

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “ PEDRO KOURÍ”

## Anticuerpos monoclonales al virus dengue 4: espectro de reactividad a los 4 serotipos del dengue

*Lic. Maritza Pupo Antúnez,<sup>1</sup> Lic. Mayling Álvarez Vera,<sup>2</sup> Lic. Melvis Soto Hernández,<sup>3</sup> Lic. Hermis Rodríguez Sánchez,<sup>4</sup> Lic. Rayner Rodríguez Díaz,<sup>5</sup> Lic. Luis Morier Díaz<sup>6</sup> y Dra. María Guadalupe Guzmán Tirado<sup>7</sup>*

### RESUMEN

Se generaron 3 anticuerpos monoclonales 8E8, 3F7 y 1E9 contra el virus dengue 4 cepa H-241. Estos anticuerpos monoclonales mostraron distintos patrones de reactividad contra los 4 serotipos de dengue y diferentes preparaciones de antígeno del serotipo 4, cuando fueron ensayados en varios métodos serológicos. El anticuerpo monoclonal 8E8 presentó una especificidad de serotipo (D-2, por inhibición de la hemaglutinación), subcomplejo (D-2 y D-4, por inmunofluorescencia) y de complejo por la técnica de inmunoperoxidasa. Fue capaz de neutralizar al virus homólogo en 80 % y resultó ser el único anticuerpo monoclonal reactivo en la prueba de fijación de complemento. El anticuerpo monoclonal 3F7 no reaccionó por inhibición de la hemaglutinación, reconoció a los serotipos D-1, D-2, D-3 y D-4 por inmunofluorescencia y sólo al D-1 y D-4 por inmunoperoxidasa mientras que fue incapaz de neutralizar el virus homólogo. El 1E9 fue reactivo solo por inhibición de la hemaglutinación contra los serotipos D-1, D-2, D-3, y D-4 y neutralizó el serotipo D-4. Todos los anticuerpos monoclonales fueron capaces de reaccionar contra diferentes antígenos de dengue mediante un ELISA de doble anticuerpo y mostraron actividad fluorescente contra el pase 38 en cultivo de riñón de perros Beagle, sin embargo no fueron capaces de reaccionar con un antígeno recombinante de D-4.

**Descriptor DeCS:** ANTICUERPOS MONOCLONALES/inmunología; VIRUS DEL DENGUE/inmunología.

Los anticuerpos monoclonales (AcM) generados contra el virus dengue han resultado un medio sensible y eficaz para estudiar los diferentes determinantes antigénicos. Estas especificidades antigénicas forman las bases para la clasificación serológica de los flavivirus mediante fijación de complemento (FC), inhibición de la hemaglutinación (IH), inmunofluorescencia (IF) y neutralización (Nt).<sup>1-5</sup> El conocimiento de la localización precisa de sitios antigénicos en las diferentes proteínas virales mediante AcMs ha permitido definir epitopes únicos, de complejo y subgrupo específico además de los mecanismos en los cuales están involucrados. Por ejemplo las especificidades de subgrupo han sido mostradas por ensayos de inmunofluorescencia y neutralización. El mapa de la proteína E de los

flavivirus ha sido establecido por ensayos de competencia<sup>6</sup> y se ha determinado la distribución de los epitopes incrementadores en varias cepas de dengue 2 mediante el método de inmunoamplificación dependiente de anticuerpo (IDA).

La IDA es un mecanismo regulador de la severidad de la enfermedad, de importancia epidemiológica y clínica. La posibilidad de identificar, con la ayuda de AcMs, los epitopes determinantes de la inmunoamplificación han convertido a éstos en valiosas herramientas para el estudio del fenómeno de IDA y el síndrome de choque por dengue.<sup>7,8</sup>

A pesar de la creación de nuevas estrategias para mejorar la tecnología de hibridomas,<sup>9,10</sup> la convencional, junto con la aplicación de técnicas

<sup>1</sup> Máster en Virología. Licenciada en Microbiología. Investigadora Auxiliar.

<sup>2</sup> Máster en Virología. Licenciada en Microbiología. Aspirante a Investigadora.

