



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

Microbiología e inmunología

**OBTENCIÓN DE MIMOTOPOS POR MEDIO DE PHAGE DISPLAY
CONTRA EL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA 2**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

P R E S E N T A

SUSANA JUÁREZ REYES

TUTORA PRINCIPAL:

DRA. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. GOHAR GEVORGYAN MARKOSIAN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DR. LUIS ALBERTO ZARCO QUINTERO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO

NOVIEMBRE, 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A mi padre Víctor Ángel Juárez Olgúin y mi madre María de Jesús Reyes Anaya, por su apoyo, consejos, confianza y amor incondicional en cada proyecto y etapa de mi vida. Siempre serán mi ejemplo a seguir y el impulso que me permita continuar.

A mis hermanas Maribel y Angélica; su amor me motiva a mejorar todos los días, para ser un digno ejemplo para ustedes. A mis tías, abuelas y abuelo, por amarme, cuidarme, educarme y apoyarme tal y como si fuera su hija. Gracias a ustedes tanto como a mis padres, he logrado alcanzar mis metas.

A Lizandra Nájera Casasola, por permitirme formar parte de tu vida y familia durante estos años. Tú apoyo, consejos y cariño incondicional siempre son una gran motivación para seguir adelante en cada proyecto en el que me involucro. A Alma Aline Ramírez García, por tu amistad, consejos sinceros y comprensión, a lo largo de esta etapa.

A mi tutora y amiga, Rosa Elena Sarmiento Silva por permitirme participar en este proyecto, brindarme su tiempo para asesorarme, platicar, reflexionar, corregirme oportunamente y nunca dejar de apoyarme, inclusive en momentos duros. Por ser siempre un ejemplo a seguir como profesionista y sobretodo, ser una gran amiga.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Virología, quienes me apoyaron y compartieron su tiempo y conocimiento durante la ejecución de este trabajo: Juan Carlos, Tere, Mario, Karen, Nallely, Pablo, Naomi, Marina, Montserrat, José, Marion, Alicia y Erika.

A la Q.F.B Elvia Lazo García y MVZ. Liliana Valdés por su apoyo técnico y asesoría en el laboratorio.

A los laboratoristas Armando, Pedro y Mario por su apoyo, consejos y disposición para trabajar en equipo dentro del laboratorio

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca proporcionada durante mis estudios de posgrado del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y Salud Animal.

Al apoyo recibido a través del proyecto PAPIIT-DGAPA IA202313: Identificación y evaluación de péptidos específicos para el Virus de la Diarrea Viral Bovina en aislados Mexicanos mediante Phage Display.

A Laboratorios Tornel S.A, por el financiamiento de este proyecto derivado del proyecto Proinova-CONACyT “Desarrollo de una Vacuna Autóctona Bovinal 5” proyecto 197928.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y al Departamento de Microbiología e Inmunología.

A mi tutora, Dra. Rosa Elena Sarmiento, y a mi comité tutor, Dra. Gohar Gevorgyan Markosian y Dr. Luis Alberto Zarco Quintero, por su disposición, observaciones y participación durante la realización de este proyecto.

A mi jurado: Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira, Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva, Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales, Dra. Gohar Gevorgyan Markosian y Dr. Sabino Pacheco Guillen, por el tiempo brindado a la corrección y enriquecimiento de este trabajo.

A la M. en C. María Elena Munguía Zamudio y al Biol. Gonzalo A. Acero Galindo, por su supervisión y asesoría brindada durante el desarrollo de las técnicas. Gracias por hacer amena la estancia en el laboratorio, por su paciencia y su amistad.

A la MVZ Ma. Grisel Anaya Santillán (FMVZ-UNAM) por proporcionar los sueros hiperinmunes y a la Dra. Patricia de la Torre (IIB-UNAM) por realizar la secuenciación de las muestras utilizadas en la metodología de este trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
Abreviaturas.....	3
I. Introducción	5
1.1 Antecedentes.....	5
1.2 Virus de la Diarrea Viral Bovina	6
1.3 Organización del genoma y proteínas virales	9
1.4 Replicación viral.....	16
1.5 Biotipos del VDVB.....	17
1.6 Genotipos virales	19
1.7 VDVB genotipo 2	20
1.8 Efectos de la infección con el VDVB en el sistema inmune	22
1.9 Manifestaciones clínicas y epidemiología	25
1.10 Diagnóstico	29
1.11 Control y vacunación.....	30
1.12 Tecnología del despliegue en fagos (Phage Display)	32
1.13 Bacteriófago filamentoso M13	33
1.14 Proceso de infección del fago M13	35
1.15 Biblioteca de péptidos desplegados en fagos filamentosos	37
1.16 Aplicaciones del despliegue en fagos	39
II. Justificación	41
III. Hipótesis	42
IV. Objetivo general	42
V. Objetivos específicos	42
VI. Material y Métodos	43
6.1 Virus	43
6.2 Crecimiento de la línea celular	43
6.3 Propagación del virus	44

6.4 Precipitación del virus con polietilenglicol (PEG)	44
6.5 Purificación del virus.....	44
6.6 Titulación de virus por el método de DICC _{50%} /mL	45
6.7 Obtención de sueros hiperinmunes	45
6.8 Determinación de proteínas del purificado viral por medio del ensayo del Bio-Rad® (Azul Brillante de Coomassie G-250)	46
6.9 Titulación de sueros hiperinmunes contra el VDVB-2 Mex.....	47
6.10 Despliegue en fago (Phage Display)	48
6.10.1 Bioselecciones	48
6.10.2 Selección y amplificación de clonas.....	50
6.10.3 Ensayos de unión	52
6.10.4 Secuenciación del ADN de los bacteriófagos	53
6.11 Ensayo con prueba comercial de ELISA para seleccionar los sueros positivos a VDVB.....	55
6.12 Ensayo de ELISA con clonas anti VDVB-2 Mex y sueros de bovinos para la identificación de sueros positivos al VDVB-2	56
VII. Resultados	60
7.1 Caracterización del VDVB-2 Mex	60
7.2 Titulación de los sueros hiperinmunes contra el VDVB-2 Mex	62
7.3 Bioselecciones	63
7.4 Selección y amplificación de clonas	64
7.5 Ensayos de unión.....	65
7.6 Secuenciación del ADN de los bacteriófagos	68
7.7 Análisis del ADN de las clonas reactivas.....	69
7.8 Mapeo de los mimotopos	71
7.9 Ensayo con prueba comercial de ELISA para seleccionar los sueros positivos a VDVB.....	75
7.10 Ensayo de ELISA con clonas reactivas a anticuerpos anti-VDVB-2 para la identificación de sueros de bovinos positivos al VDVB-2	78
7.10.1 Ensayo de ELISA con la clona 2A anti VDVB-2 Mex.....	81

