

ANTICUERPOS MONOCLONALES ESPECIFICOS PARA HERPESVIRUS BOVINO TIPO-1 (CEPA COOPER)

M.T.C. WINKLER^{1*}, F.A. OSORIO², M.S. SONDAHL²,
F.B. RANGEL FILHO¹, H. BARAHONA²

¹Instituto de Veterinária, 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. Anticuerpos monoclonales fueron preparados contra herpesvirus bovino tipo 1 (BHV-1) purificado y se seleccionaron varios de acuerdo con su habilidad de neutralizar la infectividad viral. El virus fue purificado por dos métodos alternativos de concentración, con polietilenglicol seguido de ultracentrifugación sobre un colchón de sacarosa al 25% (p/p) o usando un gradiente lineal de tartrato de potasio. De un total de 204 líneas celulares que segregaban anticuerpos para el virus, obtenidas en dos fusiones, se seleccionaron y expandieron clonalmente 39 híbridomas. La selección se basó en su reactividad específica por ELISA. De éstos, 11 anticuerpos monoclonales fueron capaces de neutralizar BHV-1 total o parcialmente, con o sin el agregado de complemento. Siete anticuerpos monoclonales fueron producidos (en la forma de fluido ascítico) y purificados por precipitación en sulfato de amonio. De éstos, dos fueron capaces de prevenir la penetración del virión luego de su adherencia a las células. Asimismo, tres anticuerpos monoclonales fueron seleccionados para ser usados en las pruebas de inmunoperoxidasa para la detección del BHV-1 en cultivos celulares infectados.

El herpesvirus bovino-1 (BHV-1), que también es conocido como virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina, es un miembro de la subfamilia *Alphaherpesvirinal*, dentro de la familia *Herpesviridae*. El BHV-1 produce una variedad de síndromes del ganado bovino que incluyen: rinotraqueítis, conjuntivitis, vulvovaginitis pustular infecciosa, balanopostitis pustular infecciosa, abortos, enteritis y encefalitis (17). Al igual que otros herpesvirus, el BHV-1 puede causar infecciones que persisten por largo tiempo en forma latente en los ganglios nerviosos sensoriales y que pueden ser

reactivadas después de stress y tratamientos con corticoides (1,19). El BHV-1 codifica 22 polipeptidos no glicosilados estructurales y 11 polipeptidos glicosilados (5,30). Contiene tres grupos de glicoproteínas en su envoltura, a saber: la gI, que es una proteína heterodimérica, consistente de dos subunidades, una de 74/55 kDa, vinculada por un puente disulfuro a otra subunidad de 130 kDa, la gIII, una glicoproteína dimérica de 180/97 kDa, y la gIV, una glicoproteína dimérica de 150/77 kDa. Cada uno de estos grupos glicoproteicos induce anticuerpos neutralizantes específicos (11,28,31,39). La glicoproteína gI del BHV-1 puede actuar como una proteína de fusión (13), mientras que la gIII parece ser la proteína más importante para adherencia a la célula (27) y la gIV tendría un rol en la penetración viral a través de la membrana celular (9,37,39) y en fusión celular (39).

* Dirección actual: Instituto Biológico de São Paulo
Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, 04014-002 São Paulo, SP, Brasil
Solicitar separatas al:
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)

El trabajo realizado consistió en la producción de anticuerpos monoclonales contra la cepa Cooper del BHV-1, la caracterización de las actividades biológicas de estos monoclonales, y su posterior uso en diagnóstico en las técnicas de ELISA, inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia. También se compararon entre dos procedimientos alternativos de purificación viral usados para preparar antígeno para inmunización y obtención de hibridomas.

MATERIALES Y METODOS

Células y virus. La cepa Cooper del BHV-1 se propagó en células renales bovinas Georgia (GBK) y el virus producido fue purificado en un gradiente de tartrato de potasio tal como fue descrito previamente (30). Alternativamente, el BHV-1 fue purificado por precipitación con polietilenglicol (PEG 6000) seguido de ultracentrifugación en un colchón de sacarosa de 25% (p/p) (comunicación personal del Dr. Brocchi, 1992, Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e Dell'Emilia, Brescia, Italia).

Electromicroscopía. Las suspensiones de virus de cada purificación fueron colocadas en rejillas y teñidas por tinción negativa con ácido fosfotúngstico. Se sacaron electromicrografías usando un microscopio Zeiss EM 900 a una magnificación de 20000 X.

