

PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE gE (gI) DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY (PSEUDORRABIA) EN UN SISTEMA DE BACULOVIRUS

Espinosa GME³, Gayosso VAL³, Aguilar SA¹, Ramírez MH², Alonso MRA³

¹Departamento de Inmunología Hospital de Pediatría Siglo XXI-IMSS, ²DPAC-FMVZ-UNAM,

³Laboratorio de Genética Molecular FMVZ-UNAM. marioespigon@yahoo.com.mx

Introducción.

La enfermedad de Aujeszky (EA) es un padecimiento altamente contagioso que se caracteriza por presentar signos respiratorios, nerviosos y reproductivos. Provoca la muerte en los animales jóvenes, puede ser inaparente en animales adultos.

Características del virus.

El VEA pertenece a la subfamilia *Alphaherpesvirinae* de la familia *Herpesviridae*. El genoma consiste de una doble cadena lineal de ADN de aproximadamente 150 Kb. La secuencia completa no ha sido determinada, principalmente por su alto contenido de nucleótidos G-C de 73%. Sin embargo, ya se tiene el 90% de la secuencia.

Baculovirus.

En los últimos años, la expresión en baculovirus ha sido una medida muy extendida y efectiva para producir proteínas recombinantes en grandes cantidades. Las modificaciones post-traduccionales de los productos génicos de los virus de insectos tienen una glicosilación, acilación y fosforilación, semejante a la de las células de los mamíferos.

Justificación. La enfermedad de Aujeszky es uno de los padecimientos que más daño causa a la porcicultura nacional. En la actualidad existe la Campaña Nacional para el Control y la Erradicación de la EA (NOM-007-ZOO-1994). En México está autorizado únicamente el uso de vacunas con delección de la proteína gE para diferenciar entre animales vacunados de los expuestos a un virus de campo. La diferenciación serológica, se realiza por ELISA con paquetes comerciales, los cuales, son importados de distintos países lo que encarece la prueba. Las pérdidas por la presencia de la enfermedad, mas el gasto en el diagnóstico, desalienta su uso por dueños y médicos.

Este trabajo propone el producir la gE en un sistema eficiente y de bajo costo en México. Lo cual, pondrá las bases, para desarrollar sistemas de diagnóstico y vacunas fundamentadas en proteínas recombinantes.

Objetivos

- 1) Clonación, y expresión del antígeno gE del virus de Aujeszky en el sistema BAC TO BAC
- 2) Caracterización del Antígeno gE Recombinante (gER).

Material y Métodos

Clonación y expresión del antígeno gE del VEA en un sistema de baculovirus. El gene que codifica para el antígeno gE fue amplificado a partir del ADN viral por PCR. Se utilizaron iniciadores específicos diseñados a partir de la secuencia reportada en el genebank (Numero de acceso M14336). El segmento amplificado (1,741 pares de bases) se introdujo en el vector pFastBacHTa/*Bam* HIFAC y fueron seleccionadas clonas con el inserto correctamente orientado (por secuenciación y PCR). Las clonas correctamente orientadas, se transformaron en células competentes DH10Bac, de estas, se obtuvo el báculo recombinante que se utilizó para transfectar células de insecto Sf9 con CellFECTIN (Gibco BRL). A partir de las células transfectadas se obtuvo el baculovirus recombinante, el cual, se utilizó en cultivos para producir la proteína recombinante.



Caracterización de gER. Se evaluó el peso molecular y la especificidad de este antígeno recombinante por electroforesis, en geles de poliacrilamida-SDS, utilizando: a) extractos de cultivos Sf9-BAC-gER, y b) el virus de Aujeszky. Los geles, fueron transferidos a membranas de nylon y se expusieron a diferentes

sueros de cerdos: a) libres de la enfermedad, b) vacunados vs EA, y c) expuestos al VEA de campo. La membrana, fue revelada en ensayos tipo western-blot. De igual forma, la gER y los sueros de cerdos se ensayaron por inmunodifusión en gel.

Resultados

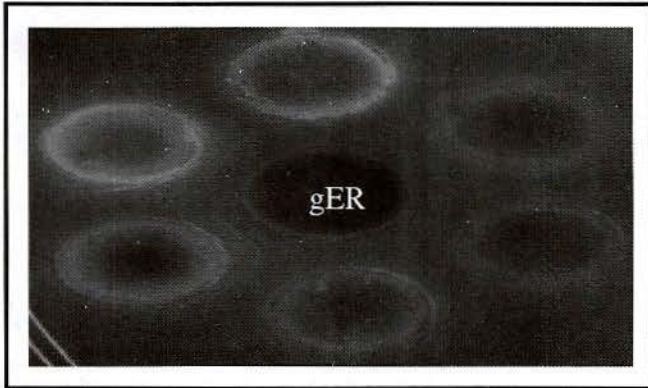
Los métodos de clonación y expresión del antígeno gE utilizando el sistema BAC TO BAC demuestran que la gER, obtenida de cultivos de células de insecto, posee propiedades antigénicas idóneas para ser utilizada en distintos métodos de diagnóstico.

Discusión-Conclusión.

En este trabajo, expresamos el gen de la gE del VEA en un baculovirus recombinante, demostrando que la antigenicidad de la gER, es específica, con los métodos convencionales de identificación (anticuerpos monoclonales y policlonales). Así mismo, corroboramos que el sistema BAC TO BAC es un método de producción eficiente y de bajo costo para producir otras proteínas de importancia veterinaria, y ser utilizado en la elaboración de futuros paquetes de diagnóstico y vacunas marcadoras en México.

Implicaciones.

Con este trabajo, aportamos una vía, para solventar los problemas de importación y sobre todo de costo-beneficio para laboratorios, granjas y médicos dedicados a la salud y producción porcina.



Confrontación de la gER con sueros de cerdos, por inmunodifusión en gel.