

Aplicación de la Biotecnología en el diagnóstico de la Enfermedad de Aujeszky (EA)

“Desarrollo de un ELISA diferencial basado en la expresión en baculovirus del mayor dominio inmunogénico de la glicoproteína E del virus de la EA”

Serena, M. Soledad; Metz, Germán E.; Corva, Santiago; Mórtola, Eduardo C.; Echeverría M. Gabriela

INTRODUCCION

La Enfermedad de Aujeszky (EA) o Pseudorrabia porcina (PRV) es una enfermedad viral que afecta a muchas especies animales, causada por el Herpesvirus suino 1 (SuHV1) (Lee y Wilson, 1979). El huésped natural es el cerdo, especie en la cual la infección por este virus se manifiesta de diferentes maneras, según se trate de individuos adultos o jóvenes. Mientras que en los primeros causa abortos e infecciones latentes, para los segundos resulta letal (Fondevilla 1982; Lukacs y col. 1985). Las infecciones naturales pueden ocurrir además en bovino, ovejas, perros y gatos, en animales salvajes como rata, ratón y zorro y experimentalmente en muchas especies incluidas las aves (Nara P, 1985). En estos casos, la enfermedad tiene siempre un curso agudo y termina generalmente con la muerte de los individuos afectados (Pianovi C, 1982; Kluge J y col. 1993). El cuadro clínico varía considerablemente según la edad del animal: cuanto más jóvenes más serios son los síntomas y más elevada la mortalidad (Crandell R, 1985; Wittmann G, 1986; Blodd D, y col. 1988). El índice de mortalidad llega al 100% en cerdos de menos de 2 semanas de edad, aproximadamente al 50% en cerdos de 3 semanas y disminuye a valores entre 5-10% en animales de 3-9 semanas de vida y entre 1-2% en animales en las etapas de engorde y terminación (http://www.oie.int/eng/en_index.htm).

Situación de la Enfermedad de Aujeszky a nivel mundial y en la Argentina

La EA fue cobrando cada vez más importancia en todo el mundo, ya que la intensificación de la producción porcina ha favorecido su difusión, provocando considerables pérdidas económicas (Crandell R. 1985; Wittmann G, 1986). En la actualidad, según los datos de la OIE, los países como EE.UU, Canadá, Nueva Zelanda y algunos países del continente Europeo son considerados libres de la EA (http://www.oie.int/eng/en_index.htm). Los esfuerzos para lograr la erradicación incluyeron: matanza selectiva de animales positivos, programas de vacunación con cepas vacunales gE deleteadas, restricción de la importación de cerdos e implementación de medidas sanitarias para la eliminación de animales reservorios como cerdos silvestres.

La presencia de la enfermedad en la Argentina fue notificada en 1978, cuando el virus fue aislado por primera vez (Ambrogi A, y col. 1981). A partir de ese año, los brotes de la enfermedad ocurrieron, primero en las zonas de mayor producción porcina del país, para luego extenderse a otras regiones de menor intensidad de producción. Brotes de gran importancia fueron detectados en los años 1980, 1988 y 1994, y de menor magnitud en otros períodos (Davido M, 1981; Sager R y col. 1984; Echeverría M y col. 1991; Echeverría M y col. 1992; Echeverría M y col. 1994). En los últimos años ha habido un marcado incremento de la cría de cerdos en nuestro país y actualmente existen unos 3.139.326 de cerdos en explotaciones semi-intensivas. Por esta razón y además por las nuevas características de comercialización en el MERCOSUR es que el control y erradicación de esta enfermedad es de especial importancia. La mayoría de los países que componen el MERCOSUR son grandes consumidores de carne de cerdo lo cual abre buenas perspectivas para el aumento de la producción. También es cierto que la integración de los mercados tiende a estandarizar los controles de calidad de los bienes comercializables, lo que se traducirá en políticas conjuntas de erradicación de enfermedades.

Control y erradicación

Las vacunas marcadas gE negativas [gE(-)] son las que se han impuesto a nivel mundial, principalmente por sus características inmunológicas, por los niveles de sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas diferenciales desarrolladas, y por los éxitos conseguidos de su amplia utilización en campo. La seguridad en dichas vacunas está dada por el hecho de que la gE es importante para la neurovirulencia la cual se ve drásticamente reducida cuando la gE es deletada del genoma viral (Kimman T y col. 1992; Jacobs L y col. 1993). Los programas que se llevan a cabo para el control y erradicación de la EA se basan en la utilización de este tipo de vacunas combinada con tests serológicos para detectar anticuerpos contra el gen deletado o mutado permitiendo la diferenciación entre animales naturalmente infectados y vacunados. Cada país adopta su estrategia de erradicación de acuerdo a diversos factores.

En nuestro país desde que se declaró como país libre de Peste Porcina Clásica (PPC), SENASA (Servicio Nacional de Sanidad Animal) se ha abocado a retomar la campaña de control y erradicación de la EA planificada desde 1998 (www.senasa.gov.ar/sanidad/porcinos/porcinos.php). La vigilancia epidemiológica se realiza en base a la sintomatología y a la serología (VN y ELISA), realizada con las muestras extraídas en el marco del Plan Nacional de PPC. Todo animal que presenta sintomatología clínica compatible con la enfermedad o que es positivo a alguna de las pruebas serológicas, es enviado a faena obligatoria. La profilaxis se hace sobre la base de vacunación voluntaria por parte del productor e indicada por un veterinario acreditado en enfermedades de los porcinos utilizando vacunas gI o gE (-), que deben ser importadas debido a la ausencia de la producción en nuestro país (Resolución 510/96 anexo I, colectiva de vacunación 98/98, SENASA). El uso de este tipo de

vacunas y ensayos serológicos específicos de control no tuvo continuidad como consecuencia de los graves problemas económicos ocurridos en 2001-2002.