Producción de anticuerpos monoclonales. Ratones hembras BALB/c fueron inmunizados por vía intraperitoneal con cuatro inyecciones de 0,5 ml cada una de BHV-1 purificado. La primera inoculación (a una dosis de 100 µg por ratón) consistió de una suspensión virulenta del BHV-1 conteniendo $10^{9.5}$ DICT₅₀/ml en un volumen igual de adyuvante completo de Freund. Dos semanas más tarde, los ratones fueron reforzados con 50 µg del BHV-1 emulsificado con adyuvante de Freund incompleto. Este refuerzo fue repetido una semana más tarde y finalmente la última inyección consistió en 50 µg de BHV-1 en solución de salina buffer fosfato (PBS, pH 7,4). Luego de tres días de la última inyección o refuerzo, las células esplénicas de los ratones inmunizados fueron fusionadas con la línea celular de ratón SP-2/0, siguiendo los procedimientos descritos por Goding, 1983 (18) y

St. Groth & Scheidegger, 1980 (36), con algunas modificaciones. Los sobrenadantes de los hibridomas en crecimiento fueron investigados en su capacidad de producción de anticuerpos específicos para BHV-1, usando una ELISA indirecta y clonados por el método de dilución límite. Las correspondientes subclases de inmunoglobulina fueron determinadas por inmunodifusión doble. La selección de anticuerpos monoclonales a ser caracterizados posteriormente se basó en la reactividad por ELISA y en su habilidad en neutralizar el BHV-1 infeccioso, con o sin complemento de cobayo. Fluidos ascíticos fueron obtenidos por inoculación vía intraperitoneal de 10^6 a 10^7 células de hibridoma produciendo anticuerpos específicos en ratones BALB/c que habían sido sensibilizados alrededor de 7 a 10 días antes con pristane (2, 6, 10, 14-tetrametilpentadecano) o adyuvante completo de Freund (26,38).

Purificación de anticuerpos. Los fluidos de ascitis fueron diluidos, en una proporción de uno en cuatro, con PBS (pH 7,2) y mezclados con volúmenes equivalentes de sulfato de amonio saturado. Se permitió que se formara un precipitado a 4°C por 30 minutos antes de centrifugar y posteriormente siguió una diálisis en PBS (pH 7,2) (29). La eficiencia de diálisis fue comprobada usando el reactivo de Nessler para sulfatos (16).

Pruebas de neutralización

Pruebas de virusneutralización. La actividad neutralizante de anticuerpos monoclonales fue investigada por titulación viral en presencia o no de una dosis fija de sobrenadante de hibridoma. La presencia de neutralización dependiente de complemento fue determinada por el agregado de suero de cobayo (2,5 % de concentración final). Una mezcla de sobrenadante de hibridoma y suspensión viral preincubada por 90 minutos a 37°C fue agregada a cada placa de 96 cavidades sembradas con células GBK. Las placas fueron incubadas a 37°C por tres días. La reducción de la actividad viral fue evaluada en base a una comparación de ambos títulos punto final 50% (con o sin complemento). Anticuerpos monoclonales fueron considerados neutralizantes cuando redujeron uno o más logaritmos de infectividad (12).

Pruebas de reducción de placas. La actividad neutralizante para BHV-1, presente en cultivos de células de hibridomas, fluidos ascíticos y anticuerpos monoclonales purificados por sulfato de amonio fueron ensayados usando una prueba de reducción de placas ejecutada en microplacas de 24 cavidades (3). Se agregó complemento de cobayo activo en algunos experimentos. Los anticuerpos monoclonales fueron considerados como "completamente neutralizantes", cuando se producía una reducción del 80% del número de placas y "parcialmente neutralizantes", cuando mostraban una reducción del número de placas de por lo menos 40% (15,33).

Neutralización postadsorción. Se usaron células GBK sembradas en placas de 24 cavidades que habían sido infectadas con una dosis que oscilaba entre 45 y 60 u.f.p. por cavidad del BHV-1 incubadas por un periodo de 2 horas a 4°C. Luego las células infectadas fueron lavadas una vez con PBS y anticuerpos monoclonales purificados por sulfato de amonio fueron agregados (sin diluir) por 2 horas a 4°C. Finalmente el anticuerpo monoclonal fue removido de esta incubación y reemplazado por medio MEM conteniendo 2% de suero fetal bovino. Las placas fueron incubadas a 37°C por 48 horas. Las monocamadas se fijaron con formol y fueron teñidas con cristal violeta. El anticuerpo monoclonal fue considerado como neutralizante cuando se observó una reducción del 50% de placas en relación al virus control (13,20).

Titulación de anticuerpos monoclonales

Prueba de neutralización viral. La prueba de neutralización viral fue llevada a cabo por el método de dilución de suero y virus fijo (6). Se usaron diluciones base 2 de fluidos ascíticos, sobrenadantes de hibridomas y anticuerpos monoclonales purificados por sulfato de amonio, comenzando en una dilución de 1:10 y fueron ensayados por duplicado para observar su habilidad de neutralizar 100 DICT₅₀ de BHV-1 en placas de microtitulación. Para algunos experimentos se usó el agregado de complemento activo de cobayo (3,29,33).

