

PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LA FIEBRE AFTOSA

J.L. da SILVA, M.M. KANASHIRO, D.L. BRUM

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

RESUMEN: Se describen los anticuerpos monoclonales (AcMs) producidos contra los virus de la fiebre aftosa tipos O, A y C. Para la caracterización preliminar se utilizaron las pruebas de virus-neutralización y seroprotección, y para la reacción de los AcMs, la prueba EITB con la proteína desnaturalizada del virus. Algunos AcMs que no neutralizaron la infección del virus en cultivos de tejidos se mostraron capaces de neutralizarla en ratones lactantes. Los AcMs designados 7EE6 y 7JA1, originarios del virus C₃ Indaial, mostraron reacción cruzada con los virus heterólogos O₁ Campos y A₂₄ Cruzeiro de la fiebre aftosa.

La protección de animales contra la infección por aftovirus es una tarea compleja que puede ocurrir mediante varios mecanismos. Por ejemplo, la neutralización directa o indirecta del virus infeccioso a través de anticuerpos y fagocitosis se ha propuesto como un mecanismo principal de defensa inmunológica contra la invasión viral (19). La introducción de la tecnología de anticuerpos monoclonales (AcMs) ayuda a entender los mecanismos de neutralización viral (20), caracteriza la extensa diversificación antigénica de los virus y define los lugares antigénicos de la superficie viral (6, 7, 9).

Numerosas agrupaciones utilizan AcMs para entender la complejidad antigénica de los aftovirus. Análisis secuenciales de mutantes resistentes de AcMs de aftovirus tipo O (cepa O₁K) (12), identificaron cuatro sitios antigénicos, uno de los cuales

corresponde a la región sensible a la tripsina en la secuencia aminoácida 140-160 y al residuo 208 del extremo C del VP₁. Un segundo sitio, involucrando los aminoácidos 43 y 44, fue identificado también en el VP₁. El tercero estaba asociado a los residuos de la secuencia de los aminoácidos 70-73, 75, 77 y 131 del VP₂ y el último, en el residuo 58 del VP₃ (12).

Para el aftovirus tipo A (cepa A₁₀ Holanda) (23) se informaron cuatro sitios antigénicos: el primero fue sensible a la tripsina e incluyó la secuencia 140-160 del VP₁, mientras que el segundo no fue sensible a la tripsina e incluyó principalmente el VP₃. Se encontraron otros dos sitios menos significativos en los residuos 169 del VP₁ y en el extremo C del VP₁.

Los conocimientos actuales sobre los epítopes discontinuos de los sitios antigénicos del serotipo C (cepa C-S8) de la fiebre aftosa que son independientes del sitio A (VP₁ 140-160), fueron revisados recientemente (14). Uno de estos sitios, llamado sitio C, corresponde al extremo carboxi del segmento del VP₁. Aunque en el aftovirus tipo

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

O los sitios A y C en conjunto forman un dominio (*domain*) discontinuo (sitio 1), en los virus tipo C aparecen como sitios continuos independientes. Otro sitio en este último virus, localizado cerca del eje de la cápside de la tercera generación, es un dominio antigénico discontinuo que aparece como uno de los principales sitios antigénicos (13), mientras que un tercer sitio antigénico independiente está localizado cerca del eje de la cápside de la quinta generación. Además, Mateu et al. (14, 15) describieron por lo menos otros 14 epítopes continuos diferentes en el sitio A y dos epítopes en el sitio C, utilizando un panel de 18 AcMs neutralizantes, algunos de los cuales se incluyen en este estudio.

Un grupo de AcMs dirigidos contra diferentes sitios antigénicos puede ser muy útil para el estudio de la antigenicidad de las vacunas. Además, pueden transformarse en una importante herramienta epidemiológica para el estudio de relacionamientos antigénicos entre las cepas de virus de vacuna y los virus de fiebre aftosa que aparecen en el campo y ayudan en la definición de la estrategia adecuada de las vacunas.

Este informe describe la producción de series de AcMs contra los aftovirus tipos O, A y C. Su caracterización preliminar se discute con base en los resultados obtenidos con pruebas de virus-neutralización y de seroprotección y por su reacción con proteínas virales en EITB.

MATERIALES Y MÉTODOS

Virus: En este estudio se emplearon las cepas de virus utilizadas para la formulación de vacunas contra la fiebre aftosa en la mayoría de los países de América del Sur: O₁ Campos Br/58, A₂₄ Cruzeiro Br/55 y C₃ Indaial Br/71. Normalmente, las preparaciones virales fueron inactivadas con BEA (4) y purificadas en un gradiente de cloruro de cesio.

