

**PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES Y SONDAS  
CONTRA *Marteilia refringens* AISLADA DEL MEJILLON *Mytilus edulis*  
DE LA BRETAÑA FRANCESA.**

Memoria del trabajo desarrollado en la Unite de Recherche Patologie Immunologie et  
Génétique Moleculaire (URPIGM), Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de  
la Mer (IFREMER), La Tremblade, Francia  
18 de marzo de 1991-17 de junio de 1991

José Antonio Fernández Robledo  
Instituto de Investigaciones Marinas-CSIC  
Eduardo Cabello, 6  
36208 Vigo (Pontevedra)  
España

Tfno. 86 23 19 30  
86 23 19 73  
Fax 86 29 27 62



**PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES Y SONDAS  
CONTRA *Marteilia refringens* AISLADA DEL MEJILLON *Mytilus edulis*  
DE LA BRETAÑA FRANCESA.**

Memoria del trabajo desarrollado en la Unite de Recherche Patologie Immunologie et  
Génétique Moleculaire (URPIGM), Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de  
la Mer (IFREMER), La Tremblade, Francia  
18 de marzo de 1991-17 de junio de 1991

José Antonio Fernández Robledo  
Instituto de Investigaciones Marinas-CSIC  
Eduardo Cabello, 6  
36208 Vigo (Pontevedra)  
España

Tfno. 86 23 19 30  
86 23 19 73  
Fax 86 29 27 62

## INDICE

Introducción .....	2
Purificación .....	3
Producción de anticuerpos monoclonales .....	4
Material y métodos .....	4
- Inmunización de los ratones .....	4
- Fusión .....	4
- "Screening" de los hibridomas .....	4
- Clonación .....	5
- Criocongelación y descongelación de los hibridomas .....	5
- Producción de anticuerpos monoclonales .....	5
Resultados .....	5
Clonación del genoma .....	6
Material y métodos .....	6
Clonación .....	6
Minipreparación plasmídica .....	6
"GeneClean" .....	6
Hibridación .....	7
Resultados .....	7
Agradecimientos .....	8
Bibliografía .....	9

## INTRODUCCION

Desde 1968, han sido varias las mortalidades que se han detectado en la ostra plana (*Ostrea edulis*) en Francia, principalmente en la región de Marennes y en la costa atlántica de Bretaña. Conocida en principio como "Maladie des Abers", posteriormente fue denominada "Maladie de la glande digestive" (enfermedad de la glándula digestiva) en referencia a su localización principal en la ostra. El agente etiológico fue descrito superficialmente por COMPS (1970) y HERRBACH (1971), y fueron GRIZEL *et al.* (1974) que estudiaron en detalle el parásito y lo denominaron *Marteilia refringens*, haciendo referencia a los gránulos refringentes que se observan en las preparaciones en fresco. TIGE & RALOUIN (1976) la describen por primera vez en el mejillón atlántico (*Mytilus edulis*), calificándolo de hospedador accidental. En 1976 PERKINS & WOLF describen una nueva especie, *Marteilia sydneyi*, en la ostra de Australia *Crassostrea commercialis*.

En base a diferencias de hospedador y de microscopía electrónica, COMPS *et al.* (1982) describen *Marteilia maurini* en el mejillón del Mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*). AUFRET & PODER (1985) encuentran *Marteilia maurini* en *Mytilus edulis*.

Las diferencias entre *Marteilia refringens* y *Marteilia maurini* se encuentran en los haplosporosomas y en la pared de la espora.

Actualmente se desconoce el ciclo de vida. Se han identificado varias formas, el estado de preesporulación (formas jóvenes) se localiza a nivel del epitelio estomacal. A continuación pasa al epitelio de los túbulos digestivos donde empieza la esporulación por gemaciones internas hasta dar en último término esporoblastos que contienen cuatro esporas tricelulares y varios gránulos refringentes. Los esporoblastos son eliminados al exterior a través del intestino.