A nivel mundial, para una correcta individualización de los animales naturalmente infectados se avanzó en estrategias de producción de la gE, o complejo gE/I, más económicas y productivas. Estas estrategias se fundamentan en la tecnología del ADN recombinante y utilizan sistemas eucariotas y procariotas de expresión de proteínas. La producción de antígenos virales recombinantes en células de insectos, por clonado en baculovirus es un método oportuno ya que no presenta las limitaciones de los sistemas bacterianos para la expresión de proteínas. Asimismo, la expresión de diferentes epitopes virales en baculovirus utilizando un sistema presentador de antígenos como es la proteína NS1 del virus de Lengua Azul, ha sido una estrategia exitosa en los últimos años (French y col. 1989; Mikhailov y col., 1996; Monastyrskaya y col. 1995; Urakawa 1988; Ghosh y col. 2002). La proteína NS1 posee la habilidad de formar estructuras tubulares estables altamente inmunogénicas en el interior de las células infectadas. Estos túbulos operan como importantes presentadores de antígenos desencadenando una importante respuesta inmune (Hewat y col. 1992). El mayor sitio antigénico se localiza en el extremo C-terminal de la proteína NS1, el cual es expuesto en la superficie de los túbulos y de esta manera incorporan estructuras antigénicas para ser presentadas al sistema inmune (Mikhailov y col. 1996). Asociado a la función de la glicoproteína gE, estudios realizados demuestran que el sitio antigénico más importante de la proteína está localizado entre el aminoácido 52 y 238, consistiendo en cinco distintos epitopes conformacionales: A (aa 64-73 y 75-84), B (aa 52-67), D (aa 68-82), C y E (aa 78-238). El dominio más inmunogénico está representado por los epitopes A, B y D identificado entre los aminoácidos 52 y 84 (Jacobs y col. 1990; Fuchs y col. 1990; Ro y col. 1995; Ao y col. 2003).

OBJETIVO DEL ESTUDIO

El propósito de este trabajo fue expresar el dominio más inmunogénico de la gE del virus de la EA en baculovirus utilizando la proteína NS1 del virus de Lengua Azul como sistema presentador de antígenos, con la finalidad de obtener una proteína recombinante que pueda ser utilizada como reactivo en un test de ELISA diferencial que permita discriminar animales vacunados de naturalmente infectados.

METODOLOGIA

1- Aislamiento del gen gE

En este trabajo se utilizó la cepa viral autóctona denominada CL15 aislada en nuestro laboratorio en el año 1988 (Echeverría y col. 1994). En el año 1993, se creó una librería genómica de todos los fragmentos del genoma de la cepa

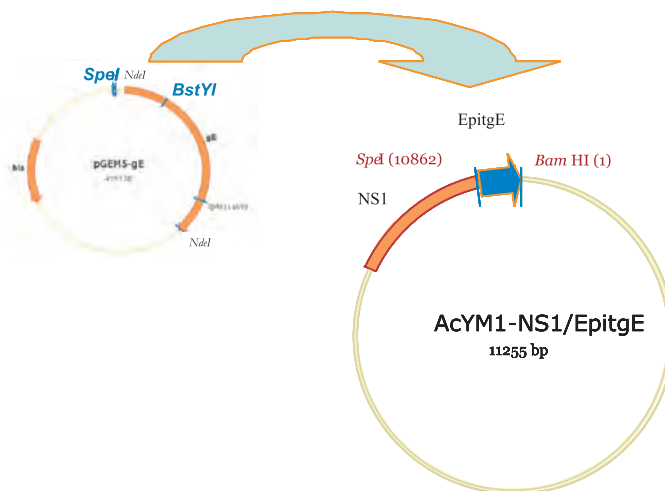
CL15 digeridos con la enzima de restricción *BamHI* en el plásmido pUC19. El fragmento #7 que incluye la secuencia que codifica para la glicoproteína gE, fue seleccionado por migración en geles de agarosa (Norimine y col. 1993).

2- Clonado y secuenciación del gen gE

El gen gE fue extraído por digestión con la enzima de restricción *MseI* del plásmido pUC#7*BamHI* y clonado en el sitio *NdeI* del plásmido pGEM-5Zf(-)-Promega, USA. Para la secuenciación del gen gE se diseñaron 7 primers "forwards" y se realizaron sucesivas rondas de secuenciación. Las secuencias obtenidas, fueron analizadas y solapadas para lograr la secuencia definitiva.

3- Construcción del vector de expresión para el sistema de baculovirus

El fragmento que contiene el dominio más inmunogénico de la proteína gE fue extraído del plásmido pGEM-5Zf(-)-gE por digestión con las enzimas de restricción *SpeI* y *BstYI*, y clonado en el vector de transferencia para baculovirus AcYM1-NS1 (Urakawa 1988), que contiene el gen que codifica para la proteína no estructural NS1 del virus de la Lengua Azul. Para tal fin, el ADN plásmidico del AcYM1-NS1 fue digerido con las enzimas de restricción *SpeI* y *BamHI* (5'-GATC sitio compatible con la enzima *BstYI*). **Figura 1**



4- Generación de los baculovirus recombinante y expresión de la proteína NS1/EpitgE

Para generar los baculovirus recombinantes se co-transfectaron células de insecto Sf9 con el ADN del plásmido AcYM1-NS1/EpitgE purificado y el ADN del baculovirus wild-type -BD BaculoGold Baculovirus DNA-, mediante la técnica

de liposoma catiónico. Los clones positivos fueron seleccionados mediante ensayo en placa. La presencia del fragmento Epi_{tg}E en los clones recombinantes se confirmó por PCR. La expresión de la proteína en cada uno de los clones seleccionados fue analizada por SDS-PAGE.