<sup>3</sup> Licenciada en Microbiología.

<sup>4</sup> Máster en Bacteriología. Licenciada en Bioquímica. Aspirante a Investigadora.

<sup>5</sup> Máster en Virología. Licenciado en Microbiología. Aspirante a Investigador.

<sup>6</sup> Licenciado en Microbiología. Investigador Auxiliar. Profesor Titular.

<sup>7</sup> Doctora en Ciencias Médicas. Especialista de II Grado en Virología. Investigadora y Profesora Titular.

moleculares, continúa suministrando estos reactivos específicos de gran utilidad en la identificación, la caracterización y el diagnóstico de los flavivirus.<sup>11-15</sup> En este estudio fueron generados y caracterizados AcMs murinos contra el virus dengue 4 (D-4V) con el objetivo de estudiar éstos en la IDA y su relación con cepas de dengue 2.

## MÉTODOS

### VIRUS Y ANTÍGENOS

Células de *Aedes albopictus* C6/36-HT donadas por el doctor Javier Díaz (Laboratorio Departamental, Medellín, Colombia) y BHK-21 clono 15 (donada por la Fundación Rockefeller) sublínea BHK-21 clono 13 (ATCC, 1992) en medio MEM que contenía 2 mmol de glutamina y 10 % de suero fetal bovino (SFB) fueron infectadas a una multiplicidad  $m=1$  con cada una de las cepas prototipos de los 4 serotipos del virus dengue D1 (Hawaii), D2(NG-C), D3 (H-87), D4 (H-241), para ser empleadas en enanos de IF e IP.<sup>16</sup>

Los sobrenadantes de las células C6/36 infectadas (Ag celular) fueron clarificados por centrifugación a 800 gravedades entre los días 4 a 7 posinoculación (según el serotipo viral inoculado) y los sobrenadantes cosechados mediante 7 % p/v de PEG 6 000 BDH (Poole, UK) para ser purificados en gradiente de sacarosa y estudiados por ELISA en ensayos comparativos.

Las células de un cultivo primario de riñón de perro Beagle,<sup>17</sup> crecidas en medio Dulbecco suplementado con 10 % de suero fetal bovino, fueron inoculadas con el pase 38 del virus D-4 cepa N-18045 en este sistema.

Las cepas prototipo de los virus del complejo dengue fueron inoculadas en el cerebro de ratones lactantes, a partir de los cuales fueron preparadas suspensiones antigénicas (Ag cerebro) y tratadas con sacarosa-acetona según se describe por Clark y Casals. Fueron utilizados en los ensayos de ELISA de doble anticuerpo (ELISA-da) y FC e IH, respectivamente.

Una suspensión viral del D-4 sin tratamiento con sacarosa/acetona fue utilizada como antígeno en la obtención de AcMs.<sup>18,19</sup>

### PURIFICACIÓN VIRAL

Fue colocado 1 mL de cada suspensión viral precipitada con PEG sobre un colchón de un

gradiente discontinuo de sacarosa 20 % y 50 % p/v en PBS y centrifugado a 1 500 gravedades durante 2 h a 4 °C. La fracción viral (500 µL) fue colectada con la utilización de una aguja de 23 G (Falconar AKI. Immunological studies on the non-structural 1 glycoprotein [NS-1] of dengue 2 virus [PhD Thesis]. London School of Hygiene and Tropical Medicine. London UK. 1992). Esta preparación antigénica purificada (AgP) fue empleada en el ELISA-da.

### GENERACIÓN Y TAMIZAJE DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Las células provenientes del bazo de los ratones inmunizados fueron obtenidas 3 d después de la inoculación final y fusionadas con la línea celular de plasmacitoma murino P3X63/Ag.8 (ATCC, 1992) en una relación 10:1 con PEG 1500 Sigma (St. Louis, MO) siguiendo la metodología de Fazekas de St Groth y Scherdergen con ligeras modificaciones.<sup>20,21</sup> Después de la selección de los hibridomas con medio HAT, el sobrenadante de cultivo fue tamizado mediante un ELISA de tipo indirecto. Los hibridomas de interés fueron clonados 3 veces por dilución limitante y la producción de los AcMs *in vivo* se realizó con la inoculación de casi  $1 \times 10^6$  células híbridas en ratones BALB/c previamente inoculados con 0,3-0,5 mL IP de Pristane Sigma (St. Louis, MO). El líquido ascítico fue cosechado y clarificado por centrifugado a 800 gravedades durante 10 min y almacenado a -20 °C hasta su uso.