La principal actividad de la acuicultura gallega es el cultivo del mejillón. La producción ronda las 200.000 toneladas/año. Por el momento se desconoce que especie es la que afecta al mejillón de nuestras costas. Los niveles de infección de *Marteilia* spp pueden llegar en algunos casos al 46% (Villalba *et al.* 1990) y afecta principalmente a las zonas internas de las rías (Fernández *et al.* 1990), constituyendo un riesgo potencial para la industria del mejillón. A nivel de la ostra, en Francia se observa un resurgimiento de la virulencia y dispersión de *M. refringens*. Estudios epidemiológicos sobre su incidencia en España no indican estas tendencias (ICES, 1990). Estudios inmunológicos y genéticos nos podrán permitir saber si se trata de la misma especie

Dada la importancia de *Marteilia refringens* y *Marteilia maurini* como agentes patógenos de alta virulencia y su presencia en el mejillón cultivado en Galicia, es necesario disponer de uno o varios métodos que permitan distinguir ambos parásitos.

Durante la estancia en el laboratorio de la Tremblade del IFREMER, se ha llevado a cabo la purificación del parásito, la producción de anticuerpos monoclonales y la clonación del genoma.

## PURIFICACION

Tanto para la producción de anticuerpos monoclonales como para la extracción de DNA, son necesarias suspensiones del parásito purificado.

Mediante el examen microscópico de frotis de la glándula digestiva (Kit Hemacolor), se eligieron para la purificación aquellos mejillones (*Mytilus edulis* procedentes de la Bretaña francesa) que presentaban una fuerte parasitación. Las glándulas se homogenizaron en AMFT (agua de mar filtrada (0.22  $\mu$ m) con Tween 80 (5%)) y tamizadas con mallas de nylon de 250 y 75  $\mu$ m. El filtrado resultante se depositó sobre un gradiente de sacarosa (30, 25, 20, 15, 10 y 5%) y se centrifugó a 2500 g durante 30 minutos a 4°C en una Beckman J-5MF/E. Las interfases 15/20, 20/25 y 25/30, que contenían las formas jóvenes se reunieron y se congelaron a -20°C. El sedimento con esporoblastos se resuspendió en AMFT y se depositó sobre un gradiente de Percoll (60, 50, 40, 30 y 20%). Después de la centrifugación a 2500 g durante 30 minutos a 4°C, las interfases 30/40 y principalmente la 20/30, se recogieron y se mezclaron con igual volumen de AMF (agua de mar filtrada) para a continuación depositarse sobre un lecho de sacarosa 20% en AMF y así eliminar los restos de Percoll. La centrifugación se realizó en las mismas condiciones anteriores durante 3 minutos. El sedimento resultante contenía esporoblastos de *Marteilia refringens* prácticamente puro.

A partir de 63 glándulas digestivas con un peso medio de 216,19 mg/glándula, se obtuvieron 832 millones de esporoblastos. Es decir unos 13 millones/mejillón o lo que es lo mismo 61 millones/g glándula digestiva.

## PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los anticuerpos monoclonales (MAB) han sido ya utilizados para distinguir parásitos morfológicamente similares. Mialhe *et al.* (1988) encuentran diferencias entre *Bonamia* de Europa y Nueva Zelanda utilizando MAB y policlonales.

Nosotros hemos producido anticuerpos monoclonales para poder distinguir *Marteilia* aislada de distintos hospedadores (*Ostrea edulis*, *Crassostrea commercialis*, *Crassostrea gigas*, *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*) y de distintos países (Francia, España, Australia).

### MATERIAL Y METODOS

Para la producción de los anticuerpos monoclonales se siguió la técnica descrita por Köhler & Milstein (1975) que consiste en la fusión de linfocitos y mielomas de ratón (figuras 1 y 2).

#### Inmunización de los ratones

Los anticuerpos monoclonales se prepararon tanto contra formas jóvenes como contra esporoblastos. Las tres primeras dosis de inmunización se prepararon a partir de dos glándulas digestivas fuertemente parasitadas. Estas se trituraron en AMF, se pasaron por un tamiz de 75  $\mu\text{m}$  y el filtrado resultante se centrifugó a 2500 g durante 20 minutos a 4°C. El sedimento se resuspendió en 1,5 ml de AMF y 1,5 ml de agua destilada y se almacenó a -20°C. Se inmunizaron cuatro ratones Balb/c a los días 1, 4 y 6 con 400  $\mu\text{l}$  de suspensión. 15 días después de la última dosis se extrajo sangre de cada ratón, el suero se limpió por centrifugación con un extracto de mejillón sin parásito y se estimó por IIFA "Indirect Immunofluorescence Assays" el desarrollo de anticuerpos contra *Marteilia*. Los dos ratones que presentaban la mejor respuesta se seleccionaron para la fusión. Tres días antes de la fusión se realizó una última inmunización, esta vez con 350  $\mu\text{l}$  de formas jóvenes purificadas.