7.10.2 Ensayo de ELISA con la clona 6H anti VDVB-2 Mex.....	82
7.10.3 Ensayo de ELISA con la clona 8C anti VDVB-2 Mex.....	83
7.10.4 Ensayo de ELISA con la clona 4C3 anti VDVB-1 NADL	84
7.10.5 Ensayo de ELISA con la clona 4H negativa al suero anti VDVB-2 Mex y al suero anti VDVB-1	85
VIII. Discusión	86
Bioselecciones	87
Ensayos de unión.....	88
Análisis de las secuencias obtenidas de las clonas reactivas	89
Análisis de la especificidad de las clonas.....	94
Análisis de sueros de bovinos por la técnica de ELISA (IDEXX)	95
Evaluación de las clonas reactivas con sueros de bovino.....	97
IX. Conclusión	100
X. Referencias	101
Índice de Figuras	111
Índice de Cuadros	114
Anexo 1. Secuencias de las clonas obtenidas a partir de la biblioteca Ph.D™7 (Biolabs® Inc., New England)	115
Anexo 2. Reactivos	117
Anexo 3. Medios y soluciones	119

RESUMEN

El Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) es un *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae*, clasificado en dos genotipos (VDVB-1 y VDVB-2). Este virus infecta poblaciones de bovinos y genera anualmente considerables pérdidas económicas a nivel mundial. En México se carece de información sobre la epidemiología del VDVB-2, pero se cuenta con aislamientos obtenidos de hatos bovinos del país. En este estudio, mediante Phage Display se seleccionaron mimotopos de epitopos del VDVB-2 Mex a partir de una biblioteca comercial de bacteriófagos (M13) que expresan 7 aminoácidos lineales en pIII y utilizando como blanco de selección sueros hiperinmunes específicos a este genotipo. Después de 3 rondas de bioselección, se analizaron 94 clonas cuya especificidad y reactividad se verificaron en ensayos de unión en presencia de sueros hiperinmunes anti-VDVB-1 NADL y anti-VDVB-2 Mex. Se encontró que 72 clonas eran reactivas a ambos sueros; sin embargo 6 clonas (2A, 3B, 5E, 6H, 8C, 8E) mostraron especificidad al suero hiperinmune anti-VDVB-2 Mex. Dichas clonas se secuenciaron junto con una clona reactiva a ambos sueros hiperinmunes (7C) y una negativa a ambos sueros (4A). Las clonas reactivas 2A, 3B y 5E contenían las secuencias “**GTVPNTS**” con homología con la glicoproteína E2 y la clona 6H con la secuencia “**LVSLSRR**” presentó similitud con la glicoproteína E2 y N^{pro}. Las clonas 8C y 8E contenían la secuencia “**WRAPQPM**” con similitud con la proteína NS3. En tanto, la clona 7C con la secuencia “**KTLSLTR**” presentó homología con NS4B, E2 y NS5B; finalmente, la clona 4A negativa no presentó homología con secuencias reportadas con el VDVB. Mediante ensayos de ELISA se demostró que los fagos-péptidos específicos al anti-VDVB-2 Mex identificaron sueros positivos a VDVB-2, así como a los sueros con co-infecciones con VDVB-1 y VDVB-2; la clona 4C3, reactiva al suero hiperinmune VDVB-1 NADL, identificó sueros positivos a VDVB-1 y 2, mientras que la clona negativa, mostró baja reactividad tanto para sueros positivos a VDVB-2, a sueros con co-infecciones y para sueros negativos. Nuestros resultados sugieren que los péptidos seleccionados tienen características inmunológicas importantes y podrán ser utilizados para el desarrollo de herramientas diagnósticas que impliquen un costo menor al de las pruebas comerciales disponibles en el mercado, permitiendo la detección de anticuerpos contra el VDVB-1 así como para el VDVB-2 en sueros de bovinos, contribuyendo al control del virus en los hatos del país.

Palabras clave: VDVB, VDVB-2 Mex, Phage Display, mimotopos, epitopos, ELISA, anticuerpos