### ENSAYOS INMUNOENZIMÁTICOS

#### ELISA celular

El tamizaje de los AcMs se realizó mediante un ELISA celular (ELISA-c). Se inocularon frascos de 25 cm<sup>2</sup> Nunclon (Koskilde, Den.) con monocapa confluyente de células C6/36 con el virus dengue 4 cepa H-241 a una multiplicidad de 0,1. A los 5 d posinoculación fueron separadas suavemente y fijadas en placas de ELISA (Dynatech, UK), tratadas antes con poli-L lisina 0,1 % p/v, centrifugadas a 400 gravedades por 5 min e incubadas 4 °C por 1 h. Posterior a la incubación se añadieron a cada pozo 100 mL de glutaraldehído 0,0025 % durante 15 min a temperatura ambiente. El bloqueo se realizó al añadir 1 % de albúmina

bovina (BSA) y después se adicionaron 100µL de los sobrenadantes del cultivo de hibridomas. La presencia del anticuerpo fue detectada con la adición de un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Sigma, St. Louis, MO) y revelada con el uso como sustrato de la ortofenilendiamina (OPD). Cada muestra fue evaluada a la vez sobre células fijadas C6/36 no infectadas. El valor de corte estuvo dado por la relación de las densidades ópticas de las muestras positivas sobre las negativas ( $R=P/N$ ). Un  $P/N \geq 3$  fue considerado como positivo.<sup>20,21</sup>

#### *ELISA de clase y subclase*

La determinación de la clase y subclase de inmunoglobulina se realizó con la utilización de un estuche de reactivos Sigma Immuno Chemicals ISO-1 (St. Louis, MO). El ensayo fue realizado de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### *ELISA doble anticuerpo (ELISA-da)*

La especificidad y reactividad cruzada fueron determinadas por un ELISA-da<sup>22</sup> con el uso de un antisuero anti-dengue (captura) y los antígenos: Ag cel, Ag cerebro y Ag P. También fue utilizado un extracto antigénico de la proteína E recombinante expresada en *Pichia pastoris*<sup>23</sup> (Muné M. Obtención de clones de *Pichia pastoris* transformados con el gen de la envoltura truncada del virus dengue 4 [Tesis de Maestría]. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”). El ensayo fue realizado como se describió antes. Estos AcM fueron también estudiados en ensayos de IH,<sup>24</sup> Nt,<sup>25</sup> FC,<sup>26</sup> IP<sup>27</sup> e IF.<sup>4</sup>

## RESULTADOS

Se escogieron 3 AcM contra D-4 a partir de los valores obtenidos en el ensayo ELISA-c y caracterizados por ELISA-da, IF, IH, FC e IP (tablas 1 y 2). En estos ensayos se utilizó el AcM producido *in vivo*, mientras que los sobrenadantes de los hibridomas fueron empleados en la determinación del isotipo. Se obtuvo IH para los AcMs 8E8 y 1E9, en el primer caso el mayor título se obtuvo para el serotipo D-2 y el 1E9 mostró reactividad cruzada a los 4 serotipos. El AcM 3F7 no fue reactivo para estos ensayos.

La actividad fluorescente determinada en células C6/36 resultó ser de complejo para el AcM 3F7 mientras que el AcM 8E8 fue subcomplejo específico. El patrón de fluorescencia exhibido fue en forma de focos y en el nivel citoplasmático. El resultado obtenido en la prueba de inmunoperoxidasa mediante células BHK-21 y RPB inoculadas con el pase 38 del D-4 N18045 arrojaron un reconocimiento subcomplejo específico para el AcM 3F7 y complejo específico para el 8E8. Los AcMs 8E8 y 1E9 neutralizaron el virus homólogo.

