

RESPUESTA INMUNITARIA SEROTIPO-ESPECÍFICA CONTRA ROTAVIRUS PORCINOS

Serotype-Specific Immune Response Against Porcine Rotaviruses

Mayra Hidalgo¹, Max Ciarlet^{2,3} y Ferdinando Liprandi²

¹Laboratorio de Virología, Instituto de Investigaciones Veterinarias, CENIAP-FONAIAP, Apartado 70, Maracay 300, Edo. Aragua, Venezuela.

²Laboratorio de Biología de Virus, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Apartado 21827. Caracas 1020-A, Venezuela.

³Dirección actual: Division of Molecular Virology., Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza. Houston, Texas 77030, U.S.A.

RESUMEN

Se evaluó la respuesta inmunitaria serotipo específica contra rotavirus porcinos, en sueros de lechones y sueros hiperinmunes producidos en conejo, mediante un ELISA de competencia. El uso de una batería de 6 anticuerpos monoclonales (AcM) producidos contra la proteína VP7 de los serotipos G3, G5 o G11 y un AcM contra el segmento VP8* de la proteína VP4 del serotipo P9, permitió la identificación de tres grupos de reactividad. El primer grupo, representado por los AcM dirigidos a los serotipos G3 y G5, definido por el reconocimiento recíproco de los AcM 1C10 y 7D2 y, otro no recíproco por el AcM 1C3. El segundo grupo de reactividad formado por los AcM de serotipo porcino G11, definido por el reconocimiento recíproco de los AcM 6E10 y 8D10 y el no recíproco del AcM 5E6. El AcM 4B2, dirigido contra VP8*, representó el tercer grupo de reactividad. La respuesta inmunitaria en sueros hiperinmunes fue serotipo específica y apoyó la presencia de un epítipo común sobre las VP7 G3 y G5 porcinas y de un dominio exclusivo sobre el serotipo G11 porcino. En lechones de 1 a 8 semanas de edad, se encontraron niveles considerables de anticuerpos que compitieron con el panel de AcM, sugiriendo que pudieran estar representados en el repertorio de anticuerpos que se producen por infección natural.

Palabras clave: Rotavirus, lechones, ELISA de competencia.

ABSTRACT

The serotype-specific immune response against porcine rotaviruses was evaluated in piglets and hyperimmune sera raised in rabbits by a competition ELISA. Using 6 monoclonal antibodies

(Mabs) directed against G3, G5 and G11 VP7 and one Mab directed against P9 VP8* cleavage product of VP4, three distinct reactivity groups were identified: reactivity group represented porcine rotavirus serotypes G3 and G5, defined by the reciprocal recognition of 1C10 and 7D2 and by the non-reciprocal recognition of the Mab 1C3; represented porcine rotavirus G11, defined by the reciprocal recognition of Mab 6E10 and 8D10, and by the non-reciprocal recognition of Mab 5E6 and the one represented by Mab 4B2, directed against VP8*. In rabbit hyperimmune sera the immune response was serotype-specific and supported the presence of a common epitope on both G3 and G5 VP7 types, as well as an exclusive domain for serotype G11. In 1- to 8-weeks old piglets, considerable levels of antibodies competed out all Mabs tested suggesting that the Mabs are represented in the antibody repertoire produced after natural infection of porcine rotavirus.

Key words: Rotavirus, piglets, competition ELISA.

INTRODUCCIÓN

La gastroenteritis rotaviral es una enfermedad de distribución mundial, que afecta a niños y a individuos jóvenes de una gran variedad de especies animales, incluyendo cerdos [10]. Las proteínas de superficie de rotavirus grupo A, VP4 y VP7, estimulan en forma independiente la producción de anticuerpos neutralizantes e inducen inmunidad protectora [13-17]. Se han desarrollado anticuerpos monoclonales contra VP4 y VP7 de diferentes serotipos [11], los cuales se han utilizado para el estudio de la estructura antigénica de estas proteínas [12] y para conocer la prevalencia de los serotipos en diferentes especies animales [16]. La caracterización antigénica de anticuerpos monoclonales que reconozcan epítipes sobre VP4 y VP7, ha hecho posible conocer la respuesta inmunitaria

taria sérica contra sitios antigénicos en estas proteínas mediante el ensayo inmunoenzimático de competencia, que se ha empleado extensamente no sólo para evaluar inmunidad en rotavirus [1, 9, 15, 19] sino para otros modelos virales como gastroenteritis transmisible [7].