Inmunización: Se inocularon, semanalmente, ratones Balb/c machos de 6 a 10 semanas de edad por vía intraperitoneal con 40/μg de preparación viral purificada, inactivada o sin inactivar. Para la

primera inoculación, se emulsionaron muestras de virus en adyuvante de Freund completo. Para la segunda y tercera inoculaciones se utilizó adyuvante de Freund incompleto. La cuarta inoculación fue administrada sin adyuvante, dos días antes de la fusión.

Anticuerpos monoclonales: Bazos de ratones inmunizados, removidos asépticamente, se lavaron y maceraron en medio Eagle modificado Dulbecco (DMEM). Las células fueron cosechadas y concentradas por centrifugación a 1000g durante 8 minutos a 4°C. Los *pellets* se trataron con solución tampón ACK (NH₄Cl 0,15 M; KHCO₃ 0,01M; Na₂EDTA 0,01 M) por un minuto en baño frío y después neutralizados con 40 ml de DMEM conteniendo suero fetal bovino (5%) y heparina (5 UI/ml). Posteriormente, la suspensión celular fue centrifugada y los *pellets* resuspendidos en DMEM.

Células de mieloma SP₂/0 Ag 14 en su fase de crecimiento exponencial se cultivaron en un medio SP2 (DMEM con 2mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, adicionado de 15% de suero fetal bovino), y fueron lavadas y resuspendidas en DMEM. Las células de bazo y de mieloma se mezclaron en una proporción de 4:1 respectivamente y fueron centrifugadas. Los *pellets* de células se dispersaron cuidadosamente y las fusiones se realizaron adicionando 1 ml de polietilenglicol 1500 (NBS Biologicals*) (PEG 1500 50% p/v en DMEM y 5% dimetilsulfóxido) para cada 1,8 x 10⁸ células, mezclando por rotación durante los dos minutos siguientes. Inmediatamente después, se adicionaron, lentamente, 20 ml de DMEM por un período de tres minutos, usando un cuentagotas. Las células suspensas se pipetearon cuidadosamente y se incubaron a 37°C por 15 minutos en baño de agua.

Después de la incubación, los sobrenadantes se trasladaron a tubos limpios, los volúmenes se ajustaron a 40 ml con DMEM y se centrifugaron. Los *pellets* fueron resuspendidos en un medio

* La mención en este trabajo de firmas comerciales o de sus productos es solo para identificación y no constituye endoso por los autores o sus organizaciones.

HAT (SP2 con hipoxantina 0,1 mM, aminopterina 0,0004 mM y timidina 0,016 mM) con $2,5 \times 10^6$ células/ml, aproximadamente, y distribuidas en placas de 96 pocitos conteniendo 0,2 ml/pocito. Las placas se colocaron en una incubadora a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

El crecimiento del hibridoma se examinó diariamente, hasta que se observaron aproximadamente 300 células en la colonia de hibridomas. Los sobrenadantes se recolectaron y analizaron por la prueba ELISA, como se describe más abajo, buscando anticuerpos específicos. Hibridomas positivos fueron clonados tres veces por la técnica de dilución limitante. Los hibridomas se mantuvieron en un medio de cultivo HT (medio SP2 con 0,1 mM de hipoxantina y 0,016 mM de timidina).

Prueba ELISA: Los hibridomas se sometieron a pruebas ELISA según los métodos descritos (2). Resumiendo, las placas ELISA (Nunc Immunoplates*) se cubrieron con suero hiperinmune de conejo específico a cada tipo de aftovirus (O, A y C), para que actuaran como anticuerpos de captura. En cada placa se colocaron aftovirus homólogos a cada anticuerpo de captura y se incubaron. Después de la incubación y los correspondientes lavados, los sobrenadantes de cada cultivo de hibridoma se sometieron a reacción con el virus homólogo, por 30 minutos, a 37°C.

Las reacciones positivas se detectaron adicionando un conjugado de inmunoglobulina caprina antiratón con peroxidasa de rabanita y desarrollándola con dihidrocloruro de ofenilenediamina.

Caracterización de anticuerpos monoclonales: Los isótipos de AcM se determinaron por la prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDGA), utilizando antisuero específico para cada isótipo.