Para la expresión de la proteína recombinante, células Hi5 fueron infectadas con el baculovirus recombinante a una multiplicidad de infección (MOI) entre 2-5. Las células fueron incubadas a 27 °C durante 72-96 hs. Para un mayor rendimiento, se procedió al cultivo de células en suspensión. La expresión de la proteína recombinante NS1/Epi_{tg}E fue analizada mediante la técnica de SDS-PAGE en geles de poliacrilamida preparados al 10%.

5- Evaluación de la actividad biológica

La actividad biológica de la proteína recombinante NS1/Epi_{tg}E fue analizada por Inmunoblotting (IB) e Inmunofluorescencia indirecta (IFI). En el IB, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa y el bloqueo se realizó con PBS + 0,1% v/v Tween 20 con el agregado de 5% p/v de leche descremada. Como anticuerpos primarios se utilizaron: monoclonal contra gE diluido 1/10 (Dra. Bárbara Klupp, Federal Research Centre for Virus Disease of Animals, Alemania) y anticuerpo policlonal contra NS1 diluido 1/5000 realizado en cobayo (Polly Roy y Eduardo Mórtola, London School of Hygiene and Tropical Medicine, UK). Como anticuerpos secundarios se utilizaron sueros comerciales cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa -SIGMA, USA- diluido 1/1000 y conejo anti-cobayo conjugado con peroxidasa -SIGMA, USA- diluido 1/2000. El revelado se realizó con una solución de diaminobencidina en PBS, con el agregado de agua oxigenada.

Para IFI, monocapas confluentes de células Sf21 y Hi5 cultivadas en cámaras de cultivo (8-chambers culture Slides-BD Falcon, USA-), fueron infectadas con el baculovirus recombinante. Los portaobjetos con las células infectadas fueron incubados a 37°C durante 45min con suero policlonal anti-NS1 diluido en PBS 1/5000, o con anticuerpo monoclonal contra gE diluido en PBS 1/10 como anticuerpos primarios. Luego, las células fueron incubadas con los respectivos anticuerpos secundarios: conejo anti-cobayo conjugado con fluoresceína-SIGMA, USA- y anticuerpo cabra anti-ratón conjugado con fluoresceína-SIGMA, USA, diluidos en PBS 1/2000. La visualización de las células infectadas se realizó en un microscopio de epifluorescencia Olympus System microscope Model BHS-.

6- Microscopía Electrónica

Para verificar la presencia de baculovirus recombinantes y evaluar la presencia de las estructuras tubulares de la proteína NS1, se realizó microscopía electrónica en el Servicio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, en un microscopio electrónico de transmisión Jeol JME 1200 EX II. Se evaluaron

tanto sobrenadante por tinción negativa, como células Hi5 infectadas con el baculovirus recombinante por cortes ultrafinos.

7- ELISA

Preparación del antígeno

La proteína NS1/EpitgE fue purificada por dos ciclos de ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. Para ello, células Hi5 fueron infectadas con el baculovirus recombinante, el sobrenadante fue removido y el pellet celular fue resuspendido en buffer TEN pH 7,5 con el agregado de 1% v/v de Tritón y 0,1% p/v de SDS. El material fue homogeneizado en hielo y centrifugado a 3000rpm durante 5min. El sobrenadante fue recolectado y colocado en un tubo de ultracentrífuga conteniendo un colchón de sacarosa 20-50% p/v en buffer TEN. Se ultracentrifugó a 20000rpm a 4°C durante 1h en una ultracentrífuga Beckman L8-M, rotor SW41Ti. Luego, el pellet formado fue resuspendido en 1ml de buffer TEN pH 7,5 y colocado en un gradiente continuo de sacarosa 20-50-60% p/v en buffer TEN. El material fue ultracentrifugado nuevamente a 30000rpm a 4°C durante 1:30hs.

ELISA NS1/EpitgE

Los 188 sueros porcinos utilizados para el desarrollo de la prueba de ELISA diferencial, fueron obtenidos del banco de sueros de la Cátedra de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP. En primera instancia, los sueros fueron procesados mediante la técnica de VN para ser discriminados en sueros positivos y sueros negativos a EA.

En la prueba de ELISA la proteína recombinante NS1/EpitgE purificada fue utilizada como antígeno. Para titular los reactivos, se realizaron diluciones en base 2 del antígeno desde 1:100 hasta 1:3200 (columna 1 a 6) enfrentándolo con diluciones seriadas desde puro hasta 1:128 (fila A a H) del suero A positivo a SuVH1 por la técnica VN. El mismo procedimiento se realizó utilizando el suero B negativo a SuVH1 por VN. Para la puesta a punto de la técnica el antígeno disuelto en buffer carbonato-bicarbonato fue fijado en la placa durante 24hs a 4°C. El bloqueo se realizó con una solución de 0,1% p/v seroalbúmina bovina-BSA- en PBS durante 1h a 37°C. Posteriormente, las placas se lavaron 5 veces con PBS/0,025% Tween-20, se colocaron 50%l de cada suero problema en la dilución determinada previamente y se incubaron a 37°C durante 1h. Luego de 5 lavados se le incorporó a cada pocillo 50%l de una dilución 1/1000 del anticuerpo conejo anti-cerdo conjugado con peroxidasa-SIGMA-. Por último se agregaron 100 %l del revelador (0,1M ácido cítrico; 0,2M PO_4HNa_2 ; 10%l H_2O_2 30vol; 30mg ABTS (2,2' azino-bis (3ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)), realizándose la lectura transcurridos 20, 30 y 60 min en un lector de multiplacas Titertek Multiskan con filtro de 405nm. Para la determinación del valor de corte de la prueba de ELISA/EpitgE, las mediciones de DO óptica obtenidas fueron analizadas aplicando el método del valor diagnóstico o predictivo. Para ello mediante el programa stata 9.0 se obtuvo un gráfico de pares de sensibilidad