El patrón de reactividad de estos AcMs por ELISA-da con el uso de diferentes preparados antigénicos de los 4 serotipos del dengue fue de hecho variable (fig.). Todos los AcMs mostraron el mayor título cuando fueron enfrentados al antígeno celular. Este resultado está de acuerdo con los obtenidos en ELISA-c, pues éstos fueron seleccionados después de la fusión por este ensayo, sin embargo el reconocimiento por cada AcM contra AgP y Ag de cerebro fue diferente.

**TABLA 1.** Características de los anticuerpos monoclonales (AcMs) anti-D4

	Sub C	Rc-ELISA
AcMs		
8E8	IgG2a	4
3F7	IgG1	3,9
1E9	IgG1	3,1
SNR	-	-
SRH	-	+

Sub C: subclase de inmunoglobulina; Rc-ELISA: relación celular-ELISA; SNR: suero normal de ratón; SRH: suero de ratón hiperinmune.

TABLA 2. Patrón de reactividad serológica de anticuerpos monoclonales (AcMs) anti-D-4

AcMs	IH				IF				IP				Nt D4	FC
	D1	D2	D3	D4	D1	D2	D3	D4	D1	D2	D3	D4		
8E8	4	32	8	<8	-	+	-	+	+	+	+	+	80%	40
3F7	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	36%	-
1E9	8	64	32	16	-	-	-	-	-	-	-	-	52%	-
SHR	256	1024	128	1024	+	+	+	+	+	+	+	+	90%	64
SNR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10%	<4

Títulos expresados como inverso de la dilución, en Nt fue usada la dilución 1:10 del anticuerpo. IH: inhibición de la hemaglutinación; IF: inmunofluorescencia; IP: inmunoperoxidasa; Nt: neutralización; FC: fijación de complemento; SNR: suero normal de ratón; SRH: suero de ratón hiperinmune.

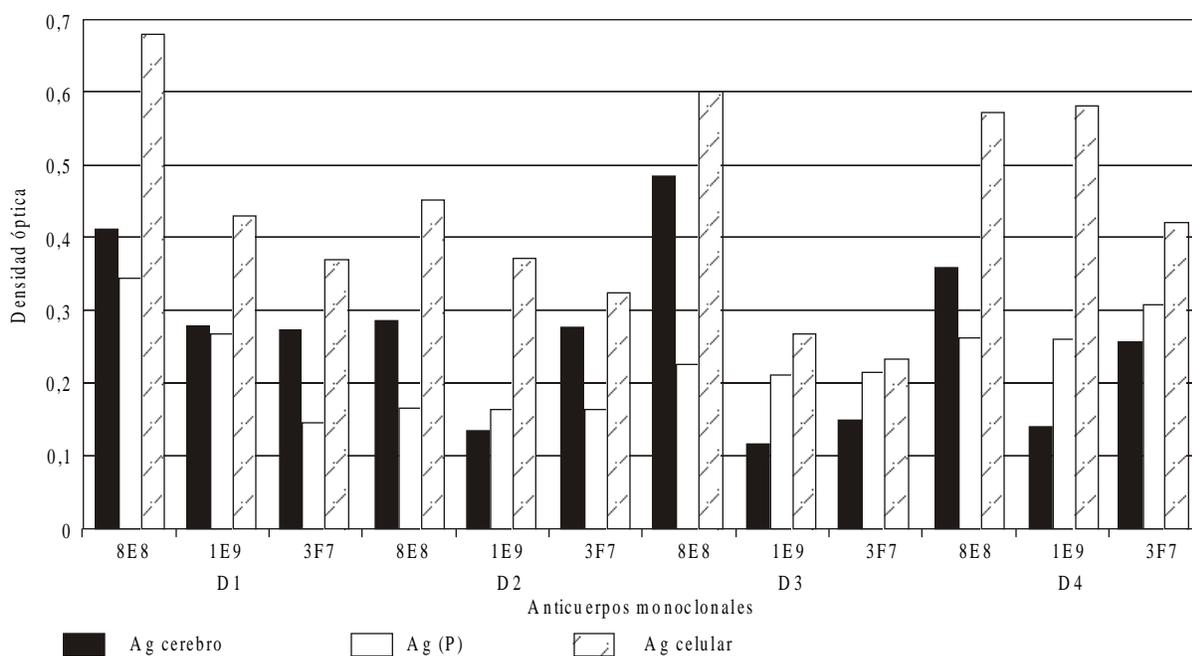


Fig. Patrón de reactividad de los anticuerpos monoclonales (AcMs) por Elisa-da.