ELISA. El método usado fue una modificación de aquel descrito por Voller y colaboradores en 1976 (43). Titulaciones en bloques fueron

previamente llevadas a cabo a los efectos de determinar la dilución óptima de uso. Se colocó el BHV-1 purificado en microplacas de titulación de 96 cavidades, a una dilución de 1:200 en PBS (pH 7,4). Los anticuerpos monoclonales fueron agregados en diluciones base 10. Se usó como conjugado un antisuero de cabra contra IgG de ratón, conjugado con peroxidasa vegetal. Se consideró el título de ELISA como la recíproca de la dilución más alta del sobrenadante de hibridoma fluido ascítico o de monoclonales purificados con sulfato de amonio que lleva un mínimo de una lectura de 0,1 de unidad de absorbancia sobre el control usando un filtro de 492 nm (39). Se usó como control negativo un anticuerpo específico contra el virus de la fiebre aftosa.

Pruebas de la inmunoperoxidasa. Monocamadas GBK crecidas en láminas Lab-Tek fueron infectadas con 10^{7.75} DICT₅₀/ml de BHV-1. Cuando se observó efecto citopático, las células inoculadas se secaron al aire y fueron fijadas en acetona tamponada al 25% por 10 minutos. Los anticuerpos monoclonales purificados por sulfato de amonio se agregaron en diluciones base 5 en tampón de lavado (PBS 7,4; 0,05% Tween 20 y EDTA 1 mM) empezando en la dilución 1:1 para determinar la dilución óptima. Después de 45-60 minutos a 37°C las láminas fueron lavadas y se agregó un conjugado de peroxidasa proteína A. Las láminas fueron lavadas y se agregó el sustrato (0,1 ul/ml de H₂O₂ y 1,0 mg/ml de diaminobenzidina tetrahidroclorido). Después del lavado las láminas fueron teñidas por contraste con hematoxilina (diluida 1:5 en solución tampón de lavado) por 10 minutos. Las láminas fueron lavadas en agua corriente y examinadas con un microscopio de campo claro (2,32,35). Como controles negativos se usaron anticuerpos específicos contra el virus de la fiebre aftosa y camadas de células no infectadas. Como control positivo se usó un suero policlonal de ratón contra el BHV-1.

RESULTADOS

Herpesvirus bovino tipo 1. El Cuadro 1 muestra los resultados de ambos métodos de purificación viral ensayados con un gradiente de tartrato de potasio seguido de concentración con

PEG, y por medio de centrifugación y/o ultracentrifugación en un colchón de sacarosa.

Electromicroscopía. El examen con electromicroscopio (Cuadro 1) confirmó que el virus obtenido por gradiente de tartrato de potasio estaba relativamente intacto. Ochenta por ciento de los viriones observados tenían envoltura completa y la preparación no presentaba contaminación visible con membranas celulares (Fig. 1). El virus obtenido por concentración con PEG y ultracentrifugación en un colchón de sacarosa (Fig. 2) reveló también poca contaminación con membranas celulares, pero la envoltura viral en este caso estaba considerablemente más dañada y solamente 20% de los viriones estaban completamente envueltos. Se encontraron partículas defectivas (vacías) en ambas purificaciones.

Panel de anticuerpos monoclonales. El análisis inicial por ELISA de los sobrenadantes obtenidos de los hibridomas reveló que existían 19 clones que reaccionaban con el BHV-1 concentrado por PEG (en el caso de fusión 60) y 187 purificados por tartrato de potasio (en la fusión 61). Diecinueve hibridomas fueron seleccionados y clonados a partir de la fusión 60 y veinte a partir de la fusión 61



FIGURA 1. Electromicrografía del BHV-1 purificado en un gradiente de tartrato de potasio (magnificación 2 x 104).

Winkler et al.

CUADRO 1. Purificación de herpes virus bovino-1.

	PEG gradiente de sacarosa	Gradiente de tartrato de potasio
Frasco de cultivo ^a	Roux 225 cm ²	Roller 850 cm ²
Título en células GBK ^b (DICT ₅₀ /ml)	10 ^{6.5}	10 ^{7.75}
Volumen purificado (ml)	2000	200
BHV-1 purificado DICT ₅₀ /ml)	10 ^{8.0}	10 ^{9.5}
Volumen final purificado (ml)	12	2.2
Concentración de proteína (mg/ml) ^c	2.4	2.0
Electromicroscopía ^d	20% virus entero 80% capsido	80% virus entero 20% capsido

^a Frasco de cultivo usado en la producción del virus.

^b Nivel de producción de virus en las células.

^c Determinado para el ensayo de proteínas Bradford (Bio-rad).

^d Electromicroscopía de transmisión (tinción negativa).

basados en los más altos valores en ELISA. Las pérdidas debido a la eficiencia de clonado fueron aproximadamente de 40% y se obtuvieron nueve

monoclonales de la fusión 60, de los siguientes isotipos: seis IgG1, un IgG2a, un IgG2b y uno no determinado; y 14 en la fusión 61: cinco IgG1, tres IgG2a, dos IgG2b, un IgG3 y tres no determinados.