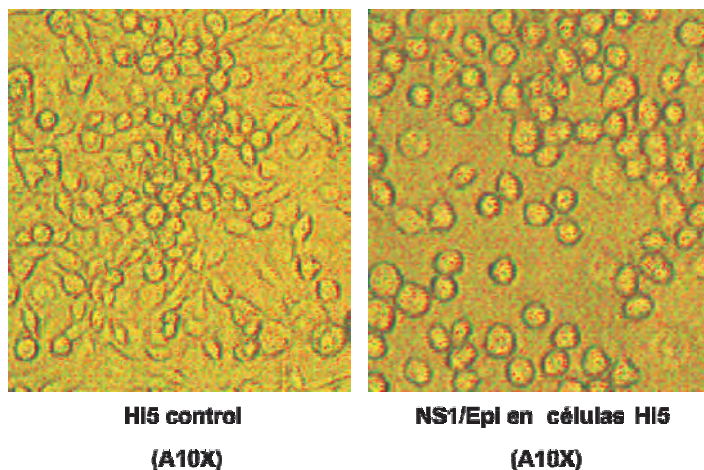
y especificidad para diferentes valores de corte, con lo cual se confeccionó una curva característica operativa del receptor o curva ROC (Receiver Operating Characteristic). Para la selección del valor de corte apropiado se tuvo en cuenta los valores de sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo deseados, en particular, y en relación a los valores óptimos que debe tener la prueba diagnóstica. Las características de la prueba de ELISA/EpitgE en relación a la prueba patrón (“gold standard”), VN, fueron cuantificadas mediante la sensibilidad y la especificidad.

RESULTADOS

El gen que codifica para la proteína gE de la cepa CL15 fue secuenciado y analizado con cepas de referencia de SuVH1 disponibles en el GenBank. De su análisis concluimos que el fragmento analizado corresponde al gen que codifica para la proteína gE ya que muestra un porcentaje de homología de entre un 95-99% con respecto a las cepas de referencia de SuHV1. Posteriormente, la secuencia fue traducida y los epitopes más inmunogénicos fueron identificados en la posición 52 a 84 aa.

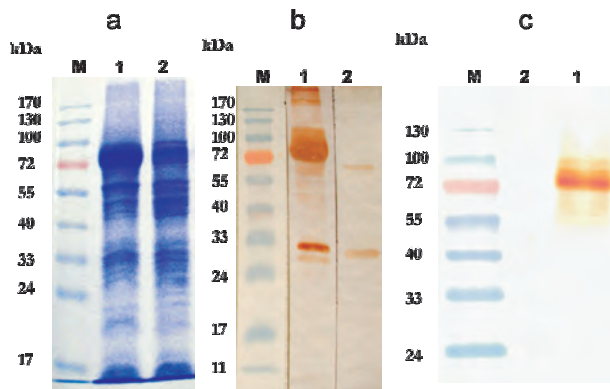
Los clones recombinantes NS1/Epi 2, NS1/Epi 3, NS1/Epi 5 y NS1/Epi 6 fueron utilizados como inóculos para la infección de células Hi5. Luego de 72hs de incubación a 27°C, las células cambiaron la morfología, pasaron de ser triangulares/poliédricas a esféricas y de mayor tamaño. Además, se observó un menor crecimiento celular con respecto a las células sin infectar. **Figura 2**

Figura 2: apariencia de las células de insecto infectadas y no infectadas con el baculovirus recombinante.



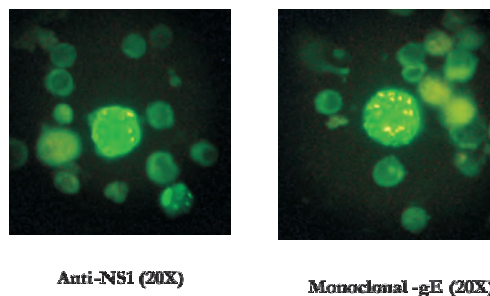
Nuestros resultados demuestran que la proteína NS1 con los epitopes de gE pudo ser expresada en células de insecto con un alto nivel de expresión para todos los clones analizados, con un peso aproximadamente de 72kDa (**Figura 3a**) verificado en geles de poliacrilamida. De acuerdo a la bibliografía, el tamaño de la proteína NS1 es de aproximadamente 60kDa (Urakawa 1988). Posteriormente, la actividad biológica de la proteína recombinante fue analizada por la técnica de IB con el uso de anticuerpo monoclonal contra gE y anticuerpo policlonal anti-NS1. La proteína reaccionó específicamente con cada uno de los anticuerpos utilizados (**Figura 3b y c**).

Figura 3: expresión de la proteína recombinante NS1/EpitgE. M= marcador de peso molecular (prestained) 1= células infectadas y 2= células control (mock) a) SDS-PAGE, b) IB con policlonal anti-NS1 y c) IB con monoclonal anti-gE.



