

Comunicación breve

OBTENCIÓN DE GLICOPROTEÍNAS DEL VIRUS DE LA ESTOMATITIS VESICULAR PARA IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS

Martins, M.A., Gomes, M.P.D., Söndahl, M.S., Alonso, A., López, J.W.

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

Se describe un método práctico basado en el uso de un detergente no iónico, que se puede remover por diálisis, para la extracción de las glicoproteínas del virus de la estomatitis vesicular con el objeto de ser usadas para la identificación de anticuerpos por la técnica de ELISA.

La estomatitis vesicular (EV) es una enfermedad que afecta bovinos, caprinos, equinos, ovinos, porcinos y otras especies de vertebrados causada por un *Vesiculovirus* de la familia *Rhabdoviridae* (6, 15). En 1927 fueron identificados serotipos New Jersey (NJ) e Indiana (IN) (8). Dentro del serotipo IN fueron aisladas numerosas cepas que son agrupadas en los subtipos IN-1, IN-2 e IN-3 (2, 4, 10). El virus de la estomatitis vesicular (VEV) está compuesto por 64% de proteínas, 20% de lípidos, 13% de carbohidratos y 3% de ácido ribonucléico (ARN) (16). En el virión fue identificado cinco proteínas: L, G, N, NS y M. La proteína G, o glicoproteína (GP) es responsable por la inducción de anticuerpos neutralizantes y por la especificidad de los serotipos (13, 16, 20). Debido a esto, se investigó diversos métodos de extracción de la GP del virión para utilizar en la producción de antisueros

(11) y en el análisis de las reacciones antígeno-anticuerpo (3, 13, 20). Para la extracción de las GP se utilizó desde enzimas proteolíticas hasta detergentes (9, 19). Mediante el uso de detergentes no iónicos con alta concentración micelar crítica (12, 18) es posible extraer las GP del VEV bajo la forma de liposomas (5, 18), inmunosomas y virosomas (17).

El procedimiento utilizado en este trabajo para la extracción de GP del VEV para su uso en la identificación de anticuerpos por la técnica ELISA (Enzime Linked Inmunoabsorbent Assay) es sencillo y práctico. El método usado es una modificación de procedimientos anteriormente descritos (5, 11, 13, 18).

Las cepas de virus NJ-Costa Rica/66, IN-1 Costa Rica/72, IN-2 Salto-Arg/63 e IN-3 Alagoas-Br/64 son inoculadas en monocamadas de células BHK₂₁, clon 13, cultivadas en botellas rodantes con 1.000 DI₅₀ CC, e incubadas a 37°C. Una vez que el efecto citopático se generaliza, se cosecha los cultivos raspando las células aún adheridas y se clarifican por centrifugación a 600 g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante es centrifugado

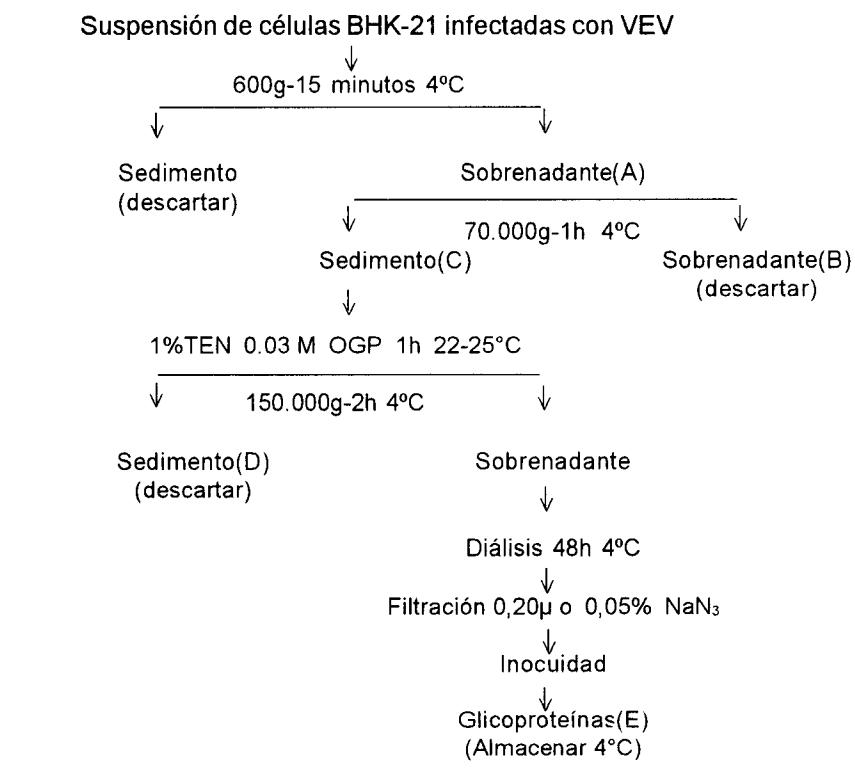
Solicitar separatas al:
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS).

