

**ISPITIVANJE NEKIH BIOLOŠKIH KARAKTERISTIKA GLIKOPROTEINSKIH
SUBJEDINICA SOJA PHY-LMV.42 VIRUSA NEWCASTLE
BOLESTI ŽIVINE***

**EXAMINATION OF SOME BIOLOGICAL PROPERTIES OF GLYCOPROTEIN
SUBUNITS OF PHY-LMV.42 STRAIN OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS**

**Nenad Milić, Jakov Nišavić, Sunčica Borozan, Andrea Zorić, Sava Lazić,
Tamaš Petrović, Zoran Rašić****

Cilj našeg istraživanja je bilo ispitivanje bioloških karakteristika prečišćenih glikoproteinskih subjedinica soja PHY-LMV.42 virusa Newcastle bolesti izolovanog iz golubova radi njihovog korišćenja za pripremanje vakcine. Soj PHY-LMV.42 virusa Newcastle bolesti je umnožavan sukcesivnim pasažama u kokošijim embrionima i identifikovan metodama Reverse transcriptase PCR i Real-Time PCR uz sekvenciranje F gena. Dokazivanje prisustva HN i F antigena u uzorcima virusnih subjedinica vršeno je metodom inhibicije hemaglutinacije sa referentnim imunim serumima. Biohemijska karakterizacija glikoproteinskih subjedinica izvršena je primenom metoda SDS-PAGE i tačne hromatografije sa masenom spektrometrijom (LC ESI-TOF-MS/MS). Ispitivanje imunogenosti virusnih subjedinica sprovedeno je u biološkom ogledu na ukupno 75 kokoši nosilja Tetra-SSL i 25 pilića Isa Brown uz izvođenje veštačke infekcije sojem Hertz 33 navedenog virusa. Niske koncentracije virusnih antigena od 0,36 mg/ml sa glikoproteinskim frakcijama od 77 i 58 kDa su ispoljavale snažnu hemaglutinacionu aktivnost od 4096 HJ/0,1ml. Subjedinične vakcine od 256 i 128 HJ/0,5 ml, indukovale su imunološki odgovor zaštitnog karaktera kod svih vakcinisanih životinja. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se niske

* Rad primljen za štampu 18.02.2016.

** Dr sc. vet. med. Nenad Milić, profesor; dr sc. vet. med. Jakov Nišavić, profesor; dr sc. Sunčica Borozan, profesor; dvm Andrea Zorić, asistent, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Beograd, Srbija; dr sc. vet. med. Sava Lazić, dr sc. vet. med. Tamaš Petrović, Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad", Novi Sad, Srbija; dr sc. vet. med. Zoran Rašić, Veterinarski specijalistički institut "Jagodina", Jagodina, Srbija

koncentracije prečišćenih virusnih subjedinica soja PHY-LMV.42 mogu koristiti za pripremanje efikasne vakcine.

Ključne reči: virus Newcastle bolesti, glikoproteinske subjedinice, SDS-PAGE, LC ESI-TOF-MS/MS, imunizacija.

Uvod / Introduction

Ispitivanje bioloških karakteristika i imunogenih svojstava glikoproteinskih antigena lentogenih sojeva virusa Newcastle bolesti u cilju njihove primene za pripremanje vakcina bilo je predmet istraživanja mnogih autora (Milić i sar., 1996; Tanabayashi i Compans, 1996; Alexander, 2000; Panshin i sar., 2001). Virus Newcastle bolesti je jedan od najznačajnijih patogena u populaciji ptica i domaće živine koji izaziva atipičnu kugu živine, kontagiozno oboljenje koje prati visoka stopa morbiditeta i mortaliteta, što ima za posledicu i velike ekonomske gubitke u živinarstvu. S obzirom da je za pripremanje efikasnih vakcina za sprovođenje imunoprofilakse atipične kuge živine od posebnog značaja izbor imunogenih vakcinalnih antigena, vršena su mnoga ispitivanja strukture, genetičkih i antigenskih karakteristika velikog broja lentogenih i mezogenih sojeva virusa Newcastle bolesti sa posebnim osvrtom na hemaglutinaciona i imunogena svojstva njihovih glikoproteinskih komponenti (Maas i sar., 2003; Arora i sar., 2010; Chatuverdi i sar., 2011; Ganar i sar., 2014). Najznačajnije strukturne komponente prečišćenih viriona virusa Newcastle bolesti predstavljaju najmanje 6 virusnih proteina koji obuhvataju: hemaglutininsko-neuraminidazni protein (HN), fuzioni protein (F), matriksni protein (M), nukleokapsidni protein (NP), fosfoprotein (P) i veliki protein (L), među kojima su imunološki najznačajniji HN i F glikoproteini spoljašnjeg virusnog omotača koji imaju ključnu ulogu i u procesu ostvarivanja infekcije jer omogućavaju adsorpciju virusa na površinu membrane ćelije domaćina (Alexander, 2000; Römer-Oberdorfer i sar., 2003). Dosadašnja iskustva u primeni inaktivisanih i živih vakcina u imunoprofilaksi Newcastle bolesti živine su ukazala da iste, pored toga što vakcinisanim životinjama omogućavaju postizanje zadovoljavajućeg imuniteta, imaju i izvesne nedostatke. Tako na primer, žive vakcine protiv virusa Newcastle bolesti kod vakcinisanih životinja stimulišu stvaranje imuniteta zaštitnog karaktera, ali često dovode i do pojave nepoželjnih postvakcinalnih efekata koji se manifestuju pojavom respiratornih poremećaja, dok u nekim slučajevima postoji mogućnost da vakcinalni sojevi virusa povrate svoju virulenciju posle višekratnih retrogradnih pasaža kroz prijemčive organizme u terenskim uslovima (Roth, 1999; Alexander, 2000). Za razliku od živih vakcina, imunogeni pripremljeni od inaktivisanih sojeva virusa Newcastle bolesti su mnogo bezbedniji za vakcinisane životinje, ali su često slabije imunogeni tako da se najčešće konjuguju sa različitim adjuvansima od kojih se najčešće koriste uljane emulzije, što često dovodi do zapaljenskih procesa na mestu aplikacije vakcine (Homhuan i sar., 2004). U cilju prevazilaženja nedostataka klasičnih vakcina protiv atipične kuge živine u novije vreme se sve više istraživanja usmerava prema

ispitivanju mogućnosti korišćenja vakcina pripremljenih od prečišćenih virusnih antigena ili pojedinih imunološki značajnih virusnih komponenti (subjedinica) koje sadrže glikoproteinske HN i F antigene virusa, odgovorne za stimulisanje specifičnog imunološkog odgovora kod vakcinisanih životinja, dok su oslobođene od infektivnih delova virusne čestice kao i balastnih proteina koji bi mogli delovati kao pirogeni (Milić i sar., 1996; Seal i sar., 2000; Panshin i sar., 2001). Iz tih razloga su i naša istraživanja bila usmerena na ispitivanje strukturnih komponenti i nekih bioloških karakteristika soja PHY-LMV.42 virusa Newcastle bolesti živine izolovanog iz golubova, a prvenstveno hemaglutinacionih aktivnosti i imunogenih svojstava njegovih subjedinica koje sadrže hemaglutininsko-neuraminidazne (HN) i fuzione (F) glikoproteinske virusne antigene u cilju pripremanja subjedinice vakcine.

