

PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA ANTIGENOS GRUPO ESPECIFICOS DEL VIRUS DE LA LENGUA AZUL

M.M. KANASHIRO¹, E.C. CONTREIRAS¹, A. ALONSO², H. BARAHONA²

¹Instituto de Veterinaria, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,
Antiga Estrada Rio-São Paulo, Km 47 23851-970 Itaguaí, RJ, Brasil

²Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)
Caixa Postal 589, 20001-970 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Resumen. Se desarrollaron anticuerpos monoclonales contra el antígeno grupo específico del virus de la lengua azul serotipo 4. Los hibridomas se obtuvieron a partir de células de bazo de ratones BALB/c inmunizados, fusionadas con células de mieloma Sp2/O-Ag14, usando polietilenglicol 1500 y clonados por dilución limitante. El sobrenadante de ocho anticuerpos monoclonales se probó, por inmunodifusión en gel de agar, contra antígenos grupo específicos procedentes de cuatro laboratorios diferentes. Todos mostraron una buena reacción con el antígeno grupo específico. Por lo tanto, estos anticuerpos monoclonales tienen gran potencial para ser usados en la identificación de anticuerpos grupo específicos mediante la prueba ELISA de competición.

La lengua azul (LA) es una enfermedad viral que afecta principalmente a los ovinos y otros rumiantes domésticos y salvajes. Se encuentra ampliamente distribuida en Africa, América, Australia, el Medio Oriente y el sudeste de Asia, y es transmitida por insectos hematófagos. Los mosquitos del género *Culicoides* son sus principales vectores (14).

El virus de la lengua azul (VLA) pertenece a la familia *Reoviridae*, género *Orbivirus* en el que han sido reconocidos actualmente 24 serotipos por pruebas de virusneutralización (4). El genoma viral está constituido por 10 segmentos de ARN de doble cadena, cada uno de los cuales codifica por lo menos un polipeptido viral. De las siete proteínas que componen la partícula viral de doble capa, cinco (P1, P3, P4, P6 y P7) forman el núcleo. Una capa proteica difusa, compuesta por las P2 y P5 (15), envuelve externamente el núcleo.

Hasta el presente las funciones de las proteínas no estructurales NS1, NS1a, NS2, NS3 y NS3a, identificadas en células infectadas con VLA, no han sido aclaradas (13).

El polipeptido P2, principal antígeno serotipo específico del VLA, es responsable por la neutralización viral. Junto con la P5, son las proteínas de mayor variabilidad entre los serotipos del VLA (13, 15).

Una de las principales proteínas grupo específicas del VLA es el polipeptido P7. Esta es más conservada, altamente hidrofóbica, puede presentarse en forma de polímeros y posee por lo menos dos epítopes en la superficie externa de la partícula viral (4, 9, 10, 11).

El diagnóstico serológico de LA se realiza principalmente mediante la prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDGA). Esta, a pesar de ser simple y práctica, tiene una baja sensibilidad, presenta reacciones cruzadas con otras orbivirosis y su interpretación es subjetiva (1). Por otro lado, la prueba de enzimoinmunoensayo (ELISA) competitiva empleando anticuerpos monoclonales presenta

Solicitar separatas al:
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)

una mayor sensibilidad y especificidad para la detección de anticuerpos contra LA, y no revela reacciones cruzadas con otras orbivirosis (3). Sobre esta base, la FAO/IAEA ha sugerido a la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) la padronización internacional de esta prueba de ELISA para la detección de anticuerpos grupo específicos contra LA (5).

El presente trabajo tiene como objetivo la producción de anticuerpos monoclonales contra un antígeno grupo específico (AGE) a partir del serotipo 4 del VLA y su caracterización parcial frente a los AGE empleados en el diagnóstico serológico de LA por IDGA.

Se emplearon ratones BALB/c machos de 6 a 8 semanas de edad inmunizados con el VLA serotipo 4 (8). El inóculo consistió en $10^{4.09}$ DL₅₀/ml de un segundo pasaje en cerebro de ratón lactante, en un volumen de 0,3 ml por vía intraperitoneal a intervalos de 10 días. El primer inóculo consistió en partes iguales de una suspensión viral y adyuvante completo de Freund. En la segunda y tercera inoculación se empleó una suspensión viral en adyuvante incompleto de Freund, también en partes iguales. Para la cuarta y quinta inoculación, se utilizó solamente la suspensión viral.

