

Određivanje virusnog titra u staničnoj kulturi upotrebom fluorescentnog virusa mumpsa

Drk, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:254727>

Rights / Prava: [In copyright](#)/Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-24**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Sara Drk

**Određivanje virusnog titra u staničnoj
kulturi upotrebom fluorescentnog virusa
mumpsa**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

hikija Čemi

Tanya Kostović Gulya

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za molekularnu biomedicinu u Centru za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu, pod voditeljstvom dr. sc. Tanje Košutić Gulija te suvoditeljstvom doc. dr. sc. Silvije Černi. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

ZAHVALE:

Iskreno zahvaljujem svim članovima Laboratorija za molekularnu biomedicinu u Centru za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu na ljubaznosti i odličnom praktičnom znanju koje sam stekla u protekloj godini.

Zahvaljujem doc.dr.sc. Silviji Černi na pristupačnosti i svojoj pomoći u toku pisanja diplomskog rada.

Velika zahvala i bacc.med.lab.dijag. Renati Jug, dr.sc Maji Jagušić, dr.sc. Anamariji Slović, mag.exp.biol. Mirni Jurković i mag.biol.mol. Dorotei Pali na pomoći u detaljima koji čine veliku razliku.

Iznad svega, veliko hvala dr.sc. Tanji Košutić Gulija na svim savjetima i usmjeravanju tokom izvođenja i pisanja svog diplomskog rada. Hvala na strpljenju i podršci u situacijama kad nije sve išlo po planu.

Posebno hvala mojim roditeljima i bratu na razumijevanju i podršci tokom cijelog studiranja i usmjeravanju u teškim trenucima. Hvala svim prijateljima za odlično iskustvo studiranja, za sve uspomene i podršku pred svaki ispit, ponajviše Zoranu za najljepše trenutke.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Određivanje virusnog titra u staničnoj kulturi upotrebom fluorescentnog virusa mumpsa

Sara Drk

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Virus mumpsa uzrokuje istoimenu bolest ljudi koja se prevenira cijepljenjem. Poznavanje titra virusa važan je parametar za njegovu karakterizaciju u virologiji i vakcinologiji. Najčešće se koriste testovi plakiranja (citopatogeni efekt u obliku plakova) i 50% infektivne doze stanične kulture (CCID₅₀) (detektiranje citopatogenog efekta u 50% inokuliranih stanica). U ovom istraživanju korišten je rekombinantni virus mumpsa MRV3, izvedenica soja L-Zagreb s ugrađenim genom za zeleni fluorescentni protein koji uzrokuje fluorescenciju inficiranih stanica. Očitavanje ovih testova standardno se radi makroskopski ili svjetlosnim mikroskopom, a rezultati ovise o objektivnosti i iskustvu operatera. Vrijednosti titra u ovim testovima razlikuju se za iste sojeve mumpsa, a za konverziju vrijednosti iz testa CCID₅₀ u vrijednosti iz testa plakiranja ne postoji jedinstveni konverzijski koeficijent. Cilj istraživanja je bio očitati titar u oba testa standardnim načinom te fluorescencijskom mikroskopijom, usporediti rezultate, definirati utjecaj načina očitavanja na rezultat testa te odrediti eksperimentalni konverzijski koeficijent za MRV3. Upotrebom fluorescencije u očitavanju testa plakiranja utvrđeno je postojanje makroskopski nevidljivih plakova te razlika vrijednosti titra od 0.4 log. Na očitavanje testova CCID₅₀ upotreba fluorescencije utjecala je neznatno. Eksperimentalni konverzijski koeficijenti za uzorke virusa MRV3 bili su u rasponu 0.04-0.15. Upotreba fluorescentnog virusa utjecala je na titar, ali nije bitno promijenila konverzijski koeficijent.

(54 stranice, 15 slika, 13 tablica, 6 tablica u prilogu, 42 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: mumps, fluorescencija, titar, plakiranje, CCID₅₀, konverzijski koeficijent

Voditelj: dr. sc. Tanja Košutić Gulija

Suvoditelj: doc. dr. sc. Silvija Černi

Ocjenitelji:

Doc. dr. sc. Silvija Černi

Izv. prof. dr. sc. Petra Peharec Štefanić

Izv. prof. dr. sc. Renata Matoničkin Kepčija

Rad prihvaćen: 4. veljače 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Determination of virus potency in cell culture using fluorescent mumps virus

Sara Drk

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Mumps virus causes a human disease of the same name which can be prevented by vaccine. Determination of virus titre is an important parameter for its characterisation in virology and vaccinology. Most frequently used methods are plaque assay, based on cytopathogenic effect in a form of plaques, and 50% cell culture infective dose (CCID₅₀) assay, based on detection of cytopathic effect of the virus in 50% of the cells. In this research, a recombinant virus MRV3 was used, prepared from L-Zagreb strain with an inserted gene for green fluorescent protein which causes fluorescence of infected cells. Reading of these assays is standardly done macroscopically or using light microscope and the results depend on objectivity and experience of the operator. Titre values in these two tests differ for same virus strains and conversion of obtained values presents a problem because a conversion value for all strains of mumps does not exist. The aim of this research was to determine virus titres in both assays standardly and using fluorescence microscope, compare the results, define the effect of the way of reading on assay results and determine experimental conversion coefficient for MRV3 virus. Using fluorescence in reading of plaque assay determined the existence of macroscopically invisible plaques and a difference of titre values of 0.4 log. Using fluorescence unnotably affected CCID₅₀. The experimental conversion coefficient for samples of MRV3 virus was calculated to be in the range 0.04-0.15. Using fluorescent virus effected virus titre, but it did not change the conversion coefficient significantly.

(54 pages, 15 figures, 13 tables, 6 supplemental tables, 42 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: mumps, fluorescence, titre, plaque assay, CCID₅₀, conversion coefficient

Supervisor: Dr. Tanja Košutić Gulija

Co-supervisor: Dr. Silvija Černi, Doc.

Reviewers:

Asst. Prof. Silvija Černi, PhD

Assoc. Prof. Petra Peharec Štefanić, PhD

Assoc. Prof. Renata Matoničkin Kepčija, PhD

Thesis accepted: 4 February 2021

SADRŽAJ:

1.	UVOD	1
1.1	Virus mumpsa.....	1
1.2	Replikacija virusa mumpsa	3
1.3	Cjepiva protiv mumpsa	6
1.4	Kvantifikacija virusa	8
1.4.1	Test plakiranja	8
1.4.2	Test 50% infektivne doze stanične kulture.....	9
1.4.3	Konverzija dobivenih vrijednosti titra.....	10
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA.....	11
3.	MATERIJALI I METODE	12
3.1	Materijali	12
3.1.1	Stanična kultura.....	12
3.1.2	Virusni soj	12
3.1.3	Kemikalije i otopine	12
3.1.3.1	Za održavanje i infekciju stanične kulture.....	12
3.1.3.2	Za određivanje titra virusa.....	13
3.1.3.2.1	Test plakiranja	13
3.1.3.2.2	Test 50% infektivne doze stanične kulture.....	13
3.1.3.3	Za izolaciju RNA.....	14
3.1.3.4	Za reverznu transkripciju.....	14
3.1.3.5	Za lančanu reakciju polimerazom	14
3.1.3.6	Za elektroforezu u agaroznom gelu i pročišćavanje PCR produkata iz gela.....	15
3.1.3.7	Za reakciju sekvenciranja.....	15
3.1.3.8	Za pročišćavanje produkata reakcije sekvenciranja	16
3.1.4	Uređaji.....	16

3.2	Metode.....	16
3.2.1	Uzgoj kulture Vero stanica.....	16
3.2.2	Priprema virusnih uzoraka.....	16
3.2.3	Određivanje virusnog titra.....	17
3.2.3.1	Test plakiranja.....	17
3.2.3.1.1	Dodatak aktinomicina D u pokrov u testu plakiranja.....	19
3.2.3.2	Test 50% infektivne doze stanične kulture.....	19
3.2.4	Statistička analiza rezultata.....	20
3.2.5	Uzorkovanje i kultiviranje virusa iz plakova.....	20
3.2.6	Izolacija RNA.....	20
3.2.7	Reverzna transkripcija.....	20
3.2.8	Lančana reakcija polimerazom.....	21
3.2.9	Elektroforeza u agaroznom gelu i pročišćavanje PCR produkata iz gela.....	22
3.2.10	Reakcija sekvenciranja.....	22
3.2.11	Pročišćavanje reakcije sekvenciranja.....	23
3.2.12	Sekvenciranje i analiza nukleotidnog slijeda.....	23
4.	REZULTATI.....	24
4.1	Uzorak MRV3 3pV VM.....	24
4.1.1	Virusni titar uzorka MRV3 3pV VM određen testom plakiranja.....	24
4.1.2	Virusni titar uzorka MRV3 3pV VM određen testom 50% infektivne doze stanične kulture.....	28
4.2	Uzorak MRV3 3pv NM.....	31
4.2.1	Virusni titar uzorka MRV3 3pV NM određen testom plakiranja.....	31
4.2.2	Virusni titar uzorka MRV3 3pV NM određen testom 50% infektivne doze stanične kulture.....	34
4.3	Usporedba vrijednosti titra virusnih uzoraka MRV3 3pV VM i MRV3 3pV NM dobivenih u testovima plakiranja i 50% infektivne doze stanične kulture.....	37
4.4	Izračun konverzijskog koeficijenta.....	39
4.5	Utjecaj aktinomicina D na prepoznavanje plakova.....	40

4.6	Karakterizacija plakova.....	42
5.	RASPRAVA.....	44
7.	LITERATURA.....	51
PRILOZI:	i
ŽIVOTOPIS:	vii

KRATICE:

Kratice		Značenje
2pV	-	druga pasaža na Vero stanicama
3pV	-	treća pasaža na Vero stanicama
akt D	-	aktinomycin D
CCID₅₀	<i>eng.</i> 50% cell culture infective dose	50% infektivne doze stanične kulture
CPE	<i>eng.</i> cytopathic effect	citopatogeni efekt
EGFP	<i>eng.</i> enhanced green fluorescent protein	pojačani zeleni fluorescentni protein
EMEM	<i>eng.</i> Eagle's minimum essential medium	Eagleov minimalni esencijalni medij
F	-	fuzijski
FTS	-	fetalni teleći serum
GLN-B	-	L-glutamin
HN	-	hemaglutinin-neuraminidaza
JL-2	<i>eng.</i> Jeryl Lynn-2	Jeryl Lynn-2
JL-5	<i>eng.</i> Jeryl Lynn-5	Jeryl Lynn-5
L	<i>eng.</i> large	gen koji kodira za virusnu RNA polimerazu
M	-	matriks
MEM-XA	<i>eng.</i> minimal essential medium with Earle's salts	minimalni esencijalni medij s Earlovim solima
MMR	<i>eng.</i> measles – mumps – rubella	ospice – mumps - rubeola
MOI	<i>eng.</i> multiplicity of infection	multiplicitet infekcije
mRNA	<i>eng.</i> messenger RNA	glasnička RNA
MRV3	-	rekombinantni virus mumpsa
NGS	<i>eng.</i> new generation sequencing	sekvenciranje nove generacije
NM	-	niski MOI
NP	-	nukleoprotein
P	<i>eng.</i> phosphoprotein	fosfoprotein
PCR	<i>eng.</i> polymerase chain reaction	lančana reakcija polimerazom
PFU	<i>eng.</i> plaque forming units	jedinice stvaranja plakova
PS-B	-	penicilin/streptomycin
RdRP	<i>eng.</i> RNA-dependent RNA polymerase	RNA-ovisna RNA polimeraza
RNP	-	ribonukleoprotein
RT	<i>eng.</i> reverse transcription	reverzna transkripcija
SH	<i>eng.</i> small hydrophobic	mali hidrofobni
VM	-	visoki MOI

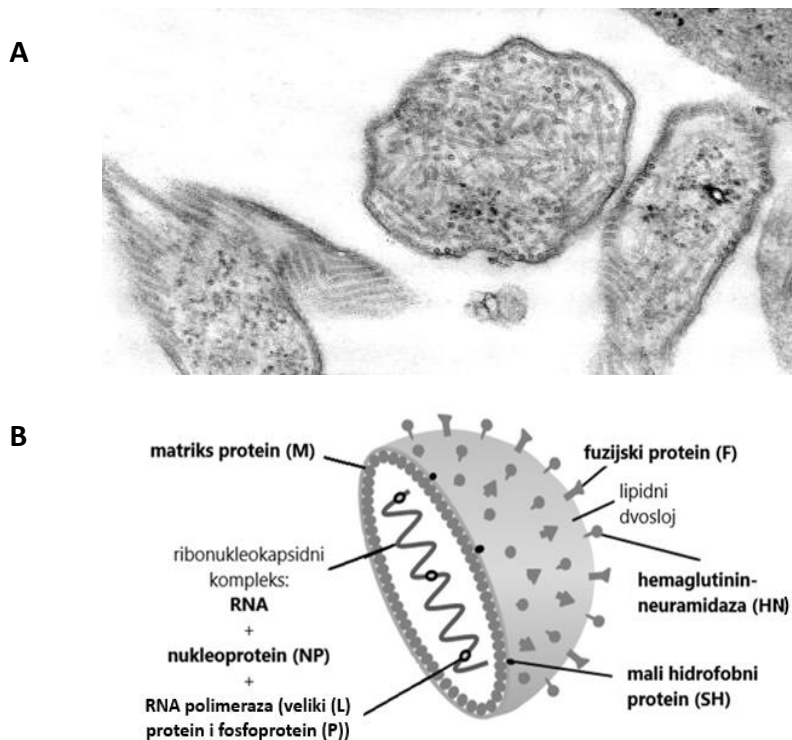
1. UVOD

1.1 Virus mumps

Virus zaušnjaka ili mumps je srednje do jako zarazan virus koji inficira ljude. Prenosi se direktnim kontaktom, kapljično ili zaraženim predmetima, a prvotno inficira gornje dišne puteve. Najčešće su zahvaćene žlijezde slinovnice (parotide), ali mogu biti i središnji živčani sustav, urinarni i spolni sustav. Izaziva blagu, akutnu bolest parotitisa ili zaušnjaka (bolest mumps). Infekcija se klinički najčešće manifestira temperaturom, glavoboljom, umorom i karakterističnim oticanjem parotidnih žlijezda (parotitis). U trećini slučajeva infekcija je asimptomatska. U 15-30% slučajeva uzrokuje orhitis, u oko 10% slučajeva meningitis, a 0.1% encefalitis i trajne neurološke posljedice. Infekcija može dovesti i do drugih ozbiljnih komplikacija poput pankreatitisa, ooforitisa ili privremene gluhoće (WHO 2007; Hviid i sur. 2008).

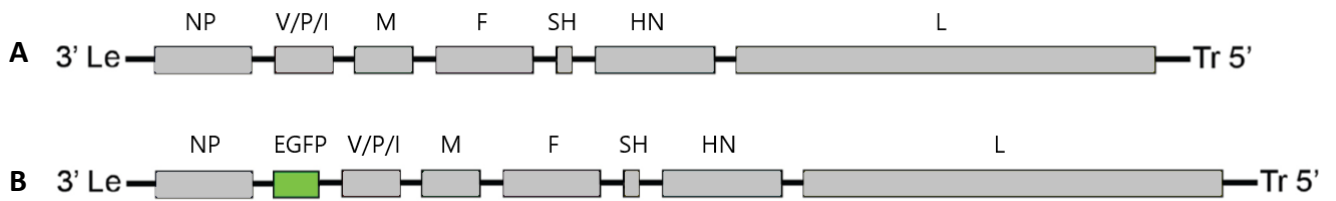
Mumps virus (*Mumps orthorubulavirus*) svrstava se u red *Mononegavirales*, porodicu *Paramyxoviridae*, potporodicu *Rubulavirinae*, rod *Orthorubulavirus* (https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=19710227&src=NCBI&ictv_id=19710227). Virus mumps ima pleomorfne čestice veličine od 100 do 600 nm, najčešće sferičnog, a ponekad i filamentoznog oblika. Čestice virusa se sastoje od helikalnog ribonukleoproteina (RNP), koji sadrži jednolančanu RNA okruženu virusnim nukleoproteinima i okružen je lipoproteinskom ovojnicom (Rubin i sur. 2013).

Lipoproteinska ovojnica sadrži uklopljene virusne proteine (Slika 1): hemaglutinin-neuraminidazu (HN), fuzijski (F) protein te mali hidrofobni protein (*eng.* small hydrophobic protein, SH). S unutarnje strane ovojnice nalazi se matriks (M) protein i helikalna nukleokapsida koju čini virusna RNA vezana uz nukleoprotein (NP), te virusni fosfoprotein (*eng.* phosphoprotein, P) i veliki protein (*eng.* large, L). Kompleks P i L proteina ima funkciju virusne RNA-ovisne RNA-polimeraze (*eng.* RNA-dependent RNA polymerase, RdRP), odgovorne za transkripciju i replikaciju virusnog genoma (Rubin i sur. 2013).



Slika 1. Struktura čestice virusa mumps. A) Presjek čestice snimljen transmisivnim elektronskim mikroskopom (preuzeto s <https://www.cdc.gov/mumps/about/photos.html>); B) Shematski prikaz čestice s proteinima NP, P, M, F, SH, HN i L (preuzeto i prilagođeno od Beleni i Borgmann 2018).

Genom virusa mumps čini nesegmentirana, jednolančana molekula RNA negativnog smisla (-RNA) koja se sastoji od 15384 nukleotida. Sastoji se od sedam transkripcijskih jedinica koje, počevši od 3' kraja, kodiraju redom za proteine: NP, P/V/I, M, F, SH, HN i L (Slika 2a). S gena P nastaju tri mRNA s kojih se transliraju tri različita proteina zbog kotranskripcijskog editiranja mRNA, odnosno umetanja nekomplementarnih G nukleotida. To ga razlikuje od ostalih gena s kojih se transkribira po jedna mRNA. Na 3' kraju genoma nalazi se regija od 55 nukleotida (*eng.* leader sequence), a na 5' kraju genoma nalazi se regija od 24 nukleotida (*eng.* trailer sequence). One su obrnuto komplementarne i esencijalne za transkripciju i replikaciju virusnog genoma. Na početku i na kraju svakog gena nalaze se kratke konzervirane sekvence koje služe kao signal za početak (*eng.* gene start) i završetak transkripcije gena (*eng.* gene end) (Rubin i sur. 2013; Clarke i sur. 2000).



Slika 2. a) Shematski prikaz organizacije genoma virusa mumpsa; b) shematski prikaz organizacije genoma rekombinantnog mumps virusa MRV3 s umetnutim genom za zelenu fluorescenciju (EGFP) (preuzeto i prilagođeno iz: Cox i Plemper 2015).

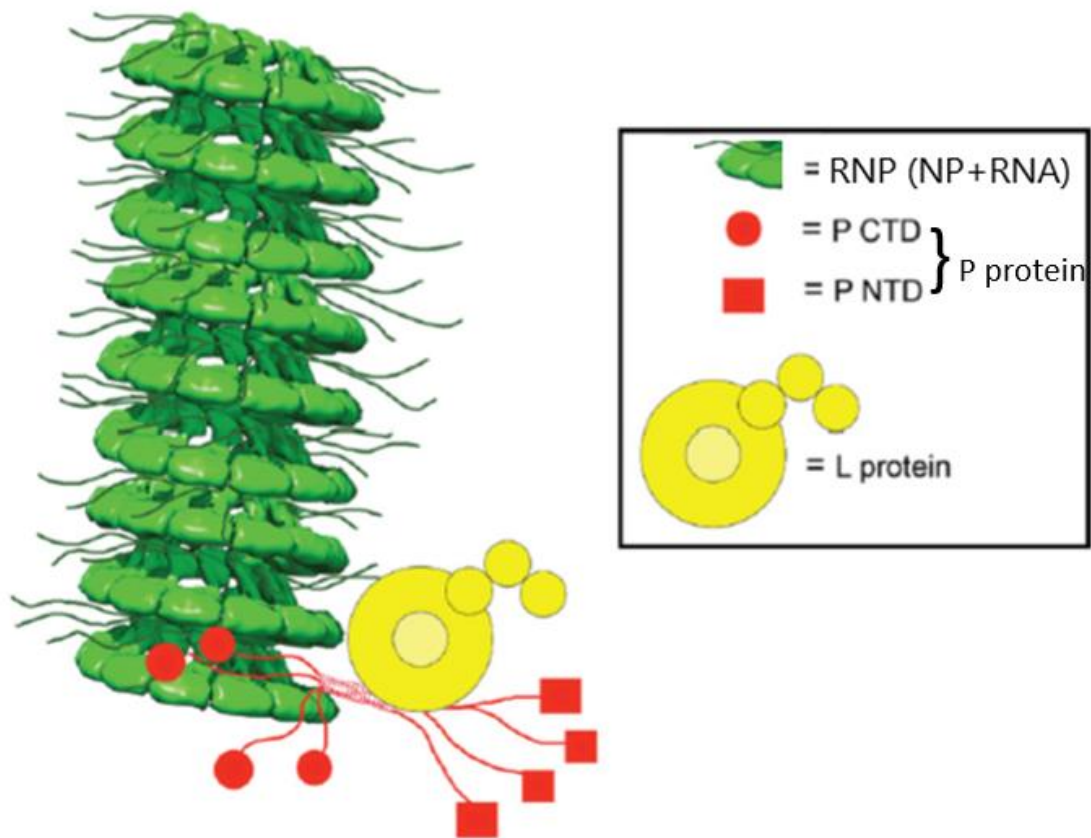
Zeleni fluorescentni protein (*eng.* green fluorescent protein. GFP) potječe iz meduze *Aequorea victoria*. Koristi se u monitoringu gena i lokalizaciji proteina u različitim stanicama i organizmima. Ekspimiran u stanicama, potiče zelenu fluorescenciju stanica kad su izložene plavom svjetlu. Za vizualizaciju pomoću GFP nisu potrebni dodatni supstrati, kofaktori i slično, a stabilan je i može se koristiti u različitim metodama, uključujući mikroskopiju. Kako bi se dodatno pojačala fluorescencija i ekspresija u stanicama sisavaca, stvoren je pojačani zeleni fluorescentni protein (*eng.* enhanced green fluorescent protein, EGFP) (Zhang i sur. 1996). Rekombinantni mumps virus MRV3, kao bazu ima nukleotidnu konsenzus sekvencu soja L-Zagreb (pristupni broj u genskoj bazi GenBank: AY685920), ima ugrađen EGFP gen na poziciji između gena NP i P/V/I (Slika 2b). Virus MRV3 priređen je *rescue* metodom (Beatty i sur. 2017). Infekcijom stanice rekombinantnim MRV3 virusom, dolazi do ekspresije proteina EGFP i zelene fluorescencije stanice.