Materijal i metode rada / *Material and methods*

Sojevi virusa / *Virus strains*

Ispitivani soj virusa Newcastle bolesti živine, izolovan iz golubova je prethodno umnožavan u alantohorijalnim šupljinama kokošijih embriona starosti od 9 do 11 dana tokom perioda od 72 časa na temperaturi od 37°C. Pre ispitivanja strukturnih, hemaglutinacionih i imunogenih svojstava virusnih antigena izvršena je identifikacija izolovanog soja PHY-LMV.42 virusa Newcastle bolesti primenom lančane reakcije polimeraze – Reverse transcriptase PCR (RT-PCR) i Real-Time PCR sa sekvenciranjem nukleotida uz korišćenje specifičnih prajmera za F gen – MV1 i B2. Za izvođenje metode RT-PCR bilo je neophodno najpre izvršiti ekstrakciju RNK virusa Newcastle bolesti uz korišćenje QIAamp viral RNA mini kita (Qiagen, SAD) po uputstvu proizvođača. Posle ekstrakcije virusne nukleinske kiseline, metoda RT-PCR izvođena je uz primenu F-5-CCTTGGTGAITCTATCCGIAG-3 i R-5-CTGCCACTGCTAGTTGIGATAATCC-3 prajmera za F protein. Protokol za izvođenje metode se sastojao od 25 ciklusa denaturacije nukleinske kiseline na temperaturi od 94°C u trajanju od 30 sek., vezivanja prajmera na temperaturi od 50°C u trajanju od 30 sek. i elongacije na 72°C u trajanju od 10 minuta. Veličina dobijenog produkta je iznosila 254bp. Pored navedenog protokola u ispitivanjima je korišćen i protokol koji pored ekstrakcije virusne nukleinske kiseline primenom prethodno navedenog kita podrazumeva i korišćenje degenerisanih prajmera 5-ATG GGC (C/T)CC AGA C(C/T)CT TCT AC-3 i 5-CTG CCA CTG CTA GTT GTG GTG ATAATC C-3 koji ograničavaju deo gena virusne nukleinske kiseline koji kodira sintezu F proteina virusa Newcastle bolesti. Veličina očekivanog produkta dobijenog u reakciji je iznosila 535bp. Korišćena metoda Real Time RT-PCR odgovara proceduri opisanoj u ispitivanjima Wise i sar. (2004). Izvođenju metode sekvenciranja je prethodila ekstrakcija i prečišćavanje PCR proizvoda iz gela agaroze. Prečišćavanje PCR proizvoda je vršeno pomoću kita za ekstrakciju - QIAquick gel extraction kit (Qiagen) po uputstvu proizvođača. Takođe, pre sekvenciranja virusnog genoma izvršena je kvantifikacija dobijene virusne DNK pomoću molekularnog standarda GeneRuler, dok je metoda

sekvenciranja izvođena uz korišćenje automatizovanog kapilarnog sistema po Sanger metodi primenom BigDye Terminator v3.1 kita (Applied Biosystems). Za izvođenje metode Real Time RT-PCR radi identifikacije nukelinske kiseline virusa Newcastle bolesti korišćena je procedura koja odgovara proceduri opisanoj u ispitivanjima Wise i sar. (2004) sa prajmerima i probom za M gen. Ovaj protokol je namenjen za brzo dokazivanje prisustva virusa Newcastle bolesti u uzorcima suspektnog materijala bez obzira na patotip virusa, odnosno za brzu i pouzdanu detekciju njegovih velogenih i lentogenih sojeva.

Sukcesivnim pasažama virusnog antigena u kokošijim embrionima tokom perioda od mesec dana i sakupljanjem njihove alantoidne tečnosti sa umnoženim virusom, dobijena je dovoljna količina virusne suspenzije sa titrom virusa od $\log=10^{-8.9}$ EID₅₀/0,1 ml i hemaglutinacionim titrom od 512 HJ/0,1ml. Soj La Sota virusa Newcastle bolesti sadržan u komercijalnoj inaktivisanoj vakcini je korišćen u uporednom ispitivanju imunogenosti subjediničnih antigena soja PHY-LMV.42 navedenog virusa na eksperimentalnoj živini.

Koncentrisanje i prečišćavanje glikoproteinskih antigena virusa Newcastle bolesti / *Concentration and purification of Newcastle disease virus glycoprotein antigens*

Sakupljena alantoidna tečnost poreklom od inokulisanih kokošijih embriona koja je sadržavala umnoženi soj PHY-LMV.42 virusa Newcastle bolesti je prvo prečišćavana centrifugovanjem na 3.200 o/min tokom vremenskog perioda od 30 minuta, posle čega je virusna suspenzija tretirana istom zapreminom rastvora 12 g/dl polietilen glikola - PEG 8000 (Sigma Aldrich GmbH, Germany) u prisustvu 0,5 mol/l natrijum hlorida tokom 3 časa na temperaturi od 4°C i centrifugovana na 3.500 o/min tokom 10 minuta. Sakupljeni precipitati kompletnih virusnih čestica su zatim resuspendovani u podlozi za kulturu tkiva (Minimal essential medium - MEM with Earle's salts; PAA Laboratories GmbH, Austria) sa 2 g/dl fetalnog goveđeg seruma (Fetal bovine serum Gold; PAA Laboratories GmbH, Austria). Uzorci resuspendovanih viriona od po 2 ml su prečišćavani metodom preparativnog ultracentrifugovanja u linearnim gradijentima gustine od 12-38 g/dl kalijum-natrijum tartarata u 0,2 mol/l fosfatnom slanom puferu (PBS) na 27.000 o/min tokom 2 časa. Posle sakupljanja iz gradijenata, prečišćeni virioni su tretirani sa 10% Triton-X-100 (Sigma Aldrich GmbH, Germany) tokom 25 minuta na temperaturi od 20°C (Mountcastle i sar., 1971; Milić i sar., 1991) i zatim centrifugovani na 39.000 o/min tokom 1 časa radi izdvajanja virusnih subjedinica od nukleokapsida. Prečišćavanje suspenzije glikoproteinskih subjedinica virusa uz oslobađanje od deterdženta korišćenog za razgradnju viriona (Triton-X-100), vršeno je primenom jonoizmenjivača Amberlite XAD-2 (Sigma Aldrich GmbH, Germany) (Cheetham, 1979; Kruse i sar., 1981; Milić i sar., 1991).

Određivanje ukupne koncentracije proteina / *Determining the total protein concentration*

Ukupna koncentracija proteina u uzorcima prečišćenih viriona i virusnih subjedinica navedenog soja virusa Newcastle bolesti je određivana metodom po Lowry i sar. (1951) uz primenu folin-fenol reagensa.

Određivanje hemaglutinacionih aktivnosti prečišćenih viriona i virusnih subjedinica / *Determining the hemagglutination activity of purified virions and viral subunits*

Hemaglutinacione aktivnosti prečišćenih viriona i virusnih subjedinica soja PHY-LMV.42 određivane su primenom metodom direktne hemaglutinacije u mikrotitracionim pločama (OIE, 2012).

Određivanje prisustva glikoproteinskih antigena u uzorcima prečišćenih viriona i virusnih subjedinica / *Determining the presence of glycoprotein antigens in purified virions and viral subunit samples*

Dokazivanje prisustva virusnih glikoproteina (HN i F antigena) u uzorcima prečišćenih viriona i virusnih subjedinica vršeno je primenom testa inhibicije hemaglutinacije (HI testa) sa referentnim poliklonskim imunim serumom i monoklonskim 7D4 serumom protiv antigena lentogenih vakcinalnih sojeva virusa Newcastle bolesti (Veterinary Laboratory Agency, UK) (OIE, 2012). Prisustvo pomenutih antigena u ispitivanim uzorcima je dodatno potvrđeno testovima inhibicije hemolitičke aktivnosti i ćelijske fuzije na ćelijskoj liniji Vero posle aktivacije prečišćenih viriona i glikoproteinskih subjedinica pomenutog soja virusa sa 0,025 g/dl tripsin-versena u PBS i njihove neutralizacije navedenim imunim serumima (Scheid i Choppin, 1973; Milić i sar., 2003; Nišavić i sar., 2007).