El objetivo de este estudio fue caracterizar la topografía antigénica de las regiones funcionales de las dos proteínas de superficie de tres cepas de rotavirus de diferente serotipo y examinar la respuesta inmunitaria específica contra epitopes serotipo específicos y de reactividad cruzada en sueros hiperinmunes producidos en conejos y en lechones en condiciones de infección natural, mediante el uso de anticuerpos monoclonales serotipo específicos en un inmunoensayo enzimático de competencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Durante el desarrollo del presente trabajo se emplearon sueros hiperinmunes producidos en conejo contra las cepas de rotavirus porcino: Gottfried (P2BG4), OSU (P9G5), 253 (P9G11) y contra la cepa de rotavirus bovino NCDV (P6G6). Además, muestras de sueros de lechones de 1 a 8 semanas de edad, procedentes de diferentes granjas de los estados Aragua, Carabobo y Miranda.

Purificación y biotinilación de los anticuerpos monoclonales

Se utilizó una batería de 6 anticuerpos monoclonales (AcM) dirigidos a la proteína de rotavirus de cápside externa VP7 [5, 6] y, un anticuerpo monoclonal dirigido contra el segmento VP8*, segmento de clivaje de la proteína de rotavirus de cápside externa VP4 [14]. Las características de estos AcM se muestran en la TABLA I. Los anticuerpos monoclonales de isotipo IgG se purificaron por columna de DEAE-AFFI-GEL-BLUE (BIO-RAD) y los monoclonales de isotipo IgM, se purificaron por cromatografía de exclusión molecular mediante una columna de Sephadex G-200 (Pharmacia). Posteriormente,

cada uno fue biotinilado con éster de N-hidrosuccinamida de biotina (Sigma).

ELISA

Se realizó un inmunoensayo enzimático (ELISA), a fin de conocer la capacidad de los AcM biotinilados para detectar antígeno en platos de microtécnica, utilizando las diferentes cepas de rotavirus contra las que fueron producidos. Se aplicó el protocolo descrito por Ciarlet y col. [6], con las siguientes modificaciones: se utilizó suero hiperinmune contra rotavirus producido en conejo como anticuerpo captura y los anticuerpos monoclonales biotinilados como anticuerpos detectores. Las lecturas de D.O. iguales o superiores a 1 se consideraron positivas, después de calibrar a cero con pozos sin antígeno.

ELISA de competencia

Con el objeto de comparar la habilidad de varios sueros sanguíneos de conejo y de cerdos para competir con los AcM biotinilados por su unión a rotavirus, se desarrolló un ensayo de ELISA de competencia (EC) descrito por Shaw y col. [19], con ligeras modificaciones. Utilizando platos de microtécnica sensibilizados con suero hiperinmune contra rotavirus OSU (P9,G5) ó 253 (P9,G11), producidos en conejo. Luego de colocar el virus, se lavaron los platos con buffer fosfato salino y se añadieron las diluciones seriadas y por duplicado de los anticuerpos competidores: AcM sin marcar (AcM frío) o suero, incubando por 4 horas a 37°C. Después de lavar se colocó la dilución preestablecida del AcM biotinilado, por 2 horas a 37°C. La primera fila de cada placa fue utilizada como control sin antígeno viral. Además, para cada AcM biotinilado se incluyeron controles de virus, a fin de demostrar la especificidad del AcM en cada prueba. El suero control positivo estuvo representado por diluciones seriadas de suero hiperinmune específico para cada cepa viral. El AcM biotinilado se detectó con streptavidina-peroxidasa (Sigma), utilizando como revelador o-Phenilendiamine. El valor promedio de la unión del AcM biotinilado en presencia de cada dilución del AcM competidor se calculó por duplicado. El título EC se expresó como la mayor dilución de AcM competidor que dio un valor de D.O. menor o igual al