a 70.000 g durante 1 hora a 4°C y se utiliza el sedimento, descartando el sobrenadante. El sedimento es resuspendido en medio TEN (Tris 0,05M, EDT 0,002M, NaCl 0,2M, pH 7,5) al 1% del volumen original (v/v). El proceso de solubilización selectiva de las GP se efectúa en reposo, a temperatura de 22 a 25°C, durante 1 hora con OGP 0,03 M. A continuación, la suspensión es centrifugada a 150.000 g durante 2 horas a 4°C y el sobrenadante contenido las GP es dializado durante 48 horas a 4°C con dos cambios del

tampón TRIS (Tris 0,01M, ClMg 6H₂O 0,001M, Ditiotreitol 0,0001M y NaN₃ 0,002M, pH 7,5) (18). Las suspensiones de GP pueden ser filtradas en membranas de acetato de celulosa de 0,20 μ ó tratadas con 0,05% NaN₃, y conservadas a 4°C en fracciones de 1 ml, en viales herméticamente cerrados, para impedir la deshidratación y permitir el almacenamiento prolongado.

El proceso de obtención de las GP (cuadro 1) es controlado mediante la tipificación, subtipificación y titulación por fijación del complemento

CUADRO 1. Flujo grama de producción de las glicoproteínas de los virus de la estomatitis vesicular, usando el detergente octyl-β-D-glucopiranósido



A,B,C,D,E: etapas del proceso de producción controladas por FC 50%.

50% (FC_{50}) (cuadro 2) de las diferentes muestras obtenidas durante el referido proceso, según las técnicas descritas (1). El grado de pureza de la GP es confirmado por pruebas de electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5% (5, 14, 18) (datos no incluidos).

El cuadro 3 muestra las diluciones que proporcionaron el 50% de reactividad en la

titulación por ELISA "sandwich" indirecta del virión y las GP de las diferentes cepas de VEV analizadas, frente a los antisueros homólogos.

Finalmente, se realizó la prueba de inocuidad de la suspensión de GP, la cual consistió en tres pasajes seriados de 48 horas cada uno, en células BHK₂₁ cultivadas en botellas rodantes. Todas las preparaciones fueron negativas.

CUADRO 2 .Título por fijación del complemento 50% de las suspensiones de virus de la estomatitis vesicular durante el proceso de obtención de las glicoproteínas de acuerdo con el fluograma

Fracciones ¹	Antígenos			
	New Jersey	Indiana-1	Indiana -2	Indiana -3
A	1:24 ²	1:12	1:50	1:130
B	1:12	< 1:10	1:20	1:30
C	1:620	1:500	1:500	1:500
D	1:30	< 1:10	< 1:10	1:20
E	1:160	1:100	1:120	1:250

¹Fracciones de las muestras indicadas en el cuadro 1.

²Dilución que proporcionó el 50% de reacción según Spearmann-Kärber.

CUADRO 3.Titulación del virión y de las glicoproteínas del virus de la estomatitis vesicular por ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)"sandwich" indirecta

Antígeno	Antígenos			
	New Jersey	Indiana-1	Indiana -2	Indiana -3
Virión	1:148 ¹	1:30	1:40	1:295
Glicoproteína	1:620	1:500	1:500	1:500

¹Dilución que proporcionó el 50% de reacción por interpolación lineal.

CUADRO 4. Inhibición de la neutralización del virus de la estomatitis vesicular en células IB-RS-2 por glicoproteínas New Jersey e Indiana-1 usando sueros hiperinmunes homólogos producidos en cobayos

Dilución de Glicoproteína	Dilución Antisuero Cobayo									
	New Jersey					Indiana-1				
	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800
1/10	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
1/30	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
1/90	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
1/270	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/810	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NO GP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ Neutralización.

- Inhibición de la neutralización.

El proceso de extracción conservó la capacidad de las GP reaccionar con anticuerpos neutralizantes de las mismas (13), como fue comprobado por la prueba de inhibición de la neutralización realizada en monocamadas de células IB-RS-2 (7).

Dicha prueba consiste en mezclar en partes iguales diluciones de antisueros de EV con una solución de las GP homólogas e incubar por 1 hora a 37°C. Seguidamente, a cada dilución se agregan 100 DI₅₀ CC de virus por 0,1 ml de la mezcla GP/antisuero y después de incubar agitando por 1 hora a 37°C, las mezclas antisuero/GP/virus son inoculadas sobre monocamadas de células IB-RS-2 y cultivadas en microplacas de 96 pocillos. Transcurridas 48 horas se observa el efecto citopático en las células. Las GP de los virus NJ e Ind-1 inhibieron la neutralización del antisuero homólogo hasta la dilución 1/90 (cuadro 4).

Las GP conservadas a 4°C se mostraron estables por un período superior a cinco años al ser usadas en pruebas de FC₅₀ y ELISA competición fase líquida.

La especificidad, estabilidad e inocuidad mostradas por las GP preparadas a partir de los virus NJ, IN-1, IN-2 e IN-3, así como la capacidad de inducir anticuerpos neutralizantes hacen de ellas un antígeno adecuado para ser utilizado en

estudios serológicos de áreas libres de la EV, permitiendo la realización de las pruebas sin riesgos biológicos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los compañeros del Laboratorio Central y de Referencia de PANAFTOSA por la ayuda en la realización, preparación y revisión del manuscrito, así como a la señora Verônica Pereira da Costa por la dactilografía del texto.