Izdvajanje i vizuelizacija strukturnih komponenti prečišćenih viriona i virusnih subjedinica metodom SDS-PAGE / *Separation and visualization of structural components of purified virions and viral subunit using SDS-PAGE method*

Biohemijska analiza strukturnih virusnih proteina u uzorcima kompletnih prečišćenih virusnih čestica kao i uzoraka izolovanih glikoproteinskih subjedinica je vršena primenom metode SDS-PAGE u diskontinuiranom puferskom sistemu po Laemmli (1970) sa selektivnim bojenjem virusnih glikoproteina sa Šifovim reagensom (Sigma Aldrich GmbH, Germany) po Gordon (1983). Metoda SDS-

PAGE je sprovedena na poliakrilamidnom gelu (4% gel za koncentrovanje uzoraka – stacking gel, 12,5% gel za razdvajanje – running gel) pod redukujućim uslovima. Elektroforezirani su uzorci prečišćenih viriona zapremine od 25 µl sa ukupnim koncentracijama proteina od 14,5 µg do 16,1 µg i uzorci prečišćenih virusnih subjedinica sa ukupnom koncentracijom proteina od približno 1,75 µg. Posle elektroforeze, gel je obojen bojom Coomassie Blue G-250 i nakon 3h obezbojen pomoću 10% rastvora sirćetne kiseline i 40% metanola u destilovanoj vodi. Pored toga, elektroforezirani uzorci kompletnih viriona i virusnih subjedinica su ispitivani i selektivnim bojenjem virusnih glikoproteina metodom „Stains-all” po Campbell i sar. (1983). Kao koelektroforezni markeri su korišćeni referentni uzorci koji su sadržavali proteine poznatih molekulskih masa od 250-10 kDa (Page Ruler plus Prestained protein Ladder – Thermo Scientific, USA).

Karakterizacija virusnih proteina u uzorcima prečišćenih viriona i virusnih subjedinica primenom metode tečne hromatografije kuplovane sa masenom spektrometrijom (LC ESI-TOF-MS/MS) / *Characterisation of virus proteins in purified virions and viral subunit samples using liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC ESI-TOF-MS/MS)*

Determinacija virusnih proteina u uzorcima prečišćenih viriona i njihovih subjedinica vršena je i metodom tečne hromatografije kuplovanom sa masenom spektrometrijom (LC ESI-TOF-MS/MS) uz korišćenje HPLC instrumenta (Agilent 1200 Series) sa Zorbax Eclipse XDB C18 RRHT kolonom (150 x 4,6 mm i.d.; 1,8µm) i diodnim detektorom (DAD) udruženi sa 6210 Time-of-flight LC/MS sistemom (Agilent Technologies). Mobilna faza se sastojala od 0,2% vodenog rastvora mravlje kiseline (rastvor A) i 100% acetonitrila (rastvor B) sa ispiranjem u gradijentu: 0-60 min 2-80% B, 60-61 min 2% B sa protokom od 0,35 ml/min.

Vakcine / Vaccines

Subjedinična vakcina je pripremljena od virusnih komponenti soja PHY-LMV.42 virusa Newcastle bolesti rastvorenih u 0,1 mol/l fosfatnog slanog pufera (PBS) tako da su dobijeni imunogeni sa koncentracijama virusnih antigena od 0,022 i 0,011 mg po dozi vakcine od 0,5 ml i hemaglutinacionom aktivnošću od 256 i 128 HJ. Komercijalne vakcine korišćene u ogledima imunizacije su vakcina PEST-OL (Veterinarski Zavod Subotica) pripremljena od inaktivisanog La Sota soja virusa Newcastle bolesti titra od 10⁹ EID₅₀ virusnih antigena po dozi od 0,5 ml.

Ispitivanja imunogenosti pripremljene subjedinичne vakcine / *Immunogenicity trials of prepared subunit vaccines*

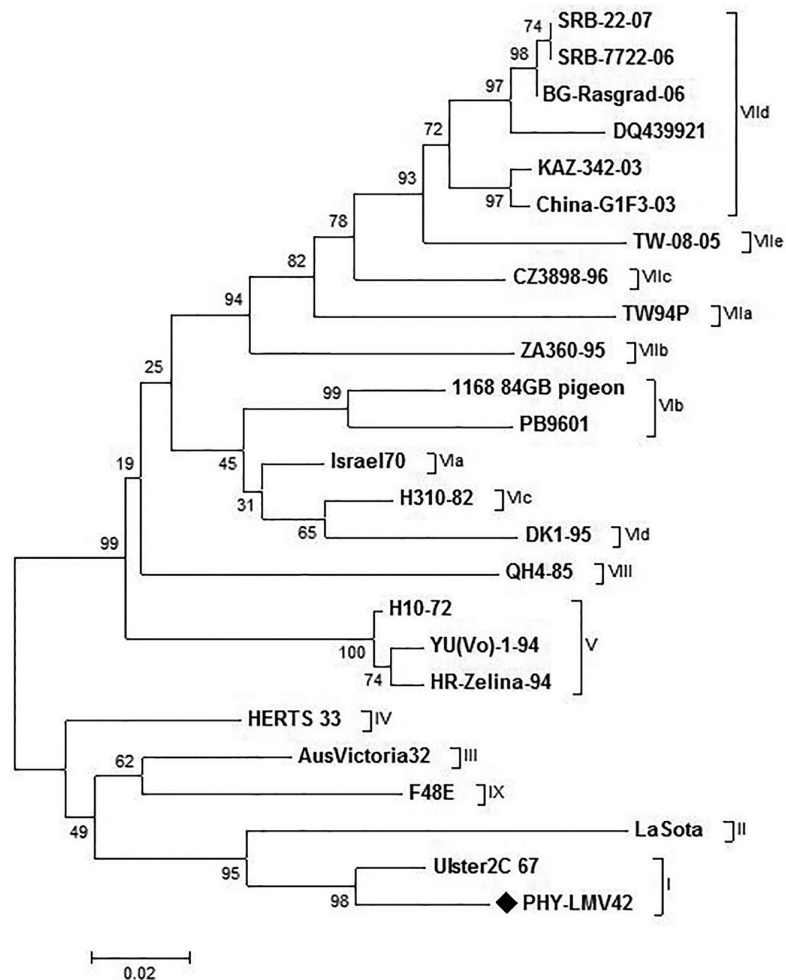
Posle određivanja hemaglutinacione aktivnosti prečišćenih virusnih subjedinica metodom direktne hemaglutinacije, ispitivana je njihova imunogenost u biološkom ogledu na ukupno 75 kokoši nosilja Tetra-SSL starosti 16 nedelja i 25 pilića Isa Brown starih 14 dana uz izvođenje veštačke infekcije pilića sojem Hertz 33 navedenog virusa. Uzorci krvnih seruma svih eksperimentalnih životinja su ispitivani na prisustvo i titar specifičnih HI antitela protiv virusa Newcastle bolesti metodom inhibicije hemaglutinacije - HI testom (OIE, 2012).

Prvi deo oglada imunizacije je sproveden na ukupno 32 Tetra-SSL kokoši seronegativne na antigene virusa Newcastle bolesti, podeljenih u tri ogledne grupe od kojih su prve dve grupe od po 11 životinja, intramuskularno (i/m) vakcinisane sa 0,022 mg i 0,011 mg prečišćenih virusnih subjedinica sa hemaglutinacionom aktivnošću od 256 HJ (prva grupa) i 128 HJ po dozi od 0,5 ml (druga grupa) i revakcinisane 14. dana oglada, dok je treća grupa od 10 nevakcinisanih kokoši služila kao kontrola u ogledu.

