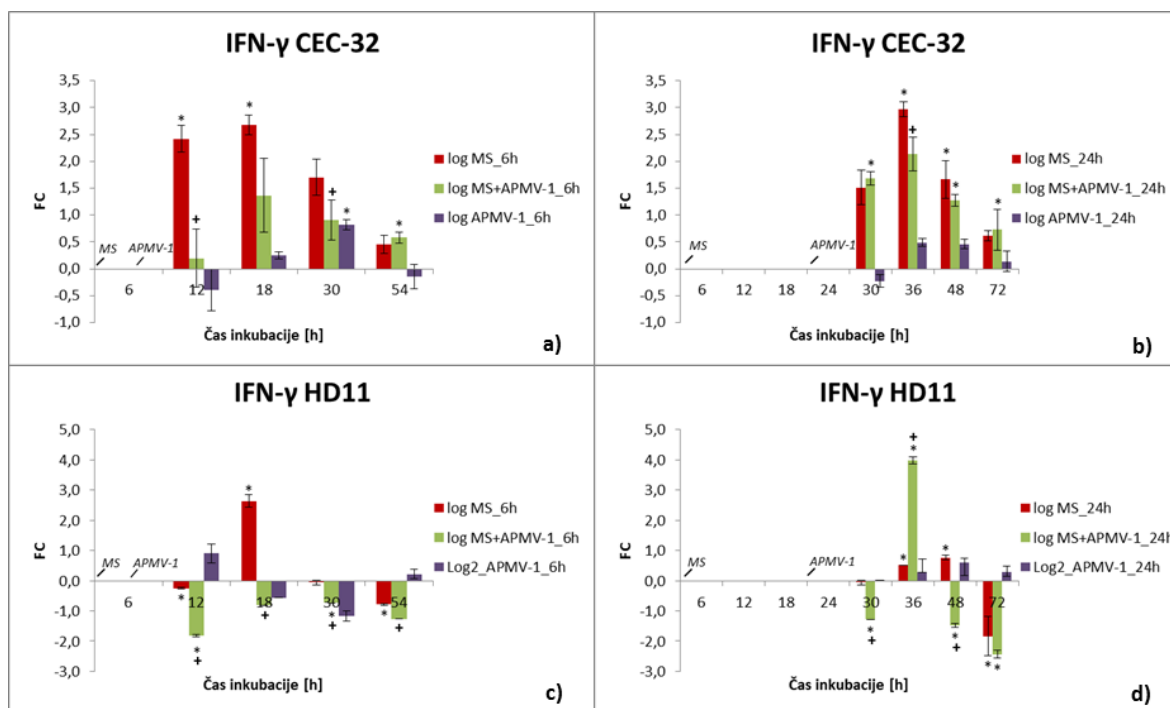
4.2.3 *IFN-γ*

Pri celicah CEC-32 (Slika 5a) se izražanje gena *IFN-γ* po samostojni okužbi z *M. synoviae* poveča med 12 in 18 ur po začetku inkubacije, razvidno je 3 kratno povečanje glede na kontrolo, nato pada in je po 54ih urah povečano le še 0,5 krat glede na kontrolo. Zaporedna okužba nekako sledi trendu izražanja gena po samostojni okužbi z *M. synoviae* in je vseskozi manjše, večje je le pri 54ih urah. APMV-1 na začetku zavre izražanje *INF-γ*, nato ga povečuje do 30 ur po začetku inkubacije, kjer doseže vrh in je izražanje glede na kontrolo povečano za 1 krat, nakar spet pade. Okužba z *M. synoviae* (Slika 5b) najbolj poveča izražanje *IFN-γ* po 36ih urah od začetka inkubacije, kjer je glede na kontrolo izražanje povečano za 3 krat, nato se vpliv s časom trajanja inkubacije zmanjšuje. Kot pri 6 urnem zamiku tudi tu izražanje gena po zaporedni okužbi sledi trendu izražanju po samostojni okužbi z *M. synoviae*. Vpliv je po 30ih urah od začetka inkubacije večji v primerjavi s samostojno okužbo z *M. synoviae*, potem pa zaporedna okužba zavre izražanje. Razlika je statistično značilna po 36ih urah od začetka inkubacije ($p = 0,003$).

APMV-1 na začetku zavre izražanje, potem pa ga poveča, vendar za manj kot 0,5 krat glede na kontrolo.

Okužba celic HD11 z *M. synoviae* (Slika 5c) skoraj nima vpliva, razen 18 ur po začetku inkubacije, kjer je izražanje *IFN-γ* povišano za 2,5 krat glede na kontrolo. Zaporedna okužba s 6 urnim zamikom zavre izražanje *IFN-γ*. Vse razlike so bile statistično značilne, vrednosti *p* so bile za vse manjše od 0,01. APMV-1 v začetku poveča izražanje za 1 krat glede na kontrolo, nato ga zavre, na koncu pa skoraj nima več vpliva. Iz slike 5d lahko razberemo, da ima samostojna okužba z *M. synoviae* malo vpliva na gensko izražanje, vsaj na začetku, ko poveča izražanje *IFN-γ* za manj kot 0,7 krat. Po 72 urah pa je vpliv malo večji, izražanje je nižje za skoraj dvakrat glede na kontrolo. Zaporedna okužba s 24 urnim zamikom na začetku zavre izražanje *IFN-γ*, nato sledi izrazito povečanje, poveča se za 4 krat glede na kontrolo in nato je izražanje spet zvrto, najbolj po 72 urah. Samostojna okužba z APMV-1 ima majhen pozitiven učinek na gensko izražanje, ki je povečano za manj kot enkrat.

Če primerjamo izražanje *INF-γ* v obeh tipih celic, ugotovimo, da zaporedna okužba v celicah CEC-32 spodbudi izražanje, medtem ko ga v celicah HD11 zavre, z izjemo pri 24 urnem zamiku 12 ur po dodatku virusa (36 ur na časovnici), kjer je izražanje za 3,5 krat večje, kot pri samostojni okužbi z *M. synoviae*. Največji pozitiven oz. najmanjši negativen učinek na izražanje *IFN-γ* pri obeh tipih celic in obeh časovnih zamikih zaporedne okužbe, opazimo po 12ih urah od dodatka virusa (18 oz. 36 ur na časovnici).



Slika 5: Izražanje gena *IFN-γ* v celicah CEC-32 in HD11 po okužbi z APMV-1 in *M. synoviae*. Izražanje gena *IFN-γ* po 6 (a) in 24 urnem zamiku (b) okužbe z APMV-1 v celicah CEC-32 okuženih z *M. synoviae* in izražanje *IFN-γ* po 6 (c) in 24 urnem zamiku (d) okužbe z APMV-1 v celicah HD11 okuženih z *M. synoviae*. Statistično značilne vrednosti glede na netretirano kontrolo s $p < 0,05$ so označene z *. Stolpci kažejo povprečne vrednosti in standardno napako iz dveh ločenih poskusov za celice CEC-32 in iz enega poskusa za celice HD11. Statistično značilne vrednosti glede na samostojno okužbo z *M. synoviae*, kjer so vrednosti $p < 0,05$, so označene s +.