Finalmente, siete anticuerpos monoclonales (dos de la fusión 60 y cinco de la fusión 61) fueron seleccionados para una producción ulterior de fluido ascítico y purificación por sulfato de amonio basados en la actividad neutralizante de sobrenadantes (Cuadro 2). Todos ellos redujeron el título viral en uno o más logaritmos a través de los títulos de ELISA de selección inicial de sobrenadantes, fluidos ascíticos y anticuerpos monoclonales purificados por sulfato de amonio, los cuales están representados en la (Fig. 3). La actividad de anticuerpo monoclonal específico fue de 100 a 1000 veces más concentrada en los fluidos ascíticos y anticuerpos monoclonales purificados por sulfato de amonio que en los sobrena-

dantes. Dos anticuerpos monoclonales (61AF5A9 y 61BF2D8) pudieron neutralizar BHV-1 a un nivel de aproximadamente 50%, previniendo la penetración del virión en las células (postadsorción) en las pruebas de virusneutralización correspondientes. Al mismo tiempo redujeron el diámetro de placas. El análisis de estos dos anticuerpos monoclonales neutralizantes demostró que pertenecían a la subclase IgG2a. Los resultados obtenidos por neutralización viral, reducción de placas, neutralización postadsorción y ELISA están representados en el Cuadro 2.

Detección por inmunoperoxidasa y anticuerpos BHV-1 en células infectadas. El examen microscópico de células infectadas usando objetivos x10 y x25 reveló actividad de peroxidasa representada por unos depósitos granulosos marrón-rojizos en el citoplasma y núcleo usando anticuerpos moleculares (61AF5A9, 61BF2D8 y 61DH5E11, dilución 1/5) purificados en sulfato de amonio. Se usó un conjugado de peroxidasa de proteína A en 1/50. No se observó actividad inmunoperoxidasa en los controles negativos.

DISCUSION

Los resultados de estos estudios sugieren que los varios monoclonales obtenidos son específicos para glicoproteínas basados en su actividad neutralizante (7,11,29,31,39,40). En general, tres glicoproteínas diferentes (gI, gIII y gIV) han sido identificadas en BHV-1 como los blancos principales de anticuerpos neutralizantes (11).

Dos anticuerpos monoclonales (61AF5A9 y 61BF2D8) redujeron el número total de placas en aproximadamente 50% del valor de control y también redujeron el tamaño de las placas en las pruebas de neutralización posteriores a la adsorción. Estos datos sugieren que estos anticuerpos monoclonales están dirigidos contra la gIV, y podrían interferir con el proceso de infección posterior a la adherencia

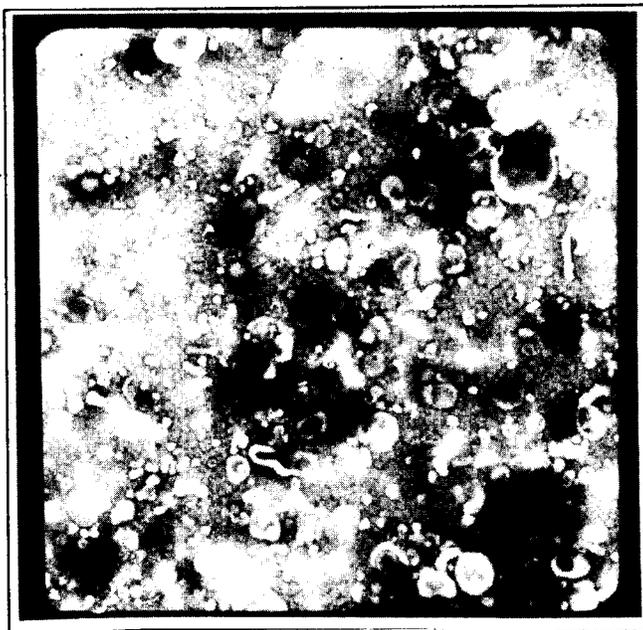


FIGURA 2. Electromicrografía del BHV-1 purificado en concentración de PEG y ultracentrifugación en un colchón de sacarosa (magnificación 2 x 104).

de virus y reducir el ensanchamiento de la placa (solamente anticuerpos contra la gIV generalmente inhiben el desarrollo de placas [13]). Estos mismos anticuerpos también presentaron títulos elevados en ELISA y virus-neutralización (33). La glicoproteína gIV cumple un rol importante en la penetración del virión a través de la membrana celular (9,37). Hay cinco áreas antigénicas en gIV que son reconocidas por anticuerpos que neutralizan el BHV-1. La adición de complemento redujo la concentración de anticuerpos necesaria para neutralizar el virus (28).

Los resultados obtenidos en las pruebas de neutralización con el tipo de monoclonales 60AB4H7, 60AG5E4, 61AE12F10, 61DF2H8 y 61DH5E11 sugieren que están dirigidos contra gI o gIII. La glicoproteína gIII es la más importante proteína de adherencia a la célula (27) y los anticuerpos monoclonales contra la gIII bloquean la adherencia de BHV-1. Cinco áreas antigénicas son reconocidas por anticuerpos dirigidos contra gIII. Cuatro de estas cinco fueron parcialmente neutralizadas antes en la ausencia de complemento y completamente neutralizadas en presencia del

CUADRO 2. Características de siete anticuerpos monoclonales (AcM) producidos contra la cepa Cooper del herpes virus bovino-1. Ensayos hechos con sobrenadante de hibridomas, fluido ascítico y anticuerpos purificados por sulfato de amonio.