Dos ratones fueron sacrificados con CO₂ a los tres días de la última inoculación y los bazo extirpados asépticamente. Estos se lavaron y maceraron en medio Dulbecco modificado (DMEM). Posteriormente, el macerado se trató con tampón ACK (NH₄CL 0,15 M; KHCO₃ 0,01M; Na₂ EDTA 2 H₂O 0,01 M) durante un minuto en baño de hielo y luego se neutralizó con 40 ml de DMEM, conteniendo 5% de suero fetal bovino y 5 UI/ml de heparina. La suspensión se centrifugó a 1000 g por 12 minutos a 4°C. El sedimento se resuspendió en medio DMEM para realizar el recuento de linfocitos.

Paralelamente, células de mieloma Sp2/O-Ag14 (16) en fase logarítmica de crecimiento, se lavaron con medio DMEM, manteniendo una relación de mieloma-linfocito 1:4. Las células de mieloma y los linfocitos se fusionaron mediante la adición de 1 ml de

polietilenglicol (PM 1500) por cada 180 millones de células, según la metodología descrita por Galfré y Milstein (6,7), modificada por el laboratorio de anticuerpos monoclonales del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PANAFTOSA).

Luego de la fusión, las células se cultivaron en medio de crecimiento selectivo (DMEM, 4 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio) con 2% de HAT y 15% de suero fetal bovino. La selección de los hibridomas positivos se realizó a través de la prueba de ELISA indirecta, en la cual la fase sólida contenía el AGE del VLA. Este AGE se obtuvo a partir del sobrenadante de cultivo en monocapa de células BHK-21 inoculadas con VLA, según la metodología descrita por Allende *et al.* (2).

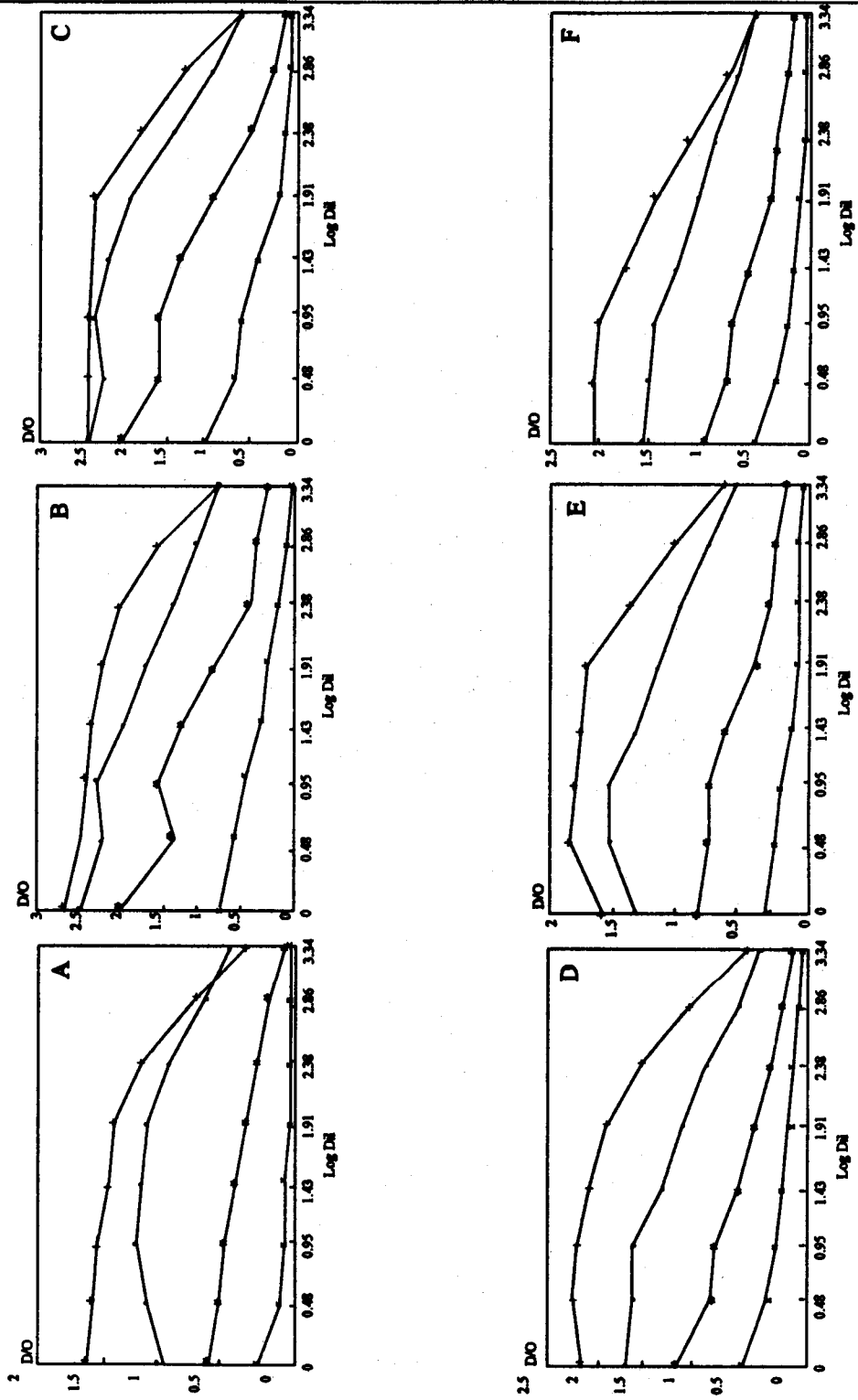
Los hibridomas positivos seleccionados se clonaron por dilución límite y se cultivaron en medio de crecimiento con 2% de HT y 15% de suero fetal bovino.