Drugi deo oglada imunizacije je vršen na četiri grupe od ukupno 43 Tetra-SSL kokoši nosilja uzetih iz proizvodnog procesa i seropozitivnih na antigene virusa Newcastle bolesti jer su ranije imunizovane protiv navedenog patogena i drugih virusa u skladu sa Programom mera zdravstvene zaštite životinja. Prve dve ogledne grupe od po 11 kokoši nosilja su i/m imunizovane subjedinичnim vakcinama koje su sadržavale 256 HJ (prva grupa) i 128 HJ po dozi (druga grupa) kao što je prethodno opisano, a treća grupa od 11 kokoši je i/m imunizovana dozama od po 0,5 ml inaktivisane PEST-OL vakcine koja je sadržavala 10^9 EID₅₀ vakcinalnog soja La Sota u uljanom adjuvansu i revakcinisana 21-og dana oglada, dok četvrta kontrolna grupa od 10 kokoši nije podvrgnuta vakcinaciji.

Imunogena svojstva i zaštitni karakter niskih koncentracija vakcinalnog imunogena od 0,011 mg prečišćenih virusnih subjedinica po dozi od 0,5 ml potvrđeni su u ogledu izvršenom na 25 pilića Isa Brown, starosti od 14 dana, negativnih na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa Newcastle bolesti. Prva grupa od 14 oglednih pilića je i/m vakcinisana dozama od 0,5 ml vakcine sa 128 HJ, revakcinisana posle 14 dana i i/m veštački inficirana dozama od po 200.000 EID₅₀ virulentnog soja Hertz 33 virusa Newcastle bolesti 28-og dana oglada, dok je druga grupa od 11 nevakcinisanih pilića seronegativnih na antigene pomenutog virusa na isti način veštački inficirana prethodno navedenim virulentnim sojem virusa atipične kuge živine.

Za statističku analizu dobijenih rezultata oglada imunizacije korišćene su neparametrijske statističke metode i to Kruskal-Wallis grupni test i Dunn's Multiple Comparison Test kao posthok test. Statistička analiza rađena je u statističkom paketu GraphPad Prism 5.



Slika 1. Filogenetsko stablo zasnovano na sekvenci dela F gena (pozicije nukleotida 47-421). Soj PHY-LMV42 je obeležen sa ◆

Picture 1. Phylogenetic tree based on the sequence of F gene part (nucleotide positions 47-421). Strain PHY-LMV42 is marked with ◆

Rezultati / Results

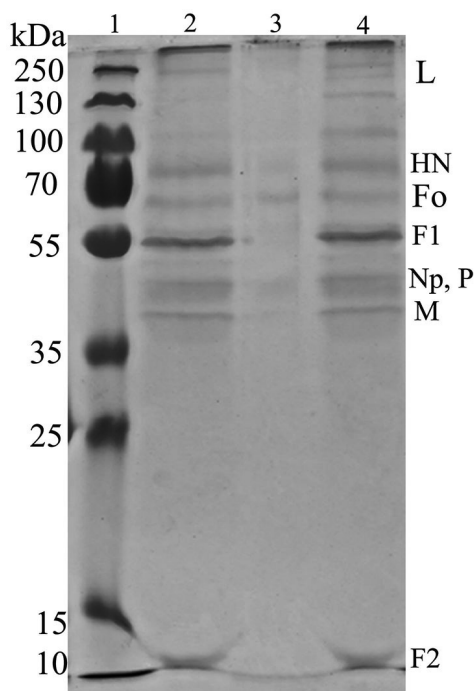
Identifikacija vakcinalnog soja PHY-LMV.42 virusa Newcastle bolesti izvršena je primenom lančane reakcije polimeraze – Reverse transcriptase PCR i Real-Time PCR sa sekvenciranjem nukleotida uz korišćenje specifičnih prajmera za F

gen – MV1 i B2. Sekvenciranjem prvog dela F gena izolovanog soja virusa, na osnovu pozicije nukleotida od 47 do 421, potvrđena je potpuna homologija (100%) sa sojem PHY-LMV.42 virusa Newcastle bolesti koji pripada klasi II i genotipu I lentogenih sojeva navedenog virusa (Slika 1).

Ukupna koncentracija proteina u uzorcima koncentrisanih i prečišćenih viriona resuspendovanih u 0,2 mol/l PBS iznosila je 0,58 mg/ml sa značajnim hemaglutinacionim titrom od 4096 HJ/0,1 ml pri čemu su niske koncentracije virusnih subjedinica od 0,36 mg/ml takođe ispoljavale snažnu hemaglutinacionu aktivnost od 4096 HJ/0,1 ml što je utvrđeno primenom testa direktne hemaglutinacije.

Navedene virusne subjedinice su razređene u 0,1 mol/l PBS u cilju pripreme imunogena sa hemaglutinacionim titrima od 256 i 128 HJ i ukupnim koncentracijama proteina od 0,022 i 0,011 mg po dozi vakcine od 0,5 ml.

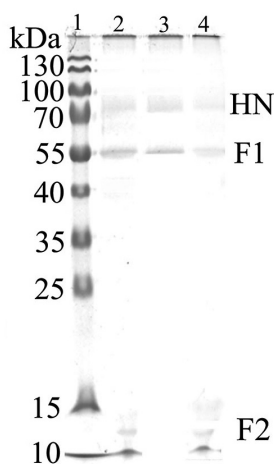
Uzorci prečišćenih viriona soja PHY-LMV.42 virusa Newcastle bolesti ispitivani metodom SDS-PAGE i bojenih sa Coomassie Brilliant Blue, sadržavali su



Slika 2. Elektroforegrami uzoraka prečišćenih viriona i glikoproteinskih subjedinica virusa Newcastle bolesti, razdvojenih na 12% gelu – SDS-PAGE, obojeni sa Coomassie Brilliant Blue (1-Referentni proteini od 250-10 kDa; 2 i 4- proteinske frakcije potpunog viriona od 250-11 kDa)

Picture 2. Electrophoregrams of the samples of purified virions and glycoprotein subunits of Newcastle disease virus, disjuncted in 12% gel – SDS-PAGE, stained with Coomassie Brilliant Blue (1-Referent proteins of 250-10 kDa; 2 and 4- protein fraction of complete virion of 250-11 kDa)

7 proteinskih frakcija molekulske mase od oko 250, 77, 69, 58, 45, 41 i 11 kDa koje su odgovarale: velikom proteinu (L), hemaglutininsko-neuraminidaznom proteinu (HN), neaktivisanom prekursoru F proteina (F_0), F_1 proteinu, nukleokapsidnom proteinu (NP) i fosfoproteinu (P), matriksnom proteinu (M) i malom fragmentu F proteina (F_2). Uzorci virusnih subjedinica koji su dobijeni razlaganjem pomoću elektroforeze sadržavali su 5 proteinskih frakcija, među kojima su proteinske komponente molekulske mase od 77, 69 i 58 kDa odgovarale HN, F_1 i F_0 proteinima (Slika 2). Uzorci prečišćenih viriona, dobijeni elektroforezom u redukujućim uslovima sa Šifovim reagensom, sadržavali su 3 glikoproteinske frakcije od 77, 58 i 11 kDa koje su odgovarale HN, F_1 i F_2 proteinima, dok su kod njihovih subjedinica utvrđena dva glikoproteina od 77 i 58 kDa koji su odgovarali HN i F_1 proteinima.