AcM	Isotipo ¹	Reducción de placa ²		Título neutralizante ³			Neutralización [*] después de adsorción		Títulos ELISA ⁴					
		Fluido ascítico GPC+	AcM purificado GPC+	Super-nadante GPC-	Fluido ascítico GPC-	AcM purificado GPC+	AcM Purificado GPC-	GPC+	Sobre-nadante	Fluido Purificado ascítico				
60AB4H7	IgG1	80%	80%	<10	<10	<10	80	80	No	No	2	3	4	
60AG5E4	IgG2b	40%	80%	<10	<10	10	20	10	20	No	No	3	4	5
61AE12F10	IgG1	No	40%	<10	<10	<10	80	80	No	No	4	7	7	
61AF5A9	IgG2a	80%	80%	<10	<10	20	320	640	2560	50%+	50%+	4	6	6
61BF2D8	IgG2a	80%	80%	<10	<10	20	180	320	1280	50%+	50%+	4	7	6
61DF2H8	IgG3	80%	80%	<10	<10	<10	<10	10	10	No	No	2	4	3
61DH5E11	IgG2b	80%	80%	<10	<10	<10	10	160	640	No	No	4	7	6

¹ Clase y subclase de Ig de ratón fue determinada por Ouchterlany de difusión doble.

² Resultados expresados como por ciento de reducción de placa relativo al control de virus. GPC indica complemento en cobayo. 80% indica neutralización completa, 40% = Neutralización parcial y No, no reaccionante.

³ Títulos de virusneutralización de sobrenadantes de hibridomas, fluidos ascíticos, anticuerpos monoclonales purificados en sulfato de amonio expresados como la recíproca de aquella dilución con un punto final de 50%.

⁴ Expresado como la recíproca de la dilución más alta que dio un resultado de por lo menos 0,1.

* Aumento de reducción de placa.

mismo. Solamente un área antigénica fue neutralizada por anticuerpos en ausencia de complemento (28).

Las glicoproteínas gI y gIV constituyen componentes esenciales del virión. La glicoproteína gI del BHV-1 es importante para la penetración del virión en las células y puede actuar como una proteína de fusión (14). Hay cuatro áreas antigénicas interrelacionadas en la glicoproteína gI. Tres áreas antigénicas fueron reconocidas por anticuerpos que neutralizaron el virus en la ausencia de complemento. Cuando el complemento estaba presente, una concentración más baja de anticuerpos fue necesaria para neutralizar BHV-1. La cuarta área neutralizante fue reconocida por anticuerpos parcialmente neutralizantes sin complemento y completamente neutralizantes en la presencia de complemento (29).

Las glicoproteínas especificadas por el herpesvirus son de particular interés dado que inducen anticuerpos neutralizantes. Cuando el BHV-1 fue purificado por ultracentrifugación en un gradiente de tartrato de potasio, se pudo confirmar por electromicroscopía la preservación de la integridad viral, particularmente la envoltura viral. El virus estaba intacto y la preparación estaba libre de proteínas celulares (Fig. 1). Se usaron gradientes de tartrato de potasio para purificar herpesvirus sin contaminación con proteínas celulares y daño mínimo a la envoltura viral (5, 8, 22, 30). Por otro lado, la purificación usando concentración con PEG y ultracentrifugación en un colchón de sacarosa alteró la integridad estructural de los viriones y se observaron pérdidas de envolturas virales (Fig. 2). Partículas incompletas pudieron ser encontradas cuando se usaron ambos protocolos de purificación. Estas partículas pueden ser contaminantes comunes de un stock viral o ser el resultado de pasajes seriados en cultivos celulares realizados a una alta multiplicidad de infección (10).

La titulación por ELISA de los sobrenadantes de cultivo celular de hibridomas, fluidos ascíticos y los anticuerpos monoclonales purificados por sulfato de amonio indicó que el nivel de anticuerpos monoclonales en fluidos ascíticos, y en los mismos fluidos ascíticos purificados por precipitación con sulfato de amonio, era de 10 a 1000 veces mayor que en los sobrenadantes de cultivos celulares de hibridomas (Fig. 3). Estos resultados están de acuerdo

