

ISPITIVANJE HEMADSORPCIONIH SVOJSTAVA
GLIKOPROTEINSKIH HN I F ANTIGENA SPOLJAŠNJEG
OMOTAČA VIRUSA NEWCASTLE BOLESTI *IN VITRO*^{*}
*INVESTIGATIONS OF HEMADSORPTION CHARACTERISTICS OF
GLYCOPROTEIN HN AND F ANTIGENS OF NEWCASTLE DISEASE
VIRUS ENVELOPE IN VITRO*

J. Nišavić, N. Milić^{**}

Cilj naših istraživanja bilo je ispitivanje hemadsorpcionih svojstava glikoproteinskih HN i F antigena spoljašnjeg omotača virusa Newcastle bolesti. Posle 6 časova od inokulacije ćelijske linije Vero virusom Newcastle bolesti, prethodno aktivisanim sa 0,025 g/dl tripsin-versena, pojava hemadsorpcije je ustanovljena u manjem intenzitetu u razređenjima antigena od 1:8 do 1:16. Hemadsorpcija je ustanovljena u pomenutim ćelijskim linijama i posle 12 časova od inokulacije u razređenju virusa od 1:64, dok je posle 24 časa od inokulacije hemadsorpcija bila prisutna i u razređenju virusa od 1:256. Posle 24 časa od inokulacije ćelijske linije Vero uzorcima virusa Newcastle bolesti, aktivisanih tripsin-versenom i dodavanja specifičnog imunog seruma, ustanovljena je inhibicija hemadsorpcije kod inokulisanih ćelija sa razređenjem imunog seruma od 1:64.

Ključne reči: Virus Newcastle bolesti, Vero ćelije, hemadsorpcija, inhibicija hemadsorpcije

Uvod / Introduction

Virus Newcastle bolesti poseduje spoljašnji omotač u čijem sastavu se nalaze dva površinska glikoproteinska antigena hemaglutinin-neuraminidazni (HN) i fuzioni (F) proteinski molekul. Hemaglutinin-neuraminidazni (HN) protein virusa Newcastle bolesti ima višestruku ulogu. Najpre obezbeđuje aktivaciju vezivanja virusa za receptore na površini ćelije i time omogućava virusnu infekciju

* Rad primljen za štampu 6. 12. 2006. godine

** Mr Jakov Nišavić, asistent, dr Nenad Milić, red. profesor, Katedra za mikrobiologiju, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

ćelije, zatim aktivira neuraminidazu i pokreće proces ćelijske fuzije sa fuzionim (F) proteinom.

Fuzioni (F) protein spoljašnjeg omotača virusa Newcastle bolesti sintetise se kao neaktivni prekursor označen sa Fo, koji se pod dejstvom ćelijskih proteaza cepa na dve subjedinice koje ostaju povezane disulfidnim vezama. Na ovaj način postaje biološki aktivan i odgovoran za odvijanje procesa virusno – ćelijske i ćelijsko-ćelijske fuzije, kao i procesa hemolize.

Materijal i metode rada / *Materials and methods*

Virus i kultura tkiva / Virus and tissue culture

Virus Newcastle bolesti, soj La Sota = $10^{-5,45}$ ($\log 10^{-5,45}$ TCID₅₀/0,1 ml) čiji je hemaglutinacioni titar bio 64HJ/0,1 ml ispitivan je primenom testova hemadsorpcije i inhibicije hemadsorpcije na ćelijskoj liniji Vero.

Imuni serum / Immune serum

Za izvođenje testa inhibicije hemadsorpcije, korišćen je imuni serum protiv virusa Newcastle bolesti, titra od 1:64 (Veterinarski zavod Zemun iz Zemuna).