TABLE I
PROPIEDADES DE LOS AcM USADOS EN ESTE ESTUDIO

AcM	Virus Inmunizante	ST	Sitio AA ¹ (región)	AA	Isotipo	Ref
1C3	A34	P9G5	94(A)	Ala	IgM	[6]
1C10	A46	P9G5	96(A)	Thr	IgG1	"
7D2	A131	P9G3	96(A)	Asn	IgM	"
5E6	253	P9G11	87(A)	Arg	IgM	"
6E10	253	P9G11	87(A)	Arg	IgG2b	"
8D10	253	P9G11	223(C)	Lys	IgG2b	"
4B2 ²	OSU	P9G11	³	-	IgG1	[14]

¹Residuo de AA en el cual mapea cada AcM por análisis de la secuencia de VP7 en mutantes resistentes a la neutralización. ²AcM producido contra VP8*, fragmento de clivaje de VP4 P9. ³No se conoce.

TABLA II
ENSAYOS DE COMPETENCIA DE LOS AcM BIOTINILADOS CONTRA LOS AcM FRÍOS*

AcM frío Competidor	AcM biotinilado						
	1C10 G5	7D2 G3	1C3 G5	8D10 G11	6E10 G11	5E6 G11	4B2 P9
1C10	>3200	>3200	50	<50	<50	2	2
7D2	>3200	>3200	50	<50	<50	< 50	< 50
1C3	>3200	>3200	1600	< 50	< 50	< 50	< 50
8D10	<50	<50	<50	>3200	1600	100	<50
6E10	<50	<50	<50	1600	3200	100	<50
5E6	<50	<50	<50	>3200	< 50	>3200	< 50
4B2	<50	<50	<50	<50	< 50	< 50	1600

* Los títulos de EC están expresados como la mayor dilución de AcM frío que da un valor de D.O. $492 \leq 50\%$ del promedio del control sin competidor en 8 pozos.

TABLA III
TÍTULO DE Ac DE ACUERDO AL ENSAYO EMPLEADO CON SUEROS HIPERINMUNES PRODUCIDOS EN CONEJO

Suero (ST G)	EC ¹ 1C3	EC 1C10	EC 7D2	EC 4B2	EC 5E6	EC 6E10	EC 8D10	NRFF ²
α GOTT(4)	<50	< 50	50	< 50	< 50	< 50	< 50	6400
α OSU (5)	1600	1600	> 3200	> 3200	50	< 50	100	25600
α 253(11)	< 50	< 50	< 50	< 50	> 3200	> 3200	> 3200	12800
α NCDV(6)	100	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	6400

¹Los títulos de EC están expresados como el recíproco de la mayor dilución de suero que da un valor de D.O. $492 \leq 50\%$ del promedio del control sin competidor en 8 pozos. ²Los títulos neutralizantes están expresados como el recíproco de la mayor dilución de suero que reduce $\geq 66\%$ de Nde focos infecciosos en el ensayo de NRFF para la cepa homóloga [10].

50% del promedio de los pozos que contenían sólo el AcM biotinilado. Se escogió la dilución 1/50 como punto de corte, por lo que un Ac competidor se consideró positivo, cuando esa dilución es capaz de reducir en 50% el promedio de D.O. a 492 nm al comparar con los pozos sin competidor.

RESULTADOS

ELISA de competencia entre los AcM

Cada AcM fue enfrentado a su homólogo y a los otros AcM dirigidos a VP7 y VP4. La TABLA II muestra los ensayos de competencia realizados. Para los AcM dirigidos contra VP7 G3 y G5, se observó que el AcM 1C10 sólo compite con el mismo y con 7D2. El AcM 7D2 lo hace con el mismo y con 1C10. El AcM 1C3 compite con su homólogo, con 1C10 y 7D2. No hay competencia de estos AcM con los producidos con el serotipo G11 ni con el AcM 4B2 específico para VP8*.