ABSTRACT

Bovine Viral Diarrhea virus (BVDv) that belongs to the genus *Pestivirus* of the family *Flaviviridae* is classified into two genotypes (BVDv-1 and BVDv-2), both are present in populations of cattle generating considerable global economic losses. In Mexico, there are no reports of BVDv-2 but the virus have been obtained from cattle herds in the country. In this study, we selected BVDv-2 (Mex strain) mimotopes by phage display peptide from a library (Ph.D.-7) that was panned against a hyperimmune rabbit sera specific to BVDv- 2 Mex. After third panning, 94 phage clones were selected and purified, their specificity and reactivity to hyperimmune rabbit sera against BVDv genotype 1 (NADL strain) and BVDv-2 Mex were evaluated by phage ELISA. Seventy-two clones showed reactivity to both versions of hyperimmune rabbit sera; however, 6 clones (2A, 3B, 5E, 6H, 8C, 8E) exhibited specificity to the hyperimmune sera anti-BVDv-2 Mex. These six reactive clones were further sequenced and aligned with the sequence proteins of BVDv. Additionally, two clones were analyzed: the clone 7C, which had reactivity to both hyperimmune sera; and a negative clone (4A). The results showed that the clones 2A, 3B and 5E display the peptide "GTVPNTS", which was similar to an exposed region of the E2 glycoprotein of BVDv. The clone 6H displayed the peptide "LVSLSRR", showing similarity to glycoprotein E2 and N^{pro} of BVDv. The clones 8C and 8E presented the peptide "WRAPQPM" and showed similarity to the NS3 protein of BVDv. Meanwhile, the clone 7C displayed the sequence "KTL~~S~~LTR" presented similarity to NS4B, E2 and NS5B proteins; finally, the negative clone, 4A, did not showed similarity to sequences reported of BVDv. All these clones were evaluated by ELISA to check the reactivity with cattle serum: phage peptide specific to sera anti-BVDv-2 Mex were able to identified positive serum obtained from animals infected with BVDv-2 as well as serum from animals with BVDv-1 and BVDv-2 co-infections; the 4C3 clone reacted with hyperimmune sera anti-BVDv-1. NADL and was able to identify positive serum BVDv-1 and BVDv-2, while negative clone showed low reactivity for BVDv-2 positive serum, co-infections serum and negative serum. Our results suggest that selected phage-peptides mimic important immunological characteristics that can be used to develop diagnostic techniques, which involve lower cost than commercial kits, thus allowing the detection of antibodies against BVDv-1 and BVDv-2 in serum from cattle to control the virus within herds in our country.

Keywords: BVDv, BVDv-2 Mex strain, Phage Display, mimotopes, ELISA, antibodies.

ABREVIATURAS

Ácido Desoxirribonucleico	ADN
Ácido Ribonucleico	ARN
American Type Culture Collection	ATCC
Aminoácidos	AA
ARN cadena sencilla	ssARN
Autoproteasa N- Terminal	N ^{pro}
Border Disease Virus	BDV
Cápside (proteína)	C
Carboxilo Terminal	C-Terminal
Citopático	CP
Comité Internacional de Taxonomía de Virus	ICTV
Complejo Respiratorio Infeccioso Bovino	CRIB
Diarrea Viral Bovina	DVB
Dosis Infectantes en Cultivo Celular	DICC
Enfermedad de las Mucosas	EM
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i>
Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas	ELISA
Factor Regulador del Interferón 3/7	IRF-3/7
Fago filamentoso	Ff
Grados centígrados	°C
Horas	h
Interferón	INF
Interleucina	IL
Kilo bases	Kb
Kilo Daltons	kDa
Marco Abierto de Lectura	ORF
Minutos	min

Amino Terminal	N-Terminal
National Animal Diseases Laboratory	NADL
No Citopático	NCP
No estructural	NS
Región No Traducible	RNT
Pares de bases	pb
Persistentemente infectado	PI
Phage Display (Despliegue en fago)	Ph.D.
Pili conjugativo F'	Pili F'
Proteína menor de la cápside del bacteriófago III	pIII
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	qPCR
Reacción en cadena de la polimerasa	PCR
Receptores Tipo Toll (Toll Like Receptors)	RTT
Retículo Endoplasmático	RE
Revoluciones por minuto	rpm
Ribonucleasa secretada	E ^{rns}
Sitio de reconocimiento de entrada al ribosoma	IRES
Transcriptasa Reversa	RT
Virus de Diarrea Viral Bovina	VDVB
VDVB-1 (Genotipo 1)	G1
VDVB- 2 (Genotipo 2)	G2
VDVB- 2 cepa Mexicana	VDVB-2 Mex
Virus de la Fiebre Porcina Clásica	VFPC
Virus de la Hepatitis C	VHC
Virus Herpes Bovino tipo 1	VHB-1
Unidades Formadoras de Placa	UFP
Unidades de Producción Pecuarias	UPP
Unidades de Producción Bovinas	UPB

I. INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES

La Diarrea Viral Bovina (DVB) se considera una de las enfermedades más importantes en la población de ganado bovino debido a que anualmente genera graves pérdidas económicas para la industria lechera y cárnica a nivel mundial. Esta enfermedad trae como consecuencia efectos negativos sobre el estado general de salud de los animales y alteración de los parámetros productivos. Aunque la denominación del virus y la enfermedad sugiere que se encuentra implicado a patologías gastrointestinales en bovinos, el Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB), está involucrado en diversos cuadros clínicos en diversos órganos y sistemas no sólo de bovinos, sino que infecta además a otras especies de animales domésticos y silvestres, tales como ovinos, caprinos, porcinos, bisontes, alpacas, llamas, venado cola blanca, entre otros (Walz et al., 2010).

Esta enfermedad se encuentra ampliamente distribuida dentro de los hatos de bovinos, con una prevalencia estimada que fluctúa del 50% hasta el 90% y puede afectar adversamente a todas las etapas del ciclo productivo. Desde el 2007 la Organización Mundial para la Salud Animal (OIE), incluyó a la DVB en la lista de enfermedades de reporte obligatorio en bovinos, debido a las implicaciones económicas, comerciales y de sanidad a nivel internacional, ya que se ha demostrado que una vez que la DVB se introduce dentro de una producción ganadera, tiende a convertirse en endémica en un lapso de 2 a 3 años modificando el estado zoonosanitario de los hatos así como la productividad del mismo (Machado et al., 2016).

Se ha identificado que más allá de ser una enfermedad propiamente digestiva, la DVB se encuentra asociada una amplia variedad de signos clínicos y subclínicos que afectan al aparato respiratorio, gastrointestinal y nervioso además de predisponer a infecciones congénitas, malformación en los becerros e

inmunosupresión y desordenes reproductivos, siendo este último, donde se genera la mayor pérdida económica (Fulton et al., 2003).