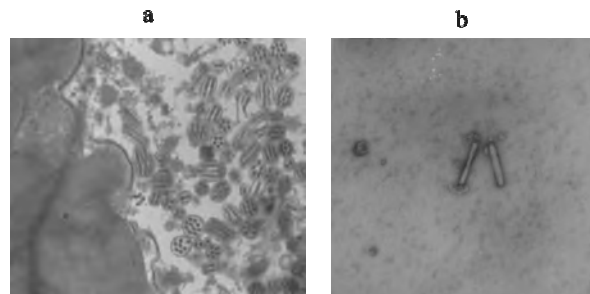
La técnica de IFI realizada en células Hi5 infectadas con el baculovirus recombinante NS1/EpitgE, reveló una fluorescencia específica cuando se utilizaron como anticuerpos primarios: monoclonal contra gE y policlonal anti-NS1. En las células infectadas se observó un color verde fluorescente característico y en el citoplasma se observaron numerosas estructuras de aspecto tubular que representarían a los túbulos de la proteína NS1. **Figura 4**

Figura 4: IFI en células Hi5 infectadas con Clon NS1/Epi 5



La presencia de los túbulos característicos de la proteína NS1 fueron visualizados por microscopía electrónica. En las muestras analizadas en cortes ultrafinos de células Sf21 y Hi5 infectadas con el baculovirus recombinante NS1/EpitgE, se observó en el citoplasma y en el núcleo, la presencia de estructuras tubulares en cortes longitudinales y transversales que se visualizaron como túbulos alargados o estructuras circulares con pequeñas esferas en la periferia (**Figura 5a**), similares a las disposición reportada por otros autores en células infectadas con virus de Lengua Azul (Huismans 1979). Ambos tipos de estructuras se vieron en el núcleo y citoplasma de las células infectadas, no así en las células utilizadas como control. La tinción negativa del sobrenadante de los cultivos celulares reveló la presencia de túbulos correspondientes a la proteína NS1/EpitgE, que se visualizaron en forma aislada o formando grupos de dos, tres o más componentes. **Figura 5b**

Figura 6: microscopía electrónica de células Hi5 infectadas con baculovirus recombinante NS1/EpitgE. a) secciones ultrafinas de células Hi5 infectadas con clon NS1/EpitgE 5. b) tinción negativa de sobrenadante de células Hi5 infectadas con clon NS1/EpitgE 5.



Para el desarrollo del ELISA diferencial, fueron utilizados 188 sueros porcinos. En primera instancia, fueron procesados mediante la técnica de VN para ser discriminados en sueros positivos y sueros negativos a SuHV1. Mediante la titulación de los reactivos en damero, se estableció la dilución de uso del antígeno en 1/800 y la de los sueros problemas en 1/4. A simple vista en cada uno de los pocillos de la placa se observaron distintas tonalidades de color verde que posteriormente fueron cuantificadas en un lector para ELISA con un filtro de 405nm. Para definir el valor de corte de la prueba se tuvo en cuenta el objetivo principal del trabajo, discriminar animales positivos de los naturalmente infectados. Con este propósito se analizaron los valores de sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo obtenidos en la comparación de ambas pruebas. De esta manera se buscó un umbral que determinara un alto valor de especificidad y alto valor predictivo positivo (VPP). Aplicando un valor de corte de 0,7 se logró una especificidad del 97% y un VPP de 95%. **Tabla 2**

	VN positivos	VN negativos	TOTAL
ELISA diferencial positivos	64	3	67
ELISA diferencial negativos	32	89	121
TOTAL	96	92	188

Especificidad 97%
Valor Predictivo Positivo 95%

DISCUSION

Uno de los objetivos principales de este trabajo fue poder producir una proteína viral recombinante de alto valor antigénico, para la aplicación en el diagnóstico serológico de la EA. Para tal fin y en relación a la utilización de vacunas gE negativas combinadas con el uso de pruebas de ELISA diferenciales, como lo establece la Legislación del SENASA, es que se seleccionó una cepa autóctona de SuHV1. El gen completo que codifica para la glicoproteína gE de la cepa CL15 fue secuenciado y analizado con las cepas de referencia de SuVH1 disponibles en el GenBank. La secuencia nucleotídica y aminoácida de la cepa CL15 fue analizada con las secuencias de las cepas de referencia disponibles en la base de datos del GenBank. De su análisis concluimos que el porcentaje de identidad entre ellas fue de 95-99%, lo que indica que la cepa seleccionada, no presenta variaciones ni modificaciones relevantes con respecto a las otras cepas distribuidas en todo el mundo. En este trabajo se logró aislar el fragmento que codifica para el dominio más inmunogénico de gE, el cual fue expresado en baculovirus utilizando un sistema presentador de antígenos que contiene el gen M6 que codifica para la proteína no estructural NS1 del virus de la Lengua Azul, que posee la habilidad de formar estructuras tubulares estables altamente inmunogénicas en el interior de las células infectadas por el virus. Estos túbulos operan como presentadores de antígenos desencadenando una importante respuesta inmune. La capacidad de esta proteína como presentadora de antígenos, fue la base para el desarrollo de vectores de expresión para baculovirus y la utilizan para la expresión de péptidos recombinantes en células de insecto, de numerosos agentes virales (Ghosh y *col.* 2002; Mikhailov y *col.* 1996). El nivel de expresión logrado utilizando este sistema, fue óptimo y cuando la proteína recombinante NS1/EpitgE fue enfrentada en la técnica de IB con anticuerpos policlonales porcinos y un suero policlonal de cobayo anti-NS1, reaccionó específicamente, demostrando su capacidad antigénica de reconocer anticuerpos específicos. Las imágenes obtenidas tras la observación de células infectadas con el baculovirus recombinante, luego de llevarse a cabo la técnica de IFI, reveló la presencia de estructuras características positivas. A su vez, la microscopía electrónica arrojó imágenes de aquellas estructuras tubulares, longitudinales y esféricas, correspondientes a los túbulos constituyentes de la proteína NS1. Se obtuvo