1.2 Replikacija virusa mumpsa

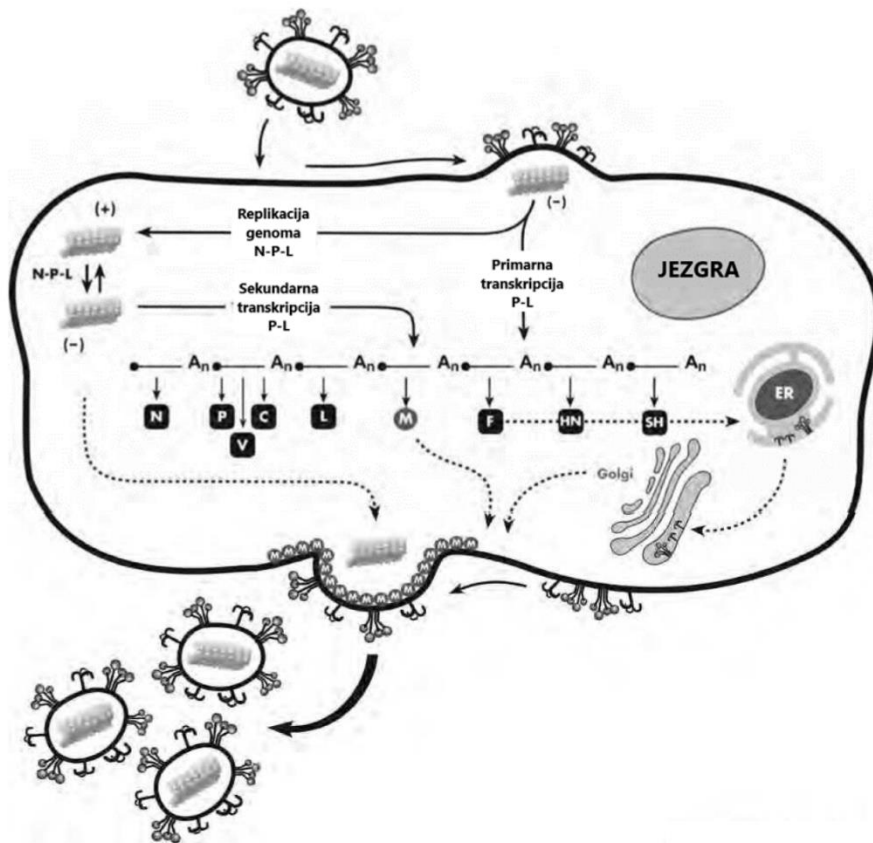
Replikacija virusa započinje ulaskom virusa u stanicu što se odvija pomoću dva glikoproteina na membrani virusa: HN i F. Protein HN je integralni membranski protein tipa II. U obliku homotetramera, HN se veže na receptore na površini stanica koji sadrže sijalinsku kiselinu, cijepa ju i uklanja iz ugljikohidrata te promovira fuziju virusne ovojnice i stanične membrane (Smith i sur. 2009; Lamb i Parks 2013).

Protein F je integralni membranski protein tipa I, ekspimiran u obliku homotrimeru i sintetiziran je kao inaktivni prekursor F_0 , koji se aktivira cijepanjem staničnim proteazama na F_1 i F_2 . Cijepanjem se izlaže hidrofobni fuzijski peptid F proteina potreban za prodiranje u membranu. Vezanjem proteina HN na stanični receptor, dolazi do konformacijskih promjena u F proteinu i fuzije virusne ovojnice i stanične membrane. Koekspresija HN i F omogućuje ulazak virusa u stanicu (Smith i sur. 2009; Lamb i Parks 2013).

Replikacija virusa odvija se u citosolu. Za replikaciju i transkripciju virusnog genoma odgovorna je virusna RdRP, kompleks P i L proteina (Slika 3). Protein L je esencijalna jedinica RdRP jer ima enzimatsku aktivnost za inicijaciju, elongaciju i terminaciju sintezu virusne mRNA, a P protein je odgovoran za vezanje proteina L i NP. Protein NP s genomskom RNA formira strukturu RNP koja u kompleksu s proteinima P i L čini nukleokapsidu (Rubin i sur. 2013; Lamb i Parks 2013).



Slika 3. Model interakcija između nukleoproteina (NP), fosfoproteina (P) i velikog proteina (L). Virusna RNA-ovisna RNA polimeraza je kompleks proteina L i P. Protein NP s genomskom RNA formira ribonukleoprotein (RNP). Gola genomaska RNA ne može se replicirati ni transkribirati. Protein P odgovoran je za vezanje proteina L i NP interkacijama u P C-terminalnoj domeni (P CTD). Time se RNA-ovisna RNA polimeraza veže za RNP i počinje sintezu virusne RNA (preuzeto i prilagođeno iz (Cox i Plemper 2015).

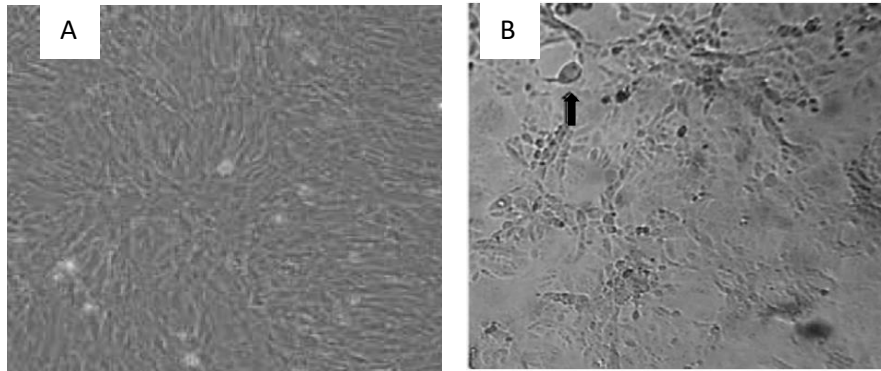


Slika 4. Shematski prikaz životnog ciklusa paramiksovirusa (preuzeto i prilagođeno iz Lamb i Parks 2013).

Gola genomska RNA ne može se replicirati ni transkribirati i u cijelom procesu replikacije ostaje vezana uz NP. Prva faza replikacije virusa je primarna transkripcija (Slika 4). Virusna RdRP sintetizira *leader* RNA i mRNA iz genomske RNA. Kasnije se genomska RNA negativnog smisla koristi kao kalup za sintezu antigenoma pozitivnog smisla, koji zatim služi kao kalup za sintezu nove genomske RNA negativnog smisla. U fazi sekundarne transkripcije sintetizira se velika količina genomskih RNA koje služe za sintezu virusnih mRNA. (Lamb i Parks 2013). Antigenom i genom obavijeni su nukleokapsidom (Rubin i sur. 2013).

Posljednji dio sinteze novih virusnih čestica je njihovo sklapanje. Ono se odvija na staničnoj plazmatskoj membrani. Smatra se da zahtjeva koordiniranu lokalizaciju važnih virusnih sastavnica, uključujući virusne glikoproteine HN i F (egzocitozom se transportiraju do stanične membrane), RNP (iz citoplazme) i protein M. Pupanje, odnosno izlazak novosklopljenih virusa iz stanice, zahtjeva interakciju virusnih sastavnica i staničnog aparata koji omogućavaju fuziju virusne ovojnice i stanične membrane. Površina inficirane stanice je prekrivena virusnim glikoproteinima, što može potaknuti fuziju stanične membrane sa

susjednim stanicama, ako u okolini postoji proteaza za aktivaciju F proteina. Time se virus dalje rasprostranjuje i stanice se udružuju u višejezgrene tvorbe, odnosno sincicij (Slika 5). Sincicij je karakteristični citopatogeni efekt (CPE) u staničnim kulturama inficiranim virusom mumpsa (Rubin i sur. 2013; Lamb i Parks 2013).



Slika 5. a) neinficirani sloj Vero stanica pod svjetlosnim mikroskopom (preuzeto iz American Type Culture Collection 2012); b) citopatogeni efekt virusa mumpsa u obliku sincicija (višejezgrene citoplazmatska masa nastala spajanjem nekoliko stanica), označen strelicom. Soj L-Zagreb, u kulturi stanica Vero vidljiv pod svjetlosnim mikroskopom (preuzeto iz Forčić i sur. 2010).

1.3 Cjepiva protiv mumpsa

Mumps se može prevenirati cijepljenjem. Prvo cjepivo protiv mumpsa proizvedeno je u SAD-u 1948. i korišten je inaktivirani virus. Takvo cjepivo inducira kratkotrajnu imunost protiv virusa i zbog toga se prestalo koristiti. 1960-ih proizvedeno je prvo cjepivo koje sadrži živi atenuirani virus, koristeći Jeryl Lynn soj virusa mumpsa. Sva cjepiva koja se koriste danas sadrže živi atenuirani virus. Većina zemalja koristi kombinirano cjepivo protiv ospica – mumpsa – rubeole (*eng.* measles – mumps – rubella, MMR) (WHO 2007; Hilleman 2011).

Atenuirano cjepivo se sastoji od cijelih i replikativno sposobnih virusnih čestica kojima je smanjena virulencija u prirodnom domaćinu, ali zadržavaju mogućnost poticanja imunskog odgovora. Virus se atenuira kroz duži vremenski period uspješnim pasažiranjem u embrioniranim kokošjim jajima i primarnim ili kontinuiranim staničnim kulturama stranih vrsta. Time više ne predstavlja opasnost za prvotnog domaćina, odnosno gubi virulentne karakteristike. Stanične kulture koje se često koriste su pileći fibroblasti, prepeličji fibroblasti, stanice bubrega majmuna, stanice bubrega hrčka i druge (Mak i Saunders 2006).

Virus mumpsa, kao RNA virus, sadrži heterogene virusne populacije koje se sastoje od virusnih čestica međusobno različitih na jednoj ili više pozicija u genomu – virusne kvazivrste. One nastaju zbog prirodne netočnosti virusne RdRP koja ponekad ugradi pogrešan nukleotid. (Mandary i sur. 2019). Zbog subkultiviranja virusa u neprirodnom supstratu, mijenja se sastav virusne populacije. Neke kvazivrste imaju selektivnu prednost zbog čega dolazi do smanjenja virulentnosti virusa. Za cjepivo je važno da uz smanjenje virulentnosti, virus zadržava svojstvo imunogeničnosti, odnosno sposobnost poticanja imunološkog odgovora u prirodnom domaćinu (Lauring i Andino 2010).

Prvo šire korišteno cjepivo protiv mumpsa bilo je Leningrad-3, a koristi se i danas. Dodatnim pasažiranjem Leningrad-3, u Hrvatskoj je proizveden L-Zagreb (WHO 2007).

Jeryl Lynn cjepivo je proizvedeno 1965. u SAD-u gdje se i danas koristi. Cjepivo sadrži dva različita virusa mumpsa, Jeryl Lynn-5 (JL-5) i Jeryl Lynn-2 (JL-2) Dodatnim pasažiranjem JL-5 proizvedeno je cjepivo RIT 4385 (Rubin i Plotkin 2013; WHO 2007).

Urabe AM9 cjepivo je proizvedeno u Japanu (Rubin i Plotkin 2013). Učinke slične Urabe AM9 cjepivu, imaju cjepiva Hoshino, Torii, Miyahara i NKM-46 (WHO 2007).

Unatoč visokoj procijepljenosti stanovništva, u posljednje vrijeme sve su češće epidemije mumpsa. Jedan od razloga za to može biti primarni ili sekundarni neuspjeh cjepiva. Primarni neuspjeh cjepiva se definira kao nedostatak inicijalnog odgovora antitijelima na cjepivo što rezultira nedostatkom obrambenog imunološkog odgovora. Sekundarni neuspjeh cjepiva označava postupni gubitak imuniteta nakon uspješnog inicijalnog odgovora i dešava se godinama nakon cijepjenja. Drugi razlog može biti križna nepodudarnost zbog antigenskih varijacija cjepnog soja i divljeg soja koji cirkulira u populaciji (Šantak i sur. 2013). Novija istraživanja naglašavaju da je nužno razviti nova, učinkovitija cjepiva protiv mumpsa (Connell i sur. 2020).

Cjepiva protiv mumpsa mogu izazvati blage reakcije poput boli na mjestu uboda, crvenila i sl., a prolaze u roku nekoliko dana. Za sva cjepiva protiv mumpsa, osim Jeryl Lynn-a i njegovih izvedenica/varijanti, dokazani su rijetki slučajevi postvakcinalnog aseptičnog meningitisa kao najozbiljnije reakcije na cjepivo. Bolest prolazi sama i bez posljedica (WHO 2014).

Iako se cijepljenje povijesno pokazalo vrlo korisnim za opće zdravlje, u posljednje vrijeme se promijenila percepcija cijepljenja od strane dijela javnosti. Dovedena je u pitanje sigurnost cjepiva i povećava se broj slučajeva gdje roditelji odbijaju cijepljenje djece. To se odrazilo na cijepljenje svim cjepivima, pa tako i MMR cjepivom. Iako se MMR cjepivo nalazi u imunizacijskim programima u zapadnim državama i visoka je procijepljenost, dolazi do epidemija mumpsa i ospica (Connell i sur. 2020). Među studentima na Sveučilištu u Iowi, SAD, došlo je do epidemije mumpsa (226 slučajeva). Većina zaraženih studenata je bila procijepljena (86% s dvije doze MMR, 12% s tri doze MMR). Provedena je kampanja za docjepljivanje MMR cjepivom nakon čega se broj slučajeva među studentima znatno smanjio (75 slučajeva) (Shah i sur. 2018). Zbog toga je važno redovito cijepljenje s dvije doze i, po potrebi, docjepljivanje. Benefiti koji proizlaze iz cijepljenja su puno veći kako za pojedinca, tako i za zajednicu, naspram potencijalne reakcije na cjepivo protiv mumpsa (WHO 2014).

1.4 Kvantifikacija virusa

Poznavanje koncentracije virusa jedan je od osnovnih parametara za karakterizaciju virusnog uzorka. Točno i precizno određivanje koncentracije, odnosno titra virusa, važno je u istraživanjima u virologiji i vakcinologiji, kontroli kvalitete, genskoj terapiji, istraživanju antiviralnih lijekova itd.

Postoji nekoliko metoda direktnog i indirektnog kvantificiranja virusa. Za kvantifikaciju živih replikativno sposobnih virusnih čestica koriste se testovi plakiranja i 50% infektivne doze. Indirektno se koncentracija virusa u uzorku može odrediti i pomoću kvantitativnog PCR testa kojim se amplificira dio virusnog genoma, gdje se, uz žive virusne čestice, neselektivno kvantificiraju i raspadnute te defektne virusne čestice. Koncentracija se može računati i pomoću količine virusnih proteina u uzorku u testovima hemaglutinacije, gdje se čestice virusa vežu za crvene krve stanice i izazivaju aglutinaciju, te testovima ELISA-e, gdje se mjeri količina antigena (Grigorov i sur. 2011). Virusne čestice se mogu kvantificirati i protočnom citometrijom ili komercijalno dostupnim brojačima virusa. Brojači proteina i čestica su brzi i kvantitativni, ali ne daju informaciju o infektivnosti i funkcionalnosti virusa (Masci i sur. 2019).

1.4.1 Test plakiranja

Test plakiranja je test infektivnosti kojim se kvantificira broj infektivnih čestica u virusnoj suspenziji. Prvotno je razvijen da bi se brojala i mjerila infektivnost bakteriofaga, a zatim je prilagođen za upotrebu u animalnoj virologiji. Test plakiranja se standardno koristi za određivanje titra za brojne viruse (American Type Culture Collection 2012).

Osnova testa plakiranja je mjerenje mogućnosti jedne infektivne čestice da stvori plak, odnosno bijelu čistinu, na staničnom monosloju. Plakovi nastaju u sklopu ciklusa virusne infekcije gdje nakon virusne replikacije, stanica umire (American Type Culture Collection 2012).

Test plakiranja traje tri do 10 dana, ovisno o virusu. U slučaju virusa mumpsa MRV3, test traje šest do osam dana. Vrlo je zahtjevan za izvođenje, a očitavanje je podložno subjektivnosti jer se broje plakovi vidljivi oku operatera koji očitava test (Masci i sur. 2019). Na ishod testa mogu utjecati i faktori poput prerastanja stanica, unošenje virusa u bazenčice, sastav agaroznog pokrova, temperatura inkubacije itd. (Smither i sur. 2013).

Titar virusa izračunat u testu plakiranja izražava se u jedinicama PFU (*eng.* plaque forming unites) po jedinici volumena (American Type Culture Collection 2012).

1.4.2 Test 50% infektivne doze stanične kulture

Virusni titar se može odrediti izračunavanjem infektivne doze što se utvrđuje pomoću testa razrjeđenja krajnje točke. Najproduktivniji takav test određuje razrjeđenje virusa koje će proizvesti patogenu promjenu u 50% inokuliranih stanica, odnosno test 50% infektivne doze stanične kulture (*eng.* 50% cell culture infective dose, CCID₅₀) (American Type Culture Collection 2012).

Testom CCID₅₀ definira se razrjeđenje virusa potrebno za infekciju 50% inokulirane stanične kulture. Za razliku od testa plakiranja, testom CCID₅₀ ne dobiva se informacija o broju infektivnih čestica (American Type Culture Collection 2012).

Za test CCID₅₀ potrebno je više dana za inkubaciju, ovisno o virusu. U slučaju virusa mumpsa MRV3 test traje šest do 10 dana. Za pravilno izvođenje testa potreban je iskusan operater te je test manualno zahtjevan. Standardno se očitava svjetlosnim mikroskopom procjenom prisustva citopatogenog efekta (CPE) u staničnom sloju svakog inokuliranog bazenčića na mikrotitarskoj pločici. Test je podložan subjektivnosti jer se očitava procjenom operatera. Na rezultat očitavanja mogu utjecati i broj bazenčića koji se upotrebljava, broj pasaža korištenih stanica, početno razrjeđenje itd. (Smither i sur. 2013).

Titar virusa izračunat u testu CCID₅₀ izražava se u jedinicama CCID₅₀ po jedinici volumena (American Type Culture Collection 2012).

1.4.3 Konverzija dobivenih vrijednosti titra

Titar dobiven testom CCID₅₀ teoretski se može konvertirati u titar dobiven testom plakiranja koristeći Poissonovu distribuciju. Konverzija se temelji na obrazloženju da će razrjeđenje koje inficira 50% stanične kulture stvoriti jedan plak u staničnom monosloju.

Titar određen u testu CCID₅₀ (u jedinici CCID₅₀/ml) pomnožen s koeficijentom 0.7 daje vrijednost istovjetnu titru određenom testom plakiranja (u jedinici PFU/ml) (American Type Culture Collection 2012).

Međutim, brojna istraživanja pokazuju da se eksperimentalno dobiveni rezultati znatno razlikuju od očekivanih vrijednosti. Za enteroviruse, omjer vrijednosti titra iz testa plakiranja i testa CCID₅₀ iznosi 0.04 za jedan soj i 0.07 za drugi soj virusa, a ne očekivanih 0.7 (Pourianfar i sur. 2012). Forčić i sur. (2010) navode konverzijski koeficijent CCID₅₀ i PFU za različite sojeve mumpsa. Na primjer, za cjepni soj JL-2, izračunat je koeficijent 0.60, za JL-5 0.79 a za Urabe 0.23. Za eksperimentalni soj Du/CRO05 izračunat je koeficijent 1.20. Za soj L-Zagreb, čija se izvedenica MRV3 koristi u ovom istraživanju, koeficijent CCID₅₀ u PFU iznosi 0.1. Rezultati se međusobno znatno razlikuju između sojeva, ali i od teoretske vrijednosti od 0.7.

Različiti sojevi mumpsa stvaraju različite CPE u staničnom supstratu. U testu plakiranja, neki stvaraju velike i jasne plakove (Urabe, JL-5), a drugi manje plakove nejasnih rubova koje je teže očitati (L-Zagreb). Također, u testu CCID₅₀ neki sojevi stvaraju jasno vidljiv sincicij i lako su uočljive morfološke promjene na stanicama (JL-5, Urabe), dok je kod drugih svjetlosnim mikroskopom teže uočiti CPE (L-Zagreb, 9218/LZg98) (Forčić i sur. 2010).

Iako se oba testa široko upotrebljavaju u istraživanjima i proizvodnji cjepiva, odnos između njihovih vrijednosti nije poznat. Važno je da postoji mogućnost točne i precizne konverzije rezultata tih testova jer se, na primjer testovi na animalnim modelima izvode s virusnim uzorcima kojima je titar izražen u jedinicama PFU (Rubin i sur. 2005; Wang i sur. 2020), dok se test CCID₅₀ koristi za određivanje titra u proizvodnji cjepiva (WHO Biologicals Unit 1995). Nepoznavanje konverzijskih koeficijenata otežava dijeljenje podataka i eksperimentalnih procedura te potvrđivanje rezultata između istraživačkih laboratorija.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Poznavanje titra virusa jedan je od osnovnih parametara za karakterizaciju virusnog uzorka te je točno i precizno određivanje titra bitno u istraživanjima u virologiji, vakcinologiji, kontroli kvalitete, genskoj terapiji, istraživanju antiviralnih lijekova itd. Najčešće se za određivanje titra virusa koriste test plakiranja i test 50% infektivne doze stanične kulture (*eng.* 50% cell culture infective dose, CCID₅₀).

Očitavanje testa plakiranja standardno se radi manualno, očitavanjem makroskopski, oku vidljivih plakova, a testa CCID₅₀ svjetlosnim mikroskopom očitavanjem vidljivog citopatogenog efekta (CPE) u staničnoj kulturi. Iz literature je poznato da vidljivost plakova, odnosno CPE ovisi o soju virusa mumpsa, tj. njegovom specifičnom djelovanju na stanični supstrat. Zbog toga rezultati očitavanja titra u oba testa velikim dijelom ovise o objektivnosti i uvježbanosti osobe koja očitava test.

Upotrebom rekombinantnog virusa mumpsa MRV3 s ugrađenim genom za pojačani zeleni fluorescentni protein će se u ovim testovima omogućiti očitavanje na standardan način i fluorescencijskom mikroskopijom. Očekivano je da će očitavanje fluorescencijskim mikroskopom znatno pridonijeti većoj osjetljivosti i objektivnosti u očitavanju testova, a time posredno i u određivanju titra virusa.

Cilj istraživanja je:

- usporediti vrijednosti titra virusa MRV3 koji će se u testovima plakiranja i CCID₅₀ odrediti očitavanjem a) standardnim načinima (makroskopski ili svjetlosnim mikroskopom) i b) fluorescencijskom mikroskopijom
- odrediti preciznosti i pouzdanosti navedenih testova, tj. definirati u kojem se testu izračunata vrijednosti titra manje razlikuju između dva načina očitavanja.
- odrediti eksperimentalni konverzijski koeficijent za pretvaranje vrijednosti titra dobivene testom CCID₅₀ u vrijednosti titra dobivene testom plakiranja za virus mumpsa MRV3 i usporediti s literaturnim podacima.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Stanična kultura

Za potrebe izvođenja testova plakiranja i CCID₅₀ koristila sam staničnu liniju Vero, fibroblaste bubrega afričkog zelenog majmuna (*Cercopithecus aethiops*). Stanična linija nabavljena je iz Europske zbirke životinjskih staničnih kultura (*eng.* European Collection of Animal Cell Cultures, ECACC) za potrebe Laboratorija za molekularnu biomedicinu Centra za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiju Sveučilišta u Zagrebu.