En todos los serotipos, 8E8 AcM reconoció al Ag cerebro mejor que al Ag P, mientras 1E9 mostró altos títulos al Ag P y el 3F7 presentó la mayor reacción con Ag-cerebro a D-1 y D-2, y con AgP dio mayor respuesta a los serotipos D-3 y D-4 que otros AcMs.

La reacción cruzada de los AcMs a los 4 serotipos del dengue fue variada. El 8E8 y el 1E9 mostraron mayor reacción con D-1 que los otros 3 serotipos, sin embargo el 3F7 fue más específico a D-4 y D-2. Ninguno de los AcMs fue capaz de reaccionar en ELISA-da con el antígeno D4 recombinante.

## DISCUSIÓN

Se describe la generación de AcMs que reconocen al virus dengue 4 cepa H-241. Fueron específicos al complejo dengue por al menos un ensayo 3 de ellos (8E8, 3F7 y 1E9) y sólo 2 (8E8 y 1E9) fueron neutralizantes.

Los ensayos de IH y Nt han formado las bases para la clasificación antigénica de los flavivirus. La proteína de la envoltura (E) está relacionada con la IH, Nt y provee evidencias para los determinantes específicos de tipo, grupo y complejo.<sup>27,28</sup> Esta

proteína media la unión del virus a los receptores de la superficie celular y el paso de fusión a ésta.<sup>29</sup> También induce la formación de anticuerpos neutralizantes, protectores y que inhiben la aglutinación de eritrocitos.

La complejidad de estas relaciones entre los flavivirus ha sido enfatizada por la aplicación de AcMs específicos a la proteína E.<sup>30,31</sup> Los AcMs han mostrado relaciones inesperadas entre miembros del complejo dengue, además de grupo y tipo específico fue reconocido otro concepto de subcomplejo específico para los serotipos (1-4) y (2-3) del virus dengue, que fueron demostrados por *Gentry* y otros.<sup>32</sup>

Estos AcMs mostraron combinaciones distintas entre IH y Nt las cuales concuerdan con reportes previos acerca de estos patrones de comportamiento respecto a la IH y la Nt (IH+, Nt+; IH-, Nt+; IH+, Nt-).<sup>33</sup>

Los análisis de la proteína E con AcMs han permitido identificar 7 epitopes clasificados en 3 grupos relacionados.<sup>4</sup> En la misma forma han sido definidos 3 dominios antigénicos sobrelapados (I, II, y III) correspondientes a 3 entidades estructurales diferentes.<sup>34-36</sup> En el dominio I, el cual está relacionado con el dominio antigénico C, han sido encontrados epitopes de especificidad de tipo y subtipo. El dominio II con el dominio antigénico A, está caracterizado por portar epitopes neutralizantes e inhibidores de la IH además de una secuencia aminoacídica altamente conservada, que explica la reactividad cruzada de los flavivirus. Por otra parte su estructura tiene 6 puentes disulfuros por lo que es muy sensible a las condiciones de desnaturalización. Reportes recientes<sup>32</sup> han encontrado 5 epitopes en el dominio A arreglados en 3 regiones espaciales independientes. Estos epitopes fueron destruidos por reducción y mostraron su alta sensibilidad a estas condiciones.

El dominio III o dominio antigénico B es el dominio C' terminal<sup>37-39</sup> y es común para todos los flavivirus, además de estar involucrado en el receptor de unión a la célula, también en algunas ocasiones es sensible a las condiciones de desnaturalización por la presencia de un enlace disulfuro.