En el caso de los AcM dirigidos a la VP7 de 253 (G11), se encontró que el AcM 8D10 compite con el mismo, con 6E10 y con 5E6. El AcM 6E10 lo hace con el mismo y con 8D10. No hay competencia de este AcM con 5E6 ni con el resto de los AcM usados en el ensayo. El AcM 5E6 compite con el mismo y con 8D10, no mostró competencia con 6E10 ni con el resto de los AcM. El AcM 4B2 solamente compitió con el mismo en el EC.

ELISA de competencia con sueros hiperinmunes producidos en conejo

La TABLA III muestra que el suero hiperinmune OSU responde de manera específica, produciendo anticuerpos (Ac) que compiten a títulos elevados con los AcM 1C3, 1C10 y 7D2 dirigidos contra VP7 de los ST G3 y G5. Además, lo hace con el AcM 4B2, a títulos superiores a 3200. Los niveles de competencia de este suero en relación a los AcM dirigidos a 253 (G11) son casi inexistentes. Sólo para el AcM 8D10 se observa un título de 100. El suero hiperinmune específico para la cepa Gottfried (P2B,G4), no mostró tener Ac que compitieran con ninguno de los AcM utilizados.

El suero hiperinmune para 253 (P9,G11) presentó Ac que compitieron únicamente con los AcM producidos con la cepa homóloga. Este suero no tiene Ac competidores con el AcM 4B2. El suero hiperinmune para la cepa de rotavirus bovino NCDV (P6,G6) no tiene Ac que compitan de manera significativa con ninguno de los AcM utilizados.

ELISA de competencia en sueros de lechones de diferentes edades

En la TABLA IV se muestran los promedios de los títulos de Ac de los sueros de lechones en el EC. Al analizar los datos de lechones en las 2 primeras semanas de edad, se obser-

TABLA IV

PROMEDIO DEL TÍTULO DE Ac DE ACUERDO AL ENSAYO EMPLEADO EN LECHONES DE DIFERENTES EDADES

Edad (sem)	n	NRFF ¹ STG5	EC ² 1C3	EC 1C10	EC 7D2	EC 4B2	NRFF STG11	EC 5E6	EC 6E10	EC 8D10
1-2	9	1245	356	540	1318	222	133	33	81	84
3	7	143	nd ³	44,3	51,4	40	85,7	193	95,7	60
4	5	120	44	46	76	40	110	0	8	10
7	5	120	14	34	112	40	202	6	14	12
8	9	161	7,8	16,6	65,5	31,1	177,8	5,6	5,6	16,7

¹Los títulos neutralizantes están expresados como el promedio del recíproco de la mayor dilución de suero que reduce en 66% el Nº de focos infecciosos en el ensayo de NRFF para la cepa homóloga [10]. ²Los títulos de EC están expresados como el promedio del recíproco de la mayor dilución de suero que da un valor de D.O 492 menor o igual al 50% del promedio del control sin competidor. ³No determinado.

vó que los sueros son capaces de competir a títulos elevados con los AcM específicos para G3 y G5. También, la respuesta de anticuerpos es elevada para el AcM 4B2 (VP8* P9). Sin embargo, los títulos de anticuerpos para los AcM dirigidos a el ST G11 son mucho menores. En el grupo de lechones de 3 a 8 semanas, se observa que la situación es inversa, niveles de anticuerpos muy bajos para todos los AcM utilizados. Con el AcM 7D2, los títulos de Ac fueron superiores a los de 1C3 y 1C10. Sólo los animales de 3 semanas presentaron títulos ligeramente mayores para los AcM dirigidos contra G11.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Existe poca información sobre la antigenicidad relativa de los epitopes de neutralización sobre VP4 y VP7, después de infección natural o vacunación. El conocimiento de la inmunogenicidad de las regiones homotípicas y heterotípicas sobre estas proteínas *in vivo*, es considerado como un aporte valioso para entender la respuesta inmunitaria frente a las infecciones rotavirales.