3.1.2 Virusni soj

U svrhu određivanja titra virusa, koristila sam soj MRV3 priređen u Laboratoriju za molekularnu biomedicinu. Virus je priređen *rescue* postupkom (Beatty i sur. 2017) koristeći nukleotidnu konsenzus sekvencu soja L-Zagreb s umetnutim genom koji kodira za pojačani zeleni fluorescentni protein (EGFP) što izaziva fluorescenciju inficiranih stanica.

Na Vero staničnom supstratu, priredila sam dva neovisna pripravka MRV3 virusa, koji su se razlikovali po multiplicitetu infekcije (*eng.* multiplicity of infection, MOI). Svaki pripravak virusa alikvotirala sam u dvadesetak alikvota i pohranila na -80 °C kako bi kod svakog određivanja titra radila s istovjetnim uzorkom.

3.1.3 Kemikalije i otopine

3.1.3.1 Za održavanje i infekciju stanične kulture

- Minimalni esencijalni medij s Earlovim solima (*eng.* Minimal Essential Medium with Earle's Salts, MEM-XA) (Capricorn Scientific)
- penicilin/streptomycin (100x) (PS-B) (Capricorn Scientific)
- L-glutamin 200mM (GLN-B) (Capricorn Scientific)
- fetalni teleći serum (FTS)
- tripsin – etilen-diamino-tetraoctena kiselina (EDTA) (Imunološki zavod d.d.)
- fiziološka otopina s fosfatnim puferom (*eng.* Dulbecco's phosphate buffered saline, PBS-1A) (Capricorn Scientific)

Podloge za uzgoj i supkultivaciju stanica: MEM-XA (PS-B, GLN-B) + 10% FTS.

Otopina za odvajanje stanica od podloge: 0.25%-tna otopina tripsin-EDTA

Podloga za infekciju stanica virusom i pripremu dva neovisna uzorka MRV3: MEM-XA + 2% FTS.

3.1.3.2 Za određivanje titra virusa

3.1.3.2.1 Test plakiranja

- MEM-XA (Capricorn Scientific)
- PS-B (Capricorn Scientific)
- FTS
- Noble agar (USB Corporation)
- Eagleov minimalni esencijalni medij (*eng.* Eagle's Minimum Essential Medium, EMEM) (2x) (Lonza)
- boja neutralno crvenilo (Sigma Aldrich)
- PBS-1A (Capricorn Scientific)
- aktinomicin D (akt D) za primjenu na staničnim kulturama (Sigma Aldrich)
- sterilna voda za injekcije (Imunološki zavod d.d.)

Podloga za prekrivanje staničnog sloja: EMEM (2x) + 10% FTS, bez fenolnog crvenila s dodatkom neesencijalnih aminokiselina, L-glutamina i otopine PS-B.

Podloga za rast stanica u pločama za uzgoj stanica sa 6 bazenčića: MEM-XA (PS-B) + 10% FTS.

Podloga za razrjeđivanje i inokulaciju virusa: MEM-XA + 2% FTS.

Pokrov: 1.5%-tna otopina Nobel agra u vodi i podloga za prekrivanje staničnog sloja u omjeru 1:1.

Otopina za bojanje staničnog pokrova: 0.5%-tno neutralno crvenilo i PBS-1A u omjeru 1:10.

3.1.3.2.2 Test 50% infektivne doze stanične kulture

U testu CCID₅₀, za rast stanica u mikrotitracijskim pločicama koristila sam podlogu od MEM + 5% FTS. Za razrjeđivanje i inokulaciju virusa koristila sam čisti MEM.

- MEM-XA (Capricorn Scientific)
- FTS
- sterilna voda za injekcije (Imunološki zavod d.d.)

Podloga za rast stanica u mikrotitracijskim pločicama: MEM-XA + 5% FTS.

Podloga za razrjeđivanje i inokulaciju virusa: MEM-XA.

3.1.3.3 Za izolaciju RNA

Za izolaciju RNA koristila sam je komercijalni komplet reagensa Zymo Quick-RNA Viral Kit (Zymo Research Group). Kemikalije koje se koriste u izolaciji RNA, a nisu dostupne u kompletu su β -merkaptoetanol, koji se dodaje u RNA pufer, i 100%-tni etanol, koji se dodaje u pufer za ispiranje.

3.1.3.4 Za reverznu transkripciju

Za reverznu transkripciju (RT) koristila sam:

- izoliranu virusnu RNA
- nasumične heksanukleotide
- 5x RT pufer (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl) (Thermo Fisher Scientific)
- 25 mM 2'-deoksinukleozid-5'-trifosfata (dNTP)
- rekombinantni inhibitor ribonukleaze (*eng.* Recombinant Ribonuclease Inhibitor) 20 U/ μ l (Thermo Fisher Scientific)
- M-MLV (*eng.* Moloney Murine Leukemia Virus) reverznu transkriptazu 200 U/ μ l (Thermo Fisher Scientific)

3.1.3.5 Za lančanu reakciju polimerazom

Za lančanu reakciju polimerazom (*eng.* Polymerase Chain Reaction, PCR) koristila sam:

- 5x PCR pufer (20 mM Tris-HCl, 22 mM NH₄Cl, 22 mM KCl, 1.8 mM MgCl₂) (New England Biolabs)
- mješavinu dNTP-a 2.5 nM
- početnicu L5 (GAGATTCTCGACCTACTGAC)
- početnicu L6 (TGGCACGACCTCATTCTCTT)
- One Taq polimerazu 5 U/ μ l (New England Biolabs)
- komplementarnu DNA (cDNA) dobivenu reverznom transkripcijom, opisanom u poglavlju 2.1.3.3.
- vodu bez RNaza i DNaza

3.1.3.6 Za elektroforezu u agaroznom gelu i pročišćavanje PCR produkata iz gela

- Tris (hidroksimetil)-aminometan (Tris) (Sigma-Aldrich)
- HCl
- EDTA (Sigma-Aldrich)
- boratna kiselina (Kemika)
- agaroz (Sigma-Aldrich)
- etidijev bromid (Sigma-Aldrich)
- 5x Gel Loading Dye (BioLabs) za nanošenje uzoraka na gel
- komercijalni komplet Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)
- destilirana voda (Imunološki zavod d.d.)

10 x TBE-pufer:

89 mM Tris-HCl

89 mM boratna kiselina

2 mM EDTA

pH 8.3

Otopina etidijeva bromida:

50 mg etidijev bromid

5 ml destilirana voda

Otopina se čuva na tamnom mjestu na 4 °C.

Agarozni gel (0.9%-tni):

0.5 g agaroze

50 ml 1 x TBE-pufer

Agarozu i pufer sam kuhala dok se agaroz ne rastali, otopinu sam ohladila na 50 do 55 °C i dodala 5 µl etidijeva bromida.

3.1.3.7 Za reakciju sekvenciranja

Za reakciju sekvenciranja koristila sam komercijalni komplet reagensa BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

3.1.3.8 Za pročišćavanje produkata reakcije sekvenciranja

Za pročišćavanje produkata reakcije sekvenciranja koristila sam 125 mM EDTA, apsolutni i 70%-tni etanol i HiDi-formamid (Applied Biosystems).

3.1.4 Uređaji

- fluorescencijski mikroskop EVOS FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific)
- fluorescencijski mikroskop ZOE Fluorescent Cell Imager (BIORAD)
- genski analizator 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

3.2 Metode

3.2.1 Uzgoj kulture Vero stanica

Stanice sam uzgojila u T-boci od 25 cm², nakon čega sam izvadila potrošenu podlogu i stanice isprala puferom PBS. Nakon toga sam dodala 0.25%-tnu otopinu tripsin-EDTA da bi se enzimatskom digestijom stanice odvojile od površine boce. Nakon 3-5 min, kada su se stanice odvojile od površine, u staničnu suspenziju dodala sam podlogu za uzgoj stanica (u omjeru 1:10 s otopinom tripsin-EDTA), kako bi FTS iz podloge inaktivirao tripsin. Stanice sam provukla kroz nastavak za pipetu 10-ak puta da bi se stvorila stanična suspenzija pojedinačnih stanica. Staničnu suspenziju razrijedila sam svježom podlogom u omjeru 1:10 u novoj boci (10 ml za bocu od 25 cm²) za daljnji uzgoj stanica, u trajanju 3 – 4 dana u inkubatoru u kontroliranim uvjetima pri 37 °C u atmosferi koja sadrži 95% zraka i 5% CO₂.

Stanice koje sam koristila u testu, potrebno je bilo najprije istaložiti centrifugiranjem pri 150 x g 5 min. Talog stanica sam pomiješala sa svježom podlogom za uzgoj i resuspendirala. Stanice sam prebrojila u Neubauerovoj komorici i odredila njihovu koncentraciju (st/ml). Broj stanica sam podesila zavisno o potrebi testa za koji koristim stanice i nasadila ih u T-boce ili pločice s bazenčićima za uzgoj.

3.2.2 Priprema virusnih uzoraka

Za potrebe ovog istraživanja, od početnog uzorka MRV3 iz druge pasaže na Vero stanicama (2pV), jednom pasažom u Vero stanicama priredila sam dva virusna uzorka. Uzorci su se razlikovali u početnoj količini virusnih čestica kojom je inficirana Vero stanična kultura, odnosno multiplicitetu infekcije (MOI). MOI izražava omjer broja virusnih čestica i broja stanica.

U virologiji je dokazano da se upotrebom različitih vrijednosti MOI pri početnoj infekciji dobivaju uzorci s različitom količinom novo produciranog virusa (Thompson i Yin 2010).

Početnom uzorku MRV3 2pV prethodno je određen titar, koji je iznosio 2.2×10^5 PFU/ml. Na osnovu prethodno određenog titra, izračunala sam koja je količina virusa potrebna za infekciju kako bi se dobio uzorak s željenim MOI. Virusom sam inficirala Vero staničnu suspenziju.

U prvu bocu (150 cm^2) dodala sam 1.5×10^7 stanica (10^6 stanica/ cm^2) i 3×10^5 virusnih čestica tako da MOI iznosi 0.02 (visoki MOI).

U drugu bocu (150 cm^2) dodala sam 1.5×10^7 stanica (10^6 stanica/ cm^2) i 3×10^3 virusnih čestica tako da MOI iznosi 0.0002 (niski MOI).

Inficirane stanice sam stavila na inkubaciju devet dana pri $35 \text{ }^\circ\text{C}$ u atmosferi s 5% CO_2 . Uzorke sam iz T-boca prebacila u plastične epruvete za centrifugiranje od 50 ml i centrifugirala pri 4000 rpm 10 min. Nakon toga, svaki sam uzorak alikvotirala u 40 epruveta od 1.5 ml. Alikvotirane uzorke pohranila sam pri $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ do daljnje uporabe.

Dobivene uzorke sam označila kao:

Virus MRV3, treća pasaža na Vero stanicama, visoki MOI; kratica oznake je: MRV3 3pV VM.

Virus MRV3, treća pasaža na Vero stanicama, niski MOI; kratica oznake je: MRV 3 3pV NM.

3.2.3 Određivanje virusnog titra

3.2.3.1 Test plakiranja

Test plakiranja temelji se na replikaciji virusa u staničnom monosloju. Inficirani monosloj se prekriva polukrutim pokrovom koji omogućava replikaciju virusa samo u inficiranim stanicama i infekciju njima susjednim stanicama, a onemogućava infekciju udaljenih stanica. Zbog toga se CPE pojavljuje u obliku plakova ili čistina u staničnom sloju pa jedan plak nastaje kao posljedica infekcije jednom virusnom česticom. Titar virusa se izražava u jedinicama stvaranja plakova (*eng.* plaque forming units, PFU) po jedinici volumena. Jedinice PFU/ml u virologiji se često izražavaju u obliku logaritma (log) kako bi se podaci lakše prikazali.

U pločicu sa šest bazenčića nasadila sam Vero stanice, u koncentraciji 1×10^6 st/ml, a pločica sam inkubirala 48 h da bi se postigao konfluentni stanični monosloj. U staklenim epruvetama pripremila sam nizove predrazrjeđenja i razrjeđenja virusa s podlogom MEM + 2% FTS. Iz bazenčića sa stanicama sam uklonila supernatant i automatskom pipetom inokulirala

po 1 ml svakog razrjeđenja u duplikatu na jednoj pločici. Inokulacija sam radila od najvećeg razrjeđenja prema najmanjem. U bazenčice za negativnu kontrolu inokulirala sam 1 ml čistog medija MEM + 2% FTS. Nakon infekcije stanica od 1.5 sat na temperaturi od 35 °C u atmosferi s 5% CO₂, supernatant inficirane kulture sam uklonila, počevši od najvećeg razrjeđenja virusa prema najmanjem, i inficirani stanični sloj prekrila polukrutim pokrovom.

Pokrov za inficirani stanični monosloj sam priredila od 1.5%-tne otopine Nobel agra u destiliranoj vodi i podloge EMEM (2x) + 10% FTS. Nobel agar sam izvagala i otopila u vodi na plinskom plameniku. Podlogu i otopinu Nobel agra sam stavila u vodenu kupelj na temperaturu od 43 °C da bi ih neposredno prije dodavanja pokrova u bazenčice mogla pomiješati u omjeru 1:1. Volumen pokrova za jedan bazenčić iznosio je 3 ml, odnosno 18 ml za jednu pločicu.

Inficirani stanični monosloj sam prekrila pripremljenim pokrovom i ostavila 15 - 20 min da se stvrdne. Zatim sam pločice zamotala u prozirnu foliju i stavila na inkubaciju šest dana pri temperaturi od 35 °C u atmosferi s 5% CO₂.

Šest dana poslije, u svaki bazenčić sam dodala 1 ml otopine za bojanje. Nakon inkubacije 1 sat pri temperaturi od 35 °C u atmosferi s 5% CO₂, uklonila sam višak otopine za bojanje te nastavila inkubaciju u istim uvjetima još četiri sata.

U svakom bazenčiću sam makroskopski (okom) očitala broj plakova, odnosno bijele čistine na crveno obojanom staničnom monosloju. Osim okom, broj plakova sam očitavala i fluorescencijskim mikroskopom EVOS gdje se plakovi vide jer zeleno fluoresciraju naspram neinficiranog staničnog monosloja. Prema WHO Expert Committee on biological Standardization (1994), poželjno je da broj plakova u najmanjem razrjeđenju ne bude veći od 80, a da u najvećem razrjeđenju bude oko 10. Titar virusa (PFU/ml) sam odredila očitavanjem plakova makroskopski i očitavanjem fluorescencijskim mikroskopom. Titar sam izračunala za svako razrjeđenje virusa po formuli:

$$\text{PFU/ml} = \text{srednja vrijednost broja plakova po razrjeđenju} \times \text{recipročna vrijednost razrjeđenja}$$

Test plakiranja je bio valjan ako je odstupanje vrijednosti titra od srednje vrijednosti manje od 0.5 log i ako je 95%-tni interval pouzdanosti ≤ 0.3 log (WHO Expert Committee on biological Standardization 1994).

3.2.3.1.1 Dodatak aktinomicina D u pokrov u testu plakiranja

Prema literaturnim podacima, aktinomicin D (akt D) dodan u pokrov u testu plakiranja utječe na jasniju pojavnost plakova (Zhang i sur. 2012; Xu i sur. 2019). Vero stanični sloj inficirala sam virusnim uzorkom MRV3 3pV NM (razrjeđenja: 2×10^{-5} , 4×10^{-5} , 8×10^{-5}). Akt D početne koncentracije 1 mg/ml dodala sam u pokrov tako da konačne koncentracije u pokrovu budu:

0.1 $\mu\text{g/ml}$ – 3 μl akt D po bazenčiću,

0.2 $\mu\text{g/ml}$ – 6 μl akt D po bazenčiću,

0.3 $\mu\text{g/ml}$ – 9 μl akt D po bazenčiću.

3.2.3.2 Test 50% infektivne doze stanične kulture

Slično kao i u testu plakiranja, u testu CCID_{50} replikacija virusa izaziva CPE u Vero staničnoj kulturi koji je jasno vidljiv pod svjetlosnim mikroskopom, najčešće kao sincicij. Testom sam utvrdila razrjeđenje virusnog uzorka koje izaziva CPE u 50% inokuliranih staničnih kultura.

Po 0.1 ml stanične suspenzije, čija je koncentracija 1.6×10^5 st/ml, stavila sam u svaki bazenčić na pločici za rast stanica sa 96 bazenčića. U staklenim epruvetama priredila sam predrizrjeđenja i razrjeđenja virusa u podlozi MEM. Multikanalnom pipetom, na stanice sam dodala po 0.05 ml svakog razrjeđenja virusa i 0.05 ml podloge MEM. U svakom postupku određivanja titra virusa testom CCID_{50} , jednu pločicu postavila sam kao negativnu kontrolu stanica i u nju sam dodala 0.1 ml čistog medija, a dvije pločice sam postavila s laboratorijskim referentnim sojem mumpsa kao pozitivne kontrole testa.

Pločice sam stavila na inkubaciju 10 dana pri temperaturi od $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ u atmosferi s 5% CO_2 . Nakon toga, svjetlosnim mikroskopom pregledavala sam bazenčiće u pločici i bilježila one s pojavom CPE na stanicama. Također, bazenčiće sam pregledavala i fluorescencijskim mikroskopom, gdje sam CPE uočila zbog zelene fluorescencije. Titar virusa ($\text{CCID}_{50}/\text{ml}$) sam izračunala po Spearman-Karber formuli:

$$\log \text{CCID}_{50} = L - d / (S - 0,5)$$

pri čemu je

L = log početnog razrjeđenja, d = log faktor razrjeđenja, S = broj bazenčića s CPE.

Test CCID₅₀ je bio valjan ako je odstupanje od srednje vrijednosti manje od 0.5 log i ako je 95%-tni interval pouzdanosti ≤ 0.3 log (WHO Expert Committee on biological Standardization 1994).

3.2.4 Statistička analiza rezultata

Statističku analizu rezultata svakog pojedinog testa provela sam pomoću programa GraphPad Prism (San Diego, CA). Odredila sam srednju vrijednost, standardnu devijaciju (SD) i granice intervala 95%-tne pouzdanosti (CI). U testu plakiranja sam t-testom usporedila rezultate između ponavljanja te između dva razrjeđenja. Usporedila sam t-testom rezultate između dva načina očitavanja korištena u testu plakiranja i testu CCID₅₀.

3.2.5 Uzorkovanje i kultiviranje virusa iz plakova

Nakon pregledavanja pločica u testu plakiranja, uzorkovala sam plakove. Uzorkovala sam dva plaka koji su vidljivi makroskopski, kao bijele čistine, i tri plaka koje nisam vidjela makroskopski, već samo pod fluorescencijskim mikroskopom. Plakove sam locirala u bazečiću i uzorkovala pomoću nastavka za pipetu, te prebacila u T-bocu od 25 cm² s 10⁶ stanica u MEM + 2% FTS za daljnju replikaciju virusa. Boce sam dalje stavila na inkubaciju pri 35 °C u atmosferi s 5% CO₂. Nakon inkubacije od 7 – 14 dana, supernatante kultura s umnoženim virusima sam centrifugirala 10 min pri 4000 rpm. Umnožene viruse iz svakog od pet uzorkovanih plakova alikvotirala sam u pet alikvota od po 1.5 ml i pohranila pri -80 °C.

3.2.6 Izolacija RNA

Virusnu RNA sam izolirala pomoću Zymo Quick-RNA Viral Kit prema uputstvima proizvođača. Nakon izolacije, virusnu RNA sam odmah koristila za reverznu transkripciju (3.2.7).

3.2.7 Reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija (RT) provodi se da bi se izolirana virusna RNA prevela u cDNA. Samoju RT prethodi korak denaturacije RNA (preRT) u trajanju od 5 min pri 65 °C (Tablica 1). Ostatak reakcijske smjese za RT (Tablica 2) dodala sam za svaki uzorak u PCR epruvete nakon preRT koraka. Epruvete sam stavila u PCR uređaj i reakcijske uvjete postavila kao što je prikazano u tablici 3. Priređenu cDNA sam do daljnje uporabe čuvala na 4 °C ili pohranila na -20 °C.

Tablica 1. Reakcijska smjesa za preRT jednog uzroka i volumen za svaku komponentu.

komponente	volumen (μl)
izolirana RNA	10
nasumični heksonukleotidi	1

Tablica 2. Reakcijska smjesa za reverznu transkripciju jednog uzorka i volumen za svaku komponentu.

komponente	volumen (μl)
5x RT pufer	4
25 mM mješavine dNTP	4
inhibitor rekombinantne ribonukleaze, 20 U/ μl	1
M-MLV reverzna transkriptaza, 50 U/ μl	1
reakcijska smjesa iz preRT	11

Tablica 3. Reakcijski uvjeti za reverznu transkripciju.

	Faza reakcije		
	Reverzna transkripcija	Denaturacija M-MLV	Hlađenje
Vrijeme/ temp.	50 min/ 37 °C	15 min/ 70 °C	5 min/ 4 °C

3.2.8 Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (*eng.* Polymerase Chain Reaction, PCR) je metoda koja omogućuje *in vitro* eksponencijalno umnažanje fragmenata od interesa. Za PCR koristila sam OneTaq polimeraza. Amplificirala sam dio gena L koji kodira virusnu polimerazu, za što sam koristila uzvodnu početnicu L5 i nizvodnu početnicu L6. Reakcijska smjesa je navedena u tablici 4. Uvjeti amplifikacije navedeni su u tablici 5.

Tablica 4. Reakcijska smjesa za PCR jednog uzorka koristeći polimerazu One Taq i volumen za svaku komponentu. Konačni volumen reakcijske smjese jednog uzorka iznosi 50 μl .

komponenta	volumen (μl)
5x standardni pufer za One Taq polimerazu	10
mješavina dNTP 2.5 mM	4
početnica L5, 20 μM	1
početnica L6, 20 μM	1
One Taq polimeraza, 5 U/ μl	0.25
cDNA	5
H ₂ O	28.75

Tablica 5. Reakcijski uvjeti za PCR.

Korak	Početna denaturacija	Denaturacija	Vežanje početnica	Ekstenzija	Završna ekstenzija
Vrijeme/temp.	3 min/94 °C	25 s/94 °C	25 s/94 °C	1 min/68 °C	5 min/68 °C
Broj ciklusa amplifikacije: 40					

3.2.9 Elektroforeza u agaroznom gelu i pročišćavanje PCR produkata iz gela

PCR uzorke razdvojila sam i vizualizirala elektroforezom na 1%-tnom agaroznom gelu s dodatkom etidijevog bromida. Agarozni gel priredila sam u volumenu od 50 ml iz agaroze otopljene u 1x TBE puferu, dodala 5 µl otopine etidijevog bromida i izlila u kalup s postavljenim češljicima. Nakon što se gel stvrdnuo, nanijela sam uzorke. Prije nanošenja, uzorke sam pomiješala s puferom za nanošenje uzorka (6x Gel Loading Dye) u omjeru 1:10. Elektroforezu PCR produkata provodila sam 20 min u kadici za horizontalnu elektroforezu, pri sobnoj temperaturi u 1x TBE puferu pri 100 mV.