#### Fusión

El 15/05/91 se llevó a cabo la doble fusión. Las células del bazo se mezclaron con células del mieloma 8-azaguanina resistente (P3-NS1/1-Ag4-1); para la fusión se utilizó polietilenglicol según el protocolo de BOULO (1989). Las células fusionadas se seleccionaron en medio HAT (hipoxantina, aminopteridina, timidina) y se repartieron en placas de 96 pocillos a razón de 100.000 células/pocillo (5 placas), 50.000 células/pocillo (25 placas) y 25.000 células/pocillo (10 placas).

#### "Screening" de los hibridomas

Diez días después de la fusión se llevó a cabo el "Screening" con el sobrenadante de aquellos hibridomas que habían crecido. Para ello se utilizaron portas con *Marteilia* purificada y fijada con acetona (5 minutos).

Los hibridomas que con IIFA presentaban una mejor respuesta se seleccionaron para la clonación.

## Clonación

La clonación se realizó según la técnica de la dilución límite. Las células de cada hibridoma, comprendidas entre 0.6 y 1 millón/ml se diluyeron (5 células/ml) y distribuyeron a razón de 200  $\mu$ l/pocillo. Después de dos semanas de cultivo, la especificidad frente a *Marteilia* se comprobó utilizando IIFA. Los clones productores de anticuerpos específicos se cultivaron sucesivamente en volúmenes cada vez mayores a fin de disponer de suficiente número de células, por una parte para congelar y por otra, para inocular a los ratones y producir anticuerpos monoclonales.

## Criocongelación y descongelación de los hibridomas

Los hibridomas cultivados en frascos de 45 ml se centrifugaron y el sobrenadante, rico en anticuerpos se almacenó a -20°C. El sedimento se resuspendió en suero de ternera con DMSO (7.5%), se contó el número de células con Azul de Tripán y se repartió a razón de 3-4 millones de células/ampolla. Las ampollas se mantuvieron a -80° C durante 48 horas, transcurridas las cuales se almacenaron en nitrógeno líquido (-196° C).

La descongelación de los hibridomas se hizo rápidamente a 37°C. La suspensión de células se puso en medio de cultivo y se centrifugó para eliminar el DMSO. El sedimento de células se resuspendió nuevamente en el medio de cultivo.

## Producción de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales se produjeron en ratones por la inoculación de los hibridomas en el peritoneo. 15 días antes se les inyectó pristane que tiene por misión inducir la formación de una ascitis en vez de un tumor sólido. Las soluciones de anticuerpos se recogieron por punción intraperitoneal 2 o 3 semanas después de la inyección de los hibridomas.

## RESULTADOS

Se obtuvieron anticuerpos policlonales (los sueros de los animales inmunizados) contra *Marteilia refringens* aislada de *Mytilus edulis* procedente de la Bretaña francesa.

En el momento de finalizar la beca tenemos siete anticuerpos monoclonales contra formas jóvenes y esporangios de *Marteilia refringens*.

## CLONACION DEL GENOMA

La genética de *Marteilia* es completamente desconocida. Como una primera aproximación en su estudio se clonó el DNA y se ensayaron distintos fragmentos para su posible utilización en el futuro como sondas para el diagnóstico rápido, así como para comparar DNA de *Marteilia* aislada en diferentes países.

### MATERIAL Y METODOS

#### Extracción de Acidos Nucleicos

Los ácidos nucleicos se extrajeron utilizando el protocolo de SAMBROOK *et al.* (1989). El parásito purificado se resuspendió en 10mM Tris.Cl. 1mM EDTA (pH=8) (TE) con la adición de 0.5% SDS y proteinasa K (20µl/ml) y la solución se incubó a 50°C durante 2 horas. Los ácidos nucleicos se extrajeron dos veces con fenol-cloroformo. Se precipitaron primero con etanol 100-Acetato de Sodio y luego con etanol 70; el sedimento se secó en una centrifuga de vacío (Howe Gyrovap) y se almacenó a -80°C. La cuantificación y grado de pureza se estimó en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-Visible UV-260) después de haberlos resuspendido en TE.