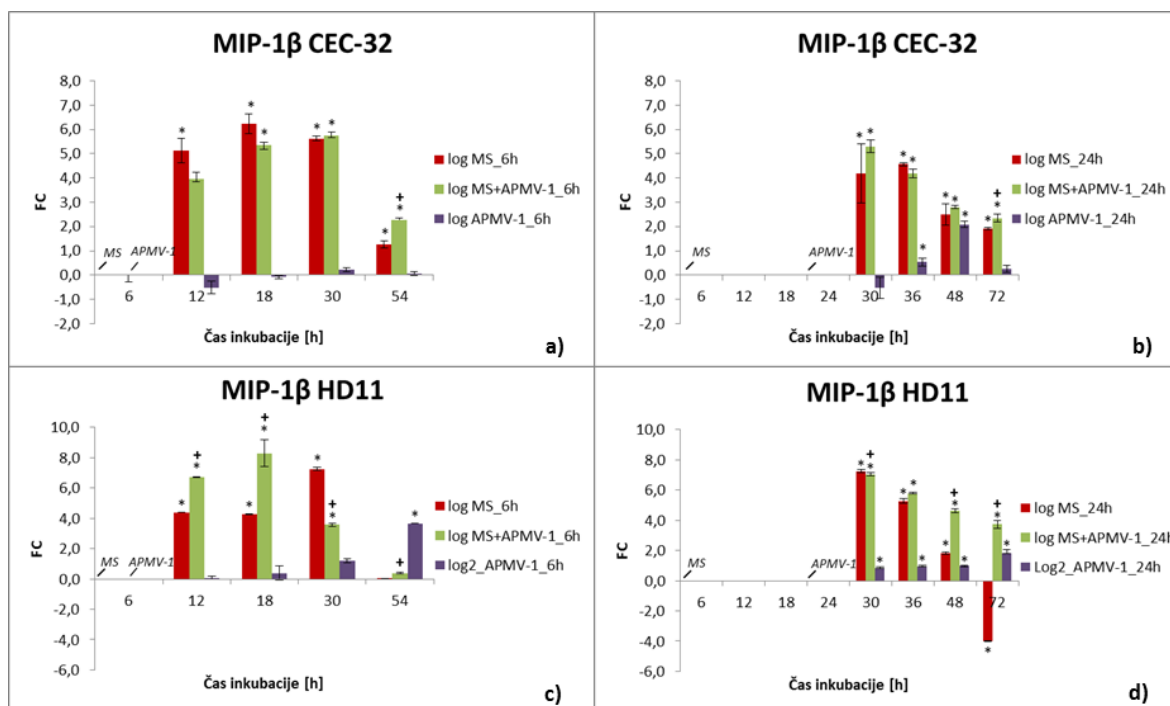
4.2.4 MIP-1β

Pri CEC-32 (Slika 6a) izražanje genov za MIP-1β pod vplivom samostojne okužbe z *M. synoviae* počasi narašča do 18 ur po začetku inkubacije, kjer je povečano za 6 krat, po 54ih urah pa pride do padca in je izražanje povečano le še za enkrat. Pri zaporedni okužbi opazimo podoben trend, le da je vrh pri 30ih urah po začetku okužbe in padec pri 54ih urah ni tako velik, izražanje je v primerjavi s samostojno okužbo z *M. synoviae* tu večje za dvakrat ($p = 0,02$). Okužba z APMV-1 ni imela velikega vpliva na izražanje. Pri sliki 6b, izražanje po okužbi z *M. synoviae* narašča do 36 ur od začetka inkubacije, kjer je glede na kontrolo povečano za 4,5 krat, s časom pa nato pade. Zaporedna okužba s 24 urnim zamikom poveča izražanje. Največje je takoj, 6 ur po dodatku APMV-1 (30 ur na časovnici), kjer je izražanje povečano v primerjavi s kontrolo za 5 krat. Izražanje nato pada in je v zadnjih dveh točkah večje kot pri samostojni okužbi z *M. synoviae*. Razlika je statistično značilna po 72ih urah od začetka inkubacije, kjer je p vrednost znašala $< 0,001$.

APMV-1 ima največji vpliv po 48ih urah od začetka inkubacije, kjer je izražanje glede na kontrolo povečano za 2 krat.

Okužba celic HD11 (Slika 6c) z *M. synoviae* privede v prvih 18ih urah od začetka inkubacije do precej konstantnega genskega izražanja, po 30ih urah naraste in je v primerjavi s kontrolo večje za 7 krat, od takrat naprej nima več vpliva. Zaporedna okužba s 6 urnim zamikom v prvih 18ih urah inkubacije povzroči večje izražanje *MIP-1 β* , kot samostojna okužba z *M. synoviae*, po 30ih urah je za 4 krat manjše in nato po 54ih urah spet malenkost večje. Vse razlike so bile statistično značilne. Okužba z APMV-1 povzroči postopno naraščanje izražanja in ga po 54ih urah poveča celo za 3,5 krat glede na kontrolo. Okužba z *M. synoviae* izražanje najbolj spodbudi 30 ur po začetku inkubacije (Slika 6d), kjer je to v primerjavi s kontrolo povečano za 7 krat, nato pozitiven učinek s časom pada in po 72 urah celo zavre gensko izražanje. Zaporedna okužba s 24 urnim zamikom ima po 30ih urah od začetka inkubacije malo manjši učinek kot samostojna okužba z *M. synoviae* ($p = 0,05$), vpliv se nato znižuje, vendar je povsod večji kot vpliv samostojne okužbe z *M. synoviae*. Razliki sta bili statistično značilni pri 48ih in 72ih urah od začetka inkubacije. Okužba z APMV-1 je konstantno spodbujala gensko izražanje, ki je bilo v primerjavi s kontrolo povečano za približno enkrat, po 72ih urah pa je naraslo in je bilo povečano približno za dvakrat.

Podobnost v izražanju po zaporedni okužbi, lahko opazimo, če primerjamo 24 urni zamik pri obeh tipih celic, kjer je trend enak, padanje izražanja s časom, vendar je pri celicah HD11 gensko izražanje večje. V primerjavi s samostojno okužbo pa je vpliv pri obeh, skupno gledano, večji.



Slika 6: Izražanje gena *MIP-1β* v celicah CEC-32 in HD11 po okužbi z APMV-1 in *M. synoviae*. Izražanje gena *MIP-1β* po 6 (a) in 24 urnem zamiku (b) okužbe z APMV-1 v celicah CEC-32 okuženih z *M. synoviae* in izražanje *MIP-1β* po 6 (c) in 24 urnem zamiku (d) okužbe z APMV-1 v celicah HD11 okuženih z *M. synoviae*. Statistično značilne vrednosti glede na netretirano kontrolo s $p < 0,05$ so označene z *. Stolpci kažejo povprečne vrednosti in standardno napako iz enega poskusa. Statistično značilne vrednosti glede na samostojno okužbo z *M. synoviae*, kjer so vrednosti $p < 0,05$, so označene s +.

