

ISPITIVANJE HEMADSORPCIONIH SVOJTAVA  
GLIKOPROTEINSKIH HN I F ANTIGENA SPOLJAŠNJEG  
OMOTAČA VIRUSA PARAINFLUENCE 3, *IN VITRO*\*  
*INVESTIGATIONS OF HEMADSORPTION CHARACTERISTICS OF  
GLYCOPROTEIN HN AND F ANTIGEN OF PARAINFLUENZA 3 VIRUS  
OUTER MEMBRANE IN VITRO*

J. Nišavić, N. Milić\*\*

Cilj naših istraživanja bilo je ispitivanje hemadsorpcionih svojstava glikoproteinskih HN i F antigena spoljašnjeg omotača virusa parainfluence 3. Posle 6 časova od inokulacije ćelijske linije Vero virusom PI3, prethodno aktivisanim sa 0,025 g/dl tripsin-versena, pojava hemadsorpcije je ustanovljena u manjem intenzitetu u razređenjima antigena od 1:2 i 1:4. Hemadsorpcija je ustanovljena u pomenutim ćelijskim linijama i posle 12 časova od inokulacije kod razređenja virusa od 1:8 i 1:16, dok je posle 24 časa od inokulacije hemadsorpcija bila prisutna i kod razređenja virusa od 1:64. Posle 24 časa od inokulacije ćelijske linije Vero uzorcima virusa PI3, aktivisanih tripsin-versenom i dodavanja specifičnog imunog seruma, ustanovljena je inhibicija hemadsorpcije kod inokulisanih ćelija sa razređenjem imunog seruma od 1:16.

*Ključne reči: Virus parainfluence 3, Vero ćelije, hemadsorpcija, inhibicija hemadsorpcije*

#### Uvod / Introduction

Virus parainfluence 3 pripada rodu *Respirovirus*, podfamiliji *Paramyxovirinae* i familiji *Paramyxoviridae*. U sastavu spoljašnjeg omotača ovog RNK virusa nalaze se dva površinska glikoproteinska antigena hemaglutininsko-neuraminidazni (HN) i fuzioni (F) protein.

Hemaglutininsko-neuraminidazni (HN) protein pripada klasi glikoproteina tipa 2 i predstavlja tetramer koji se kod virusa parainfluence 3 sastoji od dva disulfidno povezana dimera. To je multifunkcionalan molekul koji omogućava

\* Rad primljen za štampu 22. 5. 2006. godine

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

vezivanje virusa za sijalinske receptore na površini ćelije, ima aktivnost neuraminidaze i pokreće proces ćelijske fuzije kroz zajedničko delovanje sa fuzionim (F) proteinom spoljašnjeg omotača virusa PI3.

Fuzioni (F) protein spoljašnjeg omotača virusa parainfluence 3 je transmembranski glikoprotein tip 1 koji se sastoji od regiona glave, vrata i drške. Sintetiše se kao neaktivni prekursor označen sa Fo koji se pod uticajem proteaza koje luče ćelije domaćina inficirane virusom, cepa na dve subjedinice F1 i F2, međusobno povezane disulfidnim vezama. Tada postaje biološki aktivan i odgovoran za odvijanje procesa ćelijske fuzije i hemolize.

## **Materijal i metode rada / Materials and methods**

### *Virus i kultura tkiva / Virus and cell culture*

U ispitivanjima je korišćen goveđi parainfluenca virus 3, soj SD2, čiji je infektivni titar bio  $LD_{50} = 10^{-3,1}$  ( $\log 10^{-3,1}$  TCID<sub>50</sub>/0,1 ml), dok je hemaglutinacioni titar bio 64 HJ/0,1 ml. Za izvođenje testova ćelijske fuzije i inhibicije ćelijske fuzije korišćena je ćelijska linija Vero.

### *Imuni serum / Immune serum*

U testovima inhibicije ćelijske fuzije i testovima inhibicije hemolize, korišćen je specifični imuni serum kunića protiv virusa PI3 goveda u titru 1:32 (Veterinarski zavod Subotica, Subotica).