una buena concentración de la proteína purificada en gradiente por ultracentrifugación y así se utilizó como antígeno para el desarrollo de la prueba de ELISA diferencial. Se analizó y verificó la capacidad del antígeno (proteína recombinante NS1/EpitgE) de reaccionar con los diferentes sueros positivos y negativos a SuHV1. Los índices de sensibilidad, especificidad y VPP con la prueba de VN obtenidos muestran que la eficacia de ambas pruebas son comparables. Esto permite que el ELISA desarrollado en este trabajo, al tener una especificidad similar a la prueba estándar (VN) sea de aplicación masiva en laboratorios que no posean una infraestructura sofisticada.

Muchos trabajos internacionales han reportado la expresión de la proteína gE completa (Gut y *col.* 1999; Kimman y *col.* 1996), así como los epitopes inmunogénicos de la gE del SuHV1 en distintos sistemas de expresión (Ao y *col.* 2003; Yong y *col.* 2005). Sin embargo, este es el primer trabajo en el que los epitopes de gE son expresados en un sistema de baculovirus que aumenta la expresión del péptido clonado basándose en la capacidad que tiene la proteína NS1 como presentadora de antígenos.

El éxito de un programa de erradicación para la EA depende fundamentalmente del uso de pruebas serológicas diferenciales suficientemente sensibles y específicos que permiten discriminar animales naturalmente infectados de vacunados. La sensibilidad de estas pruebas podría ser evaluada de distintas maneras, incluyendo la habilidad de detectar una inmunidad humoral temprana a la infección, la capacidad de detectar latencia de cerdos infectados o bien la capacidad de detectar bajos niveles de anticuerpos en cualquier etapa de la infección (Kinker y *col.* 1997). En el presente trabajo fue posible obtener un antígeno, a partir de células de insecto infectadas con baculovirus recombinante, el cual permitirá el desarrollo de una prueba diagnóstica de fabricación propia, capaz de diferenciar animales vacunados de infectados por el virus SuHV1. Los resultados obtenidos utilizando la proteína NS1/EpitgE como antígeno para una prueba diagnóstica de ELISA, son muy alentadores y abren el camino para una futura validación de esta prueba, con la finalidad de optimizar el control y erradicación de esta enfermedad de especial importancia dado el marcado incremento de la cría de cerdos en nuestro país y las actuales características de comercialización. De esto concluimos que el sistema de expresión seleccionado y la estrategia diseñada nos permite, de acuerdo a los resultados, utilizar la proteína recombinante NS1/EpitgE como una proteína antigénica específica y a futuro, planificar inmunógenos responsables de generar respuesta inmune.

En conclusión, los resultados obtenidos revelan la capacidad inmunogénica de nuestra proteína recombinante que incluye el dominio más inmunogénico de la gE del SuHV1, al ser reconocida tanto por anticuerpos monoclonales contra gE, como por sueros policlonales de animales infectados. Este atributo, hace a este antígeno recombinante muy atractivo particularmente para utilizar en pruebas diagnósticas para ser usadas como herramientas en estudios epidemiológicos de la enfermedad.

REFERENCIAS

- Ambrogi A, Giraudo J, Busso J, Bianco B, Bagnat E, Segura de Aramburu M, Ramos B, Ceriatti S. Primer diagnóstico de la Enfermedad de Aujeszky en cerdos en la República Argentina. *Gaceta Vet.* 1981; XLIII: 58-64.
- Ao J, Wnag J, Chen X, Wang X, Long Q. Expression of pseudorabies virus gE epitopes in *Pichia pastoris* and its utilization in an indirect PRV ge-ELISA. *J. Virol. Meth.* 2003; 114: 145-150.
- Banks M. Rapid ELISA for Aujeszky's disease eradication. *Vet. Rec.* 1983; 113: 94-95.
- Ben-Porat T, Kaplan A. Molecular biology of Pseudorabies virus. En: Roizman, B. (ed.): *The Herpesviruses*. Vol III, Plenum Press, New York, 105-173; 1985.
- Bitsch V, Ekildsen M. Complement-dependent neutralization of Aujeszky's disease virus by antibody. En: *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science 17. Aujeszky's Disease*, Wittmann G. & Hall S.A., eds. Martinus Nijhoff, The Hague, The Netherlands, 41; 1982.
- Blood D, Henderson J, Radostits O. *Medicina Veterinaria*. 6ta edición, Editorial Interamericana, México, 898-902: 1988.
- Cheung A, Fang J, Wesley R. Characterization of a Pseudorabies virus that is defective in the early protein 0 and latency genes. *Am. J. Vet. Res.* 1994; 55: 1710-1716.
- Crandell R. Selected Animal Herpesviruses: new concepts and technologies. *Advances in Veterinary Sciences & Comparative Medicine*. 1985; 29: 281-327.
- Davido M. Enfermedad de Aujeszky en el sur de la provincia de Córdoba. *Gaceta Vet.* 1981; 44: 291-296.
- Echeverría M, Nosetto E, Petruccelli M, Gimeno E, Etcheverrigaray M. Ocurrencia y diagnóstico de la Enfermedad de Aujeszky en las zonas de Chañar Ladeado y Saladillo. *Vet. Arg.* 1991; VIII: 252-257.
- Echeverría M, Nosetto E, Etcheverrigaray M, Galosi C, Fonrouge R, Pereyra N, Belak K, Gimeno E. Pseudorabies (Aujeszky's Disease) in Argentina. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 1992; 11: 819-827.
- Echeverría M, Norimine J, Galosi C, Oliva G, Etcheverrigaray M, Nosetto E, Tohya Y, Mikami T. The genotype of Aujeszky's Disease viruses isolated in Argentina. *J. Vet. Med. Sci.* 1994; 56: 985-987.
- Eloit M, Fargeaud D, Vannier P, Toma B. Development of an ELISA to differentiate between animals either vaccinated with or infected by Aujeszky's Disease virus. *Vet. Rec.* 1989; 124: 91-94.
- Fondevilla N. Enfermedad de Aujeszky: etiología, patogénesis y diagnóstico. *Memorias de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Jornadas de Actualización porcina. Enfermedades Infecciosas*, 68-76; 1982.
- French T, Inumaru S, Roy P. Expression of two related nonstructural proteins of bluetongue virus (BTV) type 10 in insect cells by a recombinant baculovirus: production of polyclonal ascitic fluid and characterization of the gene product in BTV-infected BHK cells. *J. Virol.* 1989; 63: 3270-8.