Las estrategias por las cuales el virus continúa propagándose y permaneciendo en sus huéspedes, se basan en su forma de transmisión, inducción de inmunosupresión que predispone a infecciones secundarias provocadas por otros microorganismos, y quizás la más importante, el establecimiento de una infección persistente en los animales infectados, quienes son la fuente más eficiente de propagación del virus, convirtiéndose en una enfermedad de difícil control para los veterinarios dentro de las Unidades Producción Pecuarias (UPP); por lo que, medidas de bioseguridad estrictas y funcionales que incluyan los puntos críticos dentro de una UPP, así como el monitoreo de animales de nuevo ingreso a los hatos, diagnóstico oportuno e identificación de animales enfermos, vacunación, tratamientos, manejos reproductivos, evaluación de parámetros productivos y reproductivos son fundamentales para realizar un control efectivo de la enfermedad dentro de las poblaciones de rumiantes domésticos.

1.2 VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA

El primer brote documentado de Diarrea Viral Bovina en el continente americano se realizó en la región de Ithaca, Nueva York, E.U.A, en 1947. Inicialmente, se describió como “una nueva enfermedad transmisible” en el ganado bovino e inclusive se consideró que la causa era la “Disentería de invierno”. Los animales presentaban fiebre, depresión, anorexia, leucopenia, erosiones así como hemorragias gastrointestinales y diarrea (Deregt, 2008). Fue hasta 1957, cuando se realizó el primer aislamiento del agente causal, al cual se le denominó Virus de la Diarrea Viral Bovina. Durante las décadas de 1940 y 1950, en Canadá y Alemania respectivamente, se identificaron casos donde los animales presentaban un cuadro clínico con signos similares a la DVB pero más severos: diarrea acuosa o sanguinolenta, deshidratación, tenesmo, taquipnea, taquicardia, lagrimeo excesivo,

descarga nasal, sialorrea, erosiones en morro y cavidad oral, y finalmente, la muerte después de 3 a 4 días iniciada la signología (Goens, 2002). A dicha enfermedad se le conoció como “Enfermedad X” o “Schleimhautkrankheit” (más tarde denominada Enfermedad de las Mucosas) y se caracterizaba por presentar altas tasas de mortalidad pero baja morbilidad dentro de los hatos afectados y a diferencia de la DVB, no podía ser transmitido en condiciones experimentales. Mediante ensayos de neutralización de la infectividad viral, se pudo determinar que el agente aislado en los brotes de Alemania, Reino Unido y Norte América, era el VDVB (Ridpath, 2010b).

Inicialmente, el VDVB y el resto de los *Pestivirus* se clasificaron dentro de la familia *Togaviridae*, la cual incluía a los géneros *Alphavirus*, *Rubivirus* y *Flavivirus*; sin embargo, mediante caracterizaciones moleculares basadas en la organización de su genoma, estructura y estrategias de replicación, los *Flavivirus* fueron reclasificados dentro de una nueva familia viral, *Flaviviridae*. Posteriormente, la secuenciación y análisis de los genes y de la replicación del VDVB cepa NADL (National Animal Diseases Laboratory), permitió determinar que tenía mayor similitud con la familia *Flaviviridae* que con la *Togaviridae* (Collett et al., 1988).

Actualmente, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), clasifica al virus de la Diarrea Viral Bovina en la familia *Flaviviridae*, la cual comprende un grupo de virus genéticamente diversos que provocan múltiples enfermedades en humanos, animales domésticos y silvestres. A su vez, esta familia se subclasifica en 4 géneros: *Flavivirus* (con 53 especies reconocidas entre las que destacan el Virus del Dengue, Virus del Oeste del Nilo, Virus de la Fiebre Amarilla, Virus de Zika, entre otros), *Hepacivirus* (Virus de la Hepatitis C), *Pegivirus* (Pegivirus A y B), y los *Pestivirus* (Theze et al., 2015). Dentro de este último, se agrupan 4 especies virales: Virus de la Fiebre Porcina Clásica (Classical Swine Fever Virus o CSFV), Virus de la Enfermedad de las Fronteras de los Ovinos (Border Disease Virus o BDV), Virus de la Diarrea Viral Bovina genotipo 1 (VDVB-1) y Virus de la Diarrea Viral Bovina genotipo 2 (VDVB-2)(King et al., 2011).

Recientemente, se han identificado nuevas especies de Pestivirus: 1) “HoBi-like virus” (Pestivirus atípico o VDVB-3) que fue aislado a partir de suero fetal bovino de muestras de Brasil y del Suroeste de Asia; 2) Pestivirus de Jirafa (“Giraffe”) aislado de un grupo de jirafas en Kenia con signos similares a la Enfermedad de las Mucosas (EM); 3) Virus Pronghorn identificado en un antílope en EE.UU., y 4) Virus Bungowannah, el cual se identificó en brotes de abortos en cerdos de Australia (Ridpath, 2015). Actualmente estas nuevas especies aún no se encuentran dentro de la clasificación del ICTV, a pesar de que se ha demostrado de que los cuadros clínicos son similares a los provocados por el VDVB-1 y 2, y que presentan homología en las Región No Traducida 5´(RNT), en la proteína no estructural N^{pro} y en la glicoproteína E2 (Avalos-Ramirez et al., 2001, Becher et al., 1999).

