

# **Producción de antígenos recombinantes a partir de proteínas inmunogénicas de Alfaherpesvirus felino 1 para el desarrollo de un test de diagnóstico**

**DAIANA STEPHANIE BIANCHI<sup>1</sup>, SANTIAGO EMANUEL COLINA<sup>1,2</sup>, CARLOS JAVIER PANEI<sup>1,2</sup> Y NADIA ANALÍA FUENTEALBA<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Laboratorio de Virología (LAVIR), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (UNLP). La Plata, Buenos Aires, Argentina

<sup>2</sup> CONICET-CCT La Plata. La Plata, Buenos Aires, Argentina

[bianchids@hotmail.com](mailto:bianchids@hotmail.com)

La infección por Alfaherpesvirus felino 1 (FHV-1) representa aproximadamente la mitad de las infecciones virales felinas de las vías respiratorias superiores diagnosticadas, además es el causante de las lesiones oculares más frecuentes en gatos. Esta virosis es de importancia clínica en todo el mundo, ya que afecta al 95 % de la población felina y, de este porcentaje, el 80 % de los gatos permanece infectado de forma latente. El FHV-1 posee una única molécula de ADN de doble cadena, rodeado por una cápside de simetría icosaédrica. La envoltura viral que rodea la cápside, constituye la capa más externa donde se encuentran localizadas diferentes tipos de glicoproteínas. La glicoproteína D (gD) es una de ellas y es esencial para la replicación viral. Mediante un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) de competencia se detectan en la gD al menos 4 epítopes diferentes. El objetivo de este trabajo fue expresar la

gD de FHV-1 utilizando la levadura metilotrónica *Pichia pastoris* como sistema de expresión. A partir de la secuencia genómica de FHV-1 disponible en GenBank se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar el gen que codifica la gD, sin el extremo C-terminal con la secuencia de anclaje a membrana. Una vez amplificado se clonó en el vector pPIC9, que luego se utilizó para transformar por electroporación la cepa GS115 de *P. pastoris*. Las levaduras recombinantes obtenidas se cultivaron en medio BMGY a 30 °C con agitación de 90 rpm, se centrifugaron a 3000xg durante 5 minutos, y se resuspendió el *pellet* obtenido en medio BMMY. Se logró llevar a cabo la expresión de la gD fusionada al factor de secreción  $\alpha$  de *S. cerevisiae*. La expresión de la gD fue puesta en evidencia mediante SDS-PAGE en una muestra de *pellet* celular a las 48 h de inducción, obteniéndose una banda de aproximadamente 53kDa, que era aproximadamente el tamaño esperado. Posteriormente, se realizó un *immunoblot* en el que la proteína recombinante obtenida fue reconocida por los anticuerpos presentes en el suero policlonal anti-herpesvirus felino utilizado. De esta manera se dispone de una proteína recombinante antigénica para ser utilizada en pruebas diagnósticas

**Palabras clave:** *Pichia pastoris*, herpesvirus felino, gD.