- Fuchs W, Rziha H-J, Lukàcs N, Braunschweiger I, Visser N, Lütticken D, Schreurs C. S, Thiel H-J, Mettenleiter T. Pseudorabies virus glycoprotein gI: *in vitro* and *in vivo* analysis of immunorelevant epitopes. J. Gen. Virol. 1990; 71: 1141-1151.
- Ghosh M, Borca M, Roy P. Virus-derived tubular structure displaying foreign sequences on the surface elicit CD4+ Th cell and protective humoral responses. Virology. 2002; 302: 383-92.
- Gut M, Jacobs L, Tyborowska J, Szewczyk B, Bienkowska-Szewczyk K. A highly specific and sensitive competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on baculovirus expressed pseudorabies virus glycoprotein gE and gI complex. Vet. Microbiol. 1999; 69: 239-249.
- Gut-Winiarska M, Jacobs L, Kerstens H, Bienkowska-Szewczyk K. A highly specific and sensitive sandwich blocking ELISA based on baculovirus expressed pseudorabies virus glycoprotein B. J. Virol. Methods. 2000; 88: 63-71.
- Hewat E, Booth T, Wade R, Roy P. 3-D reconstruction of bluetongue virus tubules using cryoelectron microscopy. J. Struc. Biol. 1992; 108: 35-48.
- Herrmann S, Heppner B, Ludwig H. Pseudorabies virus from clinical outbreaks and latent infections grouped into four major genome types. En: Wittmann G, Gaskell RM, Rziha HJ, editors. Latent Herpesvirus infections in Veterinary Medicine, Current topics in veterinary medicine and animal science, Martinus Nijhoff Publishers, Vol 27: 387-401, Boston, USA; 1984
- Huismans H, Els H. 1979. Characterization of the tubules associated with the replication of three different orbiviruses. Virology. 1979; 92: 397-406.
- Jacobs L, Meloen R, Gielkens A, Van Oirschot J. Epitope analysis of glycoprotein I of pseudorabies virus. J. Gen. Virol. 1990; 71: 881-887.
- Jacobs L, Mulder W, Van Oirschot J, Gielkens AL, Kimman T. Deleting two amino acids in glycoprotein gI of pseudorabies virus decreases virulence and neurotropism for pigs, but does not affect immunogenicity. J. Gen. Virol. 1993; 74: 2201-6.
- Kimman T, Pol J, de Wind N, Oei-Lie N, Berns A, Gielkens A. Role of different genes in the virulence and pathogenesis of Aujeszky's disease virus. Vet. Microbiol. 1992; 33: 45-52.
- Kimman T, de Leeuw O, Kochan G, Szewczyk B, van Rooij E, Jacobs L, Kramps J, Peeters B. An indirect double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using baculovirus expressed antigen for the detection of antibodies to glycoprotein E of pseudorabies virus and comparison of the method with blocking ELISAs. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1996; 3: 167-174.
- Kinker D, Swenson S, Wu L, Zimmerman J. Evaluation of serological tests for the detection of pseudorabies gE antibodies during early infection. Vet. Microbiol. 1997; 55: 99-106.
- Kluge J, Beran G, Hill H, Plantt K. Pseudorabies (Aujeszky's Disease). En: Leman, A. D.; Straw, B. E.; Mengeling, W. L.; D'allaire, S.; Taylor, D. J. (eds.): Diseases of swine. 7a edition, Iowa State University Press, Ames IA, USA, 312-323; 1993.
- Lee Y, Wilson M. A review of Pseudorabies (Aujeszky's Disease) in Pigs. Can. Vet. J. 1979; 20: 65-69.