Las concentraciones de AcMs se determinaron por IDGA como se describió (22). En resumen, se preparó agarosa al 1% en 10 mM de Tris-HCl, 140 mM de NaCl y 0,1% de NaN₃. Después de la fusión de la agarosa, se adicionaron 90 µg de IgG bovina antiratón por cada 12 ml de la solución de agarosa a 40-50°C, y fue vertida en placas Petri de 10 cm de diámetro. Se hicieron siete

pocitos en cada placa y se llenaron con 10 µl de los AcMs correspondientes. Las concentraciones de AcMs se estimaron midiendo el halo de precipitación, comparándolo con padrones basados en datos obtenidos en concentraciones de AcMs conocidos (0 µg; 0,2 µg; 0,4 µg; 0,8 µg).

La capacidad de los AcMs para neutralizar la infecciosidad de los virus *in vitro* e *in vivo* fue comprobada por pruebas de virusneutralización (VNT) y de seroprotección (MPT), respectivamente. Para la VNT (10), se distribuyeron suspensiones de cultivo de células IBRS-2, conteniendo 3×10^5 células/ml, en cantidades de 0,1 ml, en 96 pocitos y se incubaron a 37°C por 24 horas, en incubadora con CO₂.

Cuatro soluciones de la cuarta generación de AcMs positivos se incubaron con virus previamente titulados (100 DICT₅₀) a 37°C por 1 hora. Esta mezcla de virus y AcM se distribuyó en cantidades de 0,1 ml sobre la camada de cultivo celular. Los títulos de AcMs se expresaron como el log₁₀ de la recíproca de la dilución más baja de AcM que permitió la formación de placas.

La prueba de MPT se realizó como descrito (8). En resumen, ratones lactantes de 4 a 6 días de edad se inocularon por vía subcutánea con 0,1 ml de AcMs sin diluir. Una hora más tarde, se le inoculó por vía intraperitoneal con 0,05 ml de cuatro diluciones seriales de virus de la décima generación (10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ y 10⁻⁵). La DI₅₀ de los virus en presencia de AcMs se calculó por el método Reed Muench y el resultado se expresó como el índice de seroprotección. Los sueros de control positivos y negativos y las titulaciones de virus se incluyeron en los procedimientos VNT y MPT. Los resultados se aceptaron solo cuando estos controles estaban en concordancia con los títulos padrones previamente establecidos.

Para determinar la reacción de los AcMs con la proteína estructural del virus, se realizó una prueba EITB según el procedimiento descrito en el manual técnico del "Mini Trans-Blot BIORAD*". Las proteínas estructurales del virus se separaron en SDS-PAGE con 10% de acrilamida/bisacrilamida. Para cada gel se utilizaron 100 µg de virus purificado en un gradiente de cloruro de cesio y se trasladaron a membranas de nitrocelulosa. Se usó

una solución de albúmina de suero bovino (BSA) al 2% en PBS (0,136 M NaCl; 0,002 MKCl; 0,01 M Na₂HPO₄; 0,001 M KH₂PO₄), para saturar membranas de nitrocelulosa durante la noche, a 5°C. Tiras de membranas de nitrocelulosa saturadas se sometieron a reacción con cada sobrenadante de AcM diluido al 1:2 en PBS con 2% de BSA (tampón diluyente) y fueron incubadas a 25°C durante dos horas bajo constante agitación. Posteriormente, las tiras de nitrocelulosa se lavaron tres veces con PBS conteniendo 0,05% de Tween 20, se adicionó un conjugado de inmunoglobulina bovina antirátón con peroxidasa de rabanito y esta preparación fue incubada por una hora. La reacción se realizó con 4-cloro-1-naftol (16).

RESULTADOS

Anticuerpos monoclonales: El proceso de inmunización con virus vivos y/o inactivados y purificados de la fiebre aftosa provocó una buena inmunidad en ratones, contra cada cepa del virus. Sin embargo, la inoculación usando virus sin inactivar produjo un número mayor de hibridomas positivos. Las fusiones resultaron en 120 líneas de hibridomas celulares secretando anticuerpos continuamente. De estos, 35 fueron hibridomas específicos para O₁ Campos, 58 para A₂₄ Cruzeiro y 27 para C₃ Indaial.

Los datos de 20 AcMs contra cada cepa de virus se muestran en los cuadros 1, 2 y 3. Fueron seleccionados entre todos los AcMs obtenidos en este estudio, basados en sus características (este informe) y su falta de reacción cruzada con otras cepas de aftovirus de un serotipo diferente (datos no mostrados).