Test hemadsorpcije / Hemadsorption test

U udubljenja mikrotitracionih ploča sa ravnim dnom u kojima se nalazio sloj Vero ćelija pojedinačno su inokulisana u količini od po 50 μ l dvostruka razređenja virusa Newcastle bolesti u 2% Eagle MEM-u počev od 1:2 do 1:512, koja su prethodno aktivisana sa 0,025 g/dl tripsin-versena. Posle perioda inkubacije u trajanju od 6 časova, 12 časova i 24 časa odlivana je podloga i dodavane su količine od po 50 μ l 0,5% suspenzije eritrocita kokoši. Ovako pripremljene mikrotitracione ploče inkubisane su pola časa na temperaturi od 4°C, a zatim je odlivan višak suspenzije eritrocita, a ćelije ispirane rastvorom fosfatnog pufera (PBS). Tri poslednja udubljenja mikrotitracionih ploča sa Vero ćelijama su služila za kontrolu tkiva, kontrolu virusa i kontrolu eritrocita. Reakcija hemadsorpcije u mikrotitracionim pločama, odnosno vezivanje eritrocita za ćelije kulture tkiva u kojima se nalazio virus, posmatrana je pod mikroskopom za kulturu tkiva.

Test inhibicije hemadsorpcije / Hemadsorption inhibition test

U udubljenja mikrotitracionih ploča sa ravnim dnom sa Vero ćelijama pojedinačno inokulisanim sa po 100 LD₅₀ virusa Newcastle bolesti, u količini od po 50 μ l, posle inkubisanja inokulisanih ćelija tokom vremenskog perioda od 24 časa na temperaturi od 36°C, ćelijama u bazenčićima su pojedinačno dodate količine od po 50 μ l specifičnog imunog seruma u razređenjima od 1:2 do 1:512. Ćelije su inkubisane pola časa na sobnoj temperaturi. Posle perioda inkubacije u sve bazenčiće mikrotitracionih ploča je dodato po 50 μ l 0,5% suspenzije eritrocita

kokoši i mikrotitracione ploče su ponovo inkubisane pola časa na temperaturi od 4°C. Posle inkubacije odlivan je višak suspenzije eritrocita, a ćelije ispirane PBS-om. Takođe, tri poslednja udubljenja mikrotitracionih ploča sa kulturom tkiva služila su za kontrolu tkiva, kontrolu seruma i kontrolu virusa. Ovako pripremljene mikrotitracione ploče su posmatrane pod mikroskopom za kulturu tkiva.

Rezultati / Results

Kod uzoraka virusa NDV koji su prethodno aktivisani sa 0,025g/dl tripsin-versena, posle 6 časova od inokulacije, hemadsorpcija se pojavila u manjem intenzitetu u razređenjima antigena virusa počev od 1:8 do 1:16. Nakon 12 časova od inokulacije virusa, hemadsorpcija je ustanovljena do razređenja antigena virusa od 1:64, da bi posle 24 časa od inokulacije virusa hemadsorpcija bila utvrđena do razređenja antigena od 1:256 (tabela 1).

Tabela 1. Hemadsorpciona aktivnost glikoproteinskih antigena spoljašnjeg omotača uzoraka virusa NDV, prethodno aktivisanih tripsin-versenom
Table 1. Hemadsorption activity of the glycoprotein antigens of the outer envelope of Newcastle disease virus, previously activated with trypsin-versen

Vreme proteklo od inokulacije Vero ćelija sa tripsin-versenom aktivisanim uzorcima virusa NDV / Elapsed time from inoculation of Vero cells with the samples of NDV, activated with trypsin-versen	Razređenja virusa NDV koje je izazvalo pojavu hemadsorpcije u inokulisanim Vero ćelijama / Dilutions of the Newcastle disease virus which induced hemadsorption in inoculated Vero cells
6 h	1:2, 1:4, 1:8 i 1:16
12 h	1:2, 1:4, 1:8; 1:16; 1:32 i 1:64
24 h	1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128 i 1:256

Uzorci virusa NDV, aktivisani tripsin-versenom, inokulisani su u ćelijsku liniju Vero i posle 24 časa im je dodavan specifični imuni serum. Ustanovljena je inhibicija hemadsorpcije kod inokulisanih ćelija tretiranih sa razređenjem seruma od 1:64.