#### Clonación

Para la clonación se utilizaron 100-150 ng de DNA. El DNA de *Marteilia refringens* se digirió con los enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* (5 unidades de enzima/µg de DNA) (Boehringer Mannheim Inc., P.O. Box 2284, La Jolla CA.), los fragmentos obtenidos se ligaron en el vector pBluescript II KS (Stratagene) y con los plásmidos obtenidos se transformó *Escherichia coli* XL Blue. Simultáneamente se llevaron a cabo dos clonages, uno con ácidos nucleicos extraídos de esporoblastos y otro con ácidos nucleicos de formas jóvenes. Como control se utilizaron bacterias transformadas con el plásmido sin fragmento. Las bacterias transformadas se crecieron en un medio selectivo que contenía: ampicilina (100 mg/l), tetraciclina (12.5 mg/l), IPTG (isopropil-β-tiogalactopirano, 47.6 mg/l) y X-galactosa (80 mg/l).

#### Minipreparación plasmídica

De las bacterias recombinantes (colonias incoloras) se extrajeron los plásmidos utilizando el protocolo de SAMBROOK *et al.* (1989) y se digirieron con los mismos enzimas de restricción utilizados en la clonación. Mediante electroforesis en gel de agarosa (1%) y después de teñirlo con Bromuro de Etidio se verificó, por comparación con un marcador de talla de 1 kb (Kilobases) (Bethesda Research Laboratories, 95051, Cergy Pontoise, Cedex France), el tamaño relativo de los fragmentos clonados

#### "GeneClean"

Por cuestiones de tiempo se seleccionaron tres sondas para verificar su especificidad. Previa digestión con *EcoRI* y *HindIII*, el DNA vector y el fragmento se separaron por electroforesis en gel de agarosa (1.5%), se tiñeron con Bromuro de Etidio y la porción de gel que contenía las bandas fue cortada con un bisturí. El DNA se purificó utilizando el Kit GeneClean Bio 101 Inc. P.O. Box 2284, La Jolla CA.

## Hibridación

La especificidad y sensibilidad de las sondas se comprobó utilizando el método de "dot blot" en membranas de nylon (Hybond N+; Amersham) y el Amersham ECL labelling kit (RPN 2101). Se desnaturalizó el DNA y después de una serie de reacciones en cadena que implican a la peroxidasa y al luminolse, liberó luz que se detectó en un film autoradiográfico de alta sensibilidad (Hyperfilm ECL; Amersham).

Las sondas se ensayaron frente a DNA de *Marteilia refringens*, del vector recombinante, del vector no recombinante, de *Mytilus edulis* y de *Escherichia coli*, que se depositaron con anterioridad en la membrana a distintas concentraciones y utilizando una bomba de vacío (tabla I). Para fijarlas a la membrana se utilizó el calor (80°C/1h).

## RESULTADOS

Debida a la excesiva concentración de ácidos nucleicos, se realizó una dilución 1/10 para obtener la curva de absorción característica de los ácidos nucleicos (figura 3. a y b). La concentración de éstos (DNA y RNA) se calculó después de restar la absorbancia debida a las proteínas (DO<sub>350nm</sub>) de la debida a los propios ácidos nucleicos (DO<sub>260nm</sub>).

Una unidad de DO equivale a 50 µg de ácidos nucleicos/ml. La pureza se calculó utilizando la expresión DO<sub>260nm</sub>/DO<sub>280nm</sub>.

Después del clonaje del DNA de formas jóvenes obtuvimos 931 recombinantes y en el caso de los esporoblastos 147.

De las dos sondas ensayadas mediante "dot blot" (figura 4, a y b), la 33 con 1000-1600 pb (pares de bases) y la 22 con 2000-3000 pb, solamente esta última hibridó específicamente con el DNA de *Marteilia* y con el control positivo (plásmido con el fragmento). Así mismo presentó una hibridación con 100 ng del control negativo (plásmido sin fragmento) que se considera insignificante.