Tradicionalmente, los *Pestivirus* son denominados de acuerdo a la especie donde fueron aislados y por la enfermedad que provoca. Sin embargo, en el caso del VDVB, la especificidad de su hospedero no se limita sólo a bovinos, ya que pueden infectar a otros miembros del género *Artiodactyla* (mamíferos ungulados) tales como ovinos, caprinos, porcinos y ruminantes silvestres, como llamas, antílopes, camellos, jirafas, búfalos (Arnal et al., 2004). En fechas recientes, se ha determinado que los conejos son un reservorio en potencia, al permitir la replicación del virus en diversos órganos y tejido linfoide asociado a mucosas a nivel de intestino, sin presentar signos clínicos aparentes de la enfermedad (Bachofen et al., 2014)

1.3 ORGANIZACIÓN DEL GENOMA Y PROTEÍNAS VIRALES

El Virus de la Diarrea Viral Bovina tiene una forma esférica con diámetro estimado de 45-60 nm. La partícula viral está conformada por una molécula sencilla de ARN cubierta por la proteína de la cápside, la nucleocápside y una membrana lipídica (envoltura viral), donde se encuentran las glicoproteínas E1, E2 y E^{ms} (Figura 1). (Neill, 2013, Zurcher et al., 2014b).

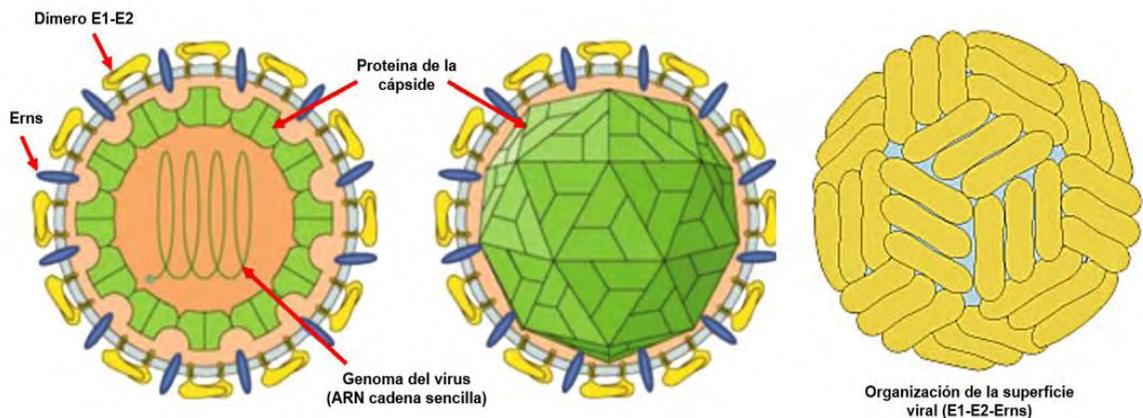


Figura 1. Esquemización de la morfología y componentes estructurales del VDVB (Coetzer y Tustin, 2004, Vargas et al., 2009; Viralzone: ExPasy.org)

El genoma es una cadena de ARN en sentido positivo de aproximadamente 12-13 kilo bases (kb) de longitud, en el cual se pueden identificar tres regiones: Región No Traducida 5' (RNT's o UTR's), un marco abierto de lectura (ORF) y la Región No Traducida 3'. Los extremos 5' y 3' del genoma, son denominados RNT's, debido a que cuentan con secuencias no codificantes; sin embargo, cuentan con estructuras secundarias que interactúan con las proteínas virales y celulares para regular la replicación del ARN y su transcripción, así como la traducción del ORF (Moes y Wirth, 2007). El extremo 5', es altamente conservado dentro de los *Pestivirus* y es de gran utilidad para realizar la caracterización en especies o en genotipos (Giangaspero et al., 2008). Se ha identificado que esta región, contiene una estructura secundaria con forma de tallo y horquilla, denominada Sitio de Entrada

Interno al Ribosoma (IRES), que consiste en cuatro dominios (A, B, C, D) y su papel en la replicación es crítico, ya que es responsable de iniciar la traducción, transcripción y replicación de la molécula de ARN viral. Topliff y Kelling (1998) demostraron que sustituciones dentro del IRES en aislados del VDVB-2, afectaban su virulencia, debido al incremento o disminución en la traducción.

El extremo 3' no se encuentra poliadenilado y cuenta con regiones variables y constantes que comparte con otros *Pestivirus*. Mediante predicciones computacionales y análisis bioquímicos, se ha demostrado que al igual que la 5' RNT, cuenta con estructuras secundarias de tallo-bucle separadas por regiones lineales (Pankraz et al., 2005, Vilcek et al., 2007). Se ha identificado que estas estructuras son muy estables y conservadas por lo que se ha sugerido que los motivos de esta región se encuentran involucrados en la traducción y replicación del ARN viral (Yu et al., 1999).

Las RNT's flanquean al marco abierto de lectura (ORF) el cual codifica para un polipéptido de aproximadamente 4,000 aminoácidos (AA), la cual es procesada co- y post-traduccionalmente a través de proteasas virales y celulares para producir de 11 a 12 proteínas: 4 proteínas estructurales y 8 no estructurales (Figura 2) (Fields et al., 2007). Las proteínas virales se encuentran codificadas en el siguiente orden:

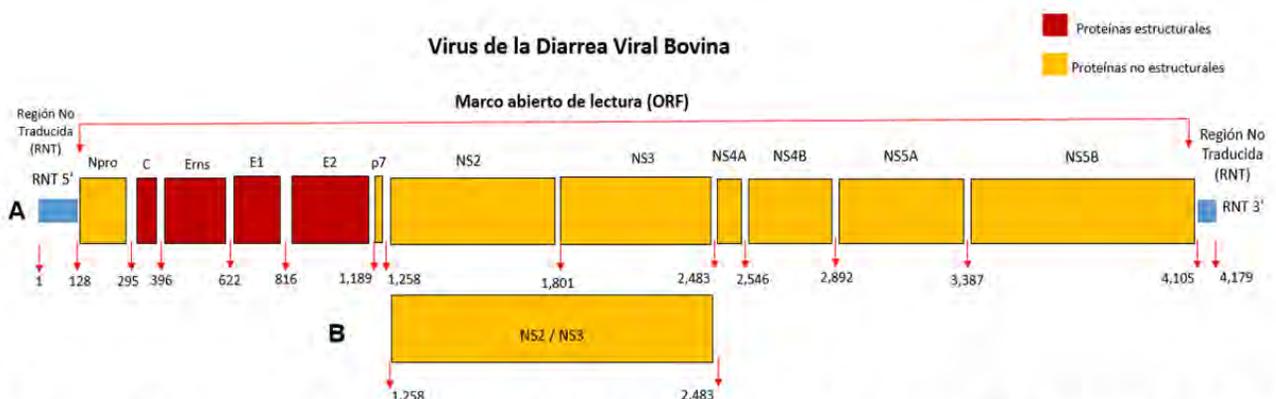


Figura 2. Representación esquemática de la organización de las Proteínas Estructurales y las No Estructurales que conforman al genoma del VDVB: A. Virus Citopático; B. Virus No Citopático.