### *Test hemadsorpcije / Hemadsorption test*

U udubljenja mikrotitracionih ploča koje su pojedinačno inokulisane sa po 50  $\mu$ l dvostrukih razređenja virusa PI3 u 2% Eagle MEM-u od 1:2 do 1:512, prethodno aktivisanih sa 0,025 g/dl tripsin-versena, posle perioda inkubacije od 6 časova, 12 časova i 24 časa i odlivanja podloge, dodavane su količine od po 50  $\mu$ l 0,5% suspenzije eritrocita zamorca. Zatim su ovako pripremljene mikrotitracione ploče držane pola časa na temperaturi od 4°C, posle čega je odlivan višak suspenzije eritrocita, a ćelije ispirane PBS-om. Tri poslednja udubljenja mikrotitracionih ploča sa Vero ćelijama služila su kao kontrola tkiva, virusa i eritrocita. Ovako pripremljene mikrotitracione ploče su posmatrane 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 LD<sub>50</sub> virusa PI3, u količini od po 50  $\mu$ 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  $\mu$ l specifičnog imunog seruma u razređenjima od 1:2 do 1:512. Posle perioda inkubacije ćelija od pola časa na sobnoj temperaturi u sve bazenčiće mikrotitracionih ploča je dodato po 50  $\mu$ l 0,5% suspenzije eritrocita zamorca. Zatim su ova-

ko pripremljene mikrotitracione ploče držane pola sata na temperaturi od 4°C. Posle isteka ovog vremenskog perioda, odlivan je višak suspenzije eritrocita, a ćelije ispirane sa PBS-om. Tri poslednja udubljenje mikrotitracionih ploča su služila kao kontrola tkiva, seruma i virusa. Ovako pripremljene mikrotitracione ploče su posmatrane pod mikroskopom za kulturu tkiva.

### **Rezultati / Results**

Posle 6 časova od inokulacije ćelijske linije *Vero* virusom PI3, prethodno aktivisanim sa 0,025 g/dl tripsin-versena, hemadsorpcija se pojavila u manjem intenzitetu u razređenjima antigena od 1:2 i 1:4. Hemadsorpcija je ustanovljena u pomenutim ćelijskim linijama posle 12 časova od inokulacije kod razređenja virusa od 1:8 i 1:16, dok je posle 24 časa od inokulacije hemadsorpcija bila prisutna i kod razređenja virusa od 1:64.

Posle 24 časa od inokulacije ćelijske linije *Vero* uzorcima virusa PI3, aktivisanih tripsin-versenom i dodavanja specifičnog imunog seruma, ustanovljena je inhibicija hemadsorpcije kod inokulisanih *Vero* ćelija sa razređenjem imunog seruma od 1:16.

### **Diskusija / Discussion**

Ispitivanja hemadsorpcionih svojstava glikoproteinskih HN i F antigena spoljašnjeg omotača virusa parainfluence 3 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 PI3 već posle 6 časova od inokulacije virusa. Ista se intenzivirala posle vremenskog perioda od 12 časova, odnosno 24 časa od inokulacije prethodno pomenutog virusa. Milić [2] 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 ukazali 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 površini ćelija inficiranih virusom posle 24 časa od inokulacije virusa.

Peter G. Polos i sar [1978] pojavu hemadsorpcije kvantitativno su određivali na osnovu procenta ćelija koje su adsorbovale dva ili više eritrocita u populaciji od 200 ćelija CHO-15B ćelijske linije inokulisane virusom Njukastl 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.

Identifikaciju F i HN antigena spoljašnjeg omotača virusa PI3, obavljali smo i primenom testa inhibicije hemadsorpcije. Rezultati ispitivanja su pokazali pojavu inhibicije hemadsorpcije primenom specifičnog imunog seruma protiv pomenutog virusa. Inhibicija hemadsorpcije u ćelijskoj liniji *Vero* inokulisanoj uzorcima virusa PI3, aktivisanog tripsin-versenom, ustanovljena je posle 24 časa od inokulacije kod ćelija sa razređenjem imunog seruma od 1:16. Katz i sar [1] su posle inokulacije virusa Njukastl bolesti u kulturu embrionalnih pilećih fibroblasta, ispitivali 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 Njukastl bolesti, nastala inhibicija procesa adsorpcije eritrocita na površini ćelija inficiranih pomenutim virusom.