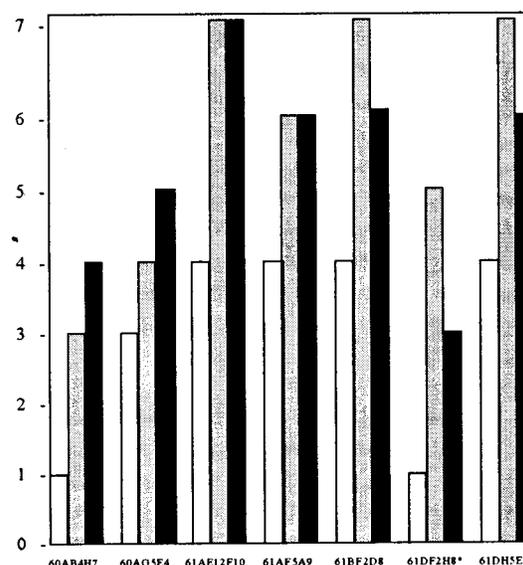


FIGURA 3. Titulación de anticuerpos moleculares por ELISA. Los títulos de ELISA fueron expresados como la recíproca de la dilución más elevada que dieron resultados de por lo menos 0,1 arriba del control en 492 nm. Las columnas blancas son los sobrenadantes, el sombreado claro los fluidos ascíticos y el oscuro, los anticuerpos monoclonales purificados con sulfato de amonio. *Pérdidas en purificación.

con los resultados comunicados previamente (18,39).

La técnica de inmunoperoxidasa es tan sensible como la de inmunofluorescencia y aún más sensible que el aislamiento viral para detección de antígenos virales en tejidos fetales (35). Cuando se usa la inmunoperoxidasa con una coloración de contraste como hematoxilina, la técnica presenta la ventaja sobre la inmunofluorescencia de que permite reconocer características morfológicas de las células en estudio (34). Tres anticuerpos monoclonales purificados por sulfato de amonio (61AF5A9, 61BF2D8 y 61DH5E11) reaccionaron positivamente y con cultivos celulares infectados con el BHV-1 cuando se usaron en esta técnica. Por lo tanto, es posible que estos anticuerpos monoclonales puedan ser usados como reactivos en inmunoperoxidasa para diagnóstico rápido en infecciones por BHV-1.

Se han propuesto varios tipos de vacuna para controlar el BHV-1, las cuales incluyen: vacunas atenuadas TK negativas (23); vacunas de delección de gen gIII (24); vacunas recombinantes entre los

virus del BHV-1 y de la fiebre aftosa (25); vacunas inactivadas y de subunidades gI, gIII y gIV (4, 21, 41, 42). El panel de anticuerpos monoclonales que hemos preparado contra las glicoproteínas gI, gIII y gIV es importante desde el punto de vista de diagnóstico, así como también para su posible uso para diferenciación entre animales vacunados o animales infectados con BHV-1, especialmente en países que estén usando vacunas a subunidad o vacunas obtenidas por ingeniería genética que contengan una delección de ciertos marcadores serológicos.

La continuación de los estudios con estos monoclonales en el futuro podrían estar dirigidos a algunos de los siguientes puntos: (i) la caracterización por ensayo de inmunoprecipitación y/o por análisis de "Western blot" para identificar exactamente las glicoproteínas virales que reconocen; (ii) la caracterización por inmunoensayo de competición recíproca para identificar áreas antigénicas en las glicoproteínas; (iii) probar la reactividad con otros herpesvirus para estudiar la reactividad cruzada y además con cepas del BHV-1 de campo brasileñas a los efectos de asegurarse que estos aislamiento tienen una significación diagnóstica regional, y (iv) uso de estos monoclonales como una herramienta diagnóstica más sensible y específica en las técnicas de inmunoperoxidasa, inmunofluorescencia y ELISA.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo fue financiado con un subsidio del Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico, (CNPq) de Brasil, al autor principal, quien lo presentó como uno de los requerimientos para el grado de Master en Microbiología Veterinaria en la Universidad Federal Rural de Río de Janeiro. Agradecemos muy especialmente a la Sra. Luzia M. de Castro Cortes por la ayuda en la preparación y a la Dra. Ortrud Monika B. Schatzmayr por su contribución con electromicroscopía.