Slika 3. Elektroforegrami uzoraka prečišćenih viriona i glikoproteinskih subjedinica virusa Newcastle bolesti, razdvojenih na 12% gelu – SDS-PAGE, obojeni sa Šifovim reagensom (1- Referentni proteini od 250-10 kDa; 2 i 4- glikoproteinske frakcije kompletnog viriona od 77, 58 i 11 kDa; 3- glikoproteinske frakcije virusnih subjedinica od 77 i 58 kDa)

Picture 3. Electrophoregrams of the samples of purified virions and glycoprotein subunits of Newcastle disease virus, disjuncted in 12% gel – SDS-PAGE, stained with Schiff's reagent (1- Referent proteins of 250-10 kDa; 2 and 4- glycoprotein fraction of complete virion of 77, 58 and 11 kDa; 3- glycoprotein fraction of virus subunits of 77 and 58 kDa)

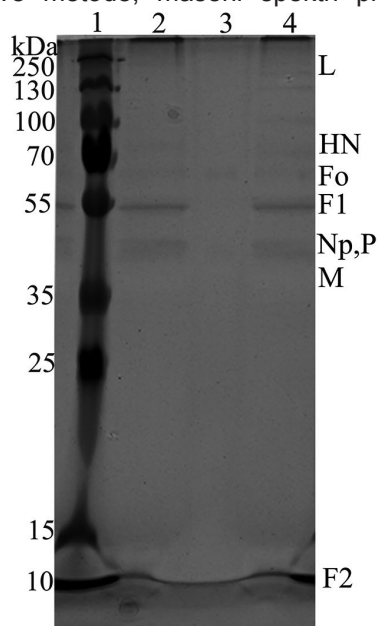
Ove glikoproteinske frakcije u elektroforeziranim uzorcima prečišćenih viriona i virusnih subjedinica ispitivanog soja virusa su se obojile u ružičasto (Slika 3). Odsustvo virusnih nukleokapsida sa infektivnom ribonukleinskom kiselinom virusa (RNK) u uzorcima virusnih glikoproteinskih subjedinica je potvrđeno metodom SDS-PAGE sa selektivnim bojenjem virusnih proteina metodom „Stains-all” (Slika 4). Pored toga, broj proteinskih frakcija i vrednosti njihovih molekulske mase u uzorcima elektroforeziranih prečišćenih viriona i virusnih subjedinica obojenih metodom „Stains-all” je bio isti kao i kod uzoraka ispitivanih metodom SDS-PAGE obojenih sa Coomassie Brilliant Blue.

Proteinske frakcije utvrđene u uzorcima kompletnih virusnih čestica koje su imale molekulske mase veće od 78.000 Da, kao što su frakcije od 107.150, 131.800 i 151.600 Da, nisu ustanovljene u uzorcima prečišćenih virusnih subjedinica. Prečišćene virusne subjedinice koje su sadržavale dva glikoproteina molekulske mase od 77 i 58 kDa koji su odgovarali HN i F_1 proteinima pomenutog virusa, zajedno sa proteinskim komponentama od 69, 45 i 41 kDa čije su molekulske

mase odgovarale F₀, P i M proteinima, korišćene su za pripremanje subjedinčne vakcine.

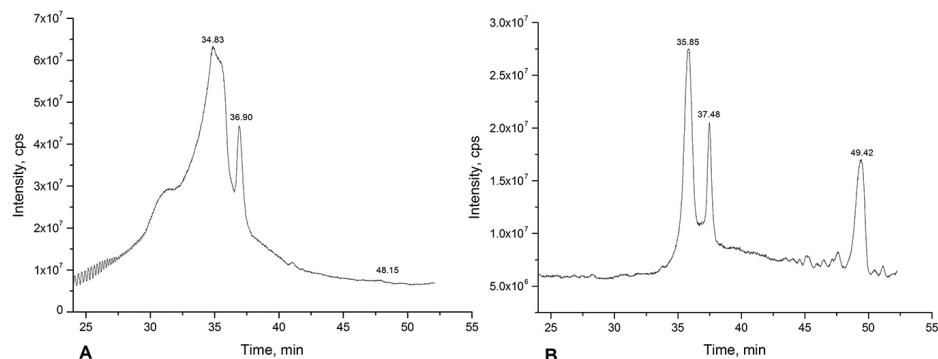
Subjedinčna vakcina za izvođenje oglada imunizacije na eksperimentalnim kokošima i pilićima je pripremljena od prečišćenih virusnih komponenti soja PHY-LMV.42 virusa Newcastle bolesti koji su sadržavali imunološki značajne glikoproteinske molekule koji obuhvataju hemaglutininsko-neuraminidazni i fuzioni protein. Identifikacija glikoproteinskih antigena izvršena je metodama SDS-PAGE, hemaglutinacije (HA testom) i inhibicije hemaglutinacije (HI testom).

Metoda tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom (LC ESI-TOF-MS/MS) je korišćena za proteomsku analizu i karakterizaciju strukturnih proteina kompletnih prečišćenih viriona soja PHY-LMV.42 virusa Newcastle bolesti i njegovih virusnih subjedinica. Na osnovu hromatograma dobijenih metodom LC ESI-TOF-MS/MS, izvršena je karakterizacija uzoraka prečišćenih viriona i izolovanih virusnih subjedinica ispitivanog soja PHY-LMV.42 virusa Newcastle bolesti (Slika 5). Šest glavnih proteinskih traka je utvrđeno u uzorcima prečišćenih viriona, dok je 5 proteinskih traka ustanovljeno u uzorcima prečišćenih virusnih subjedinica. Primenom ove metode, maseni spektri proteina su određivani



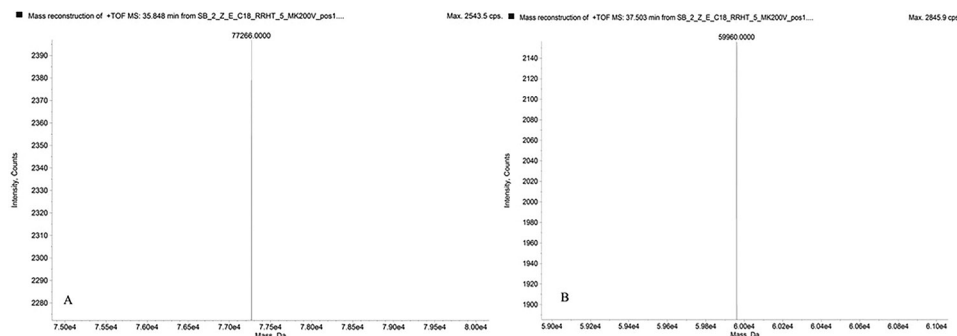
Slika 4. Elektroforegrami uzoraka prečišćenih viriona i glikoproteinskih subjedinica virusa Newcastle bolesti, razdvojenih na 12% gelu – SDS-PAGE, obojeni metodom Stains-all (1-Referentni proteini od 250-10 kDa; 2 i 4- proteinske frakcije kompletnog viriona od 250 -11 kDa; 3- proteinske frakcije virusnih subjedinica od 77, 69, 58, 45 i 41 kDa)

Picture 4. Electrophoregrams of the samples of purified virions and glycoprotein subunits of Newcastle disease virus, disjuncted in 12% gel – SDS-PAGE, stained with Stains-all method (1-Referent proteins of 250-10 kDa; 2 and 4- protein fraction of complete virion of 250 -11 kDa; 3- protein fraction of virus subunits of 77, 69, 58, 45 and 41 kDa)



Slika 5. Hromatogrami i retenciona vremena dobijeni metodom LC ESI-TOF-MS/MS: A) Za uzorke potpunih viriona; B) Za uzorke virusnih subjedinica