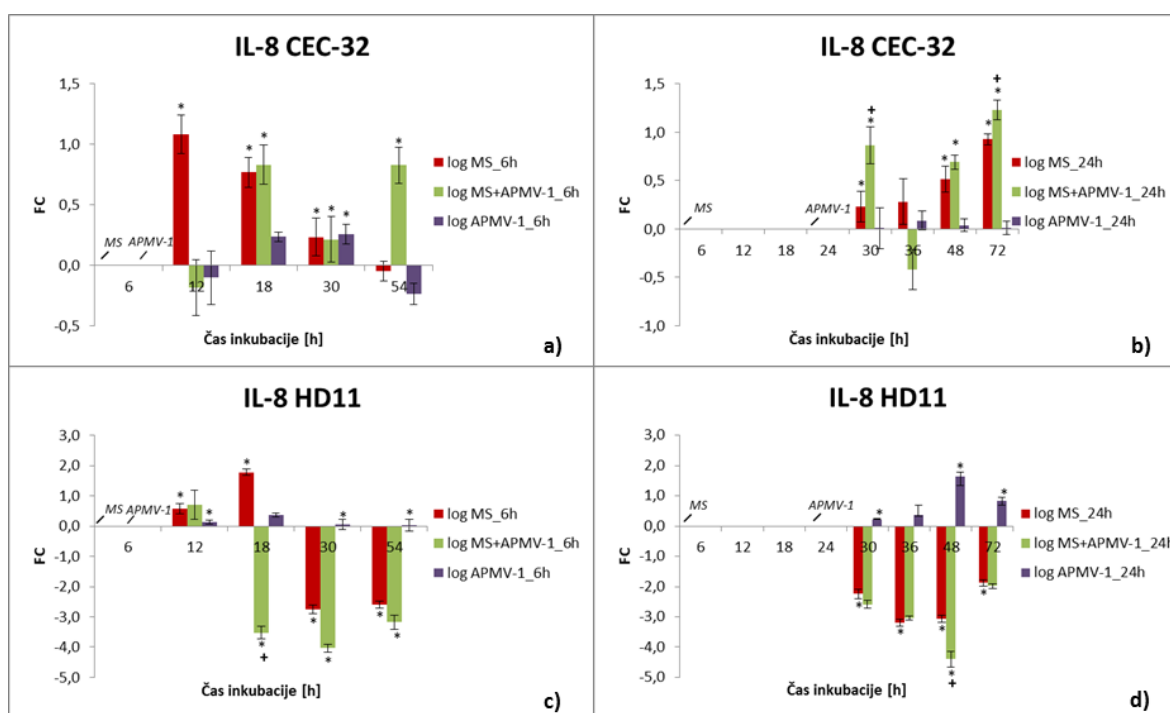
4.2.5 IL-8

Pri okužbi celične linije CEC-32 z *M. synoviae* po 6ih urah (slika 7a) je največji vpliv na izražanje gena *IL-8* opaziti pri 12ih urah (1,1 krat večji), nato se s časom inkubacije zmanjšuje, znižanje izražanja pri 54 urah ni statistično značilno glede na kontrolo ($p = 0,9$). Okužba z APMV-1 na začetku in koncu povzroči zmanjšanje izražanja, medtem ko v vmesni fazi, pri 12ih in 54ih urah vpliva pozitivno. Sočasna okužba po 12 urah skupne inkubacije vpliva na zmanjšanje izražanja, ki pa ni statistično značilno glede na kontrolo ($p = 0,5$). Največji vpliv je po 18ih in 54ih urah (1,8 kratno povečanje), kjer je vpliv večji kot pri samostojni okužbi z *M. synoviae*. Pri vmesnem padcu po 30 urah razlik v primerjavi s samostojno okužbo z *M. synoviae* in APMV-1 skoraj ni. Na sliki 6b po okužbi z *M. synoviae* opazimo naraščanje izražanja s časom inkubacije, ki ga pri 72ih urah poveča za skoraj enkrat v primerjavi s kontrolo. Vpliv zaporedne okužbe pri 24 urnem zamiku povzroči večje izražanje kot pri samostojni okužbi z *M. synoviae* in je največje pri 72ih urah (vrednost p glede na samostojno okužbo je znašala 0,03). Izjema je zavrto izražanje po 36ih urah od začetka inkubacije, ki pa ni statistično značilno glede na kontrolo. Prav

tako ni značilna razlika s samostojno okužbo z *M. synoviae* ($p = 0,5$). Velika je tudi standardna napaka ($\pm 0,21$). Okužba z APMV-1 nima vpliva na izražanje.

Pri HD11 (Slika 7, a in b) opazimo, da ima samostojna okužba z APMV-1 edina pozitiven učinek na izražanje *IL-8* za razliko od samostojne okužbe z *M. synoviae* in zaporedne okužbe po 6ih in 24ih urah, ki to izražanje zavirata. Izjema je le pozitiven učinek samostojne okužbe z *M. synoviae* po 12ih in 18ih urah inkubacije ter pozitiven učinek zaporedne okužbe s 6 urnim zamikom po skupno 12ih urah ki je tudi večji od vpliva samostojne okužbe z *M. synoviae* ($p = 0,06$), kar je prikazano na sliki 7c. Pri 18ih urah (Slika 7c) je zaviralen učinek zaporedne okužbe z APMV-1 s 6 urnim zamikom po 6ih urah statistično značilen tako glede na kontrolo ($p < 0,001$), kot glede na samostojno okužbo z *M. synoviae* ($p < 0,001$). Taka okužba največji učinek razvije po 30ih urah, oz. 24 ur po dodatku APMV-1, ko je izražanje zmanjšano za 4 krat). Tudi pri 24 urnem zamiku okužbe z APMV-1 (Slika 7d) je največji vpliv zaznati 24 ur po dodatku, izražanje je zmanjšano za 4 krat v primerjavi s kontrolo. Ta je statistično značilen glede na netretirano kontrolo ($p < 0,01$) in glede na samostojno okužbo z *M. synoviae* ($p < 0,01$). Zaporedna okužba s 6 ali 24 ur zamika, zmanjša izražanje *IL-8* in ima bolj negativen učinek kot samostojna okužba z *M. synoviae*.

Zaporedna okužba z APMV-1 celic CEC-32 okuženih z *M. synoviae* povzroči pozitivno izražanje *IL-8*, medtem ko ga pri celicah HD11 zavre. Učinek zaporedne okužbe na izražanje, pozitiven ali negativen, je pri obeh tipih celic večji ali enak kot učinek samostojne okužbe z *M. synoviae*, razen ko izražanje po zaporeni okužbi ni statistično značilno glede na kontrolo. Samostojna okužba z APMV-1 stimulira izražanje gena za *IL-8* v celicah HD11.



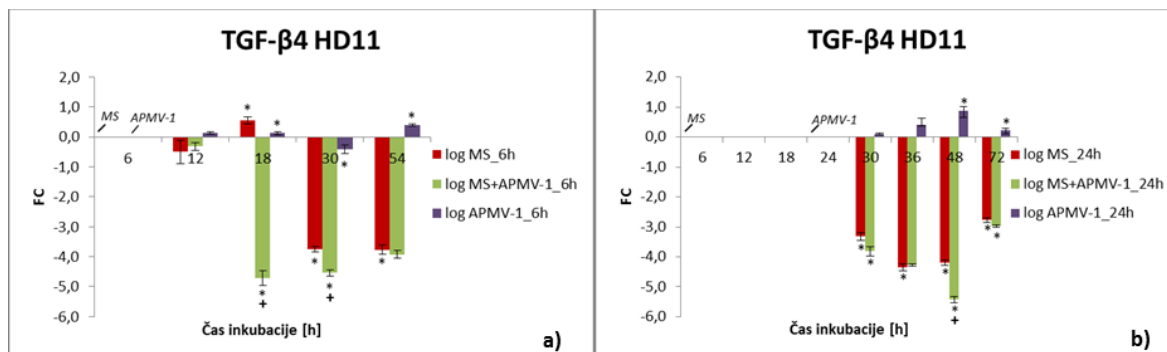
Slika 7: Izražanje gena *IL-8* v celicah CEC-32 in HD11 po okužbi z APMV-1 in *M. synoviae*. Izražanje gena *IL-8* po 6 (a) in 24 urnem zamiku (b) okužbe z APMV-1 v celicah CEC-32 okuženih z *M. synoviae* in izražanje *IL-8* po 6 (c) in 24 urnem zamiku (d) okužbe z APMV-1 v celicah HD11 okuženih z *M. synoviae*. Statistično značilne vrednosti glede na netretirano kontrolo s $p < 0,05$ so označene s *. Stolpci kažejo povprečne vrednosti in standardno napako iz dveh ločenih poskusov za celice HD11 in iz enega poskusa za celice CEC-32. Statistično značilne vrednosti glede na samostojno okužbo z *M. synoviae*, kjer so vrednosti $p < 0,05$ so označene s +.

4.2.6 *TGF- β 4*

Pri celicah HD11 (Slika 8a) okužba z *M. synoviae* zavre gensko izražanje, z izjemo 0,5 kratnega povišanja po 18ih urah inkubacije. Zaporedna okužba s 6 urnim zamikom izražanje zavre v še večji meri kot samostojna okužba z *M. synoviae*. Ta učinek je največji po 18ih urah od začetka inkubacije, kjer je izražanje zmanjšano za približno petkrat v primerjavi s kontrolo in štirikrat v primerjavi s samostojno okužbo z *M. synoviae* ($p < 0,001$). APMV-1 ima zelo majhen vpliv na izražanje, največji vpliv je v končni fazi, ko ga pri 30ih urah zmanjša za 0,4 krat, pri 72ih urah pa poveča za enako vrednost. Pri preučevanju vpliva zaporedne okužbe s 24 urnim zamikom (Slika 8b) povečanje izražanja povzroči samo samostojna okužba z APMV-1, z vrhom pri 48ih urah, medtem ko ga ostali dve okužbi zmanjšata. Okužba z *M. synoviae* povzroči največje zmanjšanje izražanja po 36ih urah inkubacije, kjer je izražanje v primerjavi s kontrolo manjše za 4 krat, nato se učinek s časom zmanjšuje. Zaporedna okužba s 24 urnim zamikom najmanjše izražanje povzroči po 48ih urah od začetka inkubacije, kjer je izražanje 5,5 krat manjše kot pri

kontroli. Izražanje je v primerjavi s samostojno okužbo v tej točki tudi statistično značilno ($p < 0,001$). Vpliv zaporedne okužbe je bil v primerjavi s samostojno okužbo povsod večji.

Zaporedna okužba z APMV-1 celic HD11 okuženih z *M. synoviae* povzroči zmanjšanje izražanja *TGF-β4* glede na kontrolo. Njen učinek je večji kot pri samostojni okužbi. Samostojna okužba z APMV-1 stimulatивно vpliva na gensko izražanje *TGF-β4*.