Diskusija / Discussion

Ispitivanje hemadsorpcionih svojstava glikoproteinskih HN i F antigena spoljašnjeg omotača virusa Newcastle bolesti obavljali smo primenom testova hemadsorpcije i inhibicije hemadsorpcije. Primenom testa hemadsorpcije ustanovljena je pojava adsorpcije eritrocita zamorca na površinu Vero ćelija inokulisanih uzorcima aktivisanog virusa Newcastle bolesti već posle 6 časova. Ista se intenzivirala posle vremenskog perioda od 12 časova, odnosno 24 časa od inokulacije prethodno pomenutog virusa. Peter G. Polos i sar [2] pojavu hemadsorpcije kvantitativno su određivali na osnovu procenta ćelija koje su adsorbivale dva ili

više eritrocita u populaciji od 200 ćelija CHO-15B ćelijske linije inokulisane virusom Newcastle bolesti. Autori su na ovaj način ustanovili pojavu hemadsorpcije već posle 6 časova od inokulacije virusa u slabijem i posle 13 časova od inokulacije virusa u jačem intenzitetu. Milić [3] je pratio pojavu hemadsorpcije 0,4 % suspenzije eritrocita zamorca na inokulisanim ćelijskim linijama PK-15, TB, AUBEK i MDBK posle na 6 časova, 12 časova, 24 časa, 48 časova i 72 časa od inokulacije virusa PI3. Rezultati navedenih ispitivanja su pokazali da je hemadsorpcija u inokulisanim ćelijskim linijama PK-15, TB i AUBEK bila pozitivna posle 12 časova od inokulacije virusa, dok je kod ćelijske linije MDBK ustanovljena posle 24 časa od inokulacije. U svim prethodno navedenim ćelijskim linijama, utvrđena je pojava adsorpcije eritrocita na površine ćelija inficiranih virusom posle 24 časa od inokulacije virusa. Zhuhui Huang i sar [11] primenom više testova uključujući i test hemadsorpcije ustanovili su značajnu ulogu HN proteina u virulenciji virusa Newcastle bolesti. Aruna Panda i sar [9] primenom metode RT-PCR i testa hemadsorpcije, ispitivali ulogu koju amino-kiselinska sekvenca koja se nalazi na fuzionom proteinu virusa Newcastle bolesti i na koje deluju enzimi proteaze, ima u procesu aktivacije ovog proteina. Rezultati ispitivanja su pokazali da je aktivacija fuzionog (F) proteina delovanjem intracelularnih proteaza, od izuzetnog značaja za virulenciju virusa Newcastle bolesti. Katz i sar [1] posle inokulacije virusa Newcastle bolesti u kulturu embrionalnih pilećih fibroblasta, ispitivali su neke biološke karakteristike njegovih glikoproteinskih HN i F antigena primenom testova hemadsorpcije i inhibicije hemadsorpcije. Rezultati testa inhibicije hemadsorpcije su pokazali da je primenom specifičnog imunog seruma protiv virusa Newcastle bolesti, nastala inhibicija procesa adsorpcije eritrocita na površini ćelija inficiranih pomenutim virusom.

Zaključak / Conclusion

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja, može da se zaključi da testovi hemadsorpcije i inhibicije hemadsorpcije mogu, zajedno za drugim standardnim virusološkim metodama, uspešno da se koriste za ispitivanje nekih bioloških karakteristika glikoproteinskih HN i F antigena spoljašnjeg omotača virusa Newcastle bolesti.

Literatura / References

1. Katz D., Ben-Moshe Hana, Shlomit Alon: Titration of Newcastle Disease Virus and Its Neutralizing Antibodies in Microplates by a Modified Hemadsorption and Hemadsorption Inhibition Method, *Journal of Clinical Microbiology*, 3, 227-232, 1976. - 2. Polos P. *et al.*: Insensitivity of a Ricin-Resistant Mutant of Chinese Hamster Ovary Cells to Fusion Induced by Newcastle Disease Virus, *Journal of Virology*, 30, 69-75, 1979. - 3. Milić N.: Magistarska teza pod naslovom: Rano otkrivanje virusa PI3 u različitim kulturama tkiva uporednim ispitivanjem nekoliko metoda, 1989. - 4. Ah-Tye *et al.*: Virus-receptor interaction of human parainfluenza viruses types 1, 2 and 3, *Microb Pathog*, 27, 5, 329-336, 1999. - 5.