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento, en primer lugar al INSTITUTO DE INVESTIGACIONES MARINAS-CSIC (Departamento de Patología de Organismos Marinos) donde estoy realizando la tesis, a la DIPUTACION PROVINCIAL DE PONTEVEDRA, a CAIXA GALICIA, que mediante la OBRA SOCIAL y por medio de las "Becas para la Formación de Personal Investigador en Francia" ha contribuido enormemente a mi formación. Gracias a IFREMER (La Tremblade) por recibirme y, que a través de la URPIGM (Unite de Recherche Patologie Immunologie et Génétique Moleculaire) me ha permitido dar mis primeros pasos en el campo de la biología molecular. Merci, a bien tôt.

## BIBLIOGRAFIA

- Auffret, M. & Poder, M. 1985. Recherches sur *Marteilia maurini*, parasite due *Mytilus edulis* sur les côtes de Bretagne nord. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, **47**, 105-109.
- Boulo, V. 1989. Preparation d'anticorps polyclonaux et monoclonaux spécifiques de *Bonamia ostreae* (Ascetospora) et mise au point d'immunodosages. Applications taxonomiques et epidemiologiques. These pour l'obtention du Diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, Ministère de l'Education Nationale. Ecole Pratique des Hautes Etudes, Sciences de la Vie et de la Terre.
- Comps, M. 1970. Observations relatives à l'affection branchiale des huitres portugaises (*Crassostrea angulata* Lmk). *Revue Trav. Inst. (scient. tech) Pêch. marit.*, **33**, 151-160.
- Comps, M.; Pichot, Y. & Papagianni. 1982. Recherche sur *Marteilia maurini*, N. SP. parasite de la moule *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, **45**, 211-214.
- Fernández, J.A.; A. J. Figueras; M. M. Santarem & J. R. Caldas. 1990. Comparación de la carga parasitaria y enfermedades del mejillón de dos zonas de la Ría de Vigo. *Actas III Congreso Naci. de Acuicult.*. 909-912.
- Grizel, H.; Comps, M.; Bonami, J.-R.; Cousserans, F.; Duthoit, J.L. & Le Penneç, M.A. 1974. Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linné. *Science et Peche, Bull. Inst. Pêch. marit.*, **240**, 7-36.
- Herrvach, B. 1971. Sur une affection parasitaire de la glande digestive de l'huitre plate, *Ostrea edulis* Linné. *Revue Trav. Inst. (scient. tech) Pêch. marit* **35**, 79-87.
- Khôler, G. & Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature (London)*. **256**, 495-497.
- Mialhe, E.; Boulo, V. & Grizel, H. 1988. Monoclonal Antibodies: A tool for Molluscan Pathology. *American Fisheries Society Special Publication* **18**, 304-310
- Mialhe, E.; Bachère, E.; Chagot, D. & Grizel, H. 1988. Isolation and purification of the protozoan *Bonamia ostreae* (Pichot et al., 1980), a parasite affecting the flat oyster *Ostrea edulis* L. *Aquaculture* **71**, 293-299.
- Perkins, F. O. & Wolf, P. H. 1976. Fine structure of *Marteilia sydneyi* SP. N-haplosporidan pathogen of Australian oysters. *J. Parasitol.*, **4**, 528-538.
- Tige, G. & Rabouin, M.A. (1976). Etude d'un lot de moules transférées dans un centre touché par l'épizootie affectant l'huitre plate *Int. Counc. Explor. Sea, Shellf. Benthos Comm.*, C.M. 1976/K12.
- Villalba, A.; M. Carmen López, Susana G. Mourelle & M. Jesús Carballal. 1990. Assessment of the effects of the infection by *Marteilia* sp. on the reproduction of mussels, *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in estuaries of Galicia (NW of Spain). *4th Internat. Colloq Pathol. Marine Aquacul.* 17-21 Sept. 90 Vigo (Pontevedra) Spain. 74-75.

Tabla I.- Orden y concentraciones de DNA en el "dot blot". P(+).- Plásmido con inserto.  
P(-) .- Plásmido sin inserto.