Durante toda la fase de clonaje y ampliación de los hibridomas para la obtención de sobrenadantes, se empleó la técnica de ELISA indirecta, para la verificación de la estabilidad de los cultivos.

Se obtuvieron ocho anticuerpos monoclonales a partir de las fusiones realizadas (Figura 1). En cada caso los isotipos respectivos se determinaron por medio de IDGA, empleando antisueros específicos para cada isotipo (Cuadro 1).

CUADRO 1. Determinación de los isotipos de los anticuerpos monoclonales por inmunodifusión en gel de agar.

Anticuerpo monoclonal	K	-	IgG1	IgG1a	IgG2b	IgG3	IgM
38Ah11	+	-	-	+	-	-	-
38BC3	+	-	-	+	-	-	-
38BD11	+	-	-	+	-	-	-
38EC8	+	-	-	-	+	-	-
38ED6	+	-	-	+	-	-	-
38BE10	+	-	-	+	-	-	-
40FD8	+	-	-	+	-	-	-
40HD5	+	-	-	-	+	-	-



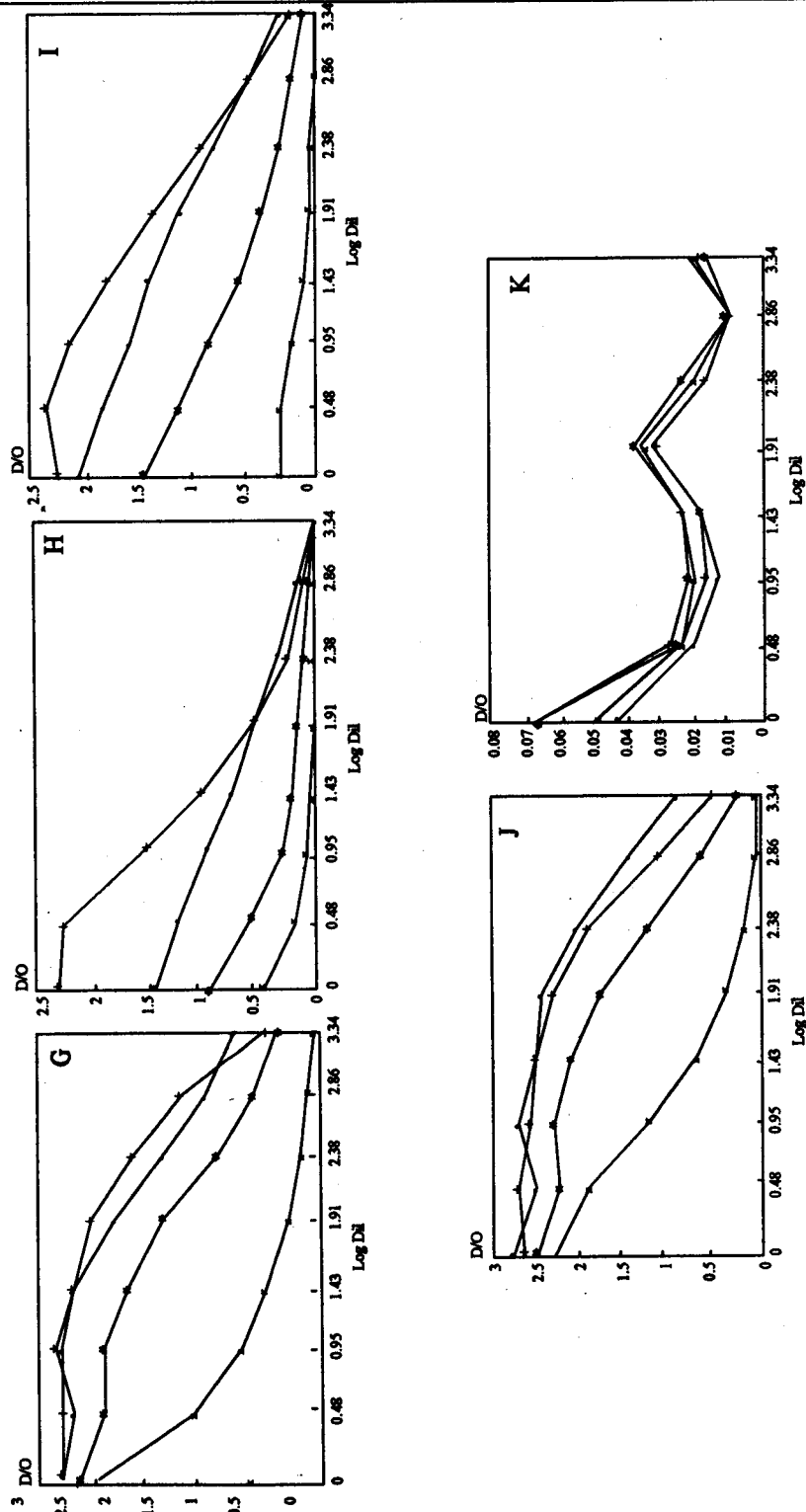


FIGURA 1. Reactividad de los anticuerpos monoclonales frente a los antígenos grupo específicos (PANAFATOSA, VDT, LARA, NVSL) a través de la prueba de ELISA. A 38ED6; B 38BC3; C 38BD11; D 38AH11; E 38EC6; F 39BE10; G 40FD8; H 40HD5; I 17-A3; J suero positivo; K anticuerpo monoclonal antiviral de la fiebre aftosa.

Los ocho anticuerpos monoclonales se evaluaron en base a su reactividad contra cuatro AGE producidos y utilizados rutinariamente para la detección de anticuerpos anti-LA por IDGA en diferentes laboratorios: PANAFTOSA, Veterinary Diagnostic Technology, Inc. USA (VDT), LARA-Campinas, São Paulo, Brasil, y National Veterinary Service Laboratory - USA, Ames, Iowa (NVSL). Cada AGE fue empleado como fase sólida en la prueba de ELISA indirecta en la reacción con los anticuerpos monoclonales (Figura 1). Como control positivo se empleó un suero hiperinmune de ratón anti-VLA (Figura 1J) y un anticuerpo monoclonal 3-17-A3 (Figura 1I) específico para la proteína grupo específica (P7) de VLA (3, 5) y como control negativo, un anticuerpo monoclonal antiviral C₃ Indaial de la fiebre aftosa (Figura 1K).

Los anticuerpos monoclonales presentaron una mayor reactividad frente al AGE PANAFTOSA, debido al empleo de la cepa homóloga de VLA en la producción de los AGE en PANAFTOSA y en el laboratorio LARA.

La alta reactividad de los monoclonales frente al AGE del laboratorio VDT se justifica posiblemente por la utilización de más de una cepa en la producción de este antígeno. La menor reactividad observada frente al antígeno del laboratorio NVSL podría atribuirse a la utilización de una cepa del VLA que presenta pequeñas variaciones en el segmento del ARN viral, que codifica a la proteína grupo específica entre los varios serotipos de LA, observadas en cepas aisladas de diferentes regiones geográficas (12).