Chen L. *et al.*: The structure of the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus suggests a novel paradigm for the molecular mechanism of membrane fusion, *Structure (Camb)*, 9, 3, 255-266., 2001. - 6. Morrison G. Trudy: The three faces of paramyxovirus attachment proteins, *Trends in Microbiology*, 9, 3, 2001. - 7. Morrison G. Trudy: Structure and function of a paramyxovirus fusion protein, *Biochimica et Biophysica Acta* 1614, 73-84, 2003. - 8. Lawrence C. M. *et al.*: Structure of the Hemagglutinin-neuraminidase from Human Parainfluenza Virus Type 3, *J. Mol. Biol.*, 335, 1343-1357, 2004. - 9. Panda Aruna *et al.*: Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virus, *Microb. Pathog.*, 36, 1, 1-10, 2004. - 10. Ferreira Laura *et al.*: Gangliosides and N-glycoproteins function as Newcastle disease virus receptors, *Int J Biochem Cell Biol.*, 36, 11, 2344-2356, 2004. - 11. Zhuhui Huang *et al.*: The hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence, *J. Virol.*, 78, 8, 4176-4184, 2004.

ENGLISH

INVESTIGATIONS OF HEMADSORPTION CHARACTERISTICS OF GLYCOPROTEIN HN AND F ANTIGENS OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS ENVELOPE *IN VITRO*

J. Nisavic, N. Milic

The objective of these investigations was to examine the hemadsorption characteristics of glycoprotein HN and F antigens of the Newcastle Disease virus envelope. Six hours following inoculation of the cell line with the Newcastle Disease Vero virus, previously activated with 0.025 g/dl trypsin-versene, the appearance of hemadsorption was established in a smaller intensity in antigens diluted in ratios from 1:8 to 1:16. Hemadsorption was also determined in the mentioned cell lines 12 hours following inoculation in viruses diluted 1:64, while hemadsorption was present in virus dilutions of 1:256 after 24 hours. Inhibition of hemadsorption in inoculated cells with immune serum dilutions of 1:64 was established 24 hours following inoculation of the cell line with Vero samples of the Newcastle Disease virus, activated with trypsin-versene and the addition of specific immune serum.

Key words: Newcastle Disease virus, Vero cells, hemadsorption, hemadsorption inhibition

РУССКИЙ

ИСПЫТАНИЕ ХЕМАДСОРБЦИОННЫХ СВОЙСТВ ГЛИКОПРОТЕИНЫХ HN И F АНТИГЕНОВ НАРУЖНОЙ ОБЛОЧКИ ВИРУСА НЬЮКАСЛА БОЛЕЗНИ, *IN VITRO*

Й. Нишавич, Н. Мишич

Цель наших исследований было испытание хемадсорбционных свойств гликoproteиных HN и F антигенов наружной оболочки вируса Ньюкасла болезни. После 6 ч. от инокуляции клеточной линии Vero вирусом Ньюкасла болезни, предварительно, активированным с 0,025 г для трипсин-версена, явление хемадсорбции установлено в более маленькой интенсивности в разрежениях антигена от 1:8 до 1:16. Хемадсорбция установлена в упомянутых клеточных линиях и после 12 ч. от

инокуляции в разрезении вируса от 1:64, пока после 24 ч. от инокуляции хемадсорбция была присутствующая и в разрезении вируса от 1:256. После 24 ч. от инокуляции клеточной линии Vero образчиками вируса Ньюкасла болезни, активированных трипсин-версеном и добавления специфического иммунного серума, установлено торможение хемадсорбции у инокуляционных клеток с разрезением иммунного серума от 1:64.

Ключевые слова: Вирус Ньюкасла болезни, Vero клетки, хемадсорбция, торможение хемадсорбции