Las colonias de hibridomas fueron clonadas para certificar la homogeneidad y estabilidad en las líneas de hibridomas celulares. En cada caso, se confirmó la buena capacidad de secreción de anticuerpos de las líneas de hibridomas celulares.

Caracterización de los anticuerpos monoclonales: En los cuadros 1, 2, y 3 se muestran los isotipos de AcM. Todos los isotipos IgG3 fueron capaces de neutralizar la infecciosidad del virus en ratones

lactantes. La única excepción fue el AcM 7JA1, que mostró reacción cruzada con los virus O y A.

Las concentraciones de AcMs por IDGA mostraron grandes variaciones en la concentración de AcMs de los sobrenadantes de los cultivos de hibridoma (cuadros 1, 2 y 3). Estas diferencias fueron inherentes a cada hibridoma, aunque es posible que el manejo de los cultivos de hibridoma haya tenido alguna influencia en la concentración de AcMs.

Se detectaron reacciones cruzadas en las pruebas ELISA. Los AcMs 7EE6 y 7JA1, originarios de la cepa C₃ Indaial, también tuvieron reacciones variables con los virus O₁ Campos y A₂₄ Cruzeiro (figura 1). De estos dos AcMs, solo el 7EE6 mostró títulos altos en las pruebas de seroneutralización y

Cuadro 1. Propiedades de los AcMs para el aftovirus tipo O

MONO-CLONAL	ISOTIPO	CONC ^a	VNT ^b	MPT ^c	EITB ^d
11HC10	K/IgG3	—	> 3,50	4,27	VP1 ^e
11AD6	K/IgG2a	186	< 1,20	2,35	CONF ^f
12BB5	K/IgG3	162	< 1,20	3,25	CONF.
12FA5	K/—	10	< 1,20	0,88	CONF.
12DB7	K/IgG2a	99	1,90	2,83	CONF.
12GG11	K/IgG2a	118	< 1,20	0,00	CONF.
12EH6	K/IgG1	118	< 1,20	0,06	CONF.
12FG2	K/IgM	—	< 1,20	0,38	CONF.
36AF8	K/—	—	< 1,20	—	VP1
12CA12	K/IgG1	47	< 1,20	—	CONF.
13EG1	K/IgG2a	118	< 1,20	0,00	CONF.
13EC5	K/IgG1	108	< 1,20	0,00	CONF.
13DG11	K/IgM	—	< 1,20	0,31	CONF.
34CH4	K/—	33	< 1,20	0,50	CONF.
36AC6	K/IgM	—	> 3,60	2,50	CONF.
36BE8	K/Ig2a	—	1,90	—	VP1
36CC2	K/IgG2a	129	< 1,20	< 1,25	CONF.
36BB11	K/IgG1	108	< 1,20	—	CONF.
36AA8	K/IgG2a	118	< 1,20	< 1,25	CONF.
36AD5	K/IgG2a	186	< 1,20	< 1,25	CONF.

^a Concentración de AcMs determinada por la prueba de inmunodifusión en gel de agar.

^b Títulos en pruebas de virusneutralización.

^c Índice de seroprotección, determinado por pruebas de seroprotección.

^d Prueba de EITB.

^e Reacciones positivas y ^f negativas con proteínas de virus desnaturalizados determinadas por EITB.

- No determinado.

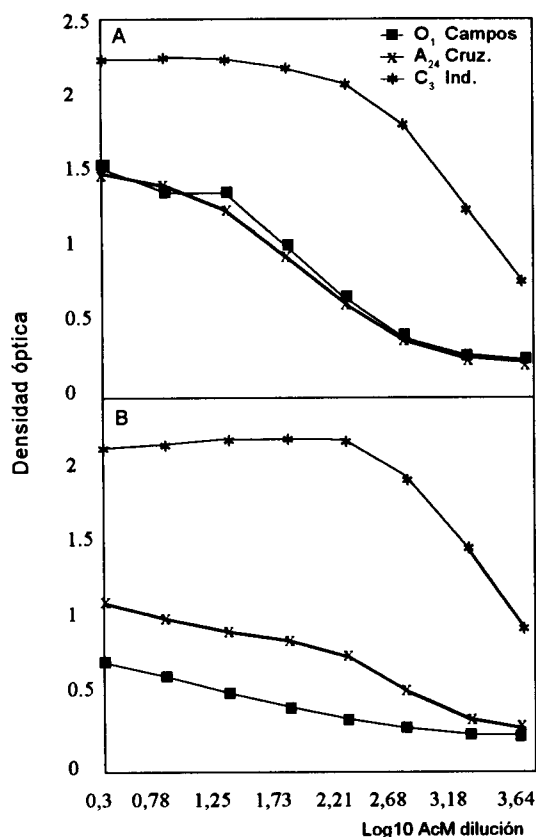


Figura 1. Reacción de AcMs 7EE6 (A) y 7JA1 (B) contra virus homólogos (C_3 Indaial) y heterólogos (O_1 Campos y A_{24} Cruzeiro) en pruebas ELISA