Slika 8: Izražanje gena *TGF-β4* v celicah CEC-32 in HD11 po okužbi z APMV-1 in *M. synoviae*. Izražanje gena *TGF-β4* po 6 (a) in 24 urnem zamiku (b) okužbe z APMV-1 v celicah CEC-32 okuženih z *M. synoviae* in izražanje *TGF-β4* po 6 (c) in 24 urnem zamiku (d) okužbe z APMV-1 v celicah HD11 okuženih z *M. synoviae*. Statistično značilne vrednosti glede na netretirano kontrolo s $p < 0,05$ so označene z *. Stolpci kažejo povprečne vrednosti in standardno napako iz dveh ločenih poskusov. Statistično značilne vrednosti glede na samostojno okužbo z *M. synoviae*, kjer so vrednosti $p < 0,05$ so označene s +.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Intenzivna reja perutnine, zaradi sočasne prisotnosti različnih virusov, mikoplazem in drugih bakterij, imunosupresivnih dejavnikov ter neugodnih okoljskih razmer, ustvarja pogoje za nastanek zapletenih interakcij med mikrobnimi in gostiteljevimi celicami. Sočasne okužbe so v takih pogojih veliko bolj običajne kot enostavne okužbe, kjer nastopa samo posamezen patogeni mikroorganizem (Kleven, 2008c). Zagotavljanje dobre biološke varnosti na obratih pogosto ni dovolj za preprečevanje širjenja različnih okužb, zato je potrebno uvajati ostrejšše preventivne ukrepe, kjer je pomembno cepljenje. S tem pa lahko ustvarimo situacijo, ko je v živalih že prisoten nek patogen mikroorganizem, z vakcinacijo pa žival izpostavimo še drugemu patogenu, čeprav je le ta inaktiviran. Posledica je lahko spremenjen potek bolezni, ki jo povzroča mikroorganizem pa tudi spremenjen potek mehanizmov imunskega odziva, ki jih induciramo s cepivom (Saif, 2008).

V skupino ptičjih patogenih mikroorganizmov, ki so lahko sočasno prisotni pri kokoših, spadata tudi *Mycoplasma synoviae* in ptičji paramiksovirus tipa 1 (APMV-1). Ker se *M. synoviae* prenaša tudi vertikalno preko valilnih jajc (Kleven, 2008a), je možno, da so z njo okuženi že piščanci, ki jih preventivno cepimo proti atipični kokošji kugi. Sinergistični učinki in pojav resnejših kliničnih znakov so že bili dokazani (Kleven in sod., 1972; King in sod., 1973; Vardaman in sod., 1973; Springer in sod., 1974; Villegas in sod., 1976; Hopkins in Yoder, 1982), ni pa veliko znanega, kako v takih primerih poteka imunski odziv. Pri proučevanju tako kompleksnih mehanizmov se ponavadi vsaj v prvih korakih poslužujemo primarnih ali trajnih celičnih kultur, ki izvirajo iz proučevane živalske vrste.

APMV-1 pri perutnini povzroča atipično kokošjo kugo, ki je že vrsto let pereč problem rejcev, saj povzroča veliko ekonomsko škodo zaradi visoke smrtnosti, manjšega prirasta, slabše konverzije krme, slabše nesnosti in slabše valilnosti (Alexander, 2009; Gallili in Ben-Nathan, 1998). Klinični znaki okuženih živalih so zelo različni in so odvisni od virulentnosti seva, na podlagi česar jih delimo na zelo virulentne velogene seve, manj virulentne mezogene in najmanj virulentne lentogene seve, ki se ponavadi uporabljajo za izdelavo cepiv (de Leeuw in sod., 2005).

Tudi gensko izražanje imunskih celic je zelo odvisno od virulentnosti seva in seveda, od proučevanega tipa celic. Ugotovljeno je bilo, da velogeni sev APMV-1 CA02 po 6ih urah inkubacije v levkocitih vranice močno poveča izražanje genov za IFN- α , IFN- γ , IL-6 in IL-1 β , medtem ko pri lentogenemu sevu LaSota ni bilo opaženega odziva (Kapczynski in sod., 2013). Munir in sod. (2005) so poročali, da velogeni nevrotropni sev Texas GB v kokošjih embrionalnih fibroblastih zavre interferonski odziv v začetnih fazah okužbe. Pri zarodkih pa je lentogeni sev APMV-1 LaSota značilno povišal izražanje genov za IFN- γ , IL-6 in IL-16 v vranici ter genov za IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-16, IL-21, XCL1 in MIP-1 β v timusu (Bolha in sod., 2013).

V *in vivo* poskusu, kjer so SPF kokoši (specific pathogene free) okužili z viscetropnim velogenim sevom APMV-1 CA02, se je pri izolaciji iz vranice pokazalo povišano izražanje genov *IL-6*, *MIP-3 α* in prekursorja *IFN- γ* po 24ih urah od okužbe. Drugi dan se je izražanje teh genov še povečalo, povečalo pa se je tudi izražanje iNOS in genov za vnetne citokine IL- β , IL-18, IL-8 in IFN- γ . V istem poskusu so primerjali tudi *in vitro* izražanje genov po okužbi s sevom CA02 in LaSota. Pri okužbi z LaSoto je bilo izražanje IFN- α , IFN- γ , IL-1 β in IL-6 v primerjavi s sevom CA02 manjše tudi za 30 krat (Kapczynski in sod., 2013).

Mikoplazme so prokariontski mikroorganizmi, ki jih taksonomsko, zaradi odsotnosti celične stene, uvrščamo v razred Mollicutes (Razin in sod., 1998). Pri pticah najdemo nekaj več kot 20 različnih vrst mikoplazem, od tega 12 vrst pri kokoših in purah. Le 4 od njih pa povzročajo večjo ekonomsko škodo v intenzivni reji zaradi slabšega prirasta in nesnosti živali (Kleven, 2008a). *M. synoviae* je ena izmed najbolj patogenih predstavnic svojega rodu in pri perutnini najpogosteje povzroča okužbe zgornjih dihal. Okužba se lahko razvije tudi v kužni sinovitis, ki se kaže predvsem z vnetjem sklepov ali pa z vnetjem zračnih vrečk. Do slednjega najpogosteje pride po cepljenju živali proti kužnemu bronhitisu ali atipični kokošji kugi (Buim in sod., 2011; Kleven in sod., 1972).

Ugotovljeno je bilo, da *M. synoviae* vpliva na izražanje številnih imunskih genov. V kokošjih makrofagih *M. synoviae* povzroči povišano izražanje *IL-6* in *IL-1 β* (Lavrič in sod., 2007, 2008). Pri okuženih embrijih pa so poročali o povišanju IFN- γ , IL-1 β , IL-6,

IL-12p40, *IL-16*, *IL-18*, *MIP-1 β* , *iNOS*, *XCL1* in *LITAF* v jetrih, vranici, bursi in timusu (Bolha in sod., 2013).

Na podlagi dosedanjih raziskav (Bolha in sod., 2013; Lavrič in sod., 2007) smo se odločili, da bomo podrobneje pogledali izražanje genov za *IL-1 β* , *IL-6*, *IFN- γ* , *MIP-1 β* , *IL-8* in *TGF- β 4* v celicah CEC-32 in HD11 po samostojni okužbi z *M. synoviae* in APMV-1 ter ga primerjali z učinkom zaporedne okužbe celic z *M. synoviae* in APMV-1 po 6ih ali 24ih urah. Uporabili smo tipski sev bakterije *M. synoviae* WVU 1853 in lentogeni sev APMV-1 La Sota, ki se pogosto uporablja za cepljenje perutnine. Učinek na izražanje genov smo preverili s kvantitativnim PCR v realnem času.

Ker se *M. synoviae* prenaša preko valilnih jajc in tako okužuje že embrije (Kleven, 2008a), smo v raziskavi uporabili celično linijo kokošjih embrionalnih fibroblastov (CEC-32), ki so za raziskavo odziva na okužbo z *M. synoviae* primerne tudi zato, ker med drugim gradijo tudi tkiva, ki jih prizadane ta bakterija. V predhodnih študijah je bila na tej celični liniji že dokazana invazivnost *M. synoviae* (Dušanić in sod., 2009).