<i>Marteilia refringens</i> 1 2.0 $\mu$ g	<i>Marteilia refringens</i> 2 1.5 $\mu$ g	<i>Marteilia refringens</i> 3 1.0 $\mu$ g	<i>Marteilia refringens</i> 4 0.5 $\mu$ g	<i>Marteilia refringens</i> 5 0.25 $\mu$ g
P(+) 1 10ng	P(+) 2 1ng	P(+) 3 100pg	P(+) 4 10pg	SSC20X
P(-) 1 100ng	P(-) 2 10ng	P(-) 3 1ng	P(-) 4 100pg	P(-) 5 10pg
<i>Mytilus edulis</i> 1 1.5 $\mu$ g	<i>Mytilus edulis</i> 2 0.5 $\mu$ g	SSC20X	<i>Escherichia coli</i> 1 100ng	<i>Escherichia coli</i> 2 10ng

MONOCLONAL ANTIBODY TECHNOLOGY

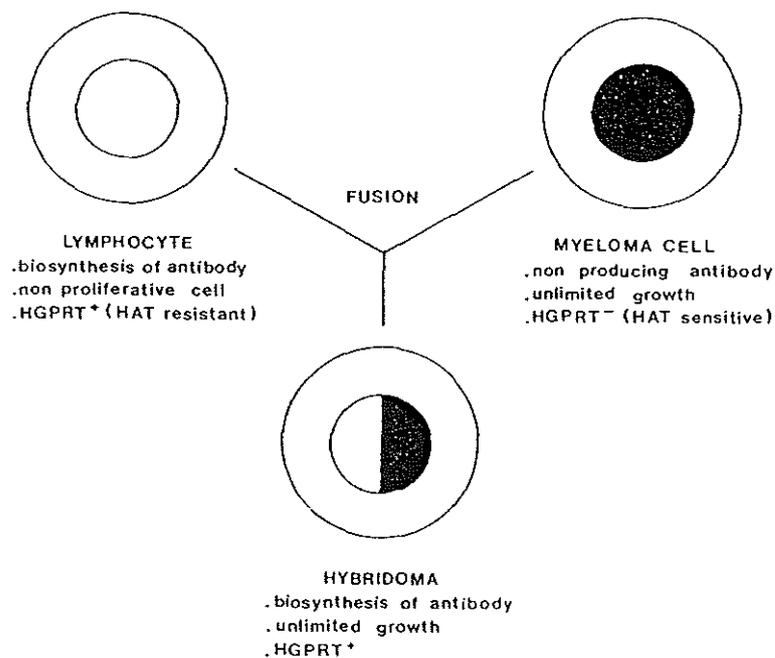


Figura 1.- Principio de la preparación de los hibridomas. HGPRT = hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa. HAT = hipoxantina aminopteridina timidina Mialhe *et al* (1988).