El 8E8 y 1E9 fueron positivos por ensayos serológicos al reconocimiento de la proteína E. El hecho de que los AcMs no pudieron ser

confirmados por ensayos de inmunodetección (datos no mostrados) sugiere una posible afectación por causa de su alta sensibilidad a las condiciones de reducción. Mientras el 3F7 fue capaz de reconocer al virus sólo cuando éste estaba expresado en células RPB o C6/36. Estos resultados sugieren que el AcM 3F7 podría identificar otra proteína viral asociada con la membrana celular.

La estrategia de la proteína E truncada en el C' terminal y expresada en diferentes vectores ha sido descrita antes<sup>40</sup> y se ha demostrado en un gran número de casos la producción de anticuerpos protectores a esta proteína.<sup>41-43</sup>

La proteína E utilizada en este estudio fue mutada en su sitio de anclaje cerca del dominio B. Los AcMs no fueron reactivos cuando se enfrentaron a la proteína E recombinante truncada. Es posible que el epitope reconocido por los AcMs no esté bien conservado o sea inaccesible en esta proteína a pesar de que estos AcMs fueron generados a partir del virus dengue serotipo 4. El mismo resultado se obtuvo cuando el AcM anti-dengue H3/6 fue utilizado en un ensayo similar, en este caso, la causa pudo ser porque el AcM H3/6 fue obtenido contra el virus D-2,<sup>20</sup> lo cual explica una reactividad disminuida frente a otros serotipos.

Todos estos resultados sugieren que los AcMs 8E8 y 1E9 deben reconocer la proteína E del virus dengue y posiblemente un determinante localizado en el dominio A de esta proteína estructural, de acuerdo con su reactividad serológica. El AcM 3F7 podría reconocer otra proteína que está expresada sobre la superficie celular, es posible sea NS-1.

Una respuesta definitiva sobre la especificidad de estos AcMs puede ser obtenida con el uso de inmunodetección no reductora y como controles AcMs anti-NS-1 y anti-capsida.

#### AGRADECIMIENTOS

A la doctora Susana Vázquez por sus sugerencias y valiosa colaboración en la revisión de este manuscrito.

#### SUMMARY

These types of monoclonal antibodies 8E8, 3F7 and 1E9 to dengue 4 virus H-241 strain. These monoclonal antibodies show various patterns of reactivity to the four dengue serotypes and different antigen preparations of serotype 4 when they were tested in various serological methods. The monoclonal antibody 8E8 exhibited a specificity of serotype (D-2 ; by hemagglutination inhibition); subcomplex (D-2 and D-4 by immunofluorescence)

and complex (by immunoperoxidase technique). It was able to neutralize by 80% homologous virus and it turned out to be the only reactive monoclonal antibody in the complement fixation test. The monoclonal 3F7 did not react to by hemagglutination inhibition, recognized serotypes D-1, D-2, D-3 and D-4 by immunofluorescence and only serotypes D1 and D4 by immunoperoxidase technique but it was unable to neutralize the homologous virus. The 1E9 antibody was reactive to serotypes D1, D-2, D-3 and D-4 only by hemagglutination inhibition and neutralized serotype D-4. All the monoclonal antibodies were able to react to various dengue antigens through an ELISA of double antibody and showed fluorescent activity against 38<sup>th</sup> pass in Beagle dog kidney culture; however, they could not react to a D-4 recombinant antigen.