PCR produkte sam za potrebe sekvenciranja izrezala iz gela i pročistila pomoću kompleta reagensa Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System prema uputama proizvođača.

3.2.10 Reakcija sekvenciranja

Sekvencijska reakcija je reakcija polimerazom u kojoj se koristi smjesa deoksinukleotida i fluorescentno obilježenih dideoksinukleotida. Dideoksinukleotidi nemaju OH skupinu na 2' ni na 3' ugljikima šećera pa kad se ugrade u lanac, onemogućuju daljnju sintezu lanca DNA. Njihovu ugradnju obavlja Taq-DNA-polimeraza koja ne posjeduje 3'→5' egzonukleaznu aktivnost. Komponente reakcijske smjese su navedene u tablici 6. Uvjeti amplifikacije navedeni su u tablici 7.

Tablica 6. Reakcijska smjesa za sekvencijsku reakciju jednog uzorka i volumen za svaku komponentu. Konačni volumen smjese iznosi 20 µl.

komponente	volumen (µl)
5x Sequencing pufer	4
reakcijska smjesa Big Dye	2
početnica L5, 3.3 µM	1
H ₂ O	8
pročišćeni PCR produkt	5

Tablica 7. Reakcijski uvjeti za sekvencijsku reakciju.

Korak	35 ciklusa amplifikacije		
	denaturacija	vezanje početnica	ekstenzija
vrijeme/temp.	20 s/95 °C	15 s/52 °C	3 min/60 °C

3.2.11 Pročišćavanje reakcije sekvenciranja

Pročišćavanje reakcije sekvenciranja sam provela da bi se uklonili prvenstveno nevezani dideoksinukleotidi. Protokol za jedan uzorak:

- U Eppendorf epruvetu od 1.5 ml dodala sam 5 μ L 125 mM EDTA, 20 μ L reakcijske smjese iz reakcije sekvenciranja i 60 μ L apsolutnog etanola, uzorak sam kratko promiješala na miješalici i stavila na inkubaciju 15 min na sobnoj temperaturi
- Uzorak sam centrifugirala 30 min pri 10000 x g
- Supernatant sam u potpunosti uklonila, ostavila sam talog
- Na talog sam dodala 60 μ L 70%-tnog etanola
- Uzorak sam centrifugirala 15 min pri 10000 x g
- Supernatant sam u potpunosti uklonila, talog sam stavila da se osuši na zraku
- Talog sam otopila u 10 μ l HiDi-formamida.

3.2.12 Sekvenciranje i analiza nukleotidnog slijeda

Uzorke sam sekvencirala Sanger metodom (Hagemann 2015). Pročišćene produkte otopljene u HiDi-formamidu sam nanijela u pločicu za automatsko uzorkovanje (*eng.* autosampler). Fragmenti DNA iz sekvencijske reakcije razdvojeni su kapilarnom elektroforezom u genskom analizatoru 3130 Genetic Analyzer s četiri kapilare, s POP6 polimerom i 1x Tris EDTA puferom. Detekcija fluorescencije odvijala se pomoću laserskog čitača i signali su automatski sakupljeni pomoću programa Run 3130 Data Collection i obrađeni pomoću programa Sequencing Analysis 5.2. Za pregledavanje elektroferograma koristila sam program Chromas (Technelysium). Nukleotidni slijed dobiven sekvenciranjem sam dalje uspoređivala s nukleotidnim slijedom gena od interesa. Za analizu sekvenci i uspoređivanje, koristila sam program Clone Manager Suite (Sci Ed Software).

4. REZULTATI

U ovom radu, određivala sam titar za uzorke MRV3 3pV VM i MRV3 3pV NM koje sam priredila iz početnog uzorka virusa MRV3 2pV kroz jednu pasažu na Vero stanicama. MRV3 sadrži gen za EGFP čime je omogućeno očitavanje titra, osim standardno, i fluorescencijskim mikroskopom.

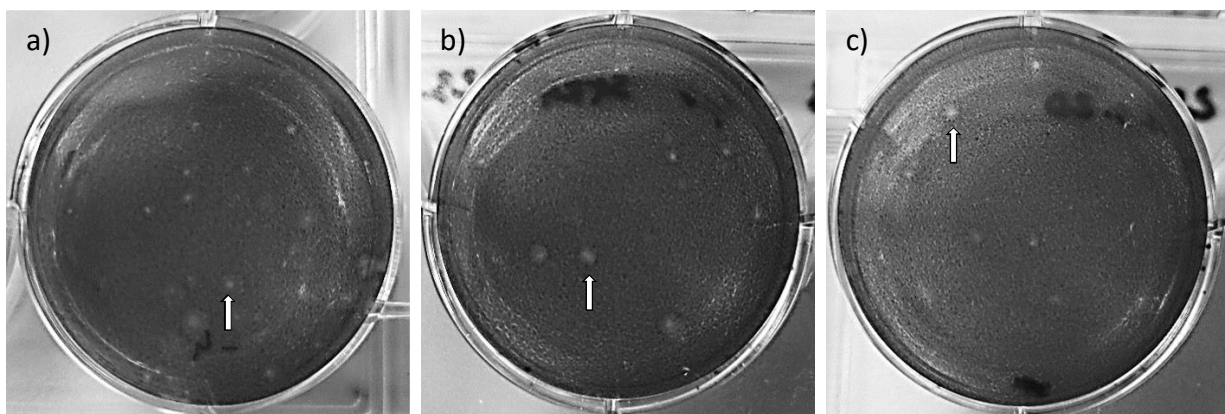
Za oba uzorka, provela sam test plakiranja i test CCID₅₀. Test plakiranja sam očitavala makroskopski i fluorescencijskim mikroskopom EVOS. Test CCID₅₀ sam očitavala svjetlosnim mikroskopom i fluorescencijskim mikroskopom ZOE.

4.1 Uzorak MRV3 3pV VM

4.1.1 Virusni titar uzorka MRV3 3pV VM određen testom plakiranja

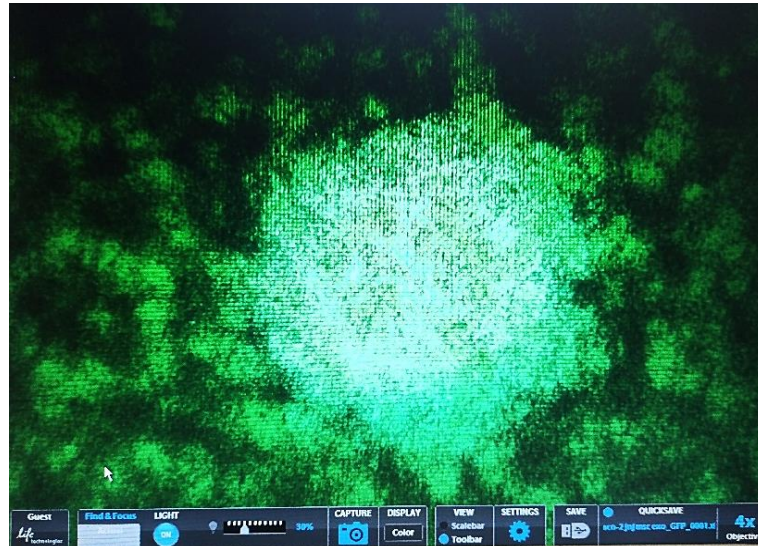
Kako bih preliminarno odredila titar, provela sam test s razrjeđenjima od 10^{-1} do 10^{-7} . Za uzorak MRV3 3pV VM (dalje označen kao VM) testove sam izvodila s radnim razrjeđenjima 1×10^{-4} , 2×10^{-4} , 4×10^{-4} u duplikatu. Za svako pojedino ponavljanje i pojedino razrjeđenje, broj plakova po razrjeđenju, srednju vrijednost plakova i izračun PFU/ml titra prikazala sam u prilogu I.

Makroskopsko očitavanje provela sam brojanjem vidljivih plakova (Slika 6) u bazenčićima s minimalno 10 i maksimalno 80 plakova (WHO Expert Committee on biological Standardization 1994).



Slika 6. Rezultati infekcije Vero stanica rekombinantnim virusom mumpsa MRV3 iz treće pasaže na Vero stanicama s visokim multiplicitetom infekcije (MRV3 3pV VM) u testu plakiranja izvedenom s tri različita razrjeđenja virusa: a) 1×10^{-4} , b) 2×10^{-4} , c) 4×10^{-4} . Šesti dana nakon infekcije vidljivi su plakovi (označeni strelicama).

Očitavanjem fluorescencijskim mikroskopom svaki je plak bio vidljiv kao zeleno fluorescirajući u odnosu na nefluorescirajuće neinficirane stanice (Slika 7). Kako bih mogla usporediti rezultate dobivene očitavanjem makroskopski i fluorescencijskim mikroskopom, brojala sam plakove u istim bazenčićima.



Slika 7. Primjer plaka uzrokovanog rekombinantnim virusom MRV3, s ugrađenim genom za zeleni fluorescentni protein, na Vero stanicama u testu plakiranja. Inficirane stanice zeleno fluoresciraju što omogućuje očitavanje testa fluorescencijskim mikroskopom EVOS (povećanje 4x).

Test plakiranja uzorka VM očitavala sam za razrjeđenja 2×10^{-4} i 4×10^{-4} i izračunala titar. Test sam izvodila u 10 ponavljanja i dobila 10 rezultata za oba načina očitavanja (Tablica 8). Titar nisam izračunala za razrjeđenje 1×10^{-4} zbog prevelikog broja plakova u bazenčiću kod očitavanja fluorescencijskim mikroskopom.

Tablica 8. Rezultati određivanja titra u testu plakiranja uzorka rekombinantnog virusa mumpsa MRV3 iz treće pasaže na Vero stanicama s visokim multiplicitetom infekcije (MRV3 3pV VM), očitanom makroskopski i fluorescencijskim mikroskopom. Prikazan je titar za razrjeđenja virusa 2×10^{-4} i 4×10^{-4} u 10 ponavljanja, apsolutne razlike titra između razrjeđenja, apsolutne razlike titra između vrijednosti dobivenih različitim načinima očitavanja, srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD) i srednja vrijednost \pm 95%-tni interval pouzdanosti (CI). Plavom bojom u tablici su označene statistički značajne vrijednosti ($P < 0.0001$).

	MAKROSKOPSKI			FLUORESCENCIJSKA MIKROSKOPIJA			RAZLIKA vrijednosti dobivenih različitim načinima očitavanja	
	2×10^{-4}	4×10^{-4}	razlika	2×10^{-4}	4×10^{-4}	razlika	2×10^{-4}	4×10^{-4}
ponavljanje	logPFU/ml	logPFU/ml	logPFU/ml	logPFU/ml	logPFU/ml	logPFU/ml	logPFU/ml	logPFU/ml
1	5.633	5.663	0.029	5.973	6.079	0.106	0.340	0.416
2	5.477	5.763	0.286	5.968	6.086	0.118	0.491	0.323
3	5.531	5.146	-0.385	5.944	5.964	0.019	0.413	0.818
4	5.447	5.556	0.109	5.949	6.064	0.115	0.502	0.508
5	5.643	5.505	-0.138	6.025	5.991	-0.034	0.382	0.486
6	5.477	5.580	0.103	5.991	6.025	0.034	0.514	0.446
7	5.531	5.623	0.092	6.013	5.954	-0.059	0.481	0.331
8	5.491	5.477	-0.014	5.959	6.009	0.050	0.468	0.531
9	5.531	5.342	-0.189	6.021	6.009	-0.012	0.490	0.666
10	5.415	5.477	0.062	6.017	6.057	0.040	0.602	0.580
srednja vrijednost \pm SD	5.518 \pm 0.074	5.513 \pm 0.173	-0.004 \pm 0.111	5.986 \pm 0.031	6.024 \pm 0.047	0.038 \pm 0.038	0.468 \pm 0.074	0.511 \pm 0.151
srednja vrijednost \pm CI	5.518 \pm 0.053	5.513 \pm 0.124	/	5.986 \pm 0.022	6.024 \pm 0.034	/	/	/

Odstupanje od srednje vrijednosti bilo je manje ako sam test očitavala fluorescencijskim mikroskopom (0.039 – 0.042 log), nego makroskopski (od 0.071 – 0.126 log) i nije prelazilo 0.5 log u niti jednom slučaju. Interval pouzdanosti nije prelazio granice od 0.3 log za oba načina očitavanja (Tablica 8).

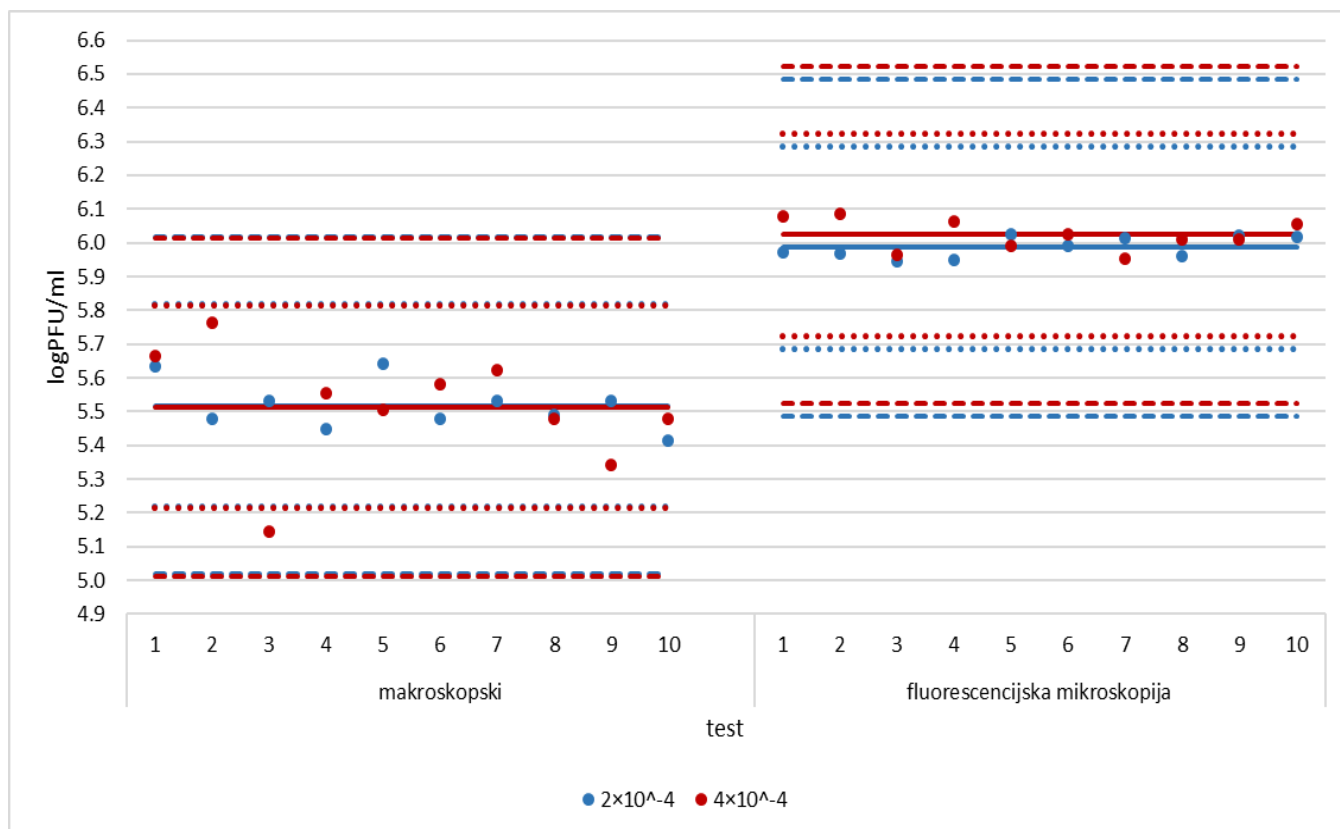
Raspon razlika između razrjeđenja 2×10^{-4} i 4×10^{-4} bile su veće kod makroskopskog očitavanja (-0.385 – 0.286 log) nego očitavanja fluorescencijskim mikroskopom (-0.059 – 0.118 log) (Tablica 8), ali nisu prelazile 0.5 log.

Srednje vrijednosti titra koje sam izračunala iz oba razrjeđenja bile su gotovo istovjetne: 5.518 log i 5.513 log za makroskopsko očitavanje te 5.986 log i 6.024 log za očitavanje fluorescencijskim mikroskopom.

Utvdila sam da između dva uspoređena razrjeđenja nije bilo statistički značajnih razlika (makroskopski $-0.004 \log$, $P = 0.94$; fluorescencijskim mikroskopom $0.038 \log$, $P = 0.09$). To pokazuje da sam testove plakiranja tehnički dobro izvela i očitala te da je vrijednost titra bila pouzdana uzevši u obzir način očitavanja. Zbog toga sam u daljnjim analizama koristila vrijednosti titra koje sam izračunala iz razrjeđenja 2×10^{-4} i očitala makroskopski i fluorescencijskim mikroskopom.

Uspoređujući titar s obzirom na način očitavanja, virusni titar bio je veći ako sam test očitala fluorescencijskim mikroskopom u svih 10 ponavljanja (Tablica 8, Slika 8). Srednja vrijednost titra, za razrjeđenje 2×10^{-4} , iznosila je $5.518 \log$ ako sam test očitala makroskopski, a $5.986 \log$ ako sam test očitala fluorescencijskim mikroskopom. Srednja vrijednost razlika titra između dva načina očitavanja iznosila je $0.468 \log$. Provela sam statističku analizu rezultata dobivenih očitavanjem makroskopski i fluorescencijskim mikroskopom, za razrjeđenje 2×10^{-4} , pomoću parnog t testa koji je pokazao da postoji statistički značajna razlika ($P < 0.0001$) između dva načina očitavanja (Tablica 8). Očitavanjem fluorescencijskim mikroskopom dobila sam u svim ponavljanjima veći titar.

Vrijednosti razlika između očitavanja na dva navedena načina bile su velike ($0.323 - 0.818 \log$), i u pet od 10 ponavljanja su graničile s $0.5 \log$ ili prelazile $0.5 \log$. Očitavanjem fluorescencijskim mikroskopom uočila sam plakove koji su makroskopski nevidljivi. Ti podaci su pokazali da postoji veliki nedostatak u očitavanju testa plakiranja makroskopski i da sam očitavanjem fluorescencijskim mikroskopom dobila viši titar virusnog uzorka VM.



Slika 8. Grafički prikaz vrijednosti titra uzorka rekombinantnog virusa mumpsa MRV3 iz treće pasaže na Vero stanicama s visokim multiplicitetom infekcije (MRV3 3pV VM) iz testa plakiranja očitano makroskopski i fluorescencijskim mikroskopom, iz razrjeđenja 2×10^{-4} i 4×10^{-4} . Prikazane su linije srednje vrijednosti titra za oba razrjeđenja s oba načina očitavanja (ravne pune linije), linije dozvoljenog odstupanja od 0.5 log (isprekidane linije) i linije dozvoljenog odstupanja od 0.3 log (točkaste linije).

4.1.2 Virusni titar uzorka MRV3 3pV VM određen testom 50% infektivne doze stanične kulture

Kako bih preliminarno odredila titar, u testu $CCID_{50}$, provela sam testove s početnim razrjeđenjima 3×10^{-4} i faktorom razrjeđenja 0.33. Prema tome sam za uzorak VM odredila početno razrjeđenje 10^{-3} . Test sam radila u pet vremenskih točaka i svaki put priredila sam četiri nezavisna niza razrjeđenja, te sam dobila ukupno 20 pločica za očitavanje testa.

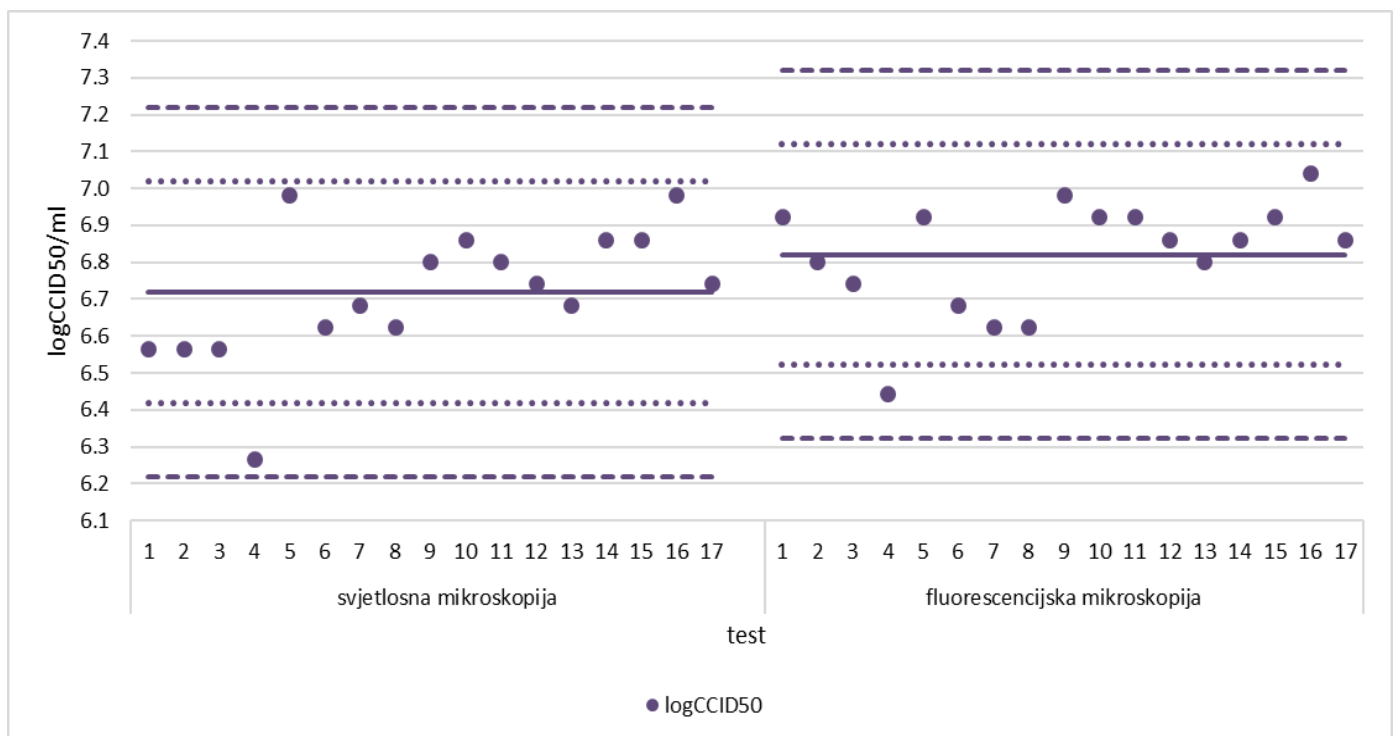
Odbacila sam tri rezultata od 20, i prikazala ukupno 17 rezultata, za oba načina očitavanja (Tablica 9). Za svaki pojedini test, svako ponavljanje, izračunat korigirani i nekorigirani titar, prikazala sam u prilogu II.