La prueba ELISA de competición, empleando anticuerpos monoclonales, según FAO/IAEA (5) es la más indicada para substituir las pruebas de IDGA, fijación del complemento e inmunofluorescencia en el diagnóstico serológico de LA. Los anticuerpos monoclonales desarrollados en el presente trabajo presentan un gran potencial para su empleo en la prueba ELISA de competición y en estudios epidemiológicos de LA.

RECONOCIMIENTO

El autor principal presentó este trabajo a la Universidad Federal Rural de Rio de Janeiro en cumplimiento parcial de los requisitos para el título de *Magister Scientiae* en Microbiología Veterinaria.

REFERENCIAS

1. AFSHAR, A., THOMAS, F.C., WRIGHT, P.F., SHAPIRO, J.L., ANDERSON, J. Comparison of competitive ELISA, indirect ELISA and standard AGID tests for detecting bluetongue virus antibodies in cattle and sheep. *Vet. Rec.*, 124: 136-141, 1989.
2. ALLENDE, R.S., ARITA, G.M., SÖNDAHL, M.S., ALONSO, A. Identificación de anticuerpos de la lengua azul por la técnica de inmunodifusión en gel de agar. Identification of bluetongue antibodies by the technique of immunodiffusion in agar gel. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 55: 27-30, 31-34, 1989.
3. ANDERSON, J. Use of monoclonal antibody in a blocking ELISA to detect group specific antibodies to bluetongue virus. *J. Immun. Methods*, 74: 139-149, 1984.
4. EATON, B., HYATT, A.D., WHITE, J.R. Localization of the nonstructural protein NS1 in bluetongue virus-infected cells and its presence in virus particles. *Virology*, 163: 527-537, 1988.
5. FAO/IAEA. Consultants group meeting on "International standardisation and supply of reagents of ELISA kits to detect group specific antibodies to bluetongue virus". *Animal Production and Health Newsletter*, 13: 7-8, 1991.
6. GALFRÉ, G., MILSTEIN, C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. In: GODING, J.W. *Monoclonal antibodies: principles and practices*. London, Academic Press Inc. 1983. pp. 68-69.
7. GODING, J.W. *Monoclonal antibodies: principles and practice*. London, Academic Press Inc. 1983. 276 p.
8. GROOCOCK, C.M., CAMPBELL, C.H. Isolation of an exotic serotype of bluetongue virus from imported cattle in quarantine. *Can. J. Comp. Med.*, 46: 160-164, 1982.
9. HUISMANS, H., ERASMUS, B.J. Identification of the serotype-specific and group-specific antigens of bluetongue virus. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 48: 51-58, 1981.

10. KOWALIK, T.F., K. LI, J.K. Sequence analyses and structural predictions of double-stranded RNA segment S1 and VP7 from United States prototype bluetongue virus serotypes 13 and 10. *Virology*, 172: 189-195, 1984.
11. LEWIS, S.A., GRUBMAN, M.J. Bluetongue virus: surface exposure of VP7. *Vir. Res.*, 16: 17-26, 1990.
12. LUNT, R.A., WHITE, J.R., BLACKSELL, S.D. Evaluation of a monoclonal antibody blocking ELISA for the detection of group-specific antibodies to bluetongue virus in experimental and field sera. *J. gen. virol.*, 69: 2729-2740, 1988.
13. MERTENS, P.P.C., PEDLEY, S., COWLEY, J., BURROGHS, J.N., CORTEYN, A.H., JEGGO, M.H., JENINGS, D.M., GORMAN, B.M. Analysis of the roles of bluetongue virus outer capsid proteins VP2 and VP5 in determination of virus serotype. *Virology*, 170: 561-565, 1989.
14. OBDEYN, M. *Bluetongue: a review of the disease*. Rio de Janeiro, PANAFTOSA, 1987, 58 p (Scientific and Technical Monograph Series, 16).
15. ROY, P. Bluetongue virus genetics and genome structure. Review article. *Vir. Res.*, 13(3): 179-206, 1989.
16. SHULMAN, M., WILDE, C.D., KÖHLE, G. A better cell line for making hybridoma secreting specific antibodies. *Nature*, 176(16): 269-270, 1978.