Predpostavljali smo, da bo prisotnost APMV-1 pri že okuženih celicah z *M. synoviae* spremenila vnetni odziv na primarno okužbo, zato smo gensko izražanje izbranih imunskih genov preverili tudi pri makrofagom podobni celični liniji HD11. Makrofagi predstavljajo prvo linijo obrambe proti patogenim dejavnikom tako v respiratornem traktu (Reese in sod., 2006), preko katerega se horizontalno prenašajo okužbe z *M. synoviae* (Kleven in Ferguson-Noel, 2008), kot tudi v ostalih tkivih (Qureshi, 1998). Igrajo ključno vlogo pri homeostazi tkiva, specifični in nespecifični imunosti in pri vnetnih procesih. Nahajajo se povsod v telesu vretenčarjev in nevretenčarjev, kjer s specifičnimi receptorji zaznavajo tako apoptotične fagocitirane in odmrle celice, kot tuje snovi in mikroorganizme, na katere odgovarjajo z izločanjem signalnih in efektorskih molekul (Kaspers in sod., 2008).

Po pričakovanjih je okužba z *M. synoviae* povečala izražanje genov za vnetne citokine *IL-6* in *IL-1 β* . Izražanje je bilo v celicah CEC-32 povečano do 30 ur po začetku inkubacije, nakar se je ustavilo. To sovпада z dejstvom, da sta oba citokina aktivatorja akutne faze in se v največji meri izločata takoj po okužbi (Gibson in sod., 2014; Jones, 2005). Zaporedna okužba z APMV-1 s 6 urnim zamikom je v primerjavi s samostojno okužbo z *M. synoviae*

zavrta izražanje *IL-6* in *IL-1 β* v prvih 12ih urah po dodatku virusa, po 24ih pa povečala. Trend je bil drugačen pri 24 urnem zamiku. Izražanje genov po zaporedni okužbi je bilo v prvih 12ih urah po dodatku virusa večje kot pri samostojni okužbi z *M. synoviae*, nato pa je bilo manjše. Izražanje *IL-1 β* , ki ga izločajo predvsem makrofagi (Wigley in Kaiser, 2003), je bilo v celicah HD11 precej večje in bolj konstantno, kot pri CEC-32. Sinergističen učinek mikoplazme in APMV-1 je pri 6 urnem zamiku po 12ih in 24ih urah od dodatka cepiva značilno zmanjšal izražanje *IL-1 β* v primerjavi s samostojno okužbo z *M. synoviae*. Pri 24 urnem zamiku je zaporedna okužba prav tako zavrta imunski odziv na okužbo z *M. synoviae*.

IFN- γ sodeluje pri Th1 odzivu in primarno vpliva na aktivacijo makrofagov, kar pospeši predstavljanje antigenov v molekulah poglobitvenega histokompatibilnostnega kompleksa tipa II (MHC II). Njegovo delovanje je torej usmerjeno proti virusom (Wigley in Kaiser, 2003). Velja načelo, da večja kot je prisotnost IFN- γ v celicah HD11, večje bo sinteza dušikovega oksida, ki deluje močno protimikrobno (Wigley in Kaiser, 2003; Kaspers in sod., 2008). V naši raziskavi je sinergistični učinek *M. synoviae* in APMV-1 značilno zavrta izražanje gena *IFN- γ* , v celicah HD11 še bolj kot v CEC-32, kar pomeni, da je bila verjetno zavrta tudi sinteza NO, zmanjšano je bilo verjetno tudi predstavljanje virusnih antigenov v makrofagih z MHC II, kar bi v živali posredno povzročilo zmanjšan protitelesni odziv na APMV-1 in zmanjšano zaščito pred že prisotno okužbo z *M. synoviae* in ostalimi patogenimi mikroorganizmi, ki bi še lahko bili prisotni v organizmu. Najpomembnejši učinek pa bi lahko bil zmanjšan odziv spominskih celic B, kar želimo doseči s cepljenjem.

IL-8 in MIP-1 β sta kemotaktična citokina, ki prav tako sodelujeta pri vnetnem odzivu. IL-8 je glavni aktivator nevtrofilcev, ki so bistveni za akutno fazo vnetja (Baggiolini in Clark-Lewis, 1992). MIP-1 β izločajo tako aktivirani makrofagi kot fibroblasti, deluje kot kemoatraktant za celice T in stimulira nastanek monocitov ter granulocitov (Sick in sod., 2000). Sinergistični učinek *M. synoviae* in dodanega cepiva je v celicah CEC-32 na genski ravni povečal vnetni odziv s strani IL-8 v primerjavi s samostojno okužbo z *M. synoviae*. V makrofagom podobni celični liniji pa je zaporedna okužba povzročila še večji padec v izražanju gena kot pri samostojni okužbi z *M. synoviae*. Zanimiv je bil šibek in zakasnel učinek APMV-1, ki je povišal izražanje gena za IL-8. Podobno so opazili tudi Munir in

sod. (2005), ki so tak učinek pripisali inhibiciji proteina V velogenega nevrotropnega seva APMV-1 Texas GB s strani zmanjšane interferonske aktivnosti. Zaporedna okužba s 24 urnim zamikom je pri obeh tipih celic povzročila enak trend pri izražanju *MIP-1 β* . Stimulativen učinek je s časom padal in je bil večji, kot pri samostojni okužbi z *M. synoviae*. 6 urni zamik okužbe z APMV-1 je v različnih celicah povzročil različno izražanje. Pri CEC-32 je bilo izražanje gena v prvih 12ih urah po dodatku cepiva zavrto v primerjavi s samostojno okužbo z *M. synoviae*, v naslednjih 36ih urah pa je bil učinek večji. Obratno se je izkazalo pri celicah HD11, kjer so bile vse razlike v primerjavi s samostojno okužbo statistično značilne.

TGF- β 4, ki ima pri kokoših protivneten učinek (Swaggerty in sod., 2004), v celicah HD11 očitno ne regulira vnetnega odziva pri okužbi z *M. synoviae*, saj je bilo izražanje gena v tem primeru zavrto. Zaporedna okužba z APMV-1 je ta učinek še povečala. Če bi bil protivnetni odziv po okužbi reguliran s strani TGF- β 4, bi bilo njegovo izražanje pri povečanem izražanju vnetnih citokinov tudi povišano in ne zavrto, kot v našem primeru. Izražanje TGF- β 4 pa je bilo povečano po samostojni okužbi z APMV-1, kar je verjetno posledica hemaglutinin nevraminidaznega proteina. Nevraminidaza virusa gripe ima sposobnost direktne aktivacije latentnega TGF- β , ki vodi v sistemsko povečanje aktivne oblike TGF- β (Fitzpatrick in Bielefeldt-Ohmann, 1999). Sekvenca in struktura proteina HN APMV-1 in nevraminidaze virusa gripe sta si v mnogih točkah enaki (Colman in sod., 1993). TGF- β med drugim zagotavlja tudi kemotaktičen gradient za levkocite in ostale celice, ki sodelujejo pri vnetnih procesih (Letterio in Roberts, 1998), kar bi lahko povzročilo tudi povečanje izražanja genov *IL-8* in *MIP-1 β* pri okužbi celic HD11 z APMV-1.

Če povzamemo, dodatek APMV-1 na že prisotno okužbo z *M. synoviae*, je v fibroblastnih in makrofagom podobnih celicah spremenil izražanje imunskih genov, vpletenih v vnetni odziv. V primerjavi s samostojno okužbo je zaporedna okužba v celicah CEC-32 vidnejše zavrta izražanje genov vnetnih citokinov *IL-1 β* in *IL-6* pri 6 urnem zamiku ter *IFN- γ* . Spodbudila pa je izražanje genov *MIP-1 β* , *IL-8* in *IL-1 β* pri 24 urnem zamiku. V celicah HD11 je bilo po zaporedni okužbi zavrto izražanje *IL-1 β* , *IFN- γ* , *IL-8*, in *TGF- β 4*. Izzritejšje povišanje izražanja je bilo opaziti le pri genu *MIP-1 β* .