Odstupanje od srednje vrijednosti nije prelazilo 0.5 log u nijednom ponavljanju. Interval pouzdanosti nije prelazio granicu od 0.3 log za oba načina očitavanja, osim u četvrtom ponavljanju (Slika 9).

U 13 od 17 ponavljanja, izračunala sam veći titar ako sam test očitala fluorescencijskim mikroskopom. Veći titar sam izračunala ako sam test očitala svjetlosnim mikroskopom u odnosu na fluorescencijski u petom (6.982 log u odnosu na 6.922 log) i sedmom (6.984 log u odnosu na 6.624 log) ponavljanju testa (Slika 9).

Kod očitavanja svjetlosnim mikroskopom, srednja vrijednost titra iznosila je 6.719 log, kod očitavanja fluorescencijskim mikroskopom 6.821 log, dok je razlika srednjih vrijednosti iznosila 0.102 log, što je ulazilo unutar dozvoljene granice 95%-tnog intervala od 0.3 log i znači da sam test dobro izvela. Provela sam statističku analizu rezultata dobivenih očitavanjem svjetlosnim i fluorescencijskim mikroskopom, pomoću parnog t testa koji je pokazao da postoji statistički značajna razlika ($P = 0.0012$) između dva načina očitavanja. Razlike titra između dva načina očitavanja bile su u rasponu 0.000 log do 0.385 log (Tablica 9).

Rezultati su pokazali da očitavanje testa $CCID_{50}$ fluorescencijskim mikroskopom neznatno utječe na vrijednost titra, te da je standardni način očitavanja testa svjetlosnim mikroskopom bio visoko pouzdan.



Slika 9. Grafički prikaz vrijednosti virusnog titra uzorka rekombinantnog virusa mumpsa MRV3 iz treće pasaze na Vero stanicama s visokim multiplicitetom infekcije (MRV3 3pV VM) iz testa 50% infektivne doze stanične kulture ($CCID_{50}$) očitano svjetlosnim mikroskopom i fluorescencijskim mikroskopom, u 17 ponavljanja. Prikazane su linije srednje vrijednosti titra za oba načina očitavanja (pune linije), linije dozvoljenog odstupanja od 0.5 log (isprekidane linije) i linije dozvoljenog odstupanja od 0.3 log (točkaste linije).

Tablica 9. Rezultati određivanja titra u testu 50% infektivne doze stanične kulture (CCID₅₀) za rekombinanti virus mumpsa MRV3 iz treće pasaže na Vero stanicama s visokim multiplicitetom infekcije (MRV3 3pV VM), očitano svjetlosnim mikroskopom i fluorescencijskim mikroskopom, u 17 ponavljanja. Rezultati su u tablici odijeljeni obzirom na vremenske točke očitavanja testa isprekidanom crtom. Prikazane su razlike vrijednosti titra dobivene iz dva načina očitavanja, srednje vrijednosti ± standardna devijacija (SD) i srednje vrijednosti ± 95%-tni interval pouzdanosti (CI). Plavom bojom u tablici je označena statistički značajna vrijednost (P = 0.0012).

ponavljanje	Svjetlosni mikroskop	Fluorescencijski mikroskop	razlika nekorigiranih logCCID ₅₀ /1ml
	nekorigirani logCCID ₅₀ u volumenu 1 ml	nekorigirani logCCID ₅₀ u volumenu 1 ml	
1	6.565	6.922	0.358
2	6.565	6.803	0.239
3	6.565	6.743	0.179
4	6.266	6.445	0.179
5	6.982	6.922	-0.060
6	6.624	6.684	0.060
7	6.684	6.624	-0.060
8	6.624	6.624	0.000
9	6.803	6.982	0.179
10	6.863	6.922	0.060
11	6.803	6.922	0.119
12	6.743	6.863	0.119
13	6.684	6.803	0.119
14	6.863	6.863	0.000
15	6.863	6.922	0.060
16	6.982	7.042	0.060
17	6.743	6.863	0.119
srednja vrijednost ± SD	6.719 ± 0.179	6.821 ± 0.153	0.102 ± 0.091
srednja vrijednost ± CI	6.719 ± 0.092	6.821 ± 0.079	/

4.2 Uzorak MRV3 3pV NM

4.2.1 Virusni titar uzorka MRV3 3pV NM određen testom plakiranja

Napravila sam testove s razrjeđenjima od 10^{-1} do 10^{-7} , kako bih preliminarno odredila titar. Za uzorak MRV3 3pV NM (dalje označen kao NM) priredila sam razrjeđenja 2×10^{-5} , 4×10^{-5} , 8×10^{-5} u duplikatu. Za svako pojedino ponavljanje i pojedino razrjeđenje, broj plakova po razrjeđenju, srednja vrijednost plakova i izračun PFU/ml titra prikazala sam u prilogu III.

Test sam očitavala na isti način kao i za uzorak VM (poglavlje 3.1.1), ali sam očitavala razrjeđenja 4×10^{-5} i 8×10^{-5} . Izračunala sam titar za 10 ponavljanja i dobila 10 rezultata za oba načina očitavanja (Tablica 10). Titar nisam izračunala za razrjeđenje 2×10^{-5} zbog prevelikog broja plakova u bazenčiću kod očitavanja fluorescencijskim mikroskopom.

Tablica 10. Rezultati određivanja titra u testu plakiranja rekombinantog virusa mumpsa iz treće pasaže na Vero stanicama s niskim multiplicitetom infekcije (MRV3 3pV NM), očitano makroskopski i fluorescencijskim mikroskopom. Prikazan je titar za razrjeđenja 4×10^{-5} i 8×10^{-5} u 10 ponavljanja, apsolutne razlike titra između dva razrjeđenja, razlike vrijednosti titra dobivene različitim načinima očitavanja, srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD) i srednja vrijednost \pm 95%-tni interval pouzdanosti (CI). Plavom bojom u tablici su označene statistički značajne vrijednosti ($P < 0.0001$).

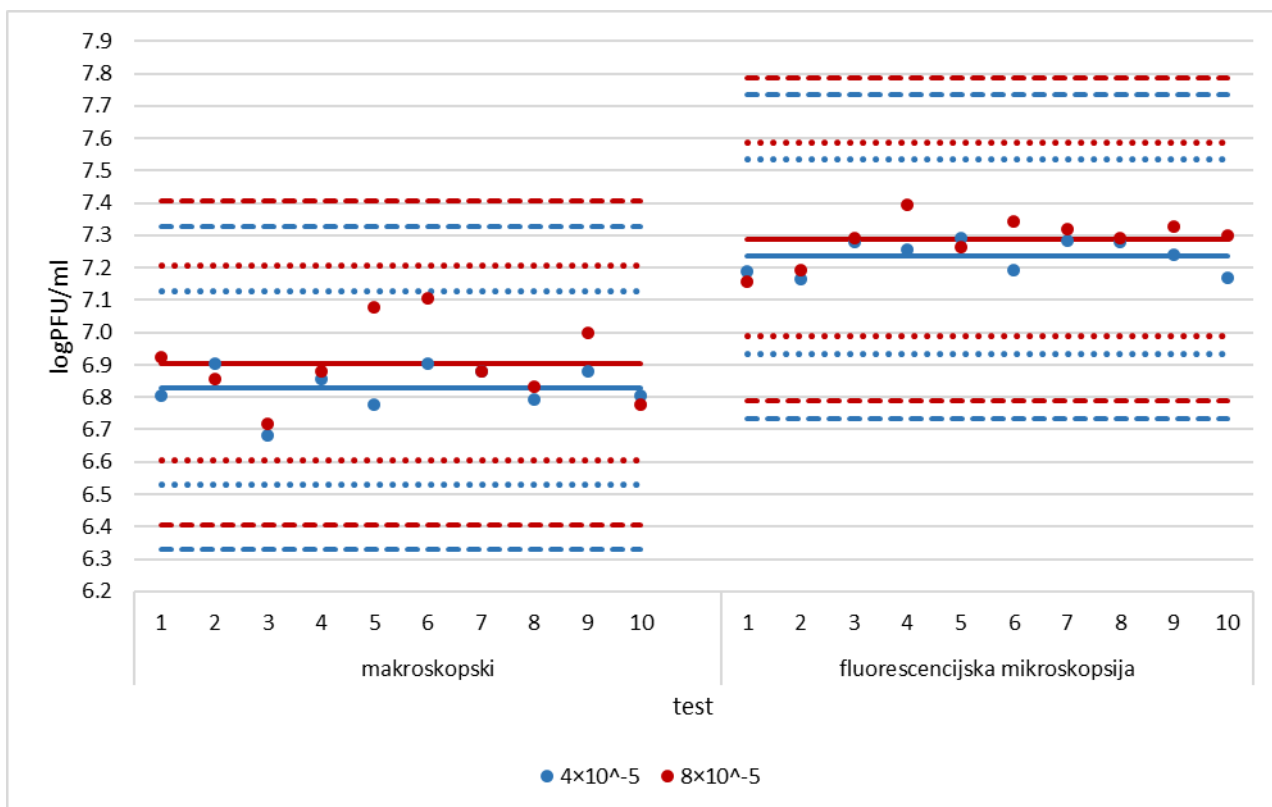
	MAKROSKOPSKI			FLUORESCENCIJSKA MIKROSKOPIJA			RAZLIKA vrijednosti dobivenih različitim načinima očitavanja	
	4×10^{-5}	8×10^{-5}	razlika	4×10^{-5}	8×10^{-5}	razlika	4×10^{-5}	8×10^{-5}
ponavljanje	logPFU/ml	logPFU/ml	logPFU/ml	logPFU/ml	logPFU/ml	logPFU/ml	logPFU/ml	logPFU/ml
1	6.806	6.924	0.118	7.188	7.158	-0.030	0.382	0.234
2	6.903	6.857	-0.046	7.164	7.193	0.029	0.261	0.336
3	6.681	6.716	0.035	7.279	7.292	0.014	0.598	0.576
4	6.857	6.881	0.023	7.255	7.394	0.139	0.398	0.513
5	6.778	7.079	0.301	7.292	7.265	-0.027	0.514	0.186
6	6.903	7.107	0.204	7.193	7.342	0.149	0.290	0.235
7	6.881	6.881	0.000	7.283	7.318	0.035	0.402	0.437
8	6.792	6.833	0.040	7.279	7.292	0.014	0.487	0.459
9	6.881	7.000	0.119	7.241	7.326	0.086	0.360	0.326
10	6.806	6.778	-0.028	7.170	7.301	0.131	0.364	0.523
srednja vrijednost \pm SD	6.829 \pm 0.070	6.906 \pm 0.125	0.077 \pm 0.096	7.234 \pm 0.051	7.288 \pm 0.069	0.054 \pm 0.055	0.406 \pm 0.102	0.383 \pm 0.138
srednja vrijednost \pm CI	6.829 \pm 0.050	6.906 \pm 0.090	/	7.234 \pm 0.037	7.288 \pm 0.050	/	/	/

Odstupanje od srednje vrijednosti bilo je manje ako sam test očitala fluorescencijskim mikroskopom (0.058 – 0.070 log), nego makroskopski (0.074 – 0.148 log) i nije prelazilo 0.5 log u niti jednom slučaju. Interval pouzdanosti nije prelazio granice od 0.3 log za oba načina očitavanja (Tablica 10).

Raspon razlika između razrjeđenja 4×10^{-5} i 8×10^{-5} bile su veće kod makroskopskog očitavanja (-0.046 – 0.301 log) nego očitavanja fluorescencijskim mikroskopom (-0.030 – 0.149 log), ali nisu prelazile 0.5 log (Tablica 10).

Srednje vrijednosti titra koje sam izračunala iz oba razrjeđenja bile su gotovo istovjetne: 6.829 log i 6.906 log za makroskopsko očitavanje te 7.234 log i 7.288 log za očitavanje fluorescencijskim mikroskopom. Utvrdila sam da između dva uspoređena razrjeđenja nije bilo statistički značajnih razlika (makroskopski 0.077 log, $P = 0.05$; fluorescencijskim mikroskopom 0.054 log, $P = 0.07$). To je pokazalo da sam testove plakiranja tehnički dobro izvela i očitala te da je vrijednost titra bila pouzdana uzevši u obzir način očitavanja. Zbog toga sam u daljnjim analizama koristila vrijednosti titra izračunate iz razrjeđenja 4×10^{-5} , očitane makroskopski i fluorescencijskim mikroskopom.

Uspoređujući vrijednosti titra s obzirom na način očitavanja, virusni titar bio je veći ako sam test očitala fluorescencijskim mikroskopom u svih 10 ponavljanja (Tablica 10, Slika 10). Srednja vrijednost titra, za razrjeđenje 4×10^{-5} , iznosila je 6.829 log ako sam test očitala makroskopski, a 7.234 log ako sam test očitala fluorescencijskim mikroskopom. Srednja vrijednost razlika titra između dva načina očitavanja bila je 0.406 log. Provela sam statističku analizu rezultata dobivenih očitavanjem makroskopski i fluorescencijskim mikroskopom, za razrjeđenje 4×10^{-5} , pomoću parnog t testa koji je pokazao da postoji statistički značajna razlika ($P < 0.0001$) između dva načina očitavanja (Tablica 10). Očitavanjem fluorescencijskim mikroskopom dobila sam u svim ponavljanjima testa veći titar.



Slika 10. Grafički prikaz vrijednosti titra uzorka rekombinantnog virusa mumpsa MRV3 iz treće pasaže na Vero stanicama s niskim multiplicitetom infekcije (MRV3 3pV NM) iz testa plakiranja očitano makroskopski i fluorescencijskim mikroskopom, iz razrjeđenja 4×10^{-5} i 8×10^{-5} . Prikazane su linije srednje vrijednosti titra za oba razrjeđenja s oba načina očitavanja (ravne pune linije), linije dozvoljenog odstupanja od 0.5 log (isprekidane linije) i linije dozvoljenog odstupanja od 0.3 log (točkaste linije).

Vrijednosti razlika titra između očitavanja na dva navedena načina bile su velike (0.261 – 0.589 log), i u tri od 10 ponavljanja su graničile s 0.5 log ili prelazile 0.5 log. U ovom sam uzorku također utvrdila plakove koji su se vidjeli samo očitavanjem fluorescencijskim mikroskopom. Ti podaci su pokazali da postoji veliki nedostatak u očitavanju testa plakiranja makroskopski i da je očitavanje fluorescencijskim mikroskopom bilo uspješnije u određivanju stvarnog titra virusnog uzorka NM.

4.2.2 Virusni titar uzorka MRV3 3pV NM određen testom 50% infektivne doze stanične kulture

Kako bih preliminarno odredila titar, u testu CCID₅₀ provela sam testove s početnim razrjeđenjima 3×10^{-4} i faktorom razrjeđenja 0.33.

Prema tome sam za uzorak NM odredila početno razrjeđenje 10^{-4} i 10^{-5} . Test sam napravila u osam vremenskih točaka i svaki put priredila četiri nezavisna niza razrjeđenja, te sam dobila 32 pločica za očitavanje testa.

Odbacila sam 15 rezultata od 32, i prikazala ukupno 17 rezultata, za oba načina očitavanja (Tablica 11). Za svaki pojedini test, svako ponavljanje, izračunat korigirani i nekorigirani titar, prikazala sam u prilogu IV.

Odstupanje od srednje vrijednosti nije prelazilo 0.5 log u nijednom ponavljanju. Interval pouzdanosti nije prelazio granice od 0.3 log za oba načina očitavanja (Tablica 11), ali je titar u pet ponavljanja testa odstupao za više od 0.3 log od srednje vrijednosti za oba načina očitavanja (4., 7., 8., 9. i 15. ponavljanje) (Slika 11).

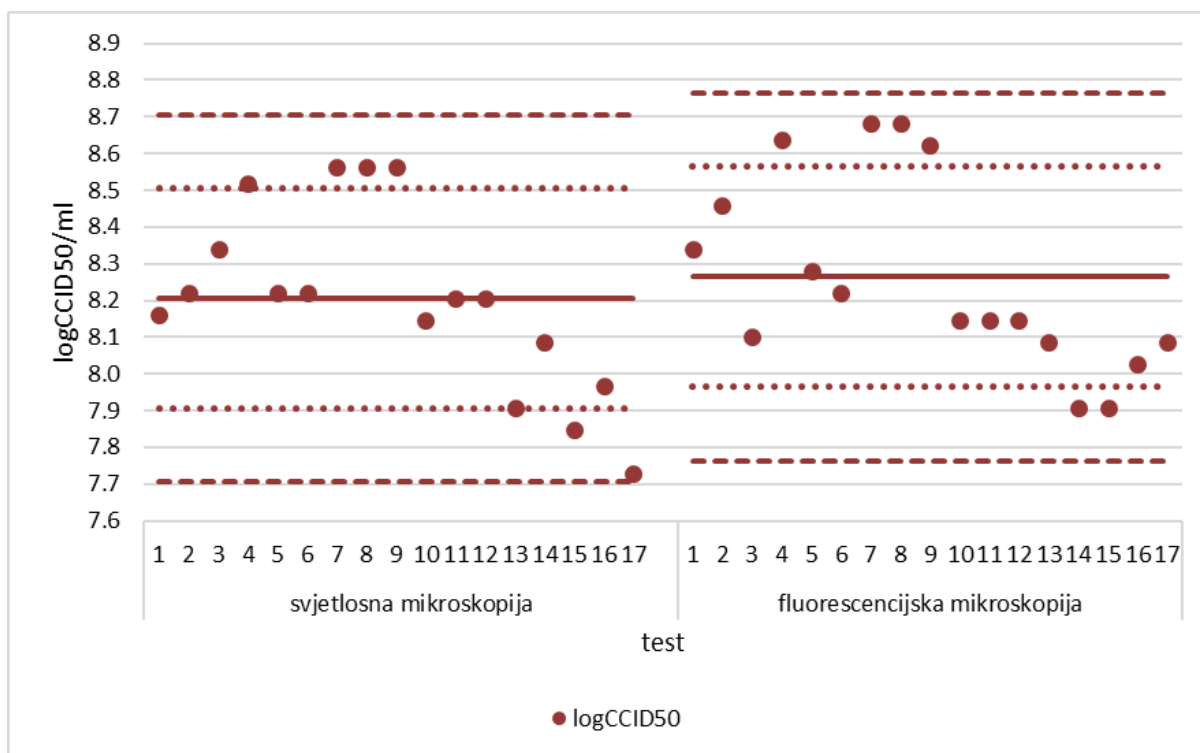
U dva ponavljanja testa, vrijednosti titra prelazile su granicu intervala od 0.3 log, samo ako je test očitao svjetlosnim mikroskopom. U 11 od 17 ponavljanja, veći sam titar izračunala ako sam test očitala fluorescencijskim mikroskopom. Veći sam titar izračunala ako sam test očitala svjetlosnim mikroskopom u odnosu na fluorescencijski u 3. (8.340 log u odnosu na 8.101 log), 11. (8.207 log u odnosu na 8.147 log), 12. (8.207 log u odnosu na 8.147 log) i 14. (8.087 log u odnosu na 7.908 log) ponavljanju testa (Slika 11).

Tablica 11. Rezultati određivanja titra u testu 50% infektivne doze stanične kulture (CCID₅₀) za rekombinanti virus mumpsa MRV3 iz treće pasaže na Vero stanicama s niskim multiplicitetom infekcije (MRV3 3pV NM), očitano svjetlosnim mikroskopom i fluorescencijskim mikroskopom, u 17 ponavljanja. Rezultati su u tablici odijeljeni obzirom na vremenske točke očitavanja testa isprekidanom crtom. Prikazane su razlike vrijednosti titra dobivene iz dva načina očitavanja, srednje vrijednosti ± standardna devijacija (SD) i srednje vrijednosti ± 95%-tni interval pouzdanosti (CI). Razlika srednjih vrijednosti iz dva načina očitavanja nije bila statistički značajna (P = 0.1132).

ponavljanje	Svjetlosni mikroskop	Fluorescencijski mikroskop	razlika nekorigiranih logCCID ₅₀ /1ml
	nekorigirani logCCID ₅₀ u volumenu 1 ml	nekorigirani logCCID ₅₀ u volumenu 1 ml	
1	8.161	8.340	0.179
2	8.221	8.459	0.238
3	8.340	8.101	-0.239
4	8.519	8.638	0.119
5	8.221	8.280	0.060
6	8.221	8.221	0.000
7	8.565	8.684	0.119
8	8.565	8.684	0.119
9	8.565	8.624	0.060
10	8.147	8.147	0.000
11	8.207	8.147	-0.060
12	8.207	8.147	-0.060
13	7.908	8.087	0.179
14	8.087	7.908	-0.179
15	7.849	7.908	0.060
16	7.968	8.028	0.060
17	7.730	8.087	0.358
srednja vrijednost ± SD	8.205 ± 0.253	8.264 ± 0.263	0.059 ± 0.095
srednja vrijednost ± CI	8.205 ± 0.130	8.264 ± 0.135	/

Kod očitavanja svjetlosnim mikroskopom, srednja vrijednost titra iznosila je 8.205 log, a kod očitavanja fluorescencijskim mikroskopom 8.264 log, a razlika srednjih vrijednosti bila je 0.059 log, što je ulazilo unutar dozvoljenih 0.3 log i znači da sam test dobro izvela. Provela sam statističku analizu rezultata dobivenih očitavanjem svjetlosnim i fluorescencijskim mikroskopom, pomoću parnog t testa koji je pokazao da ne postoji statistički značajna razlika ($P = 0.1132$) između dva načina očitavanja. Razlike titra između dva načina očitavanja bile su u rasponu 0.000 log do 0.358 log (Tablica 11).

Rezultati pokazuju da je očitavanje testa $CCID_{50}$ fluorescencijskim mikroskopom neznatno utjecalo na vrijednost titra, te da je standardni način očitavanja testa svjetlosnim mikroskopom bio visoko pouzdan. Na izračun titra virusa NM nije utjecao način očitavanja testa $CCID_{50}$.



Slika 11. Grafički prikaz vrijednosti virusnog titra uzorka rekombinantog virusa mumpsa MRV3 iz treće pasaže na Vero stanicama s niskim multiplicitetom infekcije (MRV3 3pV NM) iz testa 50% infektivne doze stanične kulture ($CCID_{50}$) očitano svjetlosnim mikroskopom i fluorescencijskim mikroskopom, u 17 ponavljanja. Prikazane su linije srednje vrijednosti titra za oba načina očitavanja (pune linije), linije dozvoljenog odstupanja od 0.5 log (isprekidane linije) i linije dozvoljenog odstupanja od 0.3 log (točkaste linije).