seroprotección con virus homólogos (cuadro 3). La reacción cruzada con 7EE6 en VNT y MPT resultó en títulos de $<1,20$ y $1,52$ respectivamente para O_1 Campos y de $<1,20$ y $0,55$ para A_{24} Cruzeiro.

La capacidad de los AcMs para neutralizar la infecciosidad viral en cultivos de tejidos se estudió por VNT (cuadros 1, 2 y 3). El virus A_{24} Cruzeiro pareció inducir, principalmente, los AcMs de bajos títulos de neutralización. Exceptuando el 31DF4, todos los títulos de AcMs del A_{24} Cruzeiro fueron de $1,80$ o menos en la VNT. Por el contrario, con la MPT el A_{24} Cruzeiro indujo un número más alto de AcMs con alto índice de seroprotección. 17 de los AcMs mostraron un título MPT de $2,00$ o más (cuadro 2). La cepa del virus O_1 Campos presentó

poca capacidad para generar AcMs con propiedades protectoras o neutralizantes, especialmente si comparada con los AcMs obtenidos de los virus A_{24} Cruzeiro y C_3 Indaial.

Los datos sobre la capacidad de los AcMs para proteger ratones por MPT se muestran en los cuadros 1, 2 y 3. La neutralización de la infecciosidad de los virus por MPT mostró resultados diferentes de los observados en VNT. Así, muchos AcMs que no neutralizaron la infecciosidad del virus en cultivos de tejidos, en MPT protegieron ratones lactantes.

De las proteínas virales definidas por los AcMs en EITB (cuadros 1, 2 y 3), una media de 50% de los epitopes identificados por los AcMs

Cuadro 2. Propiedades de los AcMs para el aftovirus tipo A

MONO-CLONAL	ISOTIPO	CONC ^a	VNT ^b	MPT ^c	EITB ^d
16EC11	K/-	118	$<1,20$	3,00	VP1*
16EC2	K/IgM	-	$<1,20$	3,00	CONF ^f
17CA6	K/IgG2a	33	$<1,20$	1,25	CONF.
31DC7	K/IgG3	140	$<1,20$	2,24	VP1
31DE3	K/-	20	$<1,20$	3,00	VP1
31DB8	K/-	162	$<1,20$	4,02	VP1
31DF4	K/IgG3	33	3,40	4,03	VP1
31EF12	K/IgG2a	15	1,80	4,25	CONF.
31EH2	K/-	47	1,50	2,75	CONF.
31ED1	K/IgG2a	47	1,40	4,50	CONF.
31EE8	K/IgG2a	63	1,60	1,50	CONF.
31EA12	K/IgG2a	-	1,30	2,00	CONF.
31EG9	K/IgG2a	63	1,30	4,65	CONF.
31EB2	K/IgG2a	63	1,40	4,25	CONF.
31FE7	K/-	162	$<1,20$	3,10	VP1
31FA4	K/IgG2a	150	$<1,20$	3,15	VP1
31GA6	K/IgG3	70	$<1,20$	3,85	CONF.
31GA3	K/IgG3	118	$<1,20$	3,35	VP1
32AA5	K/Ig2a	140	$<1,20$	0,85	VP1
32DH3	K/IgG2a	186	$<1,20$	4,25	CONF.

^a Concentración de AcMs determinada por la prueba de inmunodifusión en gel de agar.

^b Títulos en pruebas de virusneutralización.

^c Índice de seroprotección, determinado por pruebas de seroprotección.

^d Prueba de EITB.

* Reacciones positivas y ^f negativas con proteínas de virus desnaturalizados determinadas por EITB.

- No determinado.