La respuesta inmunitaria contra rotavirus, generada por infección natural o por vacunación, ha sido evaluada tradicionalmente por ensayos de neutralización [3, 4, 20]. Esta respuesta se puede estudiar en forma más específica mediante ensayos de competencia, utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra las proteínas de neutralización viral. En el presente trabajo, las diferencias en los patrones de competencia entre los anticuerpos monoclonales, permitieron ubicarlos en grupos de reactividad, recíproco y no recíproco dentro de cada serotipo. Las competencias recíprocas se establecen entre anticuerpos que se unen a epitopes idénticos o muy próximos sobre la proteína de neutralización. Las competencias no recíprocas se establecen entre anticuerpos que reconocen epitopes espacialmente cercanos. Para los anticuerpos contra los serotipos G3 y G5 el grupo de reactividad recíproca está formado por 1C10 y 7D2. El grupo de reactividad no recíproca está formado por 1C3 que compite en una sola vía con 1C10 y 7D2. Estos resultados permiten definir al menos un epitope común compartido por la proteína VP7 de cepas porcinas de los

serotipos G3 y G5 [6]. En el caso de los anticuerpos contra G11, el grupo de reactividad recíproca está formado por 6E10 y 8D10 y la reactividad no recíproca se estableció para 5E6 que compite en una sola vía con 8D10. Estos resultados permiten definir al menos un dominio antigénico exclusivo para la VP7 G11 [5]. El anticuerpo monoclonal 4B2 forma un grupo de reactividad único, ya que sólo compite con el mismo, lo cual es compatible con el hecho de estar dirigido contra un epitope localizado en el segmento VP8* de la proteína VP4 P9 [14, 18].

Los resultados con sueros hiperinmunes de conejos, mostraron que la respuesta inmunitaria que se desarrolla por exposiciones repetidas a un antígeno único es serotipo específico y corroboran la presencia de un epitope común sobre las VP7 G3 y G5 y de un dominio exclusivo para G11 por ensayos *in vivo*.

Los datos de competencia para los lechones mostraron que, en las dos primeras semanas los animales observan anticuerpos séricos que compiten contra los monoclonales dirigidos a las VP7 G3, G5, G11 y VP8* P9, indicando que los epitopes reconocidos por los monoclonales son inmunogénicos en situaciones de infección natural. Además, el hecho de que la mayoría de los animales presenten niveles elevados de anticuerpos, se interpreta como un reflejo de la inmunidad materna. Se observó que a partir de la tercera y hasta la octava semana, el número de animales con anticuerpos competidores es bastante reducido, así como los títulos de anticuerpos, lo que sugiere en primer lugar, que los anticuerpos maternos son catabolizados y que anticuerpos similares a los utilizados en los ensayos de competencia estén comenzando a producirse como consecuencia de infección activa [8, 10]. El mayor nivel de respuesta contra el serotipo G11, observado en lechones de 3 semanas, puede deberse a que en el momento de la toma de la muestra estuvieran cursando una infección activa por cepas de ese serotipo. En algunos casos los sueros de lechones presentaron títulos neutralizantes elevados sin que exista competencia alguna, pudiendo interpretarse como una menor afinidad de los anticuerpos por los epitopes definidos por los monoclonales o que estos anticuerpos no contribuyen con el fenómeno de neutralización viral, como ha sido reportado para otros virus [2].