4.3 Usporedba vrijednosti titra virusnih uzoraka MRV3 3pV VM i MRV3 3pV NM dobivenih u testovima plakiranja i 50% infektivne doze stanične kulture

U testovima plakiranja i CCID₅₀ izračunala sam srednje vrijednosti iz svih izračunatih vrijednosti titra za virusne uzorke VM i NM i usporedila sam rezultati. Za uzorak VM koristila sam podatke titra za razrjeđenje 2×10^{-4} , a za uzorak NM podatke titra za razrjeđenje 4×10^{-5} .

Za uzorak VM u testu plakiranja izračunala sam srednju vrijednost iz 10 rezultata makroskopskog očitavanja (5.518 log) i očitavanja fluorescencijskim mikroskopom (5.986 log) (Tablica 8). U testu CCID₅₀ izračunala sam srednju vrijednost iz 17 rezultata očitavanja svjetlosnim mikroskopom (6.719 log) i očitavanja fluorescencijskim mikroskopom (6.821 log) (Tablica 9).

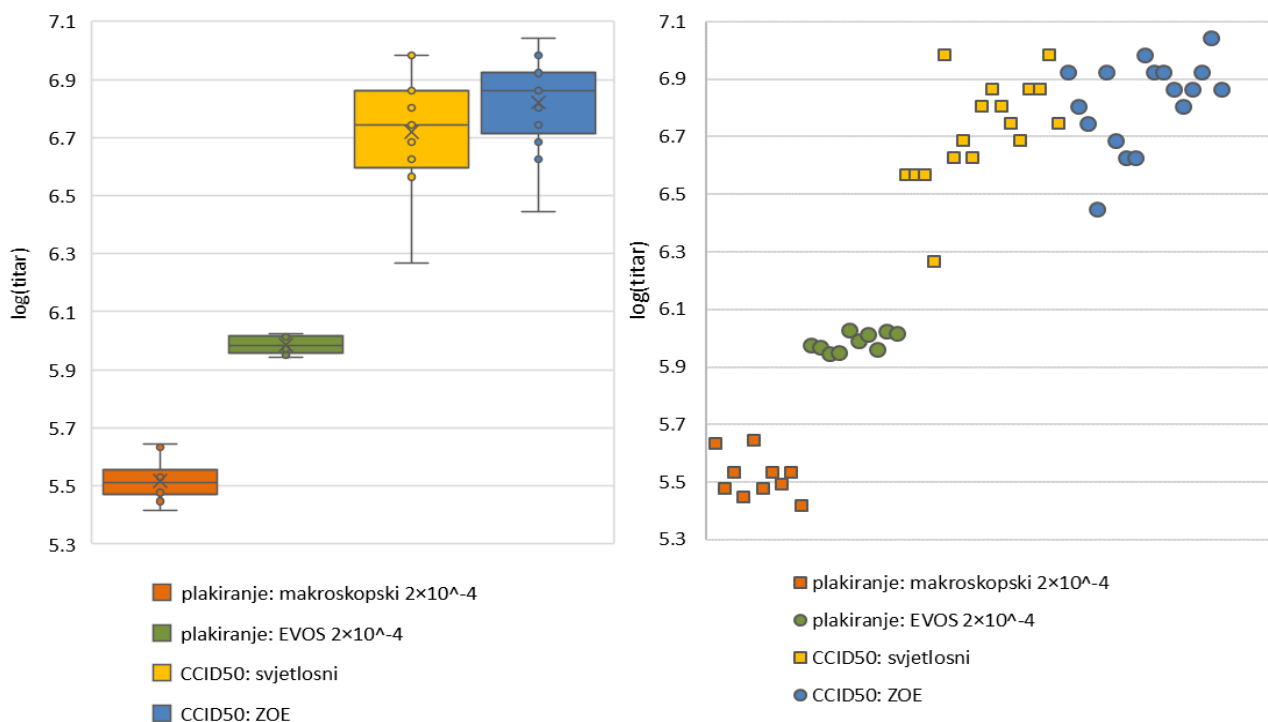
Za uzorak NM, u testu plakiranja izračunala sam srednju vrijednost iz 10 rezultata makroskopskog očitavanja (6.829 log) i očitavanja fluorescencijskim mikroskopom (7.234 log) (Tablica 10). U testu CCID₅₀ izračunala sam srednju vrijednost iz 17 rezultata očitavanja svjetlosnim mikroskopom (8.205 log) i očitavanja fluorescencijskim mikroskopom (8.264 log) (Tablica 11).

Usporedbom srednjih vrijednosti za oba uzorka uočila sam da se viši titar u oba testa postiže očitavanjem fluorescencije (Slika 12 i Slika 13).

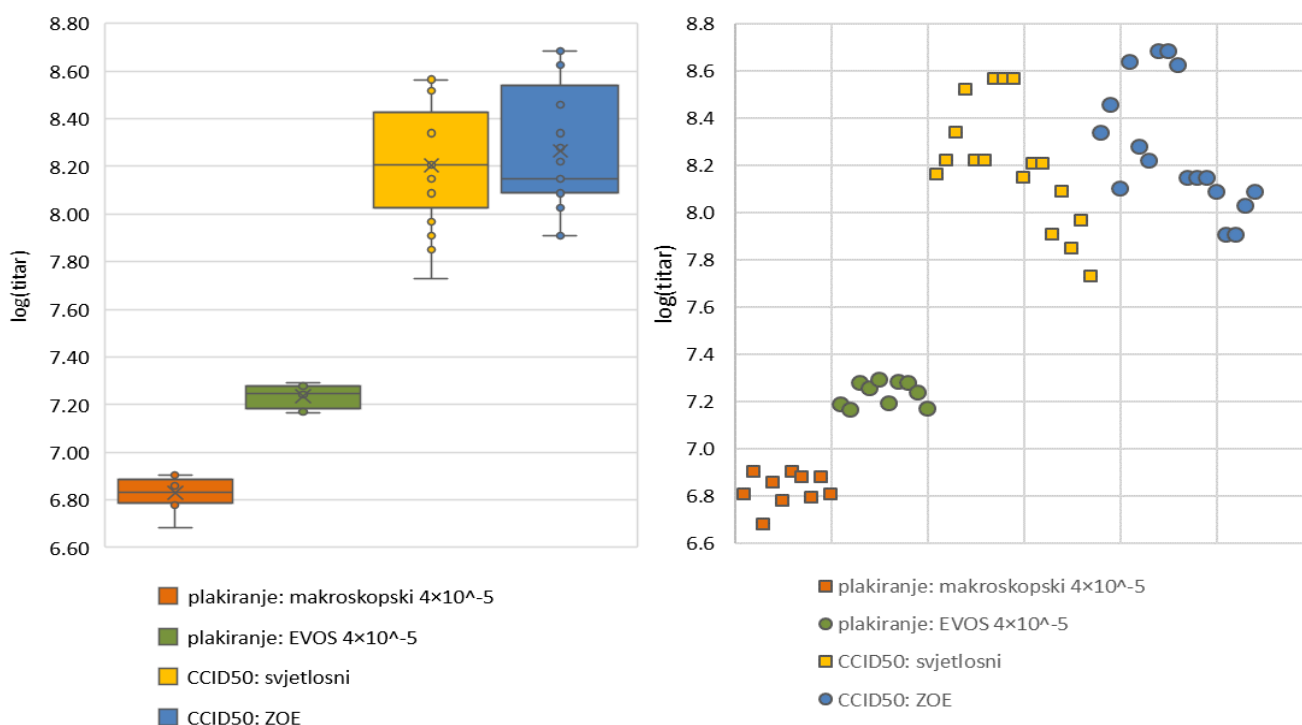
Iz podataka o srednjoj vrijednosti titra uočila sam i da je, neovisno o načinu očitavanja testa, kod oba uzorka viši titar određen testom CCID₅₀ nego testom plakiranja. Razlika srednjih vrijednosti između testova plakiranja i CCID₅₀ bio je za uzorak VM 1.201 log kod standardnog očitavanja te 0.835 log kod očitavanja fluorescencijskim mikroskopom, dok je za uzorak NM bio 1.376 log kod standardnog očitavanja te 1.030 log kod očitavanja fluorescencijskim mikroskopom (Slike 12 i 13).

Slike 12 i 13 pokazuju da je u testu plakiranja bila veća razlika s obzirom na način očitavanja nego u testu CCID₅₀ i da je u testu CCID₅₀ bio veći rasap rezultata oko srednje vrijednosti nego u testu plakiranja.

Rezultati pokazuju i da su razlike titra između dva načina očitavanja kod oba uzorka bile veće za test plakiranja nego za test CCID₅₀ (plakiranje VM: 0.468 log, NM: 0.406 log// CCID₅₀ VM: 0.102 log, NM: 0.059 log) (Tablice 8 i 9, Slike 12 i 13).



Slika 12. Grafički prikaz rezultata određivanja titra dobivenih testovima plakiranja i 50% infektivne doze stanične kulture (CCID₅₀) uzorka rekombinantnog virusa mumpsa MRV3 iz treće pasaže na Vero stanicama s visokim multiplicitetom infekcije (MRV3 3pV VM). Lijevo je prikazan graf zbirnih rezultata. Desno je prikazan svaki individualni rezultat.



Slika 13. Grafički prikaz rezultata određivanja titra dobivenih testovima plakiranja i 50% infektivne doze stanične kulture (CCID₅₀) uzorka rekombinantnog virusa mumpsa MRV3 iz treće pasaže na Vero stanicama s niskim multiplicitetom infekcije (MRV3 3pV NM). Lijevo je prikazan graf zbirnih rezultata. Desno je prikazan svaki individualni rezultat.

4.4 Izračun konverzijskog koeficijenta

Za određivanje konverzijskog koeficijenta (KK), usporedila sam vrijednosti titra iz testova plakiranja i CCID₅₀ (Tablica 12). Za izračun KK, koristila sam vrijednost (X) dobivenu koristeći definiciju logaritma i pravila logaritmiranja ($10^{\log(\text{titar})} = X$) i zatim izračunala prema formuli:

$$KK = \frac{\text{PFU/ml}}{\text{CCID}_{50}/\text{ml}}$$

Za uzorak MRV3 3pV VM, standardnim očitavanjem testova (makroskopski i svjetlosnim mikroskopom) izračunala sam konverzijski koeficijent 0.06, a očitavanjem fluorescencijskim mikroskopom 0.15.

Za uzorak MRV3 3pV NM, standardnim očitavanjem testova (makroskopski i svjetlosnim mikroskopom) izračunala sam konverzijski koeficijent 0.04, a očitavanjem fluorescencijskim mikroskopom 0.09.

Očitavanjem fluorescencijskim mikroskopom izračunala sam veći konverzijski koeficijent.

Tablica 12. Rezultati određivanja titra dobiveni standardnim očitavanjem (makroskopski ili svjetlosnim mikroskopom) i očitavanjem fluorescencijskim mikroskopom testova plakiranja i 50% infektivne doze stanične kulture (CCID₅₀), vrijednost (X) dobivenu koristeći definiciju logaritma i pravila logaritmiranja ($10^{\log(\text{titar})} = X$) te konverzijski koeficijent (omjer testa plakiranja i testa CCID₅₀) za dva načina očitavanja, za uzorke rekombinantnog virusa mumpsa MRV3 iz treće pasaže na Vero stanicama s visokim multiplicitetom infekcije (MRV3 3pV VM) i niskim multiplicitetom infekcije (MRV3 3pV NM).

		log(titar)		X		konverzijski koeficijent	
		standardno očitavanje	fluorescencijski mikroskop	standardno očitavanje	fluorescencijski mikroskop	standardno očitavanje	fluorescencijski mikroskop
MRV3 3pV VM	plakiranje	5.518	5.986	329609.712	968277.856	0.06	0.15
	CCID ₅₀	6.719	6.821	5236004.366	6622165.037		
MRV3 3pV NM	plakiranje	6.829	7.234	6745280.277	17139573.075	0.04	0.09
	CCID ₅₀	8.205	8.264	160324539.069	183653834.335		

4.5 Utjecaj aktinomicina D na prepoznavanje plakova

Provela sam test plakiranja u kojem sam utvrđivala utjecaj aktinomicina D (akt D) na vizualizaciju plakova. U pokrov za prekrivanje inficiranog Vero staničnog sloja dodala sam akt D u tri koncentracije (0.1, 0.2, 0.3 µg/ml). Paralelno sam napravila test s pokrovom bez akt D. Time sam mogla vizualno usporediti plakove i vidjeti utječe li koncentracija akt D na njihovu vizualizaciju, te kako akt D utječe na stanični sloj.

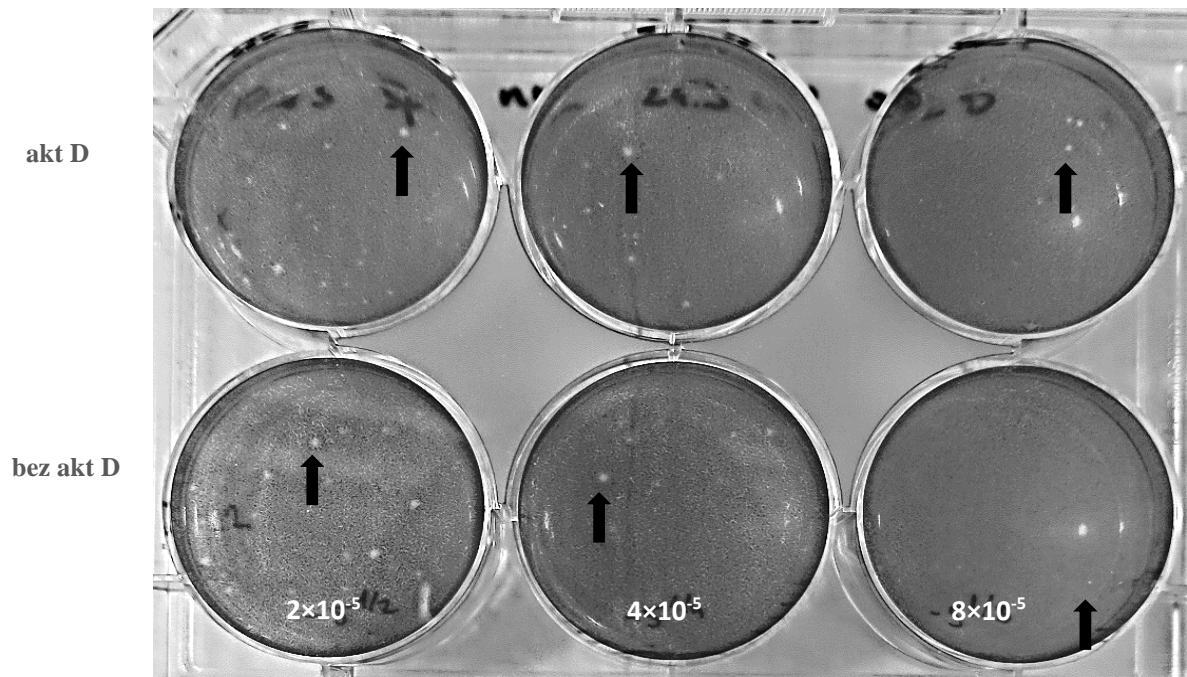
Plakovi se nisu razlikovali obzirom na dodanu koncentraciju akt D i niti jedna koncentracije nije bila toksična za stanični sloj. Na osnovu tih rezultata, sljedeće plakiranje sam izvela s koncentracijom 0.2 µg/ml akt D u pokrovu. Za svaki pojedini test i pojedino razrjeđenje, broj plakova po razrjeđenju, srednja vrijednost plakova i izračun PFU/ml titra prikazala sam u prilogu V.

Izračunala sam titar za testove bez akt D i s akt D koncentracije 0.2 µg/ml, u razrjeđenjima 4×10^{-5} i 8×10^{-5} očitani makroskopski i fluorescencijskim mikroskopom (Tablica 13). Plakove nisam brojala fluorescencijskim mikroskopom u razrjeđenju 2×10^{-5} jer je broj plakova bio prevelik da bi se izbrojao.

Tablica 13. Rezultati određivanja titra uzroka rekombinantnog virusa mumpsa MRV3 iz treće pasaže na Vero stanicama s niskim multiplicitetom infekcije (MRV3 3pV NM) dobiveni testom plakiranja bez i uz dodatak aktinomicina D (akt D) koncentracije 0.2 µg/ml, očitanim makroskopski i fluorescencijskim mikroskopom. Prikazan je titar za razrjeđenja virusa 4×10^{-5} i 8×10^{-5} .

	MAKROSKOPSKI		FLUORESCENCIJSKA MIKROSKOPIJA	
	4×10^{-5}	8×10^{-5}	4×10^{-5}	8×10^{-5}
	logPFU/ml	logPFU/ml	logPFU/ml	logPFU/ml
bez	6.849	6.824	7.236	7.246
akt D	6.748	6.705	7.262	7.265

Titar koji sam odredila makroskopskim očitavanjem u testu bez akt D (6.849 log i 6.824 log) statistički se nije znatno razlikovao od titra iz testa s akt D (6.748 log i 6.705 log) ($P = 0.05$). Titar koji sam odredila očitavanjem fluorescencijskim mikroskopom u testu bez akt D (7.236 log i 7.246 log) također se nije znatno razlikovao od titra iz testa s akt D (7.262 log i 7.265 log) ($P = 0.1$). Rezultati pokazuju da akt D nije utjecao na jasnoću ili veličinu plakova (Slika 14).



Slika 14. Rezultati infekcije Vero stanica rekombinantnim virusom mumpsa MRV3 iz treće pasaže na Vero stanicama s niskim multiplicitetom infekcije (MRV3 3pV NM) u testu plakiranja izvedenom s tri različita razrjeđenja virusa 2×10^{-5} , 4×10^{-5} , 8×10^{-5} u duplikatu. Šesti dana nakon infekcije vidljivi su plakovi (označeni strelicama). Gornji red bazenčića sadrži stanični sloj prekriven pokrovom bez aktinomicina D (akt D), a donji red stanični sloj prekriven pokrovom koji sadrži akt D u koncentraciji $0.2 \mu\text{g/ml}$.

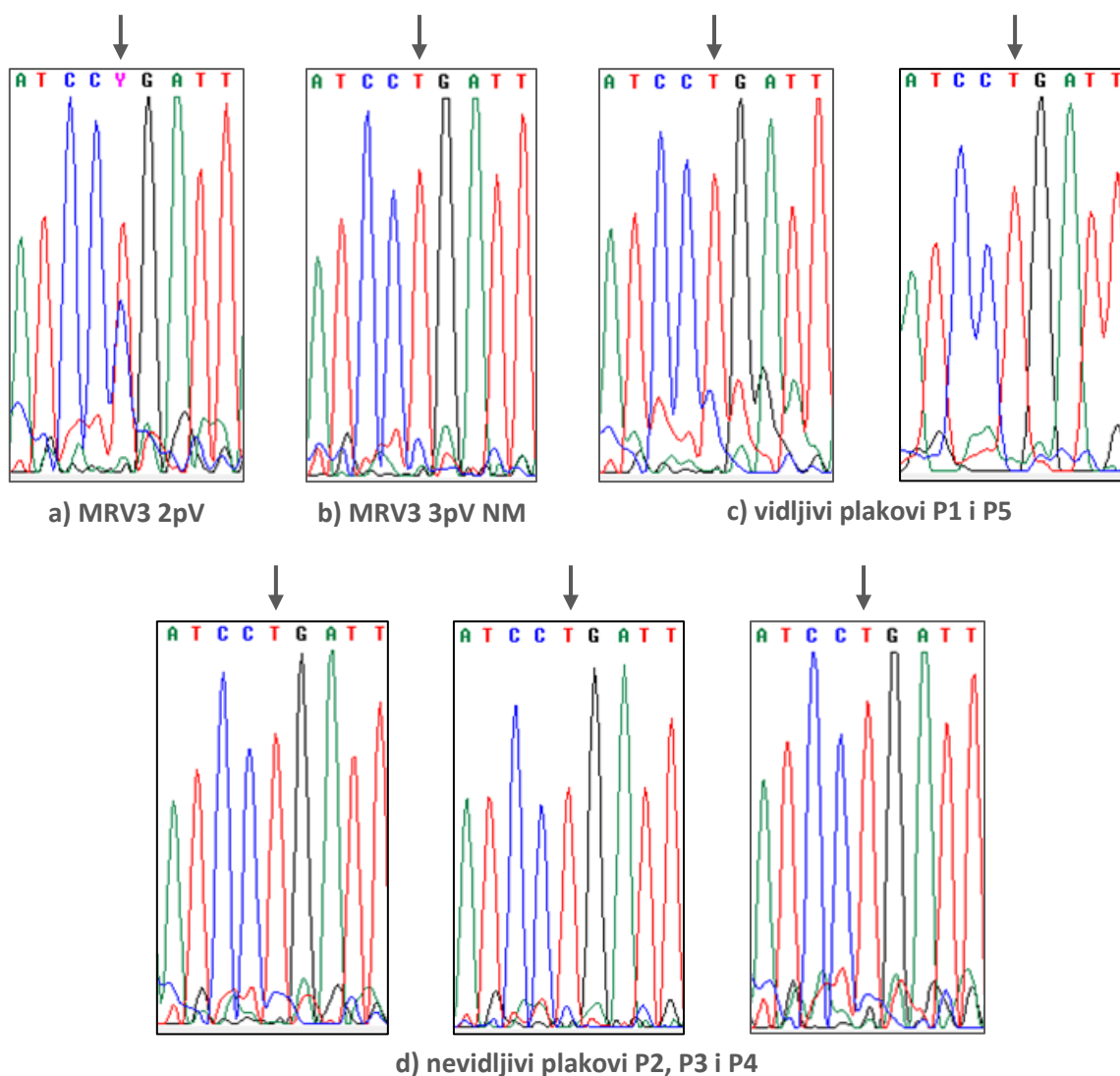
4.6 Karakterizacija plakova

Utvdila sam da virus MRV3 ima mogućnost stvaranja makroskopski vidljivih i nevidljivih plakova. Kako bih utvdila postoji li promjena u genomu koja bi uzrokovala makroskopsku nevidljivost plakova, uzorkovala sam pet plakova virusnog uzorka MRV3 3pV NM koji su pokazivali različitu makroskopsku pojavnost (nazvani vidljivi, uzorci P1 i P5, i nevidljivi plakovi, uzorci P2, P3 i P4). Iz tih plakova kultivirala sam viruse i umnožila ih kroz jednu pasažu na Vero stanicama. Genome ovih virusa usporedila sam s originalnom sekvencom MRV3. Ispitala sam postoji li razlika među njima i utječe li na vijabilnost, odnosno infektivnost virusa.

Virusi iz svih plakova (P1-P5) pokazali su sposobnost replikacije na Vero stanicama kroz pojavu zelene fluorescencije inficiranih stanica i vidljivog CPE.