Cuadro 3. Propiedades de los AcMs para el aftovirus tipo C

MONO-CLONAL	ISOTIPO	CONC ^a	VNT ^b	MPT ^c	EITB ^d
1BH8	K/-	26	1,90	2,22	VP1*
2LC9	K/-	-	< 1,20	1,70	VP1
7AB5	K/IgG3	250	3,50	> 4,75	VP1
7AH1	K/IgG2b	211	< 1,20	0,60	VP1
7BH11	K/IgG2b	236	< 0,61	1,25	CONF ^e
7CA8	K/IgG3	295	> 3,60	3,25	VP1
7CH1	K/IgG1	200	1,90	3,75	VP1
7CA11	K/IgG1	160	3,50	3,60	VP1
7DH4	K/IgG2b	165	< 1,20	1,40	CONF.
7DG11	K/IgG1	-	< 0,61	0,21	CONF.
7DF10	K/IgG1	120	1,50	4,32	CONF.
7EE6	K/IgG3	160	3,40	3,07	VP1
7EG3	K/IgG1	-	< 1,20	0,71	CONF.
7FC4	K/IgG2a	256	< 1,20	0,75	CONF.
7FC12	K/IgG1	104	3,30	3,00	VP1
7JA1	K/IgG3	90	< 0,61	0,46	VP1
7JD1	K/IgG1	200	> 3,61	3,50	VP1
7LA5	K/IgG3	90	< 1,20	4,25	CONF.
7DH9	K/IgG2a	295	< 1,20	0,60	CONF.
7LE9	K/IgG1	-	-	3,58	CONF.

^a Concentración de AcMs determinada por la prueba de inmunodifusión en gel de agar.

^b Títulos en pruebas de virusneutralización.

^c Índice de seroprotección, determinado por pruebas de seroprotección.

^d Prueba de EITB.

^e Reacciones positivas y ^fnegativas con proteínas de virus desnaturalizados determinadas por EITB.

- No determinado.

generados por los virus A₂₄ Cruzeiro y C₃ Indaial, correspondieron a epítopes no conformacionales en VP₁. Por el contrario, los epítopes identificados por la mayoría de los AcMs generados por la cepa O₁ Campos, resultaron ser conformacionales. Solo los AcMs 11HC10, 36AF8 y 36BE8 reaccionaron con la secuencia lineal VP₁ en EITB.

DISCUSIÓN

Todos los AcMs descritos en este informe contenían cadenas Kappa livianas y la mayoría de las cadenas pesadas eran del isótopo IgG. Esta característica refleja el hecho de que 95% de las

moléculas de inmunoglobulina de ratones contienen cadenas Kappa livianas y que los procedimientos de inmunización posteriores, normalmente resultan en una respuesta IgG (11).

Los AcMs inducidos por O₁ Campos, que reconocieron la secuencia lineal del VP₁, solo fueron revelados por los AcMs 11HC10, 36AF8 y 36BB11. Otros AcMs fueron dirigidos a epítopes conformacionales en la superficie del virión. Se sugiere que el sitio neutralizante principal de O₁ Campos es más dependiente conformacional que los observados en los virus A₂₄ Cruzeiro y C₃ Indaial (6, 13, 24).

En un estudio previo (15), los epítopes reconocidos por los AcMs del C₃ Indaial 7EE6 y 7JA1 en la región VP₁ correspondieron, respectivamente, a los aminoácidos 138 a 156 (sitio A) y 192 a 209 (sitio C). En este estudio se descubrió que estos AcMs tienen reacción cruzada con los virus O₁ Campos y A₂₄ Cruzeiro (figura 1). El AcM 7EE6 presentó actividad neutralizante en la prueba de seroprotección sobre virus homólogos y también sobre los virus heterólogos O₁ Campos y A₂₄ Cruzeiro. Aunque los títulos de reacción cruzada de los AcMs fueron considerados bajos, estos hallazgos sugieren similitudes entre los epítopes neutralizables definidos por el AcM 7EE6, tanto en los virus homólogos como en los otros dos tipos de virus heterólogos. Los estudios continúan para elucidar mejor estos hallazgos.

El experimento *in vitro* de VNT es selectivo para un tipo particular de anticuerpo, capaz de neutralizar la infecciosidad viral, principalmente en altas concentraciones (17). Esto es contrario a lo que realmente sucede en un hospedero natural o en una prueba de seroprotección *in vivo*, donde intervienen otros intermediarios inmunológicos, como opsonización de anticuerpos y anticuerpos con complemento, que permiten la fagocitosis de partículas virales (18). Además, las clases y subclases de anticuerpos juegan un rol importante sobre la activación complementaria y la interacción de anticuerpos con receptores Fc en macrófagos o en neutrófilos (21). De hecho, muchos AcMs con títulos VNT muy bajos tuvieron un alto índice de seroprotección. La situación inversa no se verificó. Esto tiene implicaciones importantes para expe-

rimentos y ensayos en que el título está relacionado a la capacidad protectora de un antígeno. En cuanto la prueba de seroprotección generalmente es considerada la más relevante en la protección de bovinos, se puede decir que un título alto en ratones de un determinado AcM puede reflejar las peculiaridades de un isótipo de murino particular y sus interacciones con fagocitos de murino en lugar de la situación en el ganado.