Dentro de las proteínas estructurales encontramos las siguientes:

1. C, proteína de la cápside, es una proteína pequeña (14 kDa) con carga básica. La función de esta proteína, debido a que presenta afinidad al ARN, es la de empaquetar al genoma viral. Su extremo N-terminal contiene el sitio de corte de la proteína N^{pro}, esta última procesa a la proteína C previo al ensamblaje del virión (Fields et al., 2007, Collett et al., 1988).
2. E^{ms} (inicialmente denominada E0) al igual que N^{pro} no tiene equivalente en otros *Flavivirus*. Es una glicoproteína que se encuentra en forma de homodímeros y se ha determinado que casi la mitad de su estructura se encuentra glicosilada. A diferencia de E1 y E2, no participa en la entrada del virus a la célula y puede desvincularse fácilmente de la envoltura viral (Tews and Meyers, 2007). Como glicoproteína de envoltura, participa en la unión del virus al interactuar con su porción Carboxilo Terminal (C-Terminal) con los glucosaminoglicanos (GAG's) localizados en la superficie celular. Se ha descrito la participación de E^{ms}, en la inhibición de la activación de Receptores Tipo Toll (RTT-3 y 7) y su función como antagonista del INF-I (Interferón tipo I) en diversas especies con efecto prolongado (Fields et al., 2007, Zurcher et al., 2014a). Su efecto inhibitorio sobre la síntesis de proteínas y proliferación de linfocitos, así como en la inducción de apoptosis en linfocitos, deriva en leucopenia e inmunosupresión (Bruschke et al., 1997). Adicionalmente, se ha identificado que cuando es secretada por las células infectadas tiene actividad enzimática de Ribonucleasa degradando preferentemente ARN de cadena sencilla (ssARN) (Lussi y Schweizer, 2016).
3. E2 es una glicoproteína localizada en la envoltura del virión. Es considerada la proteína más inmunodominante del virus así como el principal blanco para anticuerpos neutralizantes. Van Rijn y colaboradores (1997) determinaron que el dominio N-terminal es el más inmunogénico. Al igual que E1, es una

proteína integral de membrana tipo I y participa en la entrada del virus a la célula, el ensamblaje del virus y la maduración de los viriones (El Omari et al., 2013). Está formada por 370 AA, cuenta con un ectodominio N-terminal y un C-terminal, en éste último, se encuentran 30 AA que participan en la unión. Se ha reportado que E2 se une a la proteína de superficie celular CD46 (Krey et al., 2006), la cual se encuentra presente en células polimorfonucleares, linfocitos, monocitos y macrófagos, así como en células epiteliales y endoteliales (Christmas et al., 2006, Maurer et al., 2004)

E2 está conformada por cuatro dominios: DA y DB (son los más distales a la membrana viral), DC (compuesto por una alta cantidad de puentes disulfuro) y DD (ubicado en C-terminal es el dominio más conservado dentro de los *Pestivirus*). La caracterización de esta región mediante anticuerpos monoclonales han sugerido la existencia de epitopos neutralizantes en un solo dominio del VDVB genotipo 1, mientras que para el genotipo 2, se ha sugerido que la región inmunodominante se encuentra en el dominio A (Deregt et al., 1998, Wang et al., 2015).

El genoma viral también codifica para proteínas no estructurales cuyas funciones son esenciales durante la replicación:

1. N^{pro}: es una autoproteasa cuya actividad catalítica reside en el extremo N-terminal. Esta proteína se autocataliza postraduccionalmente para liberar a la proteína C. Estudios sugieren que actúa como antagonista del INF tipo I, mediante la degradación del Factor Regulador del IFN 3 (IRF-3) (Lussi y Schweizer, 2016). Debido a la posible relación con el establecimiento de la infección persistente e inmunotolerancia, se ha propuesto que la manipulación de la región N-terminal de N^{pro} permitirá generar cepas no virulentas que podrían ser utilizadas como vacunas,

más seguras para el feto en desarrollo, que las existentes en el mercado (Seago et al., 2007, Gil et al., 2006).

2. p7: es una proteína de 6 a 7 kDa, compuesta principalmente por aminoácidos hidrofóbicos. Debido a su proximidad con E2 en el polipéptido, se ha sugerido que participa durante la maduración de E2 y en la morfogénesis del virus (Elbers et al., 1996). Esta proteína puede permanecer asociada a las células infectadas como p7 libre o como heterodímero E2-p7. Se ha demostrado que p7 es necesaria para la producción de virus infeccioso, pero no para la replicación del ARN. Se cree que desempeñan un papel similar a la proteína p7 del Virus de la Hepatitis C, en la formación de canales de iones (viroporina) que permeabilizan la membrana de compartimentos intracelulares (Retículo Endoplásmico y Aparato de Golgi), facilitando la liberación de la progenie viral (Fields et al., 2007, Harada et al., 2000).
3. NS2/3: La proteína NS2 es una cisteína proteasa, que no es esencial durante replicación, sin embargo participa en la regulación de la replicación del ARN de los *Pestivirus*. Lattwein y colaboradores (2012) observaron que la porción N-terminal funcionaba como proteasa, cuya actividad es requerida para el procesamiento de NS2/3 y para la producción de progenie viral infecciosa. Se ha observado que en el caso de VHC, NS2 es indispensable para el ensamblaje del virión, independientemente de su actividad proteolítica (Li et al., 2015).