Imunosupresija vnetnih citokinov, ki se izražajo pri samostojni okužbi z *M. synoviae*, bi po cepljenju proti APMV-1 lahko vodila v napredovanje okužbe z *M. synoviae* in razvoj hujših kliničnih znakov kot sicer. Prav to je verjetno razlog za opaženo pogostejše pojavljanje vnetja zračnih vrečk (Kleven in sod., 1972). Zaradi zmanjšanega izražanja vnetnih citokinov so živali bolj dovzetne tudi za sekundarne okužbe. Pogosto v takih primerih prihaja do respiratorne kolibaciloze, ki naj bi bila najpogostejša respiratorna bolezen komercialno rejene perutnine (Kleven, 2008c). Po drugi strani bi lahko povečan vnetni odziv s strani vnetnih citokinov, ki so bili povišani pri kasnejšem impliciranju cepiva, zaradi delovanja imunskega sistema povzročil prekomerno uničevanje tkivnih celic in propad tkiva (Roitt in sod., 2001).

Zaradi pomembnosti obeh patogenih organizmov in ogromne ekonomske škode, ki jo povzročata v intenzivni reji perutnine bi bilo koristno učinek cepljenja proti atipični kokošji kugi pri živalih, okuženih z *M. synoviae*, na izražanje imunskih genov preveriti tudi *in vivo*. Trajne celične linije nam lahko pomagajo razumeti procese v organizmu, ne morejo pa nam podati popolne slike o dogajanju znotraj živega bitja.

5.2 SKLEPI

- Samostojna okužba z *M. synoviae* poveča izražanje genov za vnetne citokine IL-1 β in IL-6 do 30 ur po začetku inkubacije.
- Samostojna okužba z APMV-1 poveča izražanje genov IL-8 in TGF- β 4 v celicah HD11.
- Dodatek APMV-1 na že prisotno okužbo z *M. synoviae* v celicah CEC-32 in HD11 spremeni izražanje imunskih genov vpletenih v vnetni odziv.
- Na že prisotno okužbo z *M. synoviae* ima dodatek APMV-1 po 6ih urah drugačen vpliv na izražanje imunskih genov kot po 24ih urah.
- Pri celicah CEC-32, okuženih z *M. synoviae*, dodatek APMV-1 po 6ih urah zavre izražanje IL-1 β , IL-6 in IFN- γ .
- Pri celicah CEC-32, okuženih z *M. synoviae*, dodatek APMV-1 po 24ih urah spodbudi izražanje IL-1 β , IL-8 in MIP-1 β .
- Pri celicah HD11, okuženih z *M. synoviae*, dodatek APMV-1 zavre izražanje IL-1 β , IL-8, IFN- γ in TGF- β 4.
- Pri celicah HD11, okuženih z *M. synoviae*, dodatek APMV-1 spodbudi izražanje gena MIP-1 β .
- TGF- β 4 v celicah HD11 očitno ne regulira vnetnega odziva pri okužbi z *M. synoviae* ali pri zaporedni okužbi z APMV-1.
- Iz naših rezultatov lahko sklepamo, da dodatek APMV-1 na že prisotno okužbo z *M. synoviae* povzroči imunosupresijo vnetnih citokinov, kar bi lahko vodilo v napredovanje bolezni, ki jo povzroča *M. synoviae* in večjo dovzetnost za sekundarne okužbe.
- Predhodna okužba z *M. synoviae* bi zaradi zavrtega izražanja IFN- γ lahko vplivala na izid cepljenja proti atipični kokošji kugi z večjim razmnoževanjem virusa in izrazitejšimi kliničnimi znaki po cepljenju.

6 POVZETEK

Mikoplazme so najmanjši znanani organizmi, ki so še zmožni samostojne rasti in podvojevanja. V naravi so zelo razširjene in kot obvezni paraziti naseljujejo ljudi in druge sesalce, plazilce, ribe, členonožce ter rastline. Pri pticah najdemo nekaj več kot 20 različnih vrst mikoplazem, od tega 12 vrst pri kokoših in purah. Le 4 od njih pa povzročajo večjo ekonomsko škodo v intenzivni reji zaradi slabšega prirasta in nesnosti.

Mycoplasma synoviae je ena izmed najbolj patogenih predstavnic svojega rodu in pri perutnini najpogosteje povzroča okužbe zgornjih dihal. Okužba se lahko razvije tudi v kužni sinovitis, ki se kaže predvsem z vnetjem sklepov ali pa z vnetjem zračnih vrečk. Do slednjega najpogosteje pride po cepljenju živali proti kužnemu bronhitisu ali atipični kokošji kugi.

Atipična kokošja kuga, ki jo povzroča ptičji paramiksovirus tipa 1 (APMV-1), je že vrsto let vzrok za ogromno ekonomsko škodo po vsem svetu. Klinični znaki okuženih živalih so zelo različni in so odvisni od virulentnosti seva. Pogosta so predvsem različno huda obolenja dihal, redkeje pa prihaja do krvavitev črevesja ali okvar živčevja. Ker lahko atipična kokošja kuga pri kokoših povzroči celo do 100 % pogin, je nujno, da rejci skrbijo za dobro biološko varnost na svojih farmah. Za preprečevanje širjenja bolezni pa je nujno tudi cepljenje.

Ker se *M. synoviae* prenaša tudi vertikalno preko valilnih jajc, je možno, da so z njo okuženi že piščanci, ki jih preventivno cepimo proti atipični kokošji kugi. Sinergistični učinki na pojav resnejših kliničnih znakov so že bili dokazani, ni pa veliko znanega, kako v takih primerih poteka imunski odziv.

Namen naloge je bil preveriti ali prisotnost APMV-1 spremeni potek imunskega odziva na prej prisotno okužbo z *M. synoviae* predvsem v smislu nastanka hujših vnetnih reakcij ter napredovanja bolezni, ki jih povzroča *M. synoviae*. V raziskavi smo uporabili tipski sev bakterije *M. synoviae* WVU 1853 in lentogeni sev APMV-1 La Sota, ki se pogosto uporablja za cepljenje perutnine. Njun učinek na izražanje genov v celicah CEC-32 in HD11 smo preverili s kvantitativnim PCR v realnem času.

Ugotovili smo, da dodatek APMV-1 na že prisotno okužbo z *M. synoviae*, v fibroblastnih in makrofagom podobnih celicah vpliva na izražanje imunskih genov, vpletenih v vnetni odziv. V primerjavi s samostojno okužbo je zaporedna okužba v celicah CEC-32 vidnejše zavrta izražanje gena *IFN-γ* ter genov za vnetne citokine IL-1β in IL-6 pri 6 urnem zamiku. Spodbudila pa je izražanje genov *MIP-1β*, *IL-8* in *IL-1β* pri 24 urnem zamiku. V celicah HD11 je bilo po zaporedni okužbi zavrto izražanje *IL-1β*, *IFN-γ*, *IL-8*, in *TGF-β4*. Izzritejšje povišanje izražanja je bilo opaziti le pri genu *MIP-1β*.

Imunosupresija vnetnih citokinov, ki se izražajo pri samostojni okužbi z *M. synoviae*, bi po cepljenju proti APMV-1 lahko vodila v napredovanje okužbe z *M. synoviae* in razvoj hujših kliničnih znakov kot sicer. Zaradi zmanjšanega izražanja vnetnih citokinov bi bile živali bolj dovzetne tudi za sekundarne okužbe. Po drugi strani bi lahko povečan vnetni odziv s strani vnetnih citokinov, ki so bili povišani pri kasnejšem impliciranju cepiva, zaradi delovanja imunskega sistema povzročil prekomerno uničevanje tkivnih celic in propad tkiva.

Zavrto izražanje *IFN-γ* pa bi lahko vplivalo na učinek cepljenja proti atipični kokošji kugi, saj bi to lahko povzročilo manjše predstavljanje antigenov v molekulah poglobitvenega histokompatibilnostnega kompleksa tipa II ter posledično zmanjšan obseg spominskih celic B, kar je glavni namen cepljenja.