Las relaciones entre cepas de aftovirus pueden ser claramente establecidas en base a la secuencia de nucleótidos (5). Aunque esta técnica puede ser una herramienta epidemiológica útil, tiene sus limitaciones para predecir una antigenicidad viral, por ejemplo, la determinación de una estrategia vacunal (3). La sustitución de apenas un aminoácido dentro de la región 138-156 del VP₁ muestra que modifica la especificidad antigénica del virus (15) y que variaciones en dominios diferentes del sitio antigénico A también pueden ser relevantes sobre toda la diversidad antigénica del aftovirus en el campo (9).

En general, estas consideraciones restringen la importancia potencial de los AcMs descritos en este informe para uso en la caracterización antigénica de aftovirus obtenidos tanto de brotes en el campo como en cepas de vacunas. Estas informaciones son particularmente valiosas para identificar los 4 ó 5 sitios antigénicos de la fiebre aftosa descritos (6, 7, 9, 12, 13, 23).

Además, con el uso de AcMs descritos en este informe, se encontraron evidencias (14) de que una limitada variación de secuencias en los sitios antigénicos independientes de los aftovirus, que contienen varios epítopes, puede constituir la base para la diversidad antigénica de estos virus en el campo. Finalmente, algunos de estos AcMs probaron su utilidad en el proceso de producción de vacunas contra la fiebre aftosa (1, 2), cuantificando masas antigénicas y determinando el ajuste entre antígenos activados y virus de desafío.

RECONOCIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Horacio Barahona por su parecer y apoyo y al Dr. Alberto K. Ramalho por

la realización de las pruebas de virusneutralización y seroprotección.

Además agradecemos a los Drs. Luis Enjuanes y Mauricio G. Mateu, del Centro de Biología Molecular "Severo Uchoa", España, por su valiosa asistencia en la preparación de las primeras fases de los hibridomas y su caracterización.

REFERENCIAS

1. ALONSO, A., DARSIE, G.C., TEIXEIRA, A., C., REIS J.L., MESQUITA, J.A. Application of monoclonal antibodies to quality control of foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine*, 12 (8): 682-686, 1994.
2. ALONSO, A., GOMES, M.P.D., RAMALHO, A.K., ALLENDE, R., BARAHONA, H., SÖNDAHL, M.S., OSORIO, F.A. Characterization of foot-and-mouth disease virus by monoclonal antibodies. *Viral Immunol.*, 6 (3): 219-228. 1993.
3. ARMSTRONG, R.M., SAMUEL, A.R., CARPENTER, W.C., KANT, R., KNOWLES, N.J. A comparative study of serological and biochemical methods for strain differentiation of foot-and-mouth disease type A viruses. *Vet. Microbiol.*, 38: 285-298, 1994.
4. BAHNEMANN, H.G. Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch. Virol.*, 47: 47-56, 1975.
5. BECK, E., STROHMAIER, K. Subtyping of European foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination. *J. Virol.*, 68: 1621-1629, 1987.
6. BOLWELL, C., CLARKE, B.E., PARRY, N.R., OULDRIDGE, E.J., BROWN, F., ROWLANDS, D.J. Epitope mapping of foot-and-mouth disease virus with neutralizing monoclonal antibodies. *J. gen. Virol.*, 70: 59-68, 1989.
7. CROWTHER, J.R., FARIAS, S., CARPENTER, W.C., SAMUEL, A.R. Identification of a fifth neutralizable site on type O foot-and-mouth disease virus following characterization of single and quintuple monoclonal antibody escape mutants. *J. gen. Virol.*, 74: 1547-1553, 1993.
8. CUNHA, R.G., BAPTISTA JUNIOR, J.A., SERRÃO, U.M., TORTUELLA, I. El uso de los ratones lactantes en la evaluación de los anticuerpos