En el caso de NS3, se considera que es la proteína más conservada en los *Pestivirus*, además se ha identificado que desencadena una alta respuesta inmune humoral en bovinos expuestos por una infección natural o derivado de la vacunación, por lo que frecuentemente es usada como antígeno en pruebas de ELISA (Mahmoodi et al., 2015). Es una

molécula multifuncional de 80 kDa conformada por dos dominios: el C-Terminal corresponde a una serina proteasa involucrada en el procesamiento del resto de las proteínas no estructurales de la poliproteína, mientras que el N-Terminal funciona como ARN helicasa y ATPasa (Deregt et al., 2005). Se ha identificado que NS4A participa como co-factor de esta proteína (Agapov et al., 2004).

La expresión de NS2 y NS3, está relacionada con la citopatogenicidad viral: NS2/3 sin procesar se expresa principalmente en células infectadas con virus No Citopáticos, mientras que cepas Citopáticas expresan tanto NS2 y NS3; debido a esto, la proteína NS3 se considerada como un marcador de citopatogenicidad en células infectadas (Kummerer et al., 2000). La escisión de NS2/3 es esencial para la replicación del ARN de los *Pestivirus* y su eficiencia está regulada por una chaperona celular denominada "Jiv" (identificada en la secuencia de NS2 de cepas citopáticas) la cual permite la liberación de NS3 (Muller et al., 2003). Al estar relacionada con la citopatogenicidad, se ha demostrado que NS3 induce la activación de la cascada de apoptosis.

4. NS4A es una proteína hidrofóbica conformada por 54 AA, es requerida para estabilizar la conformación de NS3 y para su actividad proteolítica durante la replicación: interactúa con el dominio N-Terminal de NS3 y otras proteínas no estructurales en la membrana del Retículo Endoplásmico (RE) donde se producen los moldes de ARN de sentido negativo (antigenoma) y genomas virales de la progenie (Moulin et al., 2007). Lin y colaboradores (1997) han propuesto que NS4A del Virus de la Hepatitis C, además de encontrarse involucrada en el reclutamiento de proteínas virales y celulares, tales como NS4B y NS5A, tiene actividad proteolítica sobre los sitios de escisión en NS4B/NS5A y NS5A/NS5B.

5. La proteína NS4B es una proteína transmembranal con características altamente hidrofóbicas, asociada al Aparato de Golgi, mitocondrias y otras membranas inducidas por el virus. Se cree que puede asociarse al complejo de replicación del genoma, interactuando con NS3, NS5A y NS5B o encontrarse implicada en la reorganización de la membrana en células infectadas (Weiskircher et al., 2009). Qu y colaboradores (2001) demostraron que una mutación puntual en esta proteína, implica una alteración en la citopatogenicidad de la cepa: un virus CP podría cambiar a uno NCP, aún en presencia de la NS3.

6. Poco se conoce sobre las funciones de NS5A durante la replicación; sin embargo se ha sugerido que su función se relaciona con el reclutamiento de componentes celulares, además de localizarse unida a la membrana del RE con NS4A y NS5B en el complejo de replicación del ARN (Tellinghuisen et al., 2006, Grassmann et al., 2001). En condiciones *in vitro*, se ha observado que interactúa con el factor-1 de elongación de la traducción (eEF1A) el cual es esencial para la viabilidad celular, al regular la traducción del ARNm, expresión de proteínas y organización del citoesqueleto (Johnson et al., 2001). Alternativamente, en el VHC NS5A es un elemento regulador en la traducción y/o maduración del virus.

7. NS5B es una proteína que se encuentra altamente conservada dentro del género de los *Pestivirus*. La caracterización de esta proteína permitió identificar su actividad de ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP) involucrada directamente durante la replicación del ARN a través de dos mecanismos conocidos: Elongativa (dependiente de cebador) o *de novo* (independiente de cebadores)(Lai et al., 1999). Curti et al. (2013) demostró que es una proteína altamente conservada y con una baja tolerancia a cambios en sus AA: alteraciones en esta proteína podrían disminuir su eficiencia para unirse a ribonucleótidos y su actividad

catalítica en ambas vías de replicación. Actualmente, esta proteína es usada como blanco para el desarrollo de compuestos usados en tratamientos y terapias antivirales que inhiban su actividad (Newcomer et al., 2013).

1.4 REPLICACIÓN VIRAL

La infección por el VDVB inicia mediante la unión del virus a la membrana de una célula susceptible, la cual es mediada por la unión de la glicoproteína E2 (en forma de heterodímero E1-E2) con el receptor celular, CD46_{bov} (Maurer et al., 2004). Se ha propuesto la presencia de otros receptores para E2, como es el caso del receptor lipoprotéico de baja densidad (LDL-R), el cual fue identificado en células Mardin-Darby Bovine Kidney a través de anticuerpos dirigidos contra el LDL-R (Iqbal and McCauley, 2002). Adicionalmente, E^{ms} se une con el Heparan sulfato y otros GAG's presentes en la superficie celular, participando así, en la adhesión del virión a la membrana de la célula (Iqbal et al., 2000).