7 VIRI

- Alexander D.J. 2009. Ecology and Epidemiology of Newcastle Disease. V: Avian Influenza and Newcastle Disease - A Field and Laboratory Manual. Capua I., Alexander D.J. (eds.). Milano, Springer-Verlag: 19–26
- Alexander D.J., Senne D.A. 2008. Newcastle Disease, Other Avian Paramyxoviruses, and Pneumovirus Infections. V: Diseases of Poultry. 12th ed. Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson L.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Swayne D.E. (eds.). Iowa, Blackwell Publishing: 75–100
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 3: 403–410
- Atipična kokošja kuga: Načrt ukrepov ob pojavu atipične kokošje kuge v Republiki Sloveniji. 2015. Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano. Uprava Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin: 76 str.
- Baggiolin M., Clark-Lewis I. 1992. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Letters*, 307, 1: 97–101
- Beug H., von Kirchbach A., Doderlein G., Conscience J.F., Graf T. 1979. Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation. *Cell*, 18, 2: 375–390
- Bolha L., Benčina D., Cizelj I., Oven I., Slavec B., Zorman Rojs O., Narat M. 2013. Effect of *Mycoplasma synoviae* and lentogenic Newcastle disease virus coinfection on cytokine and chemokine gene expression in chicken embryos. *Poultry Science*, 92: 3134–3143
- Briand F.X., Henry A., Massin P., Jestin V. 2012. Complete Genome Sequence of a Novel Avian Paramyxovirus. *Journal of Virology*, 86, 14: 7710
- Brown D.R., Whitcomb R.F., Bradbury J.M. 2007. Revised minimal standards for description of new species of the class *Mollicutes* (division *Tenericutes*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2703–2719
- Buim M.R., Buzinhani M., Yamaguti M., Oliviera R.C., Mettifogo E., Ueno P.M., Timenetsky J., Santelli G.M.M., Piantino Ferreira A.J. 2011. *Mycoplasma synoviae* cell invasion: Elucidation of the *Mycoplasma* pathogenesis in chicken. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 34: 41–47
- Cardenas-Garcia S., Diel D.G., Susta L., Lucio-Decanini E., Yu Q., Brown C.C., Miller P.J., Afonso C.L. 2015. Development of an improved vaccine evaluation protocol to compare the efficacy of Newcastle disease vaccines. *Biologicals*, 43: 136–145
- Cizelj I., Berčič R.L., Dušanić D., Narat M., Kos J., Dovč P., Benčina D. 2011. *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* express a cysteine protease CysP, which can cleave chicken IgG into Fab and Fc. *Microbiology*, 157,2: 362–372

- Colman P.M., Hoyne P.A., Lawrence M.C. 1993. Sequence and structure alignment of paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase with influenza virus neuraminidase. *Journal of Virology*, 67, 6: 2972–2980
- Cytokines and Inflammatory Response. 2015. BioCarta (14. mar. 2016) http://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta/h_inflamPathway
- Davison F. 2008. The Importance of the Avian Immune System and its Unique Features. V: *Avian Immunology*. Davison F., Kaspers B., Schat K.A. (eds.). London, Elsevier: 1–11
- de Leeuw O.S., Koch G., Hartog L., Ravenshorst N., Peeters B.P.H. 2005. Virulence of Newcastle disease virus is determined by the cleavage site of the fusion protein and by both the stem region and globular head of the haemagglutinin–neuraminidase protein. *Journal of General Virology*, 86: 1759–1769
- Diel D.G., da Silva L.H.A., Liu H., Wang Z., Miller P.J., Afonso C.L. 2012. Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: Proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes. *Infection, Genetics and Evolution*, 12: 1770–1779
- Državna ocena ogroženosti ob pojavu posebno nevarnih bolezni živali. 2012. Ministrstvo za obrambo. Uprava Republike Slovenije za zaščito in reševanje: 67 str.
- Dufour-Gesbert F., Dheilly A., Marois C., Kempf I. 2005. Epidemiological study on *Mycoplasma synoviae* infection in layers. *Veterinary Microbiology*, 114: 148–154
- Dušanić D., Berčič R.L., Cizelj I., Salmič S., Narat M., Benčina D. 2009. *Mycoplasma synoviae* invades non-phagocytic chicken cells *in vitro*. *Veterinary Microbiology*, 138: 114–119
- Dušanić D., Bolha L., Narat M., Oven I. 2012. Setting up a gene expression study for tissue cells by method of Quantitative real-time PCR. *Acta agriculturae Slovenica*, 100, 1: 19–28
- Feberwee A., de Wit J.J., Landman W.J.M. 2009. Induction of eggshell apex abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: field and experimental studies. *Avian Pathology*, 38, 1: 77–85
- Fitzpatrick D.R., Bielefeldt-Ohmann H. 1999. Transforming growth factor b in infectious disease: always there for the host and the pathogen. *Trends in Microbiology*, 7, 6: 232–236
- Gallili G.E., Ben-Nathan D. 1998. Newcastle disease vaccines. *Biotechnology Advances*, 16, 2: 343–366
- Gibson M.S., Kaiser P., Fife M. 2014. The chicken IL-1 family: evolution in the context of the studied vertebrate lineage. *Immunogenetics*, 66, 7-8: 427–438

- Hopkins S.R., Yoder H.W. 1982. Influence of Infectious Bronchitis Strains and Vaccines on the Incidence of *Mycoplasma synoviae* Airsacculitis. *Avian Diseases*, 26, 4: 741–752
- Invitrogen. 2008. Real-Time PCR: From Theory to Practice. The University of Warwick: 37 str.
http://www2.warwick.ac.uk/fac/sci/lifesci/intranet/staffpg/support/genomics_new/real-time_pcr/qpcr_handbook.pdf (14. mar. , 2016)
- Jones S.A. 2005. Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6. *The Journal of Immunology*, 175: 3463–3468
- Kaaden O.R., Lange S., Stiburek B. 1982. Establishment and characterization of chicken embryo fibroblast clone LSCC-H32. *In Vitro*, 18, 10: 827–834
- Kaiser P. 2010. Advances in avian immunology - prospects for disease control: a review. *Avian Pathology*, 39, 5: 309–324
- Kaiser P. 2012. The long view: a bright past, a brighter future? Forty years of chicken immunology pre- and post-genome. *Avian Pathology*, 41, 6: 511–518
- Kaiser P., Hughes S., Bumstead N. 1999. The chicken 9E3/CEF4 CXC chemokine is the avian orthologue of IL8 and maps to chicken Chromosome 4 syntenic with genes flanking the mammalian chemokine cluster. *Immunogenetics*, 49: 673–684
- Kaiser P., Stäheli P. 2008. Avian Cytokines and Chemokines. V: *Avian Immunology*. Davison F., Kaspers B., Schat K.A. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 203–222
- Kapczynski D.R., Kogut M.H. 2008. Measurement of Avian Cytokines with Real-Time RT-PCR Following Infection with the Avian Infl uenza Virus. V: *Avian Infl uenza Virus*. Spackman E. (ed.). Totowa, Humana Press: 127–134
- Kapczynski D.R., Afonso C.L., Miller P.J. 2013. Immune responses of poultry to Newcastle disease virus. *Developmental and Comparative Immunology*, 41: 447–453
- Kaspers B., Kothlow S., Butter C. 2008. Avian Antigen Presenting Cells. V: *Avian Immunology*. Davison F., Kaspers B., Schat K.A. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 183–202
- King D.D., Kleven S.H., Wenger D.M., Anderson D.P. 1973. Field Studies with *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases*, 17, 4: 722–726
- Kleven S.H. 1998. Mycoplasmas in the Etiology of Multifactorial Respiratory Disease. *Poultry Science*, 77: 1146–1149
- Kleven S.H. 2008a. Control of Avian Mycoplasma Infections in Commercial Poultry. *Avian Diseases*, 52, 3: 367–374