Uzorak MRV3 2pV, od kojeg sam pripremila virusne uzorke analizirane u ovom istraživanju, dr.sc. Anamarija Slović iz Laboratorija za molekularnu biomedicinu Centra za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu, sekvencirala je metodom NGS (*eng.* New Generation Sequencing) (prilog V). Utvrđeno je da na poziciji 10572. nt postoji polimorfizam dušičnih baza T i C zastupljen u 25% analiziranih genoma. Na drugim pozicijama u genomu postoje varijacije u jednoj bazi, takozvani jednonukleotidni polimorfizmi (*eng.* single nucleotide polymorphism, SNP) (Butler 2012), ali su prisutni s puno manjom zastupljenošću. Pozicija 10572. nt nalazi se na L genu, koji kodira za virusnu RNA polimerazu. Zbog toga sam sekvencirala i analizirala fragment od otprilike 400 nukleotida kodirajućeg dijela L gena.

Viruse iz uzorkovanih plakova, uzorak MRV3 2pV i uzorak MRV3 3pV NM umnožila sam PCR-om i dobila sam produkti očekivane veličine od 765 parova baza. Analizom dobivenih sekvenci potvrdila sam polimorfizam T i C na poziciji 10572. nt u genomu MRV3 2pV. U uzorcima MRV3 3pV i virusima iz uzorkovanih plakova na istoj poziciji nisam utvdila polimorfizam (Slika 15).



Slika 15. Elektroferogrami dijela sekvence gena L uzoraka rekombinantnog virusa mumpsa iz druge pasaže na Vero stanicama (MRV3 2pV), iz treće pasaže na Vero stanicama s niskim multiplicitetom infekcije (MRV3 3pV NM) i virusa kultiviranih iz makroskopski vidljivih i nevidljivih plakova u testu plakiranja uzorka MRV3 3pV NM. Strelice prikazuju poziciju 10572. nt u genomu virusa MRV3. a) uzorak MRV3 2pV, prikazan polimorfizam na navedenoj poziciji; b) uzorak MRV3 3pV NM, ne postoji polimorfizam; c) vidljivi plakovi P1 i P5, ne postoji polimorfizam; d) nevidljivi plakovi P2, P3 i P4, ne postoji polimorfizam.

5. RASPRAVA

Testove plakiranja i 50% infektivne doze stanične kulture (CCID₅₀) koristila sam u ovom istraživanju za određivanje titra rekombinantnog virusa mumpsa MRV3 koji posjeduje ugrađeni gen za pojačani zeleni fluorescentni protein (EGFP). Kad virus inficira stanicu, unutar stanice počinje proizvodnja EGFP koji zeleno fluorescira kad je izložen plavom svjetlu. Zbog toga inficirane stanice fluoresciraju pod fluorescencijskim mikroskopom. To svojstvo virusa MRV3 omogućilo mi je usporedbu rezultata testova očitanih standardno, pri običnom bijelom svjetlu, i fluorescencijskim mikroskopom.

Iz literature je poznato da vidljivost plakova, odnosno citopatogeni efekt (CPE) ovisi o soju virusa mumpsa tj. njegovom specifičnom djelovanju na stanični supstrat. Različiti sojevi mumpsa stvaraju različite plakove i CPE. U testu plakiranja, neki stvaraju velike i jasne plakove (Urabe, JL-5), drugi manje plakove koje je teže očitati (L-Zagreb). Također, u testu CCID₅₀, neki sojevi stvaraju jasno vidljiv sincicij i lako su uočljive morfološke promjene na stanicama (JL-5, Urabe), dok je kod drugih mikroskopom teže uočiti CPE (L-Zagreb) (Forčić i sur. 2010). Zbog toga rezultati očitavanja titra u oba testa velikim dijelom ovise o objektivnosti i uvježbanosti operatera koji očitava test.

Kako bih ustanovila odnos rezultata testova plakiranja i CCID₅₀, potreban je konverzijski koeficijent. Teoretski koeficijent za konverziju titra definiran je koristeći Poissonovu distribuciju te je prema njemu jedna jedinica CCID₅₀/volumenu = 0.7 jedinica PFU/volumenu (American Type Culture Collection (2012)). Testovi na animalnim modelima izvode se s virusnim uzorcima kojima je titar izražen u jedinicama formiranja plakova (PFU), dok se test CCID₅₀ koristi za određivanje titra u proizvodnji cjepiva.

Iako se oba testa široko upotrebljavaju u istraživanjima, odnos između njihovih vrijednosti nije poznat. Važno je da postoji mogućnost točne i precizne konverzije rezultata tih testova. Konverzija vrijednosti titra iz testa CCID₅₀ i testa plakiranja predstavlja problem jer ne postoji jednostavan i uniforman način određivanja titra za sve sojeve mumpsa zbog različitog djelovanja različitih sojeva na stanice. Time je otežano dijeljenje podataka i eksperimentalnih procedura te potvrđivanje rezultata između laboratorija.

Uzorak MRV3 3pV VM iz treće pasaže na Vero stanicama pripremila sam s visokim multiplicitetom infekcije (MOI) od 0.02 virusne čestice po jednoj stanici, a MRV3 3pV NM s niskim MOI od 0.0002 virusne čestice po stanici, što je razlika od 100 puta u količini virusnih čestica upotrijebljenih za infekciju istog broja stanica. To mi je omogućilo priređivanje virusnih

uzoraka s bitno drugačijim titrom jer je u virologiji dokazano da se upotrebom različitih MOI pri početnoj infekciji dobivaju uzorci s različitom količinom novo produciranog virusa (Thompson i Yin 2010). Upotreba dva uzorka istog soja (MRV3) i iste povijesti pasažiranja (dvije pasaže na Vero stanicama), a različitog titra, bila je važna za točnu procjenu utjecaja upotrebe fluorescencije na određivanje virusnog titra.

Test plakiranja sam provela za uzorke MRV3 3pV VM i MRV3 3pV NM i očitala makroskopski i fluorescencijskim mikroskopom. Očekivala sam da će očitavanje fluorescencijskim mikroskopom znatno pridonijeti većoj osjetljivosti i objektivnosti u očitavanju testa, a time posredno i u određivanju titra virusa.

Usporedbom rezultata dobivenih očitavanjem na dva načina, ustanovila sam da je fluorescencijskim mikroskopom izbrojano više plakova i izračunat je veći titar nego makroskopski, za oba uzorka, kao što sam i očekivala. Statistička analiza rezultata makroskopskog očitavanjem i očitavanja fluorescencije pokazala je da postoji statistički značajna razlika između ta dva načina očitavanja, za oba uzorka. Razlika koja je iznosila skoro 0.5 log u praksi predstavlja veliku razliku. Na primjer, titar 5.477 log koji je bio izračunat makroskopskim očitavanjem predstavlja 299916.3 virusnih čestica, a titar 5.968 log koji je bio izračunat iz očitavanja fluorescencije predstavlja 928966.4 virusnih čestica. Razlika u vrijednostima titra iznosila je 0.491 log, a razlika između broja virusnih čestica 629050.1. To je predstavljalo veliku razliku u samom broju virusnih čestica.

Korištenjem fluorescencijskog mikroskopa u ovom istraživanju utvrdila sam da virus MRV3 ima mogućnost stvaranja plakova koji su se standardnom metodom očitavanja (makroskopski) vidjeli, i onih koji se nisu vidjeli. To je pokazalo veliku prednost korištenja fluorescencije i veliki nedostatak u očitavanju testa plakiranja makroskopski, koji je unatoč tome široko korištena metoda za izračunavanje titra različitih virusa.

Priredila sam uzorke s različitim MOI jer je dokazano da će takvi uzorci imati različit titar (Thompson i Yin 2010). Ovi rezultati su u skladu s time, za uzorke MRV3 3pV VM i MRV3 3pV NM pokazuju trend da veći MOI daje manji titar, a manji MOI daje veći titar.

Preliminarnim sekvenciranjem nove generacije (NGS) virusnog uzorka MRV3 2pV, od kojeg sam priredila uzorke za ovaj rad, pokazala je heterogenost od 25% na poziciji u genomu na 10572. nt. Metoda NGS mi je time pokazala da moram sekvencirati fragment kodirajuće regije gena L, koji kodira za virusnu RNA-ovisnu RNA polimerazu (RdRP), kako bih utvrdila

postoji li u uzorcima iz makroskopski nevidljivih plakova razlika u odnosu na makroskopski vidljive plakove koja bi utjecala na funkciju RdRP i njihovu nepojavnost u testu plakiranja.

Prema tome sam provela Sanger sekvenciranje i analizirala dobivene sekvence te utvrdila da ne postoji polimorfizam u sekvencama virusa iz uzorkovanih plakova i MRV3 3pV NM na poziciji 10572. nt. Prema tome, pojavnost plakova nije bila povezana s polimorfizmom u navedenoj poziciji, kao što je pretpostavljeno.

Iako nisu stvarali plakove vidljive makroskopski, tri virusa koje sam kultivirala iz makroskopski nevidljivih plakova nisu pokazala smanjenu infektivnost u odnosu na vidljive plakove. Svaki od tih virusa pokazao je sposobnost replikacije na Vero stanicama kroz pojavu vidljivog CPE i zelene fluorescencije inficiranih stanica koju sam detektirala u istoj vremenskoj točki.

Nisam utvrdila razlog postojanja nevidljivih plakova, ali to se moglo pripisati prerastanju stanica u više slojeva, što je karakteristika korištenih Vero stanica. To sam mogla spriječiti promjenom staničnog supstrata i koristiti npr. Vero E6 stanice jer one ne prerastaju u više slojeva (https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/crl-1586.aspx?geo_country=hr#generalinformation).

Očitavanje testa plakiranja pokušava se objektivizirati i kod drugih virusa. Detekcija plakova RSV-a obično se radi pomoću antitijela protiv fuzijskog proteina, što je zahtjevno i skupo. Poboljšani test plakiranja respiratornog sincicijskog virusa (RSV) uključuje fiksiranje i bojanje, što rezultira boljom vizualizacijom plakova (McKimm-Breschkin 2004). Za virus teškog akutnog respiratornog sindroma koronavirus 2 (SARS-CoV-2) opisan je standardni način izvođenja testa plakiranja, sa čvrstim pokrovom, i alternativni s tekućim pokrovom koji se uklanja, fiksacijom i bojanjem, što olakšava vizualizaciju plakova (Mendoza i sur. 2020). Testu plakiranja herpes simpleks virusa (HSV) povećana je objektivnost, osjetljivost i brzina korištenjem fluorescentnog antitijela i automatskog brojača (Masci i sur. 2019). U testu plakiranja virusa parainfluenze 1, 2 i 3 te virusa RSV, dodatkom imunoglobulina G u serum za neutralizaciju povećana je osjetljivost i izračunat je veći titar (Hawthorne i Albrecht 1981).

Iako ih nisam vidjela makroskopski, ti plakovi postoje što znači da je u testu plakiranja očitano makroskopski izračunat manji virusni titar nego što je u stvarnosti. Fluorescencijskim mikroskopom vidljivi su svi plakovi pa je time izračunat veći i točniji virusni titar.

Kako bih ispitala utjecaj aktinomicina D (akt D) na pojavnost plakova virusa MRV3 koji izgledom nisu uniformni i neki od njih su dvojbeni za makroskopsko očitavanje, koristila sam akt D u testu plakiranja. Prema literaturnim podacima, akt D dodan u pokrov u testu plakiranja utječe na jasniju pojavnost plakova kod metapneumovirusa, ali ne utječe na njihov broj te time posredno na očitani titar virusa. U istraživanju Zhanga i sur. (2012), akt D utječe na veličinu plakova u skladu s koncentracijom. Velike koncentracije akt D (0.5-0.6 µg/ml) oštećuju stanični monosloj, dok koncentracije od 0.1 - 0.2 µg/ml uzrokuju povećanje plakova bez uništavanja stanica. U istraživanju Xu i sur. (2018), koncentracija 0.1 µg/ml uzrokuje povećanje plakova, a 0.2 µg/ml je uništila stanični monosloj. U ovom istraživanju, nijedna od navedenih koncentracija nije rezultirala povećanjem veličine ili broja plakova, niti prouzročila uništavanje staničnog monosloja.

Testom CCID₅₀ također sam određivala titar za virusne uzorke MRV3 3pV VM i MRV3 3pV NM. Očekivala sam da će očitavanje fluorescencijskim mikroskopom znatno pridonijeti većoj osjetljivosti i objektivnosti u očitavanju testa, a time posredno i u određivanju titra virusa.

Usporedbom rezultata dobivenih očitavanjem svjetlosnim i fluorescencijskim mikroskopom, ustanovila sam je da razlika između dva načina očitavanja nije velika (0.000 – 0.358 log). U približno 75% izvedenih testova veći sam titar odredila fluorescencijskim mikroskopom. Statističkom analizom rezultata svjetlosnog očitavanja i očitavanja fluorescencije, određivala sam statističku značajnost razlike između ta dva načina očitavanja. Za uzorak MRV3 3pV VM razlika je bila statistički značajna, ali bez obzira na statističku značajnost, razlika srednjih vrijednosti je ulazila unutar dozvoljene granice 95%-tnog intervala pouzdanosti od 0.3 log, što je pokazalo da sam test dobro izvela i da su rezultati točni. Također, primijetila sam da se rezultati očitavanja iz prve vremenske točke razlikuju od rezultata svih sljedećih vremenskih točki, što pokazuje da neiskustvo i neuvježbanost mogu utjecati na očitavanje testa CCID₅₀. Razlike srednjih vrijednosti između dva načina očitavanja su neznačajno različite između dva uzorka i obje vrijednosti ulaze unutar dozvoljenih 0.3 log. To dokazuje da očitavanjem testa fluorescencijskim mikroskopom nije značajno utjecalo na rezultate.

Za uzorak MRV3 3pV NM, pojedine vrijednosti titra prelazile su dozvoljenu granicu intervala 95%-tne pouzdanosti od ± 0.3 log. Primijetila sam da su rezultati testa grupirani po vremenskim točkama, u oba načina očitavanja. Moguće su bile pogreške kod izvođenja testova (razrjeđivanje virusa, nanošenje u mikrotitarsku pločicu i sl.).

Pošto standardno očitavanje testa CCID₅₀ može biti subjektivno, odnosno ovisi o preciznosti i izvježbanosti operatera koji očitava, fluorescencijskim mikroskopom je očitavanje bilo objektivnije. Tome u dokaz idu rezultati ponavljanja testova u kojima sam veći titar odredila svjetlosnim očitavanjem, gdje sam pogrešno procijenila prisustvu infekcije u bazenčiću, te velik rasap rezultata oko srednje vrijednosti. Kako neki sojevi virusa mumpsa stvaraju manje vidljiv CPE pod svjetlosnim mikroskopom, utvrđivanje infekcije u bazenčiću bilo je otežano. Upotrebom fluorescencije to je olakšano jer su inficirane stanice jasno uočljive kao zeleno fluorescirajuće.

Cilj istraživanja bio je usporediti vrijednosti titra virusa mumpsa MRV3 određene u testovima plakiranja i CCID₅₀, očitanim standardno (makroskopski, svjetlosnim mikroskopom) i fluorescencijskim mikroskopom. Time sam dobila podatke o preciznosti i pouzdanosti testova te utvrdila kojim testom se dobivaju pouzdaniji rezultati. Virus MRV3 u testu plakiranja stvarao je, osim vidljivih, makroskopski nevidljive plakove, a u testu CCID₅₀ upotreba fluorescencije nije znatno utjecala na izračunati titar. To je pokazalo da je test CCID₅₀ pogodniji za određivanja titra virusa MRV3 od testa plakiranja.

Kao što sam već naglasila, konverzija vrijednosti titra u jedinicama CCID₅₀ u vrijednosti titra u jedinicama PFU bitna je u istraživanjima s animalnim modelima, industriji cjepiva, kontroli kvalitete, ispitivanju antivirusnih pripravaka ili lijekova. Kako ipak ne postoji konverzijski koeficijent koji bi se mogao upotrijebiti kod svih virusa, pa čak ni kod svih sojeva, potrebno ga je za svaki virus posebno odrediti.

U ovom istraživanju, ustanovila sam da postoji razlika u vrijednostima titra izračunatih u testovima plakiranja i CCID₅₀ te da sam veći titar izračunala testom CCID₅₀. U tome se moji podaci slažu s literaturom. U istraživanju filovirusa, soj Ebola virusa, ustanovljeno je da se testom CCID₅₀ dobije virusni titar deseterostruko veći nego testom plakiranja, odnosno $10 \text{ CCID}_{50} = 0,1 \text{ PFU}$ (Smither i sur. 2013). U istraživanju titra enterovirusa, kliničkog i kloniranog EV71 izolata, utvrđen je konverzijski koeficijent 0.04 za klinički EV71, a 0.07 za klonirani EV71 (Pourianfar i sur. 2012).

Utvrdila sam da konverzijski koeficijent za ove uzorke ne odgovara teoretskom koeficijentu od 0.7. Za uzorak MRV3 3pV VM, očitavanjem standardnim metodama izračunala sam koeficijent od 0.06, a očitavanjem fluorescencijskim mikroskopom 0.15. Za uzorak MRV3 3pV NM, očitavanjem standardnim metodama izračunala sam koeficijent od 0.04, a fluorescencijskim mikroskopom 0.09. U radu Forčića i sur određen je konverzijski koeficijent

za soj L-Zagreb od 0.1. Korištena je metoda standardnog očitavanja testova plakiranja i CCID₅₀. Podaci iz ovog istraživanja pokazuju da, bez obzira na način očitavanja, vrijednosti konverzijskog koeficijenta MRV3 ne razlikuju se bitno od konverzijskog koeficijenta L-Zagreb izračunatog u radu Forčića i sur. (2010).

Ostali sojevi mumpsa imaju konverzijske koeficijente u rasponu 1.51 za 9218/Zg98 do 0.13 za ZgA/Croa69. Za dva soja mumpsa, Jeryl Lynn-2 i Jeryl Lynn-5, utvrđeni su konverzijski koeficijenti od 0.60 odnosno 0.79 što je najbliži teoretskom koeficijentu (Forčić i sur. 2010)

Sva ta istraživanja, uključujući ovo, pokazala su da je konverzijski koeficijent bitno drugačiji od teoretske vrijednosti od 0.7 i da se mora odrediti eksperimentalno za svaki virus, a vjerojatno i za svaki soj virusa.

Ovim istraživanjem pokazala sam i da upotreba fluorescentnog virusa i očitavanja fluorescencije u testovima utječe na dobivanje višeg titra, ali ne u tolikoj mjeri da bi bitno promijenila konverzijski koeficijent.

6. ZAKLJUČAK

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti titar rekombinantnog virusa mumpsa MRV3 testovima plakiranja i 50% infektivne doze stanične kulture (CCID₅₀). Koristila sam MRV3 s ugrađenim genom za pojačani zeleni fluorescentni protein zbog kojeg inficirane stanice fluoresciraju pod fluorescencijskim mikroskopom. Time mi je bio omogućeno očitavanje, osim standardnim metodama (makroskopski i svjetlosnim mikroskopom), i fluorescencijskim mikroskopom, zbog čega sam mogla odrediti preciznosti i pouzdanost navedenih testova te u kojem se testu vrijednosti titra manje razlikuju između dva načina očitavanja. Kako bih omogućila konverziju vrijednosti titra u jedinicama CCID₅₀ u vrijednosti titra u jedinicama formiranja plakova (PFU), odredila sam konverzijski koeficijent virusa MRV3.

Svojim istraživanjem došla sam do nekoliko zaključaka.

- Rezultati testa plakiranja uzoraka MRV3 3pV VM i MRV3 3pV NM pokazali su da nema statistički značajne razlike između ponavljanja testa kada se radi o istom načinu očitavanja, da je test izveden korektno, a izračunati titar pouzdan.
- Između makroskopskog očitavanja i očitavanja fluorescencijskim mikroskopom u testu plakiranja postoji statistički značajna razlika. Očitavanjem fluorescencijskim mikroskopom izračunat je veći titar jer makroskopski nisu vidljivi svi plakovi, a to dokazuje da postoji veliki nedostatak u standardnom očitavanju testa plakiranja, što predstavlja teško rješiv problem.
- Test CCID₅₀ bio je pogodniji za određivanje titra virusa MRV3 jer upotreba fluorescencije nije znatno utjecala na izračunati titar.
- Upotreba fluorescentnog virusa i očitavanja fluorescencije u testovima utječe na dobivanje višeg titra, ali ne u tolikoj mjeri da bi bitno promijenila konverzijski koeficijent. Konverzijski koeficijent (KK) koji sam izračunala u ovom istraživanju za dva navedena uzorka virusa MRV3 (za uzorak MRV3 3pV VM očitano standardno KK = 0.06, očitano fluorescencijskim mikroskopom KK = 0.15; za uzorak MRV3 3pV NM očitano standardno KK = 0.04, očitano fluorescencijskim mikroskopom KK = 0.09) može se koristiti u daljnjim istraživanjima i olakšati konverziju jedinica CCID₅₀/volumenu u jedinice PFU/volumenu.

7. LITERATURA

- American Type Culture Collection (2012): ATCC Virology Guide. 1–35.
- Beatty S. M., Park A., Won S. T., Hong P., Lyons M., Vigant F., Freiberg A. N., Benjamin R., Duprex W. P. (2017): Reverse Genetics Systems. *Am. Soc. Microbiol.* **2**: 1–14.
- Beleni A. I., Borgmann S. (2018): Mumps in the vaccination age: Global epidemiology and the situation in Germany. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **15**: 1–14.
- Clarke D. K., Sidhu M. S., Johnson J. E., Udem S. A. (2000): Rescue of Mumps Virus from cDNA. *J. Virol.* **74**: 4831–4838.
- Connell A. R., Connell J., Leahy T. R., Hassan J. (2020): Mumps Outbreaks in Vaccinated Populations—Is It Time to Re-assess the Clinical Efficacy of Vaccines? *Front. Immunol.* **11**: 2089.
- Cox R., Plemper R. K. (2015): The paramyxovirus polymerase complex as a target for next-generation anti-paramyxovirus therapeutics. *Front. Microbiol.* **6**: 1–14.
- Forčić D., Košutić-Gulija T., Šantak M., Jug R., Ivancic-Jelecki J., Markusic M., Mažuran R. (2010): Comparisons of mumps virus potency estimates obtained by 50% cell culture infective dose assay and plaque assay. *Vaccine.* **28**: 1887–1892.
- Grigorov B., Rabilloud J., Lawrence P., Gerlier D. (2011): Rapid titration of measles and other viruses: Optimization with determination of replication cycle length. *PLoS One.* **6**: .
- Hagemann I. S. (2015): Overview of Technical Aspects and Chemistries of Next-Generation Sequencing. U: Kulkarni, S., Pfeifer, J. (ur.) *Clin. Genomics.* Oxford, Elsevier, str. 3–19.
- Hawthorne J. D., Albrecht P. (1981): Sensitive plaque neutralization assay for parainfluenza virus types 1, 2, and 3 and respiratory syncytial virus. *J. Clin. Microbiol.* **13**: 730–737.
- Hilleman M. R. (2011): The Development of Live Attenuated Mumps Virus Vaccine in Historic Perspective and Its Role in the Evolution of Combined Measles – Mumps – Rubella. U: Plotkin, S. A. (ur.) *Hist. Vaccine Dev.* New York, Springer, str. 207–218.
- Hviid A., Rubin S., Mühlemann K. (2008): Mumps. *Lancet.* **371**: 932–944.
- Lamb R. A., Parks G. D. (2013): Paramyxoviridae. U: Knipe, D. M., Howley, P. M. (ur.) *Fields Virol.* Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, str. 957–996.