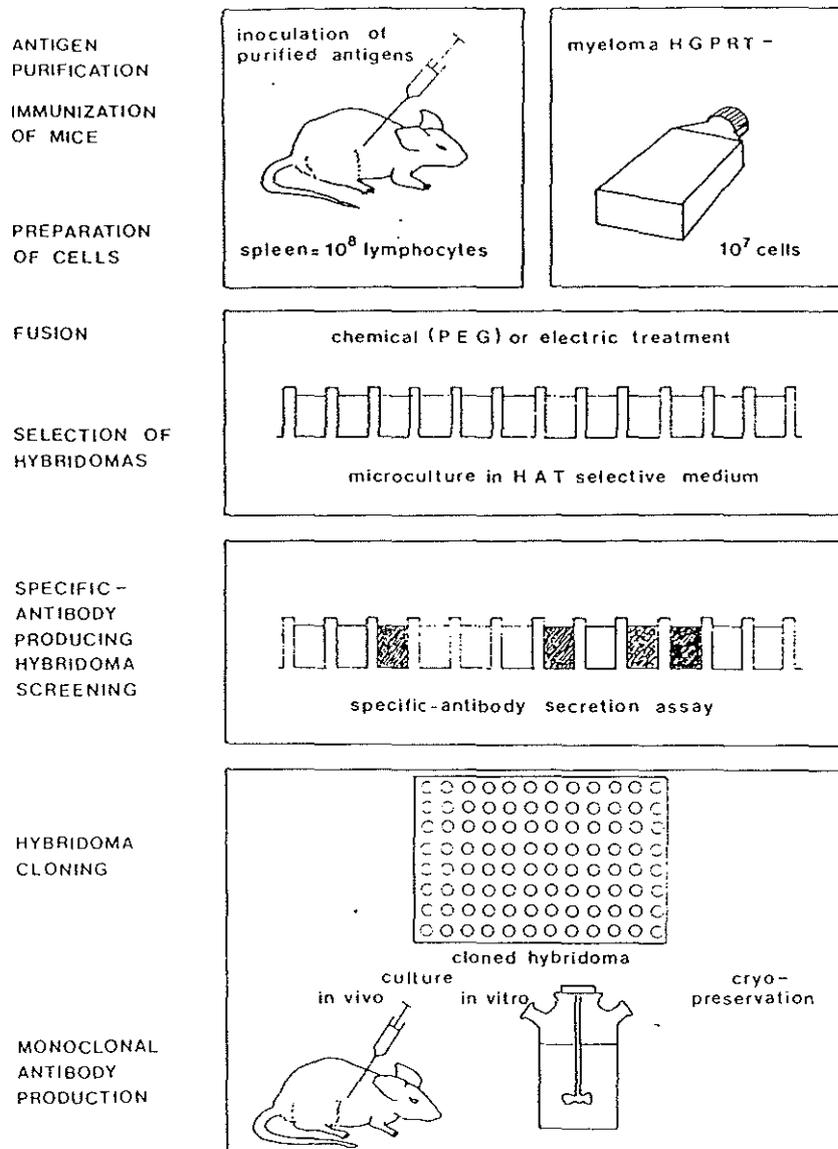


Figura 2.- Pasos en la producción de los hibridomas. HGPRT = hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa. HAT = hipoxantina aminopteridina timidina. PEG.- Polietilenglicol Mialhe *et al* (1988).