Una vez que el virus se encuentra anclado a la superficie celular, inicia el proceso de internalización por la vía de endocitosis dependiente de clatrina y de pH (Grummer et al., 2004). Posteriormente, el ARN+ genómico localizado en el citosol, que funciona como ARNm, se traduce (Pestova and Hellen, 1999), dando lugar a una polipéptido, la cual es procesada por acción de proteasas celulares y virales, para la formación de proteínas estructurales y no estructurales. La primera escisión proteolítica sucede en el procesamiento autocatalítico de la proteína N^{pro} y C. A continuación, la escisión de E^{ms} de la polipéptido, permite la translocación de las glicoproteínas de membrana al RE, en donde se lleva a cabo la maduración de éstas (Macovei et al., 2006, Neill, 2013). Las proteínas E1 y E2 forman heterodímeros en el RE y se encuentran asociados a la proteína calnexina (Branza-Nichita et al., 2002). Las proteínas no estructurales recién sintetizadas son procesadas por la serina proteasa NS3-NS4A, que a su vez, se ensamblan para formar complejos de

replicación funcionales asociados a la membrana y por acción de la RdRP (NS5B), llevarán a cabo la primera etapa de la síntesis de la de cadena negativa (antigenoma) de ARN, que posteriormente contribuirá a la formación de moléculas de cadenas de ARN+ que se ensamblarán en la progenie viral naciente (Behrens et al., 1998, Tautz et al., 1997).

El ensamblaje y maduración del VDVB sucede en el RE y Aparato de Golgi. Los viriones maduros son liberados a través de las membranas intracelulares mediante vesículas citoplasmáticas por exocitosis. En este punto, p7 (viroporina) es indispensable para desestabilizar la membrana celular y facilitar la liberación del virus (Harada et al., 2000).

1.5 BIOTIPOS DEL VDVB

Las cepas del VDVB pueden ser clasificadas en dos biotipos: Citopático (CP) y No Citopático (NCP). De igual forma, Meyers y Thiel (1996) demostraron que a nivel molecular, ambos biotipos se caracterizan por la producción de diferentes proteínas en células infectadas, los virus CP expresan NS2 y NS3, mientras que en el biotipo NCP se detecta la proteína NS2/3 sin escindir.

Se ha observado que la infección generada por el biotipo CP en cultivo celular, se caracteriza por condensación y marginación de la cromatina, así como cambios en la morfología celular, formación de cuerpos apoptóticos y muerte celular, resultado de la escisión en NS2/3 en cultivo celular. Reportes recientes han demostrado que la citopatogenicidad viral se encuentra correlacionada con duplicaciones en el genoma del virus, inserciones de secuencias de ARNm celular o mutaciones puntuales que ocurren al codificar las secuencias de las proteínas NS2 y NS3. Estudios realizados por Kümmerer y Meyers (2000) y Tautz y colaboradores (1996) en las cepas CP Oregon y CP7, demostraron la presencia de mutaciones puntuales así como pequeñas inserciones a nivel del nucleótido 4355 en NS2, involucradas en la inhibición de la actividad del cofactor “Jiv”, responsable de la escisión de

NS2/3. El autoprocesamiento de NS2/3 es crucial dentro de las primeras horas post infección, debido a que NS3 en presencia de NS4A, son esenciales dentro del complejo de replicación del ARN (ARN replicasa), por lo que una disminución de NS3 se encuentra ligado al decremento de la síntesis de ARN así como a la incapacidad de establecer una infección persistente (Lackner et al., 2005). Generalmente, los virus CP han sido aislados en la presencia de un virus NCP en brotes de “Enfermedad de las Mucosas”, a partir de lo cual, se ha propuesto que algunos virus CP habrían emergido de virus con biotipo NCP mediante recombinaciones de su genoma particularmente dentro de la proteína NS2/3 (Kummerer et al., 2000, Nakamura et al., 1997).

Por otro lado, el biotipo NCP a nivel microscópico no causa cambios fenotípicos en cultivo celular y es morfológicamente indistinguible comparado con células no infectadas. Se ha reportado que la infección por este biotipo, durante la gestación temprana puede resultar en muerte y reabsorción embrionaria, becerros muertos al parto con lesiones teratogénicas o en el nacimiento de becerros **Persistentemente Infectados (PI)** *in vivo*; estos últimos, no presentan signología clínica provocada por una viremia. Sin embargo, son inmunotolerantes a la cepa del virus que los infectó inicialmente y permanecen virémicos durante el resto de su vida. Los animales PI tienen mayor predisposición a infectarse con otros patógenos o de infectarse con un virus CP, en este último caso, la infección culmina en la “Enfermedad de las Mucosas” caracterizado por lesiones extensas a lo largo del tracto gastrointestinal. Actualmente, se conoce que este biotipo es el que tiene mayor prevalencia dentro de los hatos ganaderos y comúnmente es aislado de animales con infección aguda o animales PI (Ridpath, 2010b, Hou et al., 1998).

Schweizer y Peterhans (2001) reportaron otra diferencia significativa entre ambos biotipos: mientras que el VDVB CP induce la síntesis de INF- α/β (IFN tipo I) y apoptosis en macrófagos infectados; en contraste, los biotipos NCP no inducen la producción de IFN como respuesta a la síntesis de ARN de doble cadena (dsARN),

no hay daño aparente en las células infectadas y muestran una marcada resistencia a la apoptosis. Debido a que tanto el proceso de apoptosis y la inhibición de la síntesis de IFN tipo I son mecanismos de defensa del sistema inmune innato que suelen manifestarse en las primeras etapas de la gestación, se ha propuesto que estos son factores claves para la transmisión del virus al feto y el mantenimiento de la inmunotolerancia.

Adicionalmente, se ha reportado que los dos biotipos muestran diferente tropismo tisular: el biotipo CP ha sido aislado de órganos tales como: rumen, retículo, intestino delgado, linfonodos mesentéricos, placas de Peyer y colon; mientras que el biotipo NCP ha sido aislado comúnmente de muestras sanguíneas y órganos altamente irrigados tales como cavidad nasal, pulmón, hígado, riñones y bazo (Brownlie et al., 2000).

1.6 GENOTIPOS VIRALES

En años recientes, el estudio del genoma completo o secuencias parciales del VDVB ha permitido agruparlo en Genotipos. Inicialmente, los aislados virales se clasificaban con base en la comparación de las secuencias de la 5' RNT. Adicionalmente, la genotipificación del virus se ha llevado a cabo a través de divergencias encontradas en las secuencias de los