- contra el virus de la fiebre aftosa y su significación inmunológica. *Gac. Vet.*, 19: 243-267, 1957.
9. FEIGELSTOCK, D., MATEU, M.G., PICCONE, M.E., DE SIMONE, F., BROCCCHI, E., DOMINGO, E., PALMA E.L. Extensive antigenic diversification of foot-and-mouth disease virus by amino acid substitutions outside the major antigenic site. *J. gen. Virol.*, 73: 3307-3311, 1992.
 10. FERREIRA, M.E.V. Microtiter neutralization test for the study of foot-and-mouth disease antibodies. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 21-22: 21-24, 1976.
 11. GODING, J.W. *Monoclonal antibodies: principle and practice*. London, Academic Press, 1983. 276p.
 12. KITSON, J.D.A., MCCAHOON, D., BELSHAM, G.J. Sequence analysis of monoclonal antibody resistant mutants of type O foot-and-mouth disease virus: evidence for the involvement of the three surface exposed capsid protein in four antigenic sites. *Virology*, 179: 26-34, 1990.
 13. LEA, S., HERNÁNDEZ, J., BLAKEMORE, W., BROCCCHI, E., CURRY, S., DOMINGO, E., FRY, E., ABU-GHAZLEH, R., KING, A., NEWMAN, J., STUART, D., MATEU, M.G. The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure*, 2: 23-139, 1994.
 14. MATEU, M.G., HERNANDEZ, J., MARTINEZ, M.A., FEIGELSTOCK, D., LEA, S., PEREZ, J.J., GIRALT, E., STUART, D., PALMA, E. L., DOMINGO, E. Antigenic heterogeneity of foot-and-mouth disease virus serotype in field is mediated by very limited sequence variation at several antigenic sites. *J. Virol.*, 68 (3): 1407-1417, 1994.
 15. MATEU, M.G., MARTINEZ, M.A., CAPUCCI, L., ANDREU, D., GIRALT, E., SOBRINO, F., BROCCCHI, E., DOMINGO, E. A single amino acid substitution affects multiple overlapping epitopes in the major antigenic site of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *J. gen. Virol.*, 71: 629-637, 1990.
 16. MATEU, M.G., SILVA, J.L., ROCHA, E., BRUM, D.L., ALONSO, A., ENJUANES, L., DOMINGO, E., BARAHONA, H. Extensive antigenic heterogeneity of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Virology*, 167: 113-124, 1988.
 17. MCCULLOUGH, K.C., CROWTHER, J.R., BUTCHER, R.N., CARPENTER, W.C., BROCCCHI, E., CAPUCCI, L., DE SIMONE, F. Immune protection against foot-and-mouth disease virus studied using virus-neutralizing and non-neutralizing concentrations of monoclonal antibodies. *Immunology*, 58: 421-428, 1986.
 18. MCCULLOUGH, K.C., DE SIMONE, F., BROCCCHI, E., CAPUCCI, L., CROWTHER, J.R., KIHM, U. Minireview: protective immune response against foot-and-mouth disease. *J. Virol.*, 66 (4): 1835-1840, 1992.
 19. MCCULLOUGH, K.C., PARKINSON, D., CROWTHER J.R. Opsonization-enhanced phagocytosis of foot-and-mouth-disease virus. *Immunology*, 65: 187-191, 1988.
 20. MCCULLOUGH, K.C., SMALE, C.J., CARPENTER, W.C., CROWTHER, J.R., BROCCCHI, E., DE SIMONE, F. Conformational alteration in foot-and-mouth disease virus virion capsid structure after complexing with monospecific antibody. *Immunology*, 60: 75-82, 1987.
 21. MULCAHY, G., GALE, C., ROBERTSON, P., IYISAN, S., DIMARCHI, R.D., DOEL, T.R. Isotype responses of infected, virus-vaccinated and peptide-vaccinated cattle to foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, 8 (3): 349-256, 1990.
 22. STAVE, W., CARD, J.L., MORGAN, D.O. Analysis of foot-and-mouth disease virus type O Brugge neutralization epitopes using monoclonal antibodies. *J. gen. Virol.*, 67: 2083-2092, 1986.
 23. THOMAS, A.A.M., WOORTMELJER, R.J., PUIJ, W., BARTELING, S.J. Antigenic sites on foot-and-mouth disease virus type A10. *J. Virol.*, 62 (8): 2782-2789, 1988.
 24. XIE, Q.C., MCCAHOON, D., CROWTHER, J.R., BELSHAM, G.J., MCCULLOUGH, K.C. Neutralization of foot-and-mouth disease virus can be mediated through any of at least three separate antigenic sites. *J. gen. Virol.*, 68: 1637-1647, 1987.