- Langmead B., Salzberg S. L. (2012): Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. **9**: 357–359.
- Lauring A. S., Andino R. (2010): Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathog*. **6**: 1–8.
- Mak T. W., Saunders M. E. (2006): *Vaccines and Clinical Immunization. The Immune Response*. Elsevier, str. 695–749.
- Mandary M. B., Masomian M., Poh C. L. (2019): Impact of RNA Virus Evolution on Quasispecies Formation and Virulence. *Int. J. Mol. Sci*. **20**: 1–33.
- Masci A. L., Menesale E. B., Chen W. C., Co C., Lu X., Bergelson S. (2019): Integration of Fluorescence Detection and Image-Based Automated Counting Increases Speed, Sensitivity, and Robustness of Plaque Assays. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev*. **14**: 270–274.
- McKimm-Breschkin J. L. (2004): A simplified plaque assay for respiratory syncytial virus—direct visualization of plaques without immunostaining. *J. Virol. Methods*. **120**: 113–117.
- Mendoza E. J., Manguiat K., Wood H., Drebot M. (2020): Two Detailed Plaque Assay Protocols for the Quantification of Infectious SARS-CoV-2. *Curr. Protoc. Microbiol*. **57**: 1–15.
- Pourianfar H. R., Javadi A., Grollo L. (2012): A colorimetric-based accurate method for the determination of enterovirus 71 titer. *Indian J. Virol*. **23**: 303–310.
- Rubin S. A., Afzal M. A., Powell C. L., Bentley M. L., Auda G. R., Taffs R. E., Carbone K. M. (2005): The Rat-Based Neurovirulence Safety Test for the Assessment of Mumps Virus Neurovirulence in Humans: An International Collaborative Study. *J. Infect. Dis*. **191**: 1123–1128.
- Rubin S. A., Plotkin S. A. (2013): Mumps vaccine. U: Plotkin, S. A., Orenstein, W. A., Offit, P. A. (ur.) *Vaccines*. Philadelphia, Elsevier, str. 419–446.
- Rubin S. A., Sauder C. J., Carbone K. M. (2013): Mumps Virus. U: Knipe, D. M., Howley, P. M. (ur.) *Fields Virol*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, str. 1024–1041.
- Šantak M., Lang-Balija M., Ivančić-Jelečki J., Košutić-Gulija T., Ljubin-Sternak S., Forčić D. (2013): Antigenic differences between vaccine and circulating wild-type mumps viruses

- decreases neutralization capacity of vaccine-induced antibodies. *Epidemiol. Infect.* **141**: 1298–1309.
- Shah M., Quinlisk P., Weigel A., Riley J., James L., Patterson J., Hickman C., Rota P. A., Stewart R., Clemmons N., Kalas N., Cardemil C., Patel M., Donahue M., Schneider A., Ukegbu U., Wittich K., Kellogg J., Beardsley D., Tran N., Callaghan D., Pyatt A., Kitzmann T., Kintigh B. (2018): Mumps Outbreak in a Highly Vaccinated University-Affiliated Setting before and after a Measles-Mumps-Rubella Vaccination Campaign-Iowa, July 2015-May 2016. *Clin. Infect. Dis.* **66**: 81–88.
- Smith E. C., Popa A., Chang A., Masante C., Dutch R. E. (2009): Viral entry mechanisms: The increasing diversity of paramyxovirus entry. *FEBS J.* **276**: 7217–7227.
- Smither S. J., Lear-rooney C., Biggins J., Pettitt J., Lever M. S., Olinger G. G. (2013): Comparison of the plaque assay and 50 % tissue culture infectious dose assay as methods for measuring filovirus infectivity. *J. Virol. Methods.* **193**: 565–571.
- Thompson K. A. S., Yin J. (2010): Population dynamics of an RNA virus and its defective interfering particles in passage cultures. *Virol. J.* **7**: 1–10.
- Wang D.-Y., Yeh S.-Y., Chou C.-P., Cheng H.-F., Hsieh J.-T., Lin C.-P. (2020): Evaluation and validation of potency testing method for live rubella virus vaccine. *J. Food Drug Anal.* **9**: 183–190.
- WHO (2007): Mumps virus vaccines: WHO position paper. *Wkly. Epidemiol. Rec.* **82**: 51–60.
- WHO (2014): Observed Rate of Vaccine Reactions – MMR Vaccines. *Inf. Sheet.* 1–11.
- WHO Biologicals Unit (1995): Manual of laboratory methods for potency testing of vaccines used in the WHO Expanded Programme on Immunization. *World Heal. Organ.*
- WHO Expert Committee on biological Standardization (Geneva, 1994). *WHO Technical Report Series* 840.
- Xu J., Zhanga Y., Williams J. V. (2018): Development and optimization of a direct plaque assay for trypsin-dependent human metapneumovirus strains. *J Virol Methods.* **259**: 1–9.
- Yang X., Charlebois P., Macalalad A., Henn M., Zody M. C. (2013): V-Phaser 2.0: Variant Inference for Viral Populations. *BMC Genomics.* **14**: 674.
- Zhang G., Gurtu V., Kain S. R. (1996): An enhanced green fluorescent protein allows sensitive

detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **227**: 707–711.

Zhang Y., Wei Y., Li J., Li J. (2012): Development and optimization of a direct plaque assay for human and avian metapneumoviruses. *J. Virol. Methods.* **185**: 61–68.

<https://www.cdc.gov/mumps/about/photos.html> (pristupljeno 21.12.2020.)

https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=19710227&src=NCBI&ictv_id=19710227 (pristupljeno 20.01.2020.)

https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/crl-1586.aspx?geo_country=hr#generalinformation (pristupljeno 25.1.2021.)

PRILOZI:

Prilog I. Rezultati određivanja titra u testu plakiranja uzorka rekombinarnog virusa mumpsa MRV3 iz treće pasaže na Vero stanicama s visokim multiplicitetom infekcije (MRV3 3pV VM), očitano iz razrjeđenja virusa 2×10^{-4} i 4×10^{-4} makroskopski (vizualno) i fluorescencijskim mikroskopom. Prikazano je svako pojedino ponavljanje i pojedino razrjeđenje, broj plakova po razrjeđenju, srednja vrijednost plakova, izračun PFU/ml titra i izračun logPFU/ml titra. Oštećeni stanični sloj koji nije mogao biti očitati, označen je sa ×.

ponavljanje	2×10^{-4}				4×10^{-4}			
	MAKROSKOPSKI				MAKROSKOPSKI			
	broj plakova		PFU/ml	logPFU/ml	broj plakova		PFU/ml	logPFU/ml
1	21	22	4.30×10^5	5.633	10	13	4.60×10^5	5.663
2	15	15	3.00×10^5	5.477	14	15	5.80×10^5	5.763
3	18	16	3.40×10^5	5.531	3	4	1.40×10^5	5.146
4	15	13	2.80×10^5	5.447	×	9	3.60×10^5	5.556
5	19	25	4.40×10^5	5.643	10	6	3.20×10^5	5.505
6	15	15	3.00×10^5	5.477	10	9	3.80×10^5	5.580
7	14	20	3.40×10^5	5.531	11	10	4.20×10^5	5.623
8	15	16	3.10×10^5	5.491	7	8	3.00×10^5	5.477
9	17	×	3.40×10^5	5.531	7	4	2.20×10^5	5.342
10	14	12	2.60×10^5	5.415	9	6	3.00×10^5	5.477
srednja vrijednost	16.684		3.34×10^5	5.518	8.684		3.48×10^5	5.513
ponavljanje	FLUORESCENCIJSKI MIKROSKOP				FLUORESCENCIJSKI MIKROSKOP			
	broj plakova		PFU/ml	logPFU/ml	broj plakova		PFU/ml	logPFU/ml
	broj plakova		PFU/ml	logPFU/ml	broj plakova		PFU/ml	logPFU/ml
1	41	53	9.40×10^5	5.973	27	33	1.20×10^6	6.079
2	50	43	9.30×10^5	5.968	30	31	1.22×10^6	6.086
3	46	42	8.80×10^5	5.944	22	24	9.20×10^5	5.964
4	46	43	8.90×10^5	5.949	×	29	1.16×10^6	6.064
5	54	52	1.06×10^6	6.025	24	25	9.80×10^5	5.991
6	47	51	9.80×10^5	5.991	24	29	1.06×10^6	6.025
7	52	51	1.03×10^6	6.013	25	20	9.00×10^5	5.954
8	44	47	9.10×10^5	5.959	28	23	1.02×10^6	6.009
9	57	48	1.05×10^6	6.021	25	26	1.02×10^6	6.009
10	53	51	1.04×10^6	6.017	29	28	1.14×10^6	6.057
srednja vrijednost	48.550		9.71×10^5	5.986	26.421		1.06×10^6	6.024

Prilog II. Rezultati određivanja titra u testu 50% infektivne doze stanične kulture (CCID₅₀) uzorka rekombinantnog virusa mumpsa MRV3 iz treće pasaže na Vero stanicama i s visokim multiplicitetom infekcije (MRV3 3pV VM), izvedenom s početnim razrjeđenjem virusa 1×10^{-3} te očitano svjetlosnim mikroskopom i fluorescencijskim mikroskopom. Prikazano je svako pojedino ponavljanje, srednja vrijednost, izračun nekorigiranih i korigiranih log(titar) u testu, i nekorigiranih i korigiranih log(titar) u volumenu 1 ml. Korigirani titar je izračunat prema titru laboratorijskog referentnog soja koji nije prikazan u ovoj tablici.

ponavljanje	SVJETLOSNI MIKROSKOP				FLUORESCENCIJSKI MIKROSKOP				
	nekorigirani log(titar) u testu	korigirani log(titar) u testu	nekorigirani log(titar) u volumenu 1 ml	korigirani log(titar) u volumenu 1 ml	nekorigirani log(titar) u testu	korigirani log(titar) u testu	nekorigirani log(titar) u volumenu 1 ml	korigirani log(titar) u volumenu 1 ml	
08.10.2020.	1	5.565	6.244	6.565	7.244	5.922	6.601	6.922	7.601
	2	5.565	6.244	6.565	7.244	5.803	6.482	6.803	7.482
	3	5.565	6.244	6.565	7.244	5.743	6.423	6.743	7.423
	4	5.266	5.945	6.266	6.945	5.445	6.124	6.445	7.124
09.10.2020.	5	5.982	6.751	6.982	7.751	5.922	6.691	6.922	7.691
	6	5.624	6.393	6.624	7.393	5.684	6.452	6.684	7.452
	7	5.684	6.452	6.684	7.452	5.624	6.393	6.624	7.393
	8	5.624	6.393	6.624	7.393	5.624	6.393	6.624	7.393
12.10.2020.	9	5.803	6.467	6.803	7.467	5.982	6.646	6.982	7.646
	10	5.863	6.527	6.863	7.527	5.922	6.587	6.922	7.587
	11	5.803	6.467	6.803	7.467	5.922	6.587	6.922	7.587
	12	5.743	6.408	6.743	7.408	5.863	6.527	6.863	7.527
15.10.2020.	13	5.684	6.393	6.684	7.393	5.803	6.512	6.803	7.512
	14	5.863	6.572	6.863	7.572	5.863	6.572	6.863	7.572
	15	5.863	6.572	6.863	7.572	5.922	6.631	6.922	7.631
16.10.2020.	16	5.982	6.616	6.982	7.616	6.042	6.676	7.042	7.676
	17	5.743	6.378	6.743	7.378	5.863	6.497	6.863	7.497
srednja vrijednost	5.719	6.416	6.719	7.416	5.821	6.517	6.821	7.517	

Prilog III. Rezultati određivanja titra u testu plakiranja uzorka rekombinatnog virusa mumpsa MRV3 iz treće pasaže na Vero stanicama i s niskim multiplicitetom infekcije (MRV3 3pV NM), očitano za razrjeđenja virusa 4×10^{-5} i 8×10^{-5} , makroskopski (vizualno) i fluorescencijskim mikroskopom. Prikazano je svako pojedino ponavljanje i pojedino razrjeđenje, broj plakova po razrjeđenju, srednja vrijednost plakova, izračun PFU/ml titra i izračun logPFU/ml titra. Oštećeni stanični sloj koji nije mogao biti očitati, označen je sa ×.

ponavljanje	4×10^{-5}				8×10^{-5}			
	MAKROSKOPSKI				MAKROSKOPSKI			
	broj plakova		PFU/ml	logPFU/ml	broj plakova		PFU/ml	logPFU/ml
1	14	18	6.40×10^6	6.806	11	10	8.40×10^6	6.924
2	22	18	8.00×10^6	6.903	8	10	7.20×10^6	6.857
3	12	12	4.80×10^6	6.681	7	6	5.20×10^6	6.716
4	14	22	7.20×10^6	6.857	9	10	7.60×10^6	6.881
5	18	12	6.00×10^6	6.778	14	16	1.20×10^7	7.079
6	20	20	8.00×10^6	6.903	15	17	1.28×10^7	7.107
7	18	20	7.60×10^6	6.881	10	9	7.60×10^6	6.881
8	16	15	6.20×10^6	6.792	10	7	6.80×10^6	6.833
9	18	20	7.60×10^6	6.881	14	11	1.00×10^7	7.000
10	16	×	6.40×10^6	6.806	8	7	6.00×10^6	6.778
srednja vrijednost	17.105		6.82×10^6	6.829	6.829		8.36×10^6	6.906
ponavljanje	FLUORESCENCIJSKI MIKROSKOP				FLUORESCENCIJSKI MIKROSKOP			
	broj plakova		PFU/ml	logPFU/ml	broj plakova		PFU/ml	logPFU/ml
	1	38	39	1.54×10^7	7.188	22	14	1.44×10^7
2	39	34	1.46×10^7	7.164	18	21	1.56×10^7	7.193
3	48	47	1.90×10^7	7.279	22	27	1.96×10^7	7.292
4	45	45	1.80×10^7	7.255	31	31	2.48×10^7	7.394
5	51	47	1.96×10^7	7.292	25	21	1.84×10^7	7.265
6	38	40	1.56×10^7	7.193	29	26	2.20×10^7	7.342
7	43	53	1.92×10^7	7.283	27	25	2.08×10^7	7.318
8	45	50	1.90×10^7	7.279	21	28	1.96×10^7	7.292
9	46	41	1.74×10^7	7.241	28	25	2.12×10^7	7.326
10	38	36	1.48×10^7	7.170	26	24	2.00×10^7	7.301
srednja vrijednost	43.150		1.73×10^7	7.234	24.550		1.96×10^7	7.288

Prilog IV. Rezultati određivanja titra u testu 50% infektivne doze stanice kulture (CCID₅₀) uzorka rekombinantnog virusa mumpsa MRV3 iz treće pasaže na Vero stanicama s niskim multiplicitetom infekcije (MRV3 3pV NM), izvedenom s početnim razrjeđenjem 1×10^{-4} i 1×10^{-5} (odijeljeno podebljanom linijom) te očitano svjetlosnim mikroskopom i fluorescencijskim mikroskopom. Prikazano je svako pojedino ponavljanje, srednja vrijednost, izračun nekorigiranih i korigiranih log(titar) u testu, i nekorigiranih i korigiranih log(titar) u volumenu 1 ml. Korigirani titar je izračunat prema titru laboratorijskog referentnog soja koji nije prikazan u ovoj tablici.

		SVJETLOSNI MIKROSKOP				FLUORESCENCIJSKI MIKROSKOP			
ponavljanje		nekorigirani log(titar) u testu	korigirani log(titar) u testu	nekorigirani log(titar) u volumenu 1 ml	korigirani log(titar) u volumenu 1 ml	nekorigirani log(titar) u testu	korigirani log(titar) u testu	nekorigirani log(titar) u volumenu 1 ml	korigirani log(titar) u volumenu 1 ml
08.10.2020.	1	7.161	7.840	8.161	8.840	7.340	8.019	8.340	9.019
	2	7.221	7.900	8.221	8.900	7.459	8.138	8.459	9.138
09.10.2020.	3	7.340	8.108	8.340	9.108	7.101	7.870	8.101	8.870
	4	7.519	8.287	8.519	9.287	7.638	8.407	8.638	9.407
15.10.2020.	5	7.221	7.930	8.221	8.930	7.280	7.989	8.280	8.989
	6	7.221	7.930	8.221	8.930	7.221	7.930	8.221	8.930
23.10.2020.	7	7.565	8.142	8.565	9.142	7.684	8.261	8.684	9.261
	8	7.565	8.142	8.565	9.142	7.684	8.261	8.684	9.261
	9	7.565	8.142	8.565	9.142	7.624	8.202	8.624	9.202
02.11.2020.	10	7.147	7.680	8.147	8.680	7.147	7.680	8.147	8.680
	11	7.207	7.740	8.207	8.740	7.147	7.680	8.147	8.680
	12	7.207	7.740	8.207	8.740	7.147	7.680	8.147	8.680
	13	6.908	7.441	7.908	8.441	7.087	7.620	8.087	8.620
13.11.2020.	14	7.087	7.590	8.087	8.590	6.908	7.412	7.908	8.412
	15	6.849	7.352	7.849	8.352	6.908	7.412	7.908	8.412
	16	6.968	7.471	7.968	8.471	7.028	7.531	8.028	8.531
	17	6.730	7.233	7.730	8.233	7.087	7.590	8.087	8.590
srednja vrijednost		7.205	7.804	8.205	8.804	7.264	7.864	8.264	8.864

Prilog V. Rezultati određivanja titra u testu plakiranja uzorka rekombinantog virusa mumpsa MRV3 iz treće pasaže na Vero stanicama s niskim multiplicitetom infekcije (MRV3 3pV NM), s dodatkom aktinomicina D (akt D) u koncentracijama 0 µg/ml, 0.1 µg/ml, 0.2 µg/ml i 0.3 µg/ml. Prikazani su rezultati testa očitnog iz razrjeđenja virusa 4×10^{-5} i 8×10^{-5} makroskopski (vizualno) i fluorescencijskim mikroskopom. Prikazano je svako pojedino ponavljanje i pojedino razrjeđenje, broj plakova po razrjeđenju, srednja vrijednost plakova, izračun PFU/ml titra i izračun logPFU/ml titra.

konc. akt D	ponavljanje	4×10^{-5}			8×10^{-5}		
		MAKROSKOPSKI			MAKROSKOPSKI		
		broj plakova	PFU/ml	logPFU/ml	broj plakova	PFU/ml	logPFU/ml
0 µg/ml	1	20			5		
	2	15	6.13×10^6	6.788	9	6.67×10^6	6.824
	3	18			11		
0.1 µg/ml	4	5	3.60×10^6	6.556	7	5.60×10^6	6.742
	5	14			7		
0.2 µg/ml	6	10	5.33×10^6	6.727	3	5.07×10^6	6.705
	7	18			9		
0.3 µg/ml	8	4	2.40×10^6	6.380	3	2.40×10^6	6.380
		FLUORESCENCIJSKI MIKROSKOP			FLUORESCENCIJSKI MIKROSKOP		
konc. akt D	ponavljanje	broj plakova	PFU/ml	logPFU/ml	broj plakova	PFU/ml	logPFU/ml
0 µg/ml	1	36			11		
	2	46	1.72×10^7	7.236	25	1.76×10^7	7.246
	3	47			22		
0.1 µg/ml	4	40	1.60×10^7	7.204	23	1.84×10^7	7.265
	5	43			16		
0.2 µg/ml	6	43	1.83×10^7	7.262	27	1.84×10^7	7.265
	7	51			26		
0.3 µg/ml	8	41	1.64×10^7	7.215	21	1.68×10^7	7.225

Prilog VI. Sekvenca uzorka MRV3 dobivena je sekvenciranjem metodom sljedeće generacije, na Illumina Miniseq sustavu za sekvenciranje. Procesiranje sekvenci (engl. raw reads) uključivalo je uklanjanje sekvenci adaptera, regija koje su ispod zadovoljavajuće kvalitete (baze koje su ispod Q20 prema Phred ocjenama kvalitete) te sekvenci kraćih od 30 bp, za što je korišten program BBDuk. Potom su sekvence sravnjene na referentni genom MRV3 korištenjem Bowtie2 programa (Langmead i Salzberg 2012). Varijante u odnosu na referentni genom određene izračunom frekvencije varijante u sravnjenju pomoću programa V-Phaser 2 uz automatske postavke programa (Yang i ostali 2013).

#	Ref_Pos	Var	Cons	Strd_bias_pval	Type	Var_perc	SNP_or_LP_Profile			
	11	G	A	0.9969	snp	29.06	A:61:22	G:25:9		
	1588	C	T	0.01998	snp	4.417	C:8:28	T:325:454		
	1952	C	T	0.7214	snp	2.092	A:1:0	C:14:7	T:617:365	
	4814	A	C	0.3211	snp	2.038	A:56:39	C:2456:2104	G:2:3	T:0:2
	5194	G	A	0.7094	snp	2.944	A:2002:2374	C:2:0	G:63:70	T:1:5
	7439	A	G	0.02793	snp	2.222	A:54:87	C:3:2	G:3240:2948	T:5:6
	9481	G	A	0.4064	snp	3.799	A:1291:984	G:55:35	T:1:3	
	10572	C	T	0.7422	snp	25.8	A:2:1	C:243:255	G:1:0	T:718:710
	11558	C	T	0.9135	snp	3.131	A:7:4	C:50:38	T:1556:1156	
	13670	A	G	0.05789	snp	2.419	A:104:168	C:7:1	G:4819:6131	T:3:11
	15103	A	G	0.6395	snp	3.059	A:186:181	C:15:0	G:6009:5578	T:14:13

ŽIVOTOPIS:

Osobne informacije:

Ime i prezime: Sara Drk

Datum rođenja: 28.1.1997.

Obrazovanje:

2018 – 2021 Diplomski studij eksperimentalne biologije

Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek

2015 – 2018 Preddiplomski studij biologije

Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju

Titula: univ. bacc. biol.

2011 – 2015 Srednja škola

Gimnazija Josipa Slavenskog u Čakovcu

Praktično iskustvo:

Student demonstrator na kolegijima: Biokemija 1, Biokemija 2

Laboratorijska stručna praksa na Zavodu za animalnu fiziologiju, Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu

Organizacija i sudjelovanje u popularno-znanstvenoj manifestaciji „Tjedan mozga“ 2016/17, 2017/18

Organizacija i sudjelovanje u popularno-znanstvenoj manifestaciji „Noć biologije“ 2018/19

Terenska nastava iz zoologije i botanike

Certifikat s tečaja za osposobljavanje za rad s laboratorijskim životinjama

Ostale vještine

- jezici: hrvatski (materinji), engleski

- digitalne vještine: Microsoft Windows, MS Office

- vozačka dozvola B kategorije