REFERENCIAS

1. ALONSO, A. Manual de diagnóstico de laboratorio de las enfermedades vesiculares. Rio de Janeiro, Brasil. PANAFTOSA, 1989. (Ser. Man. Did., 15).
2. ALONSO, A., SÖNDAHL, M.S. Antigenic and immunogenic characterization of various strains of the Indiana serotype of vesicular stomatitis isolated in Brazil. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 51: 25-30, 1985.
3. ALLENDE, R., SEPÚLVEDA, L. M., SILVA, A.J. M., MARTINS, M. A., SÖNDAHL, M.S., ALONSO, A. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of vesicular stomatitis

- virus antibody. *Prev. Vet. Med.*, 14:293-301, 1992.
4. ANDRADE, C. M., ROZAS, C. E. E., AMORIM, L. M., MOTA, J. P., TEIXEIRA, E. N., SANTOS, N. F. Estomatite vesicular no Brasil: isolamento do vírus Alagoas. *An. Microbiol.*, 25: 81-87, 1980.
 5. BISHOP, D. H. L., REPIK, P., OBIJESKI, J. F., MOORE, N. F., WAGNER, R. R. Restituição of infectivity to spikeless vesicular stomatitis virus by solubilized viral components. *J. Virol.*, 16: 75-84, 1975.
 6. BROWN, F., CRICK, J. Natural history of the rhabdoviruses of vertebrados and invertebrados. In: Bishop, D.H.L., ed. *Rhabdoviruses*. Boca Raton, Flórida CRC Press, 1979. v.I., p.2-22.
 7. CASTRO, M. P. Behavoir of the foot-and-mouth disease virus in cell cultures: susceptibility of the IB-RS-2 Cell line. *Arch. Inst. Biol., São Paulo*, 31: 63-78, 1964.
 8. COTTON, W. E. Vesicular stomatitis. *Vet. Med.*, 22: 169-175, 1927.
 9. ETCHISON, J. R., SUMMER, D. F. Structure, synthesis and function of the vesicular stomatitis virus glycoprotein. In: *Rhabdoviruses*. Bishop, D.H.L. ed. Boca Raton, Flórida CRC Press, 1979. Vol. 1 P.151-160.
 10. FEDERER, K. E., BURROWS, R., BROOKSBY, J. B. Vesicular stomatitis vírus - The relationship between some strains of the Indiana serotype. *Res. Vet. Sci.*, 8: 103-117, 1967.
 11. FERRIS, N. P., DONALDSON, A. I. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of vesicular stomatitis virus antigen. *Vet. Microbiol.*, 18: 243-258, 1988.
 12. FINDLAY, J. B. C. Purification of membrane proteins. In: Harris, E.L.V., Angal, S. eds. *Protein purification applications*. A practical approach. Oxford, IRL Press, 1989. v.4, p.59-82.
 13. KELLEY, J. M., EMERSON, S. U., WAGNER, R. R. The glycoprotein of vesicular stomatitis virus is the antigen that gives rise to and reacts with neutralizing antibody. *J. Virol.*, 10: 1231-1235, 1972.
 14. LAEMMLI, U.K. Cleavage of estructural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
 15. MATTHEWS, R. E. F. Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the international committee on taxonomy of viruses. *Intervirol.*, 17:1-3, 1982.
 16. MCSHARRY, J. J., WAGNER, R. R. Lipid composition of purified vesicular stomatitis viruses. *J. Virol.*, 7: 59-70, 1970.
 17. PERRIN, P., THIBODEAU, L., SUREAU, P. Rabies immunosome(subunit vaccine) structure and immunogenicity. Pre-and post-exposure protection studies. *Vaccine*, 3: 325-332, 1985.
 18. PETRI, W. A., WAGNER, R. R. Reconstitution into liposomes of the glycoprotein of vesicular stomatitis virus by detergent dialysis. *J. Biol. Chem.*, 254: 4313-4316, 1979.
 19. WILEY, D. C. Viral membranes. In: Fields, B.N., Knipe, D.M., N. Y., eds. *Fundamental virology*. Raven Press, 1986, v.4, p.45-67.
 20. WILKS, C. R., JENNEY, E. W., HOUSE, J. A. Development of an immunoeletroosmophoresis test for the detection and typing of antibodies to vesicular stomatitis viruses. *Can. J. Comp. Med.*, 48:179-183, 1984.

ABSTRACT

Obtaining of glycoproteins of stomatitis vesicular virus for the identification of antibodies

In this article a practical method is described on the use of a non ionic detergent, that can be removed by dialysis, for the extraction of the glycoproteins of the vesicular stomatitis virus to be used in the identification of antibodies by ELISA's technique.

RESUMO

Obtenção de glicoproteínas do vírus da estomatite vesicular para identificação de anticorpos

Neste trabalho descreve-se um método prático baseado no uso de um detergente não iônico, que pode ser removido por diálise, para a extração das glicoproteínas do vírus da estomatite vesicular para seu uso na identificação de anticorpos pela técnica de ELISA.