- Kleven S.H. 2008b. Mycoplasmosis.V: Diseases of Poultry. 12th ed.. Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson L.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Swayne D.E. (eds.). Iowa, Blackwell Publishing: 805–807
- Kleven S.H. 2008c. Multicausal Respiratory Diseases. V: Diseases of Poultry. 12th ed. Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson L.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Swayne D.E. (eds.). Iowa, Blackwell Publishing: 1262–1266
- Kleven S.H., King D.D., Anderson D.P. 1972. Airsacculitis in Broilers from *Mycoplasma synoviae*: Effect on Air-Sac Lesions of Vaccinating with Infectious Bronchitis and Newcastle Virus. Avian Diseases, 16, 4: 915–924
- Kleven S.H., Ferguson-Noel N. 2008. *Mycoplasma synoviae* Infection.V: Diseases of Poultry. 12th ed. Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson L.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Swayne D.E. (eds.). Iowa, Blackwell Publishing: 845–856
- Lam K.M., DaMassa A.J. 2000. *Mycoplasma gallisepticum*-induced Release of Macrophage Inflammatory Protein-1 Beta from Chicken Monocytes-Macrophages. Journal of Comparative Pathology, 122: 35–42
- Lavrič M., Benčina D., Kothlow S., Kaspers B., Narat M. 2007. *Mycoplasma synoviae* lipoprotein MSPB, the N-terminal part of VlhA haemagglutinin, induces secretion of nitric oxide, IL-6 and IL-1b in chicken macrophages. Veterinary Microbiology, 121: 278–287
- Lavrič M., Maughan M.N., Bliss T.W., Dohms J.E., Benčina D., Keeler C. Jr., Narat M. 2008. Gene expression modulation in chicken macrophages exposed to *Mycoplasma synoviae* or *Escherichia coli*. Veterinary Microbiology, 126: 111–121
- Letterio J.J., Roberts A.B. 1998. Regulation of immune responses by TGF-beta. Annual Review of Immunology, 16: 137–161
- Miller P.J., Afonso C.L., packman E., Scott M.A., Pedersen J.C., Senne D.A., Brown J.D., Fuller C.M., Uhart M.M., Karesh W.B., Brown I.H., Alexander D.J., Swayne D.E. 2010. Evidence for a New Avian Paramyxovirus Serotype 10 Detected in Rockhopper Penguins from the Falkland Islands. Journal of Virology, 84, 21: 11496–11504
- Munir S., Sharma J.M., Kapur V. 2005. Transcriptional response of avian cells to infection with Newcastle disease virus. Virus Research, 107: 103–108
- Narat M., Benčina D., Kleven S.H., Habe F. 1998. The Hemagglutination-Positive Phenotype of *Mycoplasma synoviae* Induces Experimental Infectious Synovitis in Chickens More Frequently than Does the Hemagglutination-Negative Phenotype. Infection and Immunity, 66, 12: 6004–6009
- NCBI. 2015. Taxonomy browser. Bethesda, National center for biotechnology information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Selector/taxse.cgi> (1. sept. 2015)

- Nishimichi N., Kawashima T., Hojyo S., Horiuchi H., Furusawa S., Matsuda H. 2005. Characterization and expression analysis of a chicken interleukin-6 receptor alpha. *Developmental and Comparative Immunology*, 30: 419–429
- Noormohammadi A.H., Markham P. F., Markham J.F., Whithear K.G., Browning G.F. 1999. *Mycoplasma synoviae* surface protein MSPB as a recombinant antigen in an indirect ELISA. *Microbiology*, 145: 2087–2094
- Newcastle disease. 2012. V: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 7th ed. Pariz, World Organisation for Animal Health (OIE): 555–573
- Pan H., Halper J. 2003. Cloning, expression, and characterization of chicken transforming growth factor β 4. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303: 24–30
- Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, 9: 2002–2007
- Prakasam R., Fujimoto M., Takii R., Hayashida N., Takaki E., Tan K., Wu F., Inouye S., Nakai A. 2013. Chicken IL-6 is a heat-shock gene. *FEBS Letters*, 587: 3541–3547
- Qureshi M.A. 1998. Role of Macrophages in Avian Health and Disease. *Poultry Science*, 77: 978–982
- Rasmussen R. 2001. Quantification on the LightCycler. V: *Rapid Cycle Real-Time PCR, methods and applications*. Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K (eds). Heidelberg, Springer Press: 21–34
- Razin S. 2006. The Genus *Mycoplasma* and Related Genera (Class Mollicutes). *Prokaryotes*, 4: 836–904
- Razin S., Yogev D., Naot Y. 1998. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas; *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 4: 1094–1156
- Reese S., Dalamani G., Kaspers B. 2006. The avian lung-associated immune system: a review. *Veterinary Research*, 37: 311–324
- Rodwell A.W., Whitcomb R.F. 1983. Methods for direct and indirect measurement of mycoplasma growth. V: Razin, S., Tully, J.G. (Eds.), *Methods in Mycoplasmaology I*. New York, Academic Press: 185–196
- Roitt I., Brostoff J., David K.M. 2001. *Immunology*. 6th ed. London, Elsevier Science: 440 str.
- Rosengarten R., Citti C., Glew M., Lischewski A., Droesse M., Much P., Winner F., Brank M., Spargser J. 1999. Host-pathogen interactions in mycoplasma pathogenesis: Virulence and survival strategies of minimalist prokaryotes. *International Journal of Medical Microbiology*, 290: 15–25

- Rottem S. 2003. Interaction of Mycoplasmas With Host Cells; Physiological Reviews, 83: 417–432
- Saif Y.M. 2008. Emerging Diseases and Diseases of Complex or Unknown Etiology. V: Diseases of Poultry. 12th ed. Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson L.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Swayne D.E. (eds.). Iowa, Blackwell Publishing: 1261–1266
- Sasaki. 2006. Mycoplasma. V: Bacterial genomes and infectious diseases. Chan V.L., Sherman P.M., Bourke B. (eds.). Totowa, Humana Press: 175–190
- Sick C., Schneider K., Staeheli P., Weining K.C. 2000. Novel Chicken CXC and CC Chemokines. Cytokine, 12, 3: 181–186
- Sinkovics J.G., Horvath J.C. 2000. Newcastle disease virus (NDV): brief history of its oncolytic strains. Journal of Clinical Virology, 16: 1–15
- Slavec B., Berčič R.L., Cizelj I., Narat M., Zorman-Rojs O., Dovč P., Benčina D. 2011. Variation of *vlhA* gene in *Mycoplasma synoviae* clones isolated from chickens. Avian Pathology, 40, 5: 481–489
- Springer W.T., Luskus C., Pourciau S.S. 1974. Infectious Bronchitis and Mixed Infections of *Mycoplasma synoviae* and *Escherichia coli* in Gnotobiotic Chickens - Synergistic Role in the Airsacculitis Syndrome. Infection and Immunity, 10, 3: 578–589
- Swaggerty C.L., Kogut M.H., Ferro P.J., Rothwell L., Pevzner I.Y., Kaiser P. 2004. Differential cytokine mRNA expression in heterophils isolated from Salmonella-resistant and -susceptible chickens. Immunology, 113: 139–148
- Terregino C., Aldous E.W., Heidari A., Fuller C.M., De Nardi R., Manvell R.J., Beato M.S., Shell W.M., Monne I., Brown I.H., Alexander D.J., Capua I. 2013. Antigenic and genetic analyses of isolate APMV/wigeon/Italy/3920-1/2005 indicate that it represents a new avian paramyxovirus (APMV-12). Archives of Virology, 158: 2233–2243
- Valasek M.A., Repa J.J. 2005. The power of real-time PCR. Advances in Physiology Education, 29: 151–159
- Vardaman T.H., Reece F.N., Deaton J.W. 1973. Effect of *Mycoplasma synoviae* on Broiler Performance. Poultry Science, 52: 1909–1912
- Villegas P., Kleven S.H., Anderson D.P. 1976. Effect of Route of Newcastle Disease Vaccination on the Incidence of Airsacculitis in Chickens Infected with *Mycoplasma synoviae*. Avian Diseases, 20, 2: 395–400
- Weining K., Sick C., Kaspers B., Staeheli P. 1998. A chicken homolog of mammalian interleukin-1 beta: cDNA cloning and purification of active recombinant protein. European Journal of Biochemistry, 258: 994–1000
- Wigley P., Kaiser P. 2003. Avian Cytokines in Health and Disease. Brazilian Journal of Poultry Science, 5, 1: 1–14

Yadav A., Saini V., Arora S. 2010. MCP-1: Chemoattractant with a role beyond immunity:
A review. *Clinica Chimica Acta*, 411: 1570–1579

ZAHVALA

Želela bi se zahvaliti vsem, ki so mi kakorkoli pomagali pri izdelavi naloge, še posebno pa:

- mentorici prof. dr. Mojci Narat za vodenje, pomoč, nasvete, potrpežljivost in občasno »brco v rit«
- dr. Luki Bolha za pomoč pri laboratorijskem delu, obdelavi podatkov, za številne nasvete, koristne informacije, potrpežljivost in obilico dobre volje
- znan. svet. dr. Dušanu Benčini in doc. dr. Silvestru Žgurju za strokovni pregled naloge ter dr. Nataši Siard za tehnični pregled naloge
- staršem in partnerju za podporo, spodbudo, nasvete in ker ste verjeli vame