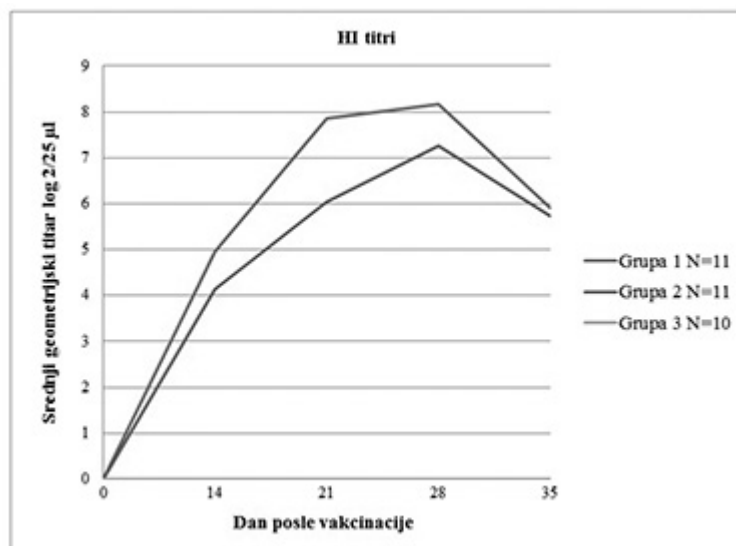
Picture 5. Chromatograms and retention times obtained by LC ESI-TOF-MS/MS method: A) For complete virion samples; B) For virus subunits samples



Slika 6. Maseni spektri glavnih glikoproteinskih komponenti dobijenih metodom LC ESI-TOF-MS/MS u uzorcima virusnih subjedinica: A) Hemaglutininsko-neuraminidazni protein – HN; B) Fuzioni protein – F1

Picture 6. Mass spectra of main glycoprotein components obtained by LC ESI-TOF-MS/MS method in virus subunits samples: A) Hemagglutinin-neuraminidase protein – HN; B) Fuzion protein – F1

na osnovu intenziteta signala, na osnovu čega su utvrđeni maseni spektri glavnih glikoproteinskih traka od 77.266 i 59.950 Da (Slika 6). Molekulske mase utvrđenih proteinskih komponenti za HN protein su se kretale od 71-77 kDa, za F protein od 59-69 kDa, dok su za M protein iznosile od 37-43 kDa. Nukleokapsidni protein (NP), ustanovljen u uzorcima potpunih virusnih čestica, nije bio prisutan u uzorcima prečišćenih virusnih subjedinica. Molekulska masa NP proteina u uzorcima prečišćenih viriona je iznosila oko 49 kDa. Molekulske mase proteinskih komponenti utvrđenih kod potpunih prečišćenih viriona i virusnih subjedinica navedenog soja virusa, utvrđene tečnom hromatografijom sa masenom spektrometrijom (LC ESI-TOF-MS/MS) su se minimalno razlikovale



Grafikon 1. Srednji geometrijski titri specifičnih HI antitela protiv virusa Newcastle bolesti (GMT log 2/25 µl) u uzorcima krvnog seruma kokoši nosilja Tetra-SSL u prvom delu oglada imunizacije

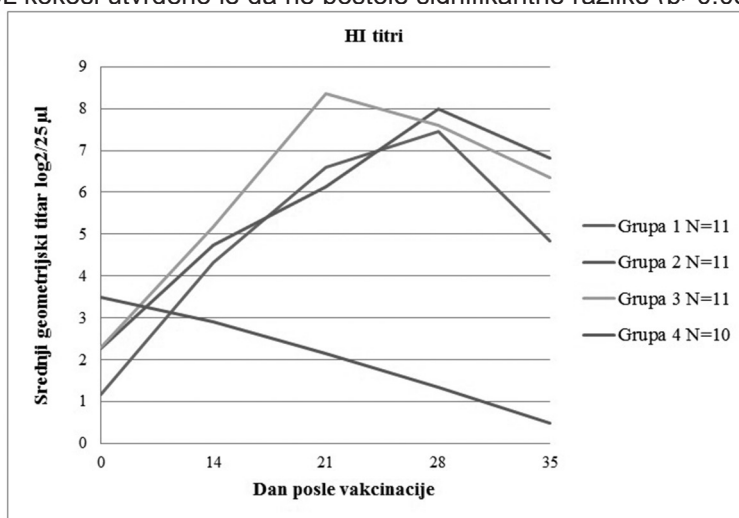
Graph 1. Geometric mean titers of specific HI antibodies against Newcastle disease virus (GMT log 2/25 µl) in blood serum samples of laying hens Tetra-SSL in the first part of immunization experiment

od molekularnih masa pomenutih proteina ustanovljenih metodom SDS-PAGE u diskontinuiranom puferskom sistemu.

Niske koncentracije napred navedenih glikoproteinskih antigena su stimulisale sintezu specifičnih HI antitela u organizmu svih vakcinisanih kokoši iz prve i druge ogleadne grupe koje su pre početka imunizacije bile seronegativne na antigene virusa Newcastle bolesti. Srednji geometrijski titri (GMT log 2/25 µl) utvrđeni u uzorcima krvnog seruma prve i druge grupe eksperimentalnih kokoši iznosili su 14. dana od vakcinacije 4,95 i 4,14; 21. dana 7,86 i 6,05; 28. dana 8,18 i 7,27, a 35. dana 5,9 i 5,73 (Grafikon 1). Statističkom analizom je utvrđeno da između vrednosti srednjih geometrijskih titara specifičnih HI antitela protiv virusa Newcastle bolesti (GMT log 2/25 µl) kod prve dve grupe vakcinisanih kokoši u navedenim vremenskim intervalima ne postoje značajne razlike ($p > 0,05$).

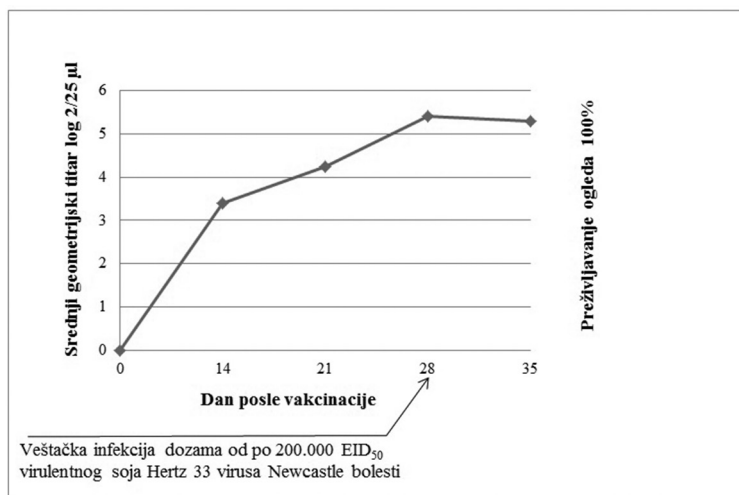
Vrednosti srednjih geometrijskih titara specifičnih HI antitela protiv virusa Newcastle bolesti (GMT log 2/25 µl) utvrđene u krvnom serumu imunizovanih kokoši iz prve i druge ogleadne grupe uzetih iz proizvodnog procesa su neposredno pre vakcinacije iznosili 1,18 i 2,27; posle 14 dana od vakcinacije 4,32 i 4,73; 21-og dana oglada 6,59 i 6,14; 28-og dana 7,45 i 8, a 35-og dana 4,84 i 6,82. Vrednosti srednjih geometrijskih titara specifičnih HI antitela u krvnim serumima treće eksperimentalne grupe kokoši nosilja imunizovanih sa po 0,5 ml inaktivisane PEST-OL vakcine bili su 2,31 neposredno pre vakcinacije; 14-og dana oglada

5,18; 21-og dana 8,35 i 35-og dana 6,35, dok su uzorcima krvnog seruma četvrte kontrolne grupe nevakcinisanih kokoši iznosili 3,50 pre početka ogleda; 14-og dana ogleda 2,9; 21-og dana 2,15; 28-og dana 1,35 i 35-og dana 0,5 (Grafikon 2). Statističkom analizom rezultata dobijenih posle imunizacije seropozitivnih Tetra-SSL kokoši utvrđeno je da ne postoje sianifikantne razlike ($p > 0.05$) između



Grafikon 2. Srednji geometrijski titri specifičnih HI antitela protiv virusa Newcastle bolesti (GMT log 2/25 µl) u uzorcima krvnog seruma kokoši nosilja Tetra-SSL u drugom delu ogleda imunizacije

Graph 2. Geometric mean titers of specific HI antibodies against Newcastle disease virus (GMT log 2/25 µl) in blood serum samples of laying hens Tetra-SSL in the second part of immunization experiment



Grafikon 3. Srednji geometrijski titri specifičnih HI antitela protiv virusa Newcastle bolesti (GMT log 2/25 μ l) u uzorcima krvnog seruma eksperimentalnih pilića Isa Brown

Graph 3. Geometric mean titers of specific HI antibodies against Newcastle disease virus (GMT log 2/25 μ l) blood serum samples of experimental Isa Brown chickens

srednjih geometrijskih vrednosti titara HI antitela među tri ogledne grupe kokoši vakcinisanih subjediničnim imunogenom od 256 i 128 HJ i inaktivisanom vakcinom PEST-OL sa uljanim adjuvansom.