- Lukacs N, Thiel H, Mettenleiter T, Rziha H. Demonstration of three major species of Pseudorabies virus glycoproteins and identification of a disulfide-linked glycoprotein complex. *J. Virol.* 1985; 53: 166-173.
- Martin S, Wardley R, Donaldson A. Serological response of pigs infected with Aujeszky's Disease virus. *Res. Vet. Sci.* 1983; 35: 227-233.
- Mettenleiter T. Molecular biology of Pseudorabies (Aujeszky's Disease) virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infec. Dis.* 1991; 14: 151-163.
- Mettenleiter T, Lomniczi B, Zsak L, Medveczky I, Ben-Porat T, Kaplan A. Analysis of the factors that affect virulence of pseudorabies virus, p. 3–11. En: J. T. van Oirschot (ed.), *Vaccination and control of Aujeszky's disease*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands; 1989
- Mikhailov M, Monastyrskaya K, Bakker T, Roy P. A new form of particulate single and multiple immunogen delivery system based on recombinant bluetongue virus-derived tubules. *Virology.* 1996; 217: 323-31.
- Moenning V, Woldesenbert P, Fey H, Liess B, Dopotka H, Behrens F. Comparative evaluation of ELISA and neutralization test for the diagnosis of Aujeszky's disease. En: *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science 17. Aujeszky's Disease*, Wittmann G. & Hall S.A., eds. Martinus Nijhoff, The Hague, The Netherlands, 51; 1982.
- Monastyrskaya K, Gould E, Roy P. Characterization and modification of the carboxy-terminal sequences of bluetongue virus type 10 NS1 protein in relation to tubule formation and location of an antigenic epitope in the vicinity of the carboxy terminus of the protein. *J. Virol.* 1995; 69: 2831-41.
- Moras E, Ierace A, Barboni A, Iribarren F, Barcos O, Menchaca E. Segundo aislamiento de Herpes Suis en un brote de la Enfermedad de Aujeszky en caninos de la Provincia de La Pampa. Libro de resúmenes del II Congreso Argentino de Virología; 1986.
- Nara P. Porcine Herpesvirus 1. En: Olsen, R. D. et al (eds.): *Comparative Pathobiology of Viral diseases*. Vol 1, CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA, 89-113; 1985
- Norimine J, Echeverría M.G, Noretto E.O, Etcheverrigaray M.E. The cloning of *BamHI* fragments of Aujeszky's Disease virus (Argentine strain CL-15) DNA. En: *Second Meeting on The Cooperative Research Project in the Area of Veterinary Sciences Between National University of La Plata and Japan International Cooperation Agency UNLP-FCV/-/JICA*. 1993.
- Pensaert M, Morrison R. Challenges of the final strategies of the Aujeszky's disease eradication program. *Vet. Res.* 2000; 31: 141-145.
- Pianovi C. Enfermedad de Aujeszky -epidemiología y control-. *Memorias de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Jornadas de Actualización Porcina. Enfermedades Infecciosas*, 77-84; 1982.
- Pomeranz L, Reynolds A, Hengartner C. Molecular Biology of Pseudorabies Virus: Impact on Neurovirology and Veterinary Medicine. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2005; 462–500.
- Ro L, Hwang W, Chou H, Huang J, Chang E, Yang H. Cloning and expression of an antigenic domain of glycoprotein gE of pseudorabies virus in *Escherichia coli* and its use as antigen in diagnostic assays. *Am. J. Vet. Res.* 1995; 56: 555-561.

- Roizman B, Batterson W. Herpesviruses and their replication En: Fields, B. N. et al (eds.): Virology. Raven Press, New York, 497-526; 1985.
- Sager R, Rossanigo C, Vazquez R, Avila J, Fondevila N. Enfermedad de Aujeszky en cerdos en Villa Mercedes (San Luis) Argentina. Rev. Med. Vet. 1984; 65: 86-89.
- Tami C, Farber M, Palma E, Taboga O. Presentation of antigenic sites from foot-and-mouth disease virus on the surface of baculovirus and in the membrane of infected cells. Arch. Virol. 2000; 145: 1815-1828.
- Toma B. Serological diagnosis of Aujeszky's disease using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). En: Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science 17. Aujeszky's Disease, Wittmann G. & Hall S.A., eds. Martinus Nijhoff, The Hague, The Netherlands, 65; 1982.
- Toma B, Eloit M. Pseudorabies virus antibodies (Aujeszky's disease). En: Methods of Enzymatic Analysis X, Antigens and Antibodies 1, Bergmeyer V.C.H., ed. D-6940 Weinheim, Germany; 1986.
- Tyborowska J, Reszka N, Kochan G, Szewczyk B. Formation of Pseudorabies virus glycoprotein E/I complex in baculovirus recombinant system. Acta Virol.. 2006; 50: 169-174.
- Urakawa T, Roy P. Bluetongue virus tubules made in insect cells by recombinant baculoviruses: expression of the NS1 gene of bluetongue virus serotype 10. J. Virol. 1988; 62: 3919-27.
- Van Oirschot J, Rziha H, Moonen P, Pol J, Van Zaane D. Differentiation of serum antibodies from pigs vaccinated or infected with Aujeszky's Disease virus by a competitive Enzyme Immunoassay. J. Gen. Virol. 1986; 67: 1179-1182
- Van Oirschot J, de Waal C. An ELISA to distinguish between Aujeszky's disease vaccinated and infected pigs. Vet. Rec. 1987; 121: 305-306.
- Wittmann G. La enfermedad de Aujeszky. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 1986; 5: 995-1009.
- Wittmann G, Leitzke I. Die Beeinflussung des Aujeszkyvirus neutralizationstests durch verschiedene Testbedingungen. Dtsch.Tierarztl. Wochenschr. 1985; 92: 262-266.
- Yong T, Huan-chun C, Shao-bo X, Ya-li Q, Qi-gai H, Yu-qi R. Development of a latex agglutination test using the major epitope domain of glycoprotein E of pseudorabies virus expressed in E. coli to differentiate between immune responses in pigs naturally infected or vaccinated with pseudorabies virus. Vet. Res. Comm. 2005; 29: 487-497.