**Subject headings:** ANTIBODIES, MONOCLONAL/immunology; DENGUE VIRUS/immunology.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Russell PK, Chiewesilp D, Brandt WE. Immunoprecipitation analyses of soluble complement fixations antigens of dengue viruses. *J Immunol* 1970; 105: 838-45.
- Casals J. The arthropod-borne group of animal viruses. *Trans NY Acad Sci* 1957;19:219-35.
- Clark DH, Casals J. Techniques for hemagglutination inhibition with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1958;7:561-73.
- Henchal EA, Gentry MK, McCown JM, Brandt WE. Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *Am J Trop Med Hyg* 1982;31:830-6.
- Bancroft WH, McCown JM, Lago PM, Brandt WE, Ruseell PK. Identification of dengue viruses from the Caribbean by plaque reduction neutralization test. *Pan Am Health Org Sci Publ* 1979;375:175-8.
- Heinz FX. Epitope mapping of flavivirus glycoproteins. En: Maramorosh K, Murphy FA. *Advances in virus research*. New York: Academic, 1986:103-68.
- Morens DM, Venkateshan CN, Halstead SB. Dengue 4 virus monoclonal antibodies identify epitopes that mediate immune infection enhancement of dengue 2 viruses. *J Gen Virol* 1987;68:91-8.
- Halstead SB, Venkateshan CN, Gentry MK, Larsen LK. Heterogeneity of infection enhancement of dengue 2 strains by monoclonal antibodies. *J Immunol* 1984;132(3):1529-32.
- Chiswell DJ, McCafferty. Phage antibodies: will new 'coliclonar' antibodies replace monoclonal antibodies? *TIBTECH* 1992;10:80-4.
- Babcook JS, Kevin E, Olsen OA, Salmon RA, Scharder JWA. A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single isolated lymphocytes producing antibodies of defined specificities. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:7843-8.
- Roehrig JT, Hunt AR, Jhonson AJ, Hawkes EA. Synthetic peptides derived from the deduced amino acid sequence of the glycoprotein of Murray Valley encephalitis virus elicit antiviral antibody. *Virology* 1989;171:49-60.
- Roehrig JT, Jhonson AJ, Hunt AR, Bohn RA, Chu MC. Antibodies to dengue 2 virus glycoprotein synthetic peptides identify antigenic conformation. *Virology* 1990;77:668-75.
- Megret F, Hugnot JP, Young P, Regenmortel HV van, Deubel V. Use of recombinant fusion proteins and monoclonal antibodies to define linear and discontinuous antigenic sites on the dengue virus envelope glycoprotein. *Virology* 1992;187:1-12.
- Hiramatsu K, Tadano M, Men R, Lai CJ. Mutational analysis of neutralization epitope on the dengue type 2 virus (Den 2) envelope protein. Monoclonal antibodies resistant D2/D4 chimera exhibit reduced mouse neurovirulence. *Virology* 1996;224:437-45.
- Logis M, Dalgarno L, Schlesinger JJ, Weir RC. Location of a neutralization determinant in the E protein of yellow fever virus (17D vaccine strain). *Virology* 1987;161:474-8.
- American Type Cell Collection. Catalogue of cell lines and hybridomas. 7<sup>th</sup> ed. Maryland: ATCC, 1992:10.
- Castillo C, Morier D, Soler M, Guzmán MG, González Z. Obtención de células de riñón de perro *Beagle puppie* (RPB-1) y establecimiento de un banco criopreservado. *Rev Cubana Med Trop* 1995;47:3:199.
- Brandt WE, Cardiff RD, Russell PK. Dengue virions and antigens in brain and serum of infected mice. *J Virol* 1970;6:500-6.
- Pupo M, Rodríguez H, Vázquez S, Vilaseca JC, Alvarez M, Otero A, *et al*. Monoclonal antibodies raised to the dengue-2 virus (Cuban: A<sub>15</sub> strain) which recognize viral structural protein. *Hybridoma* 1997;16(4):347-53.
- American Type Cell Collection. Catalogue of cell lines and hybridomas. 7<sup>th</sup> ed. Maryland: ATCC, 1992:149.
- Fazekas de St Groth S, Scherdergen D. Production monoclonal antibodies: strategies and tactics. *J Immunol Methods* 1980;35:1-21.
- Hermida C, Pupo M, Guzmán MG, González M, Marcet R. Empleo de un monoclonal anti-complejo dengue en la purificación viral. *Rev Cubana Med Trop* 1992;44:171-6.
- Sariol C, Muné M. Process for the expression of genes of the dengue viruses. Publication date 1998 06 04. Request patent W0823754A 19980604.
- Clark DH, Casals J. Techniques for haemagglutination and haemagglutination inhibition with arthropod borne viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1958;7:561-73.
- Morens DH, Halstead S. Simplified plaque reduction. Neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK 21 cells. Comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. *J Clin Microbiol* 1985;22:250-4.
- Casey HL. Standardized diagnostic complement fixation method and adaption to microtest. Washington, DC: OPS, 1965 (Public health Monograph. No.74).
- Oropeza S, Morier L, Vázquez S, Goyenechea A, Valdivia A, Hernández B, *et al*. Caracterización de los virus influenza por el método de la inmunoperoxidasa utilizando anticuerpos monoclonales, montaje y validación. *Rev Cubana Med Trop* 1996;48(3):149-55.
- Heinz FX, Roehrig JT. Immunochemistry of viruses. En: Regenmortel MHV van; Neurath AR, eds. *The basis for serodiagnosis and vaccines*. Amsterdam: Elsevier Science Biochemical Division, 1990;vol 2:289-305.
- Henchal EA, Putnak JR. The dengue virus. En: Regenmortel MHV van Neurath AR, eds. *The basis for serodiagnosis and vaccines*. Amsterdam: Elsevier Science Biochemical Division, 1990;vol 2:289-305.
- Schlesinger JJ, Brandiss MW, Monath TP. Monoclonal antibodies distinguish between wild and vaccine strains of yellow fever virus by neutralization, hemagglutination inhibition, and immunoprecipitation of the virus envelope protein. *Virology* 1983;125:8-17.
- Roehrig JT. 1986. The use of monoclonal antibodies in the studies of structural proteins of togaviruses and flavivirus. En: Schlesinger S, Schlesinger M, eds. *The Togaviridae and Flaviviridae*. New York: Plenum 1986:251-78.
- Gentry MK, Henchal J, McCown JM, Brandt WE, Dalrymple JM. Identification of distinct antigenic determinants on dengue 2 virus using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 1982;31:548-55.
- Monath TP. Flaviviruses. En: Fields BN, Knipe DM, eds. *Virology*. New York Raven, 1990;1:763-815.
- Mandi CW, Guirakou F, Holzman H. Antigenic structure of flavivirus protein E at the molecular level using tick borne encephalitis as model. *J Virol* 1989;63:564-71.