Grupa od 14 eksperimentalnih pilića Isa Brown i/m vakcinisanih i revakcinisanih virusnim subjedinicama od 128 HJ po dozi vakcine od 0,5 ml je u potpunosti preživela ogled veštačke infekcije virulentnim sojem napred navedenog patogena (100%), bez pojave ikakvih kliničkih simptoma oboljenja, dok su svi nevakcinisani pilići uginuli za 3-5 dana od veštačke infekcije. Vrednosti srednjih geometrijskih titara HI antitela ustanovljene u uzorcima krvnog seruma vakcinisanih pilića su 14-og dana posle vakcinacije bili 3,4; 21-og dana ogleda 4,25; 28-og dana 5,4 i 35-og dana 5,3 (Grafikon 3).

Diskusija / Discussion

Istraživanja Panshin i sar. (2001), Kim i sar. (2003), Römer-Oberdorfer i sar. (2003), Ren i sar. (2012) omogućila su sticanje kompletnog uvida u kompleksnu strukturu i biološke aktivnosti komponenti virusa Newcastle bolesti živine, što je predstavljalo osnovu za naša ispitivanja strukturnih karakteristika, hemaglutinacionih aktivnosti i imunogenosti prečišćenih glikoproteinskih subjedinica lentogenog soja PHY-LMV.42 virusa Newcastle bolesti u cilju pripremanja efikasnog i neškodljivog vakcinalnog antigena, potpuno oslobođenog od infektivne virusne RNK i nestrukturnih proteinskih komponenti. Veoma niske koncentracije virusnih subjedinica od svega 0,36 mg/ml su posle procesa prečišćavanja ispoljavale izraženu hemaglutinacionu aktivnost od 4096 HJ/0,1 ml što je omogućilo njihovo korišćenje u ogledima imunizacije na eksperimentalnoj živini. Rezultati biohemijskih ispitivanja proteinskih frakcija virusnih subjedinica metodom SDS-PAGE uz korišćenje napred opisanih bojenja uzoraka virusnih proteina dobijenih razlaganjem pomoću elektroforeze i metodom tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom (LC ESI-TOF-MS/MS) su potvrdili da iste sadrže ključne HN i F glikoproteinske antigene molekularnih masa od 77 i 58 kDa i omogućili sticanje potpunog uvida u njihovu strukturu. Pomenuta ispitivanja uzoraka prečišćenih viriona i virusnih subjedinica soja PHY-LMV.42 virusa Newcastle bolesti su potvrdila prisustvo imunološki značajnih HN i F glikoproteinskih antigena, pored ostalih prethodno navedenih strukturnih proteinskih komponenti virusne čestice, čije su vrednosti molekularnih masa u potpunosti odgovarale onima dobijenim u istraživanjima Heckert i sar. (1996), Maas i sar. (2003), Arora i sar. (2010). Niske koncentracije glikoproteinskih subjedinica sa hemaglutinacionim aktivnostima od 256 i 128 HJ po dozi vakcine od 0,5 ml, stimulisale su snažan humoralni imunološki odgovor kod svih vakcinisanih i revakcinisanih kokoši nosilja, dok su imunizovanim pilićima Isa Brown omogućile

potpunu zaštitu od veštačke infekcije virulentnim sojem Hertz 33 virusa Newcastle bolesti živine.

Zaključak / Conclusion

Na osnovu rezultata navedenih ispitivanja može se zaključiti da se prečišćene virusne subjedinice lentogenog soja PHY-LMV.42 virusa atipične kuge živine, oslobođene nukleokapsida (NP) sa virusnom ribonukleinskom kiselinom (RNK), velikog proteina (L) i manjeg fragmenta fuzionog proteina (F₂) mogu koristiti za pripremanje nove formulacije imunogena za spovođenje vakcinacije živine protiv virusa Newcastle bolesti.

ZAHVALNICA / ACKNOWLEDGEMENTS:

Rad je realizovan u okviru projekta TR 31008 pod naslovom: "Razvoj i primena molekularnih metoda zasnovanih na lančanoj reakciji polimeraze (PCR) u brznoj i direktnoj identifikaciji sojeva virusa Newcastle bolesti živine i ispitivanje imunogenosti subjedinične vakcine pripremljene od njihovih antigena", finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

This work was realized within the Project TR 31008 under the title: "Development and application of molecular methods based on polymerase chain reaction (PCR) in quick and direct identification of Newcastle disease virus strains and investigation of immunogenicity of subunit vaccine prepared of their antigens" financed by The Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia

Literatura / References

1. Alexander DJ. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. Rev Sci Tech. 2000; 19: 443-62.
2. Arora P, Lakhchaura DB, Garg KS. Evaluation of immunogenic potential of 75 kDa and 56 kDa proteins of Newcastle disease virus (NDV). Ind J Exp Biol. 2010; 48: 889-95.
3. Campbell KP, MacLennan DH, Jorgensen AO. Staining of the Ca²⁺-binding proteins, calsequestrin, calmodulin, troponin C, and S-100, with the cationic carbocyanine dye "Stains-all". J Biol Chem. 1983; 258: 11267-73.
4. Chaturvedi U, Kalim S, Desai G, Ratta B, Kumar R, Ravindra PV, Kumar S, Dash BB, Tiwari S, Sahoo AP, Tiwari AK. Development and in vitro characterization of a bivalent DNA containing HN and F genes of velogenic Newcastle disease virus. Indian J Exp Biol. 2011; 49: 140-45.
5. Cheetham PSJ. Removal of Triton X-100 from aqueous solution using amberlite XAD-2. Anal Biochem. 1979; 92: 447-52.
6. Ganar K, Das M, Sinha S, Kumar S. Newcastle disease virus: Current status and our understanding. Virus Res. 2014; 184: 71-81.
7. Gordon AH. Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels. In: Laboratory Techniques in biochemistry and molecular biology. New York: Elsevier, 1983: 1.
8. Heckert RA, Riva J, Cook S, McMillen J, Schwartz RD. Onset of protective immunity in chicks after vaccination with a recombinant herpesvirus of turkeys vaccine expressing Newcastle disease virus fusion and hemagglutinin-neuraminidase antigens. Avian Dis. 1996; 40(4): 770-77.