#### **Zaključak / Conclusion**

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja, može da se zaključi da se testovi hemadsorpcije i inhibicije hemadsorpcije, zajedno sa drugim standardnim virusološkim metodama, mogu uspešno da koriste za ispitivanje nekih bioloških karakteristika glikoproteinskih HN i F antigena spoljašnjeg omotača virusa parainfluenze 3.

#### **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. Milić N.: Rano otkrivanje virusa PI3 u različitim kulturama tkiva uporednim ispitivanjem nekoliko metoda, Magistarska teza, 1989. - 3. 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. - 4. Trudy G. Morrison: The three faces of paramyxovirus attachment proteins, *Trends in Microbiology*, 9, 3, 2001. - 5. Conraris Helen *et al.*: Probing the Sialic Acid Binding Site of the Hemagglutinin-Neuraminidase of Newcastle Disease Virus: Identification of Key Amino Acid Involved in Cell Binding, Catalysis, and Fusion, *Journal of Virology*, 76, 4, 1816-1824, 2002. - 6. Henrickson K. J.: Parainfluenza viruses, *Clin. Microbiol. Rev.*, 16, 242-264, 2003. - 7. Trudy G. Morrison: Structure and function of a paramyxovirus fusion protein, *Biochimica et Biophysica Acta* 1614, 73-84, 2003. - 8. Michael C. Lawrence *et al.*: Structure of the Hemagglutinin-neuraminidase from Human Parainfluenza Virus Type 3, *J. Mol. Biol.*, 335, 1343-1357, 2004. - 9. Aruna Panda *et al.*: Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virus, *Microb. Pathog.*, 36, 1, 1-10, 2004.

ENGLISH

**INVESTIGATIONS OF HEMADSORPTION CHARACTERISTICS OF GLYCOPROTEIN HN AND F ANTIGEN OF PARAINFLUENZA 3 VIRUS OUTER MEMBRANE *IN VITRO***

**J. Nisavic, N. Milic**

The objective of our investigations was to examine the hemadsorption characteristics of glycoprotein HN and F antigens of the outer membrane of the parainfluenza 3 virus. Six hours following inoculation of the cell line with the Vero virus P13, previously activated with 0.025 g/dl trypsin-versem, the appearance of less intense hemadsorption was established in antigen dilutions of 1:2 and 1:4. Hemadsorption was established in the mentioned cell lines also 12 h after inoculation in virus dilutions of 1:8 and 1:16, while 24 h following inoculation, hemadsorption was present also in a virus dilution of 1:64. Inhibition of hemadsorption in inoculated cells with immune serum dilutions of 1:16 was established 24 h after inoculation of the cell line with Vero samples of the virus P13, activated with trypsin-versem and with the addition of specific immune serum.

Key words: Parainfluenza 3 virus, Vero cells, hemadsorption, hemadsorption inhibition

РУССКИЙ

**ИСПЫТАНИЕ ХИМАДСОРБЦИОННЫХ СВОЙСТВ В ГЛИКОПРОТЕИНЫХ ХН И Ф АНТИГЕНОВ НАРУЖНОЙ ОБОЛОЧКИ ВИРУСА ПАРАИНФЛЮЭНЦЫ 3, *IN VITRO***

**Й. Нишавич, Н. Милич**

Цель наших исследований было испытание химадсорбционных свойств гlikoproteиных ХН и Ф антигенов наружной оболочки вируса параинфлюэнцы 3. После 6 ч. от инокуляции клеточной линии *Vero virusom P13*, предварительно активированным с 0,025 г/дл трипсин-версена, явление химадсорбции установлено в меньшей интенсивности в разрежениях антигенов от 1:2 и 1:4. Химадсорбция установлена в упомянутых клеточных линиях и после 12 ч. от инокуляции у разрежениях вируса от 1:8 и 1:16, пока после 24 ч. от инокуляции химадсорбция была присутствующая и у разрежения вируса от 1:64. После 24 ч. от инокуляции клеточной линии *Vero* образчиками вируса *P13*, активированных трипсин-версеном и добавления специфического иммунного серума, установлено торможение химадсорбции у инокуляционных клеток с разрежением иммунного серума от 1:16.

Ключевые слова: Вирус параинфлюэнцы 3, *Vero* клетки, химадсорбция, торможение химадсорбции