REFERENCIAS

1. ACKERMANN, M., PETERHANS, E., WYLER R. DNA of bovine herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. *Amer. J. Vet. Res.*, 43:36-40, 1982.
2. ALLAN, G.M., MCNULTY, M.S., TODD, D., MCFERRAN, J.B. The rapid detection of Aujeszky's disease virus in pigs by direct immunoperoxidase labelling. *Vet. Microb.*, 10:481-486, 1985.
3. BABIUK, L.A., WARDLEY, R.C., ROUSE, B.T. Defense mechanisms against bovine herpesviruses: relationship of virus-host cell events to susceptibility to antibody-complement cell lysis. *Infect. Immun.*, 12:958-963, 1975.
4. BABIUK, L.A., L'TALIEN, J., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., ZAMB, T., LAW-MEN, M.J.P., HUGHES, G., GIFFORD, G.A. Protection of cattle from bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) infection by immunization with individual viral glycoproteins. *Virology*, 159:57-66, 1987.
5. BOLTON, D.C., ZEE, Y.C., ARDANS, A.A.. Identification of envelope and nucleocapsid proteins of infectious bovine rhinotracheitis virus by SDS-polyacrilamide gel electrophoresis. *Vet. Microb.*, 8:57-68, 1983.
6. CABREY, E.A. Recommended standard laboratory techniques for diagnosing infectious bovine rhinotracheitis, bovine diarrhea and shipping fever. *Proc. U.S. Anim. Health Assoc.*, 75:629-648, 1971.
7. CHANG, L.W.S., ZEE, Y.C., PRITCHETT, R.F. ARDANS, A.A. Neutralizing monoclonal antibodies directed to infectious bovine rhinotracheitis virus. *Arch. Virol.*, 88:203-215, 1986.
8. CHANTER, J.K., HUDSON, J.B. Proteins of murine cytomegalovirus: identification of structural and nonstructural antigens in infected cells. *Virology*, 86:22-36, 1978.
9. CHASE, C.C., CARTER-ALLEN, K., LOHFF, C., LETCHWORTH III, G.J. Bovine cells expressing bovine herpesvirus 1 (BHV-1) glycoprotein IV resist infection by BHV-1, herpes simplex virus, and pseudorabies virus. *J. Virol.*, 64: 4866-4872, 1990.
10. COLE, C.N., SMOLER, D., WIMMER, E., BALTIMORE, D. Defective interfering particles of poliovirus. I. Isolation and physical properties. *J. Virol.*, 7:478-485, 1971.
11. COLLINS, J.K., BUTCHER, A.C., RIEGEL, C.A., MCGRANE, V., BLAIR, C.D., TERAMOTO, Y.A., WINSTON, S. Neutralizing determinants defined by monoclonal antibodies on polypeptides specified by bovine herpesvirus 1. *J. Virol.*, 52:403-409, 1984.

12. CUNNINGHAM, C.H. *A laboratory guide in virology*. 6a ed. Burgess Publishing Company, 186p, 1964.
13. DUBUISSON, J., ISRAEL, B.A., LETCHWORTH III, G.J. Mechanisms of bovine herpesvirus type 1 neutralization by monoclonal antibodies to glycoproteins gI, gIII and gIV. *J. Gen Virol.*, 73:2031-2039, 1992.
14. FITZPATRICK, D.R., ZAMB, T., PARKER, M.D., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., BABIUK, L.A.. Expression of bovine herpesvirus 1 glycoprotein gI and gIII in transfected murine cells. *J. Virol.*, 62:4239-4248, 1988.
15. FRIENDLI, K. METZLER, A.E. Reactivity of monoclonal antibodies to proteins of a neurotropic bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strain and to proteins of representative BHV-1 strains. *Arch. Virol.*, 94:109-122, 1987.
16. GARVEY, J.S., CREMER, N.E., SUSSDORF, D.H. (1977). Exchange of solvent by dialysis or gel filtration. In: *Methods in Immunology*. 3rd ed. Benjamin, Reading, MA, 1977, p.55.
17. GIBBS, E.P.J., RWEYEMANU, M.M. Bovine herpesviruses, part I. Bovine herpesvirus 1. *Vet. Bull.*, 47:317-343, 17, 1977.
18. GODING, J.W. Antibody production by hybridomas. *J. Immunol. Meth.*, 39:285-308, 1980.
19. HOMAN, E.J., EASTERDAY, B.C. Experimental latent and recrudescer bovine herpesvirus-1 infections in calves. *Amer. J. Vet. Res.*, 44:309-313, 1983.
20. HUGHES, G., BABIUK, L.A., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. Functional and topographical analyses of epitopes on bovine herpesvirus type 1 glycoprotein IV. *Arch. Virol.*, 103:47-60, 1988.
21. HUGHES, H.P.A., CAMPOS, M., GODSON, D.L., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., MCDougALL, L., RAPIN, N., ZAMB, T., BABIUK, L.A. Immunopotential of bovine herpes virus subunit vaccination by interleukin-2. *Virology*, 74:461-466, 1991.
22. KIM, K.S., SUPENZA, V.I., CARP, R.I., MOON, H.M. Analysis of the structural proteins of murine cytomegalovirus. *J. Virol.*, 17:906-915, 1976.
23. KIT, S., QAVI, H., GAINES, J.D., BILLINGSLY, P., MCCONNELL, S. Thymidine kinase-negative bovine herpesvirus type 1 mutant is stable and highly attenuated in calves. *Arch. Virol.*, 86:63-83, 1985.
24. KIT, S., OTSUKA, H., KIT, M. Gene-deleted IBRV marker vaccine. *Vet. Rec.*, 127:363-364, 1990.
25. KIT, S., KIT, M., DIMARCHI, R.D., LITTLE, S.P., GALE, C. Modified-live infectious bovine rhinotracheitis virus vaccine expressing monomer and dimer forms of foot-and-mouth disease capsid protein epitopes on surface of hybrid virus particles. *Arch. Virol.*, 120:1-17, 1991.
26. LETCHWORTH III, G.J., APPLETON, J.A. *Methods for production of monoclonal antibodies*. U.S Department of Agriculture. 1984. 63p. (Handbook N.630).
27. LIANG, X., BABIUK, L.A., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., FITZPATRICK, D.R., ZAMB, T.J. Bovine herpesvirus 1 attachment to permissive cells is mediated by its major glycoproteins gI, gIII and gIV. *J. Virol.*, 65:1124-1132, 1991.
28. MARSHALL, R.L., RODRIGUEZ, L.L., LETCHWORTH III, G.J. Characterization of the envelope proteins of infectious bovine rhinotracheitis virus (bovine herpesvirus 1) by biochemical and immunological methods. *J. Virol.*, 57:745-753, 1986.
29. MARSHALL, R.L., ISRAEL, B.A., LETCHWORTH III, G.J. Monoclonal antibody analysis of bovine herpesvirus-1 glycoprotein antigenic areas relevant to natural infection. *Virology*, 165:338-347, 1988.
30. MISRA, V., BLUMENTHAL, R.M., BABIUK, L.A. Proteins specified by bovine herpesvirus-1 (infectious bovine rhinotracheitis). *J. Virol.*, 40:367-378, 1981.
31. OKASAKI, K., HONDA, E., MINETOMA, T., KUMAGAI, T. Mechanisms of neutralization of monoclonal antibodies to different antigenic sites on the bovine herpesvirus type 1 glycoproteins. *Virology*, 150:260-264, 1986.
32. RODRIGUEZ, M., HEINLEIN, A.S., RUIZ, M., METZLER, A.E., SCHUDEL, A.A. Detection of bovine herpesvirus type 1 via an immunoperoxidase method, using monoclonal antibodies. *Amer. J. Vet. Res.*, 50:619-621, 1989.
33. SHEN, D.T., BURGER, D., LI, Z., GORHAM, R. Characterization of monoclonal antibodies to bovine herpesvirus type I, Los Angeles strain. *Vet. Microb.*, 28:25-37, 1991.
34. SINCLAIR, R.A., HARRIS, C.C. A short immunoperoxidase method. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 108:354, 1983.
35. SMITH, G.H., COLLINS, J.K., CARMAN, J. Use of an immunoperoxidase test for the detection of bovine herpesvirus-1 in aborted fetal tissue. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1:39-44, 1989.
36. ST. GROTH, S.F., SHEIDEGGER, D. Production of monoclonal antibodies strategy and tactics. *J. Immunol. Meth.*, 35:1-21, 1980.