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BEARDS, G.; DESSELBELGER, U. Determination of rotavirus serotype-specific antibodies in sera by competitive enhanced enzyme immunoassay. **J. Virol. Meth.** 24:103-110. 1989.
- [2] BRESCHKIN, A.; AHM, J.; WHITE, D. Antigenic determinants of Influenza virus hemagglutinin. **Virology.** 113:130-138. 1989.
- [3] BRÜSSOW, H.; EICHHORN, W.; ROHWEDDER, A.; SNODGRASS, D.; SIDOTI, J. Cattle develop neutralizing antibodies to rotavirus serotypes which could not be isolated from faeces of symptomatic calves. **J. Gen. Virol.** 72:1559-1597. 1991.
- [4] BRÜSSOW, H.; GERNA, G.; SIDOTI, J.; SARASINI, A. Neutralizing serum antibodies to serotype 6 human rotaviruses PA151 and PA169 in Ecuadorian and German children. **J. Clin. Microbiol.** 30:911-914. 1992.
- [5] CIARLET, M.; HIDALGO, M.; GORZIGLIA, M.; LIPRANDI, F. Characterization of neutralization epitopes on the VP7 surface protein of serotype G11 porcine rotaviruses. **J. Gen. Virol.** 75:1867-1873. 1994.
- [6] CIARLET, M.; HIDALGO, M.; LIPRANDI, F. Cross-reactive, serotype and monotype-specific neutralization epitopes on VP7 of serotype G3 and G5 porcine rotavirus strains. **Arch. Virol.** 141: 601-614. 1996.
- [7] DE DIEGO, M.; LAVIADA, M.; ENJUANES, L.; ESCRIBANO, J. Epitope specificity of protective lactogenic immunity against swine transmissible gastroenteritis virus. **J. Virol.** 66:6502-6508. 1992.
- [8] FU, Z.; HAMPTON, D. Transfer of maternal antibody against group A rotavirus from sows to piglets and serological responses following natural infection. **Res. Vet. Sci.**, 48:365-373. 1990.
- [9] GREEN, K.; TANIGUCHI, K.; MACKOW, E.; KAPIKIAN, A. Homotypic and heterotypic epitope-specific antibody responses in adults and infant rotavirus vaccinees: implications for vaccine development. **J. Infect. Dis.** 161:667-679. 1990.
- [10] HIDALGO, M.; CIARLET, M.; LUDERT, J.; LIPRANDI, F. Respuesta inmunitaria humoral en lechones contra rotavirus. **Revista Científica. Fac. Cs. Veterinarias. L.U.Z.** 6:117-123. 1996.
- [11] HOSHINO, Y.; KAPIKIAN, A. Rotavirus antigens. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** 185: 179-228. 1994.
- [12] HOSHINO, Y.; NISHIKAWA, K.; BENFIELD, D.; GORZIGLIA, M. Mapping of antigenic sites involved in serotype-specific cross-reactive neutralization on group A rotavirus outer capsid glycoprotein VP7. **Virology.** 199:233-237. 1994.
- [13] HOSHINO, Y.; SAIF, L.; SERENO, M.; CHANOCK, R.; KAPIKIAN, A. Infection immunity of piglets to either VP4 or VP7 outer capsid protein confer resistance to challenge with a virulent rotavirus bearing the corresponding antigen. **J. Virol.** 62:744-748. 1988.
- [14] LIPRANDI, F.; RODRÍGUEZ, I.; PIÑA, C.; LARRALDE, G.; GORZIGLIA, M. VP4 monotype specificities among porcine rotaviruses strains of the same VP4 serotype. **J. Virol.** 65:1658-1661. 1991.
- [15] MATSON, D.; O'RYAN, M.; PICKERING, L.; CHIBA, S.; NAKATA, S.; RAJ, P.; ESTES, M. Characterization of serum antibody responses to natural rotavirus infections in children by VP7-specific epitope-blocking assays. **J. Clin. Microbiol.** 30:1056-1061. 1992.
- [16] NAGESHA, H.; HOLMES, I. New porcine rotavirus antigenically related to human rotavirus serotype 3. **J. Virol.** 175:171-174. 1988.
- [17] OFFIT, P.; BLAVAT, G. Identification of the two rotavirus genes determining neutralization specificities. **J. Virol.** 57: 376-378. 1986.
- [18] SERENO, M.; GORZIGLIA, M. The outer capsid VP4 of murine rotavirus strain Eb represents a tentative new P type. **Virology.** 199:500-504. 1994.
- [19] SHAW, R.; FONG, K.; LOSONSKY, G.; LEVINE, M.; MALDONADO, Y.; YOLKEN, R.; FLORES, J.; KAPIKIAN, A.; VO, P.; GREENBERG, H. Epitope-specific immune responses to rotavirus vaccination. **Gastroenterology.** 93: 941-950. 1987.
- [20] TANIGUCHI, K.; URASAWA, T.; KOBAYASHI, N.; AHMED, M.; ADACHI, N.; CHIBA, S.; URASAWA, S. Antibody response to serotype-specific and cross-reactive neutralization epitopes on VP4 and VP7 after rotavirus infection or vaccination: **J. Clin. Microbiol.** 29:483-487. 1991.