9. Homhuan A, Prakongpan S, Poomvises P, Maas RA, Crommelin DJA, Kersten GFA, Jiskoot W. Virosome and ISCOM vaccines against Newcastle disease: preparation, characterization and immunogenicity. *Eur J Pharm Sci.* 2004; 22: 459-68.
10. Kim S, Wanasen N, Paldurai A, Xiao S, Collins PL, Samal SK. Newcastle disease virus fusion protein is the major contributor to protective immunity of genotype-matched vaccine. *PLoS One.* 2003; 8: e74022.
11. Kruse CA, Spector EB, Cederbaum SD, Wisnieski BJ. Micro-injection of arginase into enzymedeficient cells with the isolated glycoproteins of Senda virus as Fusogen. *Acta Biochim Biophys.* 1981; 645(2): 339-45.
12. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-85.
13. Lowry OH, Rosenbraugh NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement folin-phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-75.
14. Maas AR, Komen M, van Diepen M, Oei LH, Claassen MTJl. Correlation of hemagglutinin-neuraminidase and fusion protein content with protective antibody response after immunisation with inactivated Newcastle disease vaccines. *Vaccine.* 2003; 21(23): 3137-42.
15. Milić N, Gadjanski-Omerović G, Ašanin R, Marković B. Utilization de l' hydrochlorure de D-(6-3) glucosamine dans le procédé de purification et de séparation des sous-unités glycoprotéiques du virus *Para-influenzae* 3 bovin (PI 3). *Bull Acad de France.* 1991; 64: 365-73.
16. Milić N, Gadjanski-Omerović G, Ašanin R, Marković B, Palić T, Simonović Lj, Rašić Z, Krnjaić D, Crvak B, Milisavljević S. Examination of the immunogenicity of experimental subunit vaccine against Newcastle disease virus. *Acta Vet.* 1996; 46(5-6): 307-16.
17. Milić N, Gadjanski-Omerović G, Ašanin R, Nišavić J, Radojičić M. Examination of antigenic structure and some biological activities of hemagglutinin-neuraminidase (HN) and fusion (F) glycoprotein antigens of parainfluenza 3 virus, *in vitro*. *Acta Vet.* 2003; 53(5-6): 321-31.
18. Mountcastle WE, Compans WR, Choppin WP. Proteins and glycoproteins of Paramixoviruses: a comparison of Simian virus 5, Newcastle disease virus and Sendai virus. *J Virol.* 1971; 7(1): 47-52.
19. Newcastle disease. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* 2012. OIE, 2012: 3-8.
20. Nišavić J, Milić N, Veljović LJ. Examination of the activity of HN and F glycoprotein antigens of the outer envelope of Newcastle disease virus by using fusional, hemolytic, hemagglutination and hemadsorption tests, *in vitro*. *Acta Vet.* 2007; 57(1): 3-10.
21. Panshin A, Shihmanter E, Weisman Y, Örvell C, Kydyrmanov A, Sayatov M, Asanov N, Nyaga PN, Kasiiti JL, Macharija MJ, Lipkind M. The comparative antigenic characterization of Newcastle disease virus strains isolated in Kenya and Kazakhstan. *Comp Immunol, Micr & Inf Dis.* 2001; 24(1): 21-37.
22. Ren X, Xue C, Kong Q, Zhang C, Bi Y, Cao Y. Proteomic analysis of purified Newcastle disease virus particles. *Prot. Sci.* 2012; 1: 10-32.
23. Römer-Oberdorfer A, Werner O, Veits J, Mebastian T, Mettenleiter TC. Contribution of the length of the HN protein and the sequence of the F protein cleavage site to Newcastle disease virus pathogenicity. *J Gen Virol.* 2003; 84: 3121-29.
24. Roth JA. Mechanistic bases for Adverse Vaccine Reactions and Vaccine Failures. *Adv Veter Med.* 1999; 41: 681-700.
25. Scheid A, Choppin WP. Isolation and purification of the envelope proteins of Newcastle disease virus. *Virol.* 1973; 11(2): 263-71.
26. Seal SB, King JD, Sellers SH. The avian response to Newcastle disease virus. *Dev Comp Immunol.* 2000; 24(2-3): 257-68.

27. Tanabayashi K, Compans R W. Functional interaction of paramyxovirus glycoproteins: identification of a domain in Sendai virus HN which promotes cell fusion. J Virol. 1996; 70(9): 6112-18.
28. Wise MG, Suarez DL, Seal BS, Pedersen JC, Senne DA, King DJ, Kapczynski DR, Spackman E. Development of a Real-Time Reverse-Transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA in clinical samples. J Clin Microbiol. 2004; 42: 329-38.

ENGLISH

EXAMINATION OF SOME BIOLOGICAL PROPERTIES OF GLYCOPROTEIN SUBUNITS OF PHY-LMV.42 STRAIN OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS

Nenad Milić, Jakov Nišavić, Sunčica Borozan, Andrea Zorić, Sava Lazić, Tamaš Petrović, Zoran Rašić

The objective of our work was to investigate some biological characteristics of purified glycoprotein subunits of Newcastle disease virus strain PHY-LMV.42 isolated from pigeons for the purpose of vaccine production. PHY-LMV.42 strain of Newcastle disease virus was multiplied by successive passages in embryonated eggs and identified by the methods of Reverse transcriptase PCR and Real-Time PCR along with F gene sequencing. Proving the presence of HN and F antigens in the virus subunits samples was carried out by hemagglutination inhibition method with referent immune sera. Biochemical characterization of glycoprotein subunits was performed by SDS-PAGE method as well as liquid chromatography with mass spectrometry (LC ESI-TOF-MS/MS). Testing for the virus subunits immunogenicity was carried out in biological experiment on 75 laying hens Tetra-SSL and 25 chickens Isa Brown by inducing an artificial infection with Hertz 33 strain of the virus. Low concentrations of the virus antigens of 0.36 mg/ml along with glycoprotein fractions of 77 i 58 kDa manifested a strong hemagglutination activity of 4096 HJ/0,1ml. The subunit vaccines of 256 and 128 HJ/0.5 ml induced a protective immune response in all the vaccinated animals. Based on the obtained results it can be concluded that low concentrations of purified virus subunits of PHY-LMV.42 strain can be used for preparing of effective vaccines.

Key words: Newcastle disease virus, glycoprotein subunits, SDS-PAGE, LC ESI-TOF-MS/MS, immunization.

РУССКИЙ

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ГЛИКОПРОТЕИНОВЫХ СУБЪЕДИНИЦ ШТАММА РНУ-LMV.42 ВИРУСА ПТИЧЬЕЙ БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА

Ненад Милич, Яков Нишавич, Сунчица Борозан, Андреа Зорич, Сава Лазич, Тамаш Петрович, Зоран Рашич

Цель нашего исследования заключалась в изучении биологических характеристик очищенных субъединиц гликопротеинов штамма РНУ-LMV.42 вируса болезни Ньюкасла, изолированного от голубей для использования при изготовлении вакцины. Штамм РНУ-LMV.42 вируса болезни Ньюкасла был получен путем последовательных пассажей в куриных эмбрионах и идентифицирован методом Reverse transcriptase

PCR и Real-Time PCR с секвенированием гена F. Доказательство наличия антигенов HN и F в образцах вирусных субъединиц выполнено методом ингибирования гемагглютинации с соответствующими иммунными сыворотками. Биохимическая характеристика субъединиц гlikoproteинов выполнена с применением метода SDS-PAGE и жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (LC ESI-TOF-MS/MS). Тестирование иммуногенности вирусных субъединиц было проведено в биологическом опыте над 75 курами-несушками Tetra-SSL и 25 цыплятами Isa Brown с выполнением искусственного инфицирования штаммом Hertz 33 указанного вируса. Низкие концентрации вирусных антигенов 0,36 мг/мл с гlikoproteиновыми фракциями 77 и 58 kDa показали высокую гемагглютинационную активность - 4096 HJ/0,1ml. Субъединичные вакцины 256 и 128 HJ/0,5 ml вызвали образование защитного иммунного ответа у всех вакцинированных животных. На основании полученных результатов можно заключить, что низкие концентрации очищенных вирусных субъединиц штамма PHY-LMV.42 могут использоваться для приготовления эффективной вакцины.

Ключевые слова: вирус болезни Ньюкасла, гlikoproteиновые субъединицы, SDS-PAGE, LC ESI-TOF-MS/MS, иммунизация.