37. TIKOO, S.K., FITZPATRICK, D.R., BABIUK, L.A., ZAMB, T.J. Molecular cloning sequencing and expression of functional bovine herpesvirus glycoprotein gIV in transfected bovine cells. *J. Virol.*, 64:5132-5142, 1990.
38. TUNG, A.S., JU, S., SATO, S., NISONOFF, A. Production of large amounts of antibodies in individual mice. *J. Immunol.*, 116:676-681, 1976.
39. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., VANDENHURK, J.V., GILCHRIST, J.E., MISRA, V., BABIUK, L.A. Interactions of monoclonal antibodies and bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) glycoproteins: characterization of their biochemical and immunological properties. *Virology*, 135:466-479, 1984.
40. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., VAN DEN HURK, J.V., BABIUK, L.A. Topographical analysis of bovine herpesvirus type 1 glycoproteins: use of monoclonal antibodies to identify and characterize functional epitopes. *Virology*, 144:216-227, 1985.
41. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., ZAMB, T., BABIUK, L.A. Synthesis, cellular location, and immunogenicity of bovine herpesvirus 1 glycoproteins gI and gIII expressed by recombinant vaccinia virus. *J. Virol.*, 63:2159-2168, 1989.
42. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., PARKER, M.D., FITZPATRICK, D.R., ZAMB, T.J., VAN DEN HURK, J.V., CAMPOS, M., HARLAND, R., BABIUK, L.A. Expression of bovine herpesvirus 1 glycoprotein gIV by recombinant baculovirus and analysis of its immunogenic properties. *J. Virol.*, 65:263-271, 1991.
43. VOLLER, A., BIDWELL, D., BARTLETT, A. Microplate enzyme immunoassays for the immunodiagnosis of virus infections. In: N.B. Rose and H. Friedman (Editors). *Manual of clinical immunology*. Washington, Am. Soc. Microbiol., DC, pp. 506-512, 1976.

Anuncios

Catálogo de Publicaciones, 1952-1993
 Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)
 Rio de Janeiro, Brasil, 1993

Este documento estará disponible en el primer semestre de 1994. Se trata de una compilación de las publicaciones hechas por el personal técnico de PANAFTOSA.

El Comité Editorial recomienda a los autores que deseen publicar trabajos en esta revista la lectura de la Publicación Científica 526 de la OPS/OMS intitulada *Como escribir y publicar trabajos científicos* por Robert A. Day.