35. Mason PW, Zogel MV, Semproni AR. The antigenic structure of dengue type 1 virus envelope and NS1 protein expressed in *E. coli*. *J Gen Virol* 1990;71:2107-14.
36. Heinz FX, Mandi C, Berge RR. A topological and functional model of epitopes on the structural glycoprotein synthetic peptides identify antigenic conformation. *Virology* 1983; 126:525-37.
37. Roehrig JT, Jhonson AJ, Hunt AR. Antibodies to dengue 2 Jamaica E glycoprotein synthetic peptides identify antigenic conformation. *Virology* 1990;177:668-75.
38. Bork E, Holm L, Sander C. The immunoglobulin fold: structure classification, sequence pattern and common core. *J Mol Biol* 1994;242:309-12.
39. Lai CJ. Carboxi-terminally truncated dengue virus enveloped glycoproteins expressed on the cell surface and secreted extracellularly exhibit increased immunogenicity in mice. *J Virol* 1991;1400-7.
40. Jan LR, Yan CS, Laraine S. Increased immunogenicity and protective efficacy in outbred and inbred mice strategic C-terminal truncation of Japanese encephalitis virus envelope protein. *Am J Trop Med Hyg* 1993;48:412-23.
41. Deubel V, Kinney RM, Trent DW. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the nonstructural protein of dengue type 2 virus, Jamaica genotype: comparative analysis of the full-length genome. *Virology* 1988;165:234-44.
42. Hiramatsu K, Tadano M, Men R, Lai CJ. Mutational analysis of a neutralization epitope on the dengue type 2 virus (DEN 2) envelope protein: monoclonal antibody resistant Den2/Den4 chimeras exhibit reduced mouse virulence. *Virology* 1996;224:437-45.
43. Roehrig JT, Bolin RA, Kelly RG. Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus Jamaica. *Virology* 1998;246:317-28.

Recibido: 24 de enero del 2000. Aprobado: 21 de marzo del 2000.  
Lic. *Maritza Pupo Antúnez*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba.  
Correo electrónico: mpupo@ipk.sld.cu