

SELECCIÓN DE MIMOTOPOS DE LA PROTEÍNA N DEL VIRUS DE PRRS

Villa MA^{1*}, Huerta CR¹, Vázquez FF¹, Méndez MM¹, Martínez GR¹, Méndez PN¹
 Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México
 abel.villa@gmail.com

Introducción

El virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (VPRRS) es el agente causante del PRRS, el cual es antigénicamente y genéticamente heterogéneo¹. Para el diagnóstico del virus de PRRS se han utilizado ampliamente pruebas como ELISA y PCR. La proteína N del PRRSV es la más abundante e inmunogénica del virión, ha sido utilizada extensamente en ELISA para detectar anticuerpos en suero². La tecnología de fagos filamentosos es una herramienta útil para seleccionar péptidos o proteínas con una alta afinidad y especificidad a casi cualquier blanco molecular de interés³. El objetivo de este estudio fue seleccionar fagos filamentosos para el diagnóstico del virus de PRRS.

Materiales y Métodos

Una biblioteca combinatoria de despliegue en fagos está basada en colecciones de partículas de bacteriófagos que expresan o “despliegan” aleatoriamente secuencias de péptidos en su superficie, como producto de fusión con una de las proteínas que cubren al fago. Se utilizó una biblioteca combinatoria para seleccionar por afinidad mimotopegos de la proteína N del virus de PRRS. Los pozos de una placa de ELISA fueron cubiertos con un anticuerpo monoclonal de la cápside anti-VPRRS (SDOW-17). Para la titulación de los fagos eluidos, éstos fueron adicionados a la cepa de *E. coli* ER2738, las colonias fueron contadas y expresadas como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). Posteriormente, los fagos eluidos fueron amplificados y concentrados utilizando polietilén glicol (PEG) empleando procedimientos estándares. Tres rondas de selección fueron realizadas. Un ELISA de fagos fue utilizado para confirmar la especificidad de las clonas positivas.

Resultados

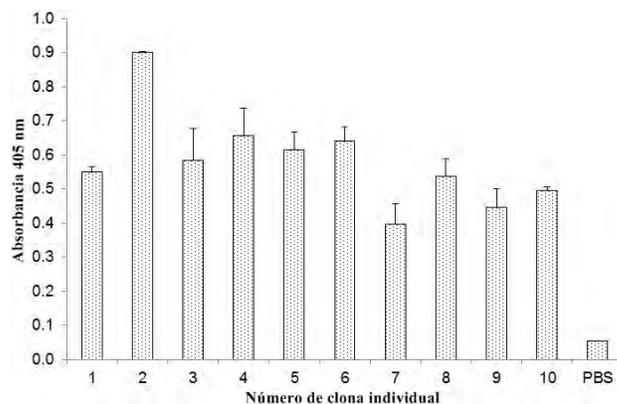
Se utilizó un anticuerpo (SDOW-17) anti-VPRRS para identificar péptidos de una biblioteca combinatoria que mimeticen las características estructurales de la proteína N. Para determinar el efecto del enriquecimiento después de cada ronda de selección, los fagos eluidos fueron titulados; éstos se incrementaron de 3.2×10^6 UFC en la primera ronda a 4.8×10^8 UFC en la tercera ronda (Cuadro 1). Después de tres rondas de selección, 10 clonas fueron picadas al azar, cada clona individual fue amplificada, purificada y titulada. La reactividad de la unión de las clonas a los anticuerpos anti-VPRRS fueron medidas por ELISA (Fig. 1).

Cuadro 1. Enriquecimiento de clonas específicas durante la selección.

Ronda de selección	Fagos		
	Adicionados*	Eluidos*	Recuperados*
1	1.0×10^{11}	3.2×10^6	3.2×10^5
2	1.0×10^{11}	4.1×10^7	4.1×10^4
3	1.0×10^{11}	4.4×10^8	4.4×10^3

*unidades formadoras de colonias

Figura 1. ELISA de sándwich con clonas de fagos seleccionados con un anticuerpo monoclonal (SDOW-17) anti-VPRRS.



Discusión

Las bibliotecas de péptidos aleatorios han sido usados exitosamente para la identificación de péptidos que mimetizan epítopos de antígenos utilizados para diagnóstico y vacunación, los cuales a pesar de su homología con el antígeno natural puede ser utilizado como antígeno en pruebas de ELISA.

Conclusión

De las diez clonas picadas al azar, dos clonas de fagos filamentosos (2 y 4) fueron seleccionados en base a su absorbancia con respecto a los controles negativos, para ser empleadas con fines de diagnóstico de la enfermedad.

Agradecimientos

Proyecto financiado por VIEP-BUAP 2011-2012 (VIMA-NATII-I).

Referencias bibliográficas

1. Kimman et al. (2009). *Vaccine* 27, 3704-3718.
2. Ren et al. (2010). *J Clin Microbiol* 48, 1875-1881.
3. Smith and Petrenko (1997). *Chem Rev* 97, 391-410.