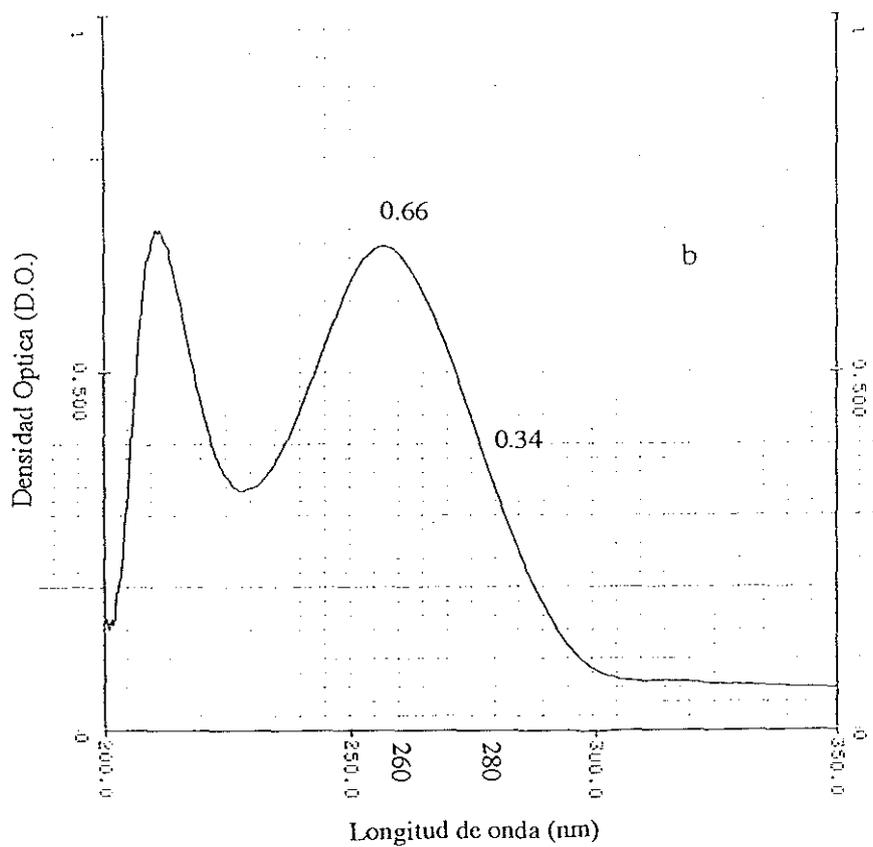
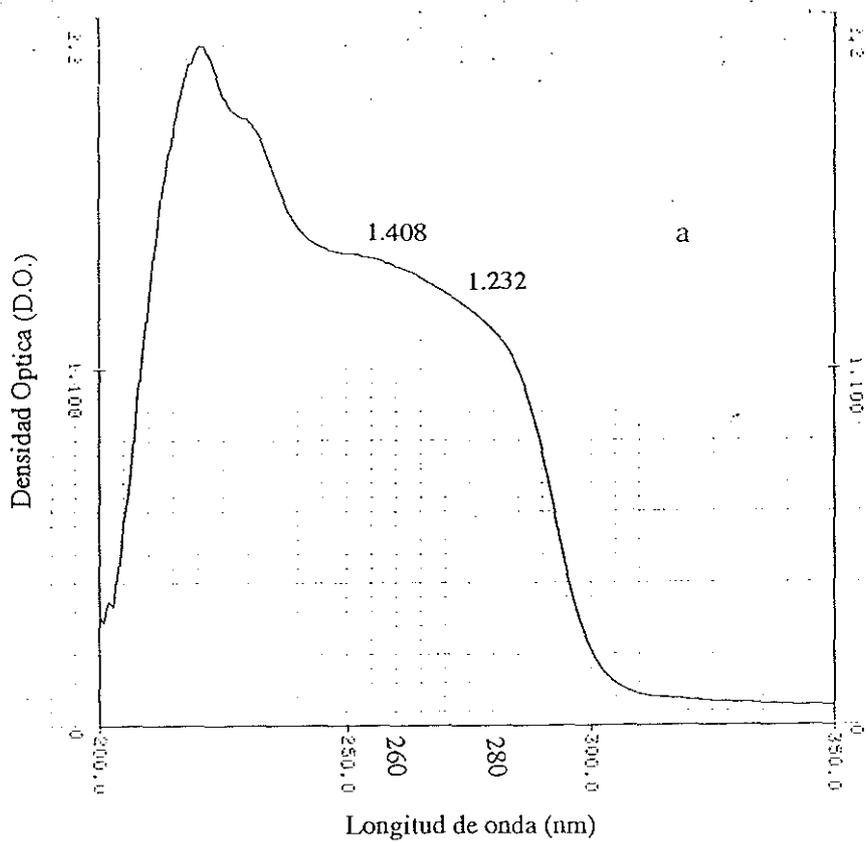
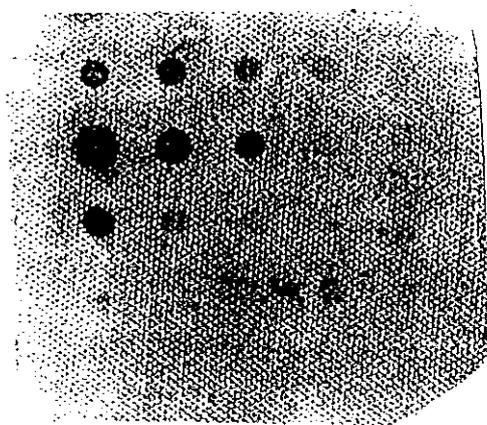
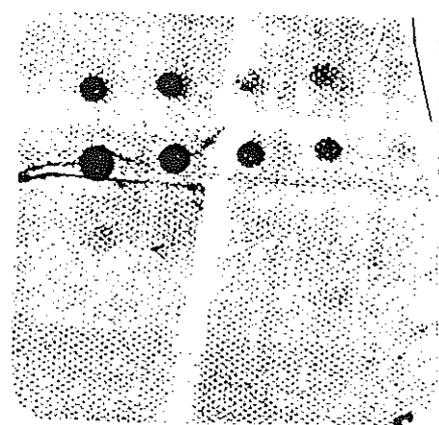


Figura 3.- Absorbancia de los ácidos nucleicos purificados de *Martellia refringens*  
 a.- concentración inicial, b.- después de la dilución 1/10.



a



b

Figura 4.- Resultado del "dot blot" a.- Sonda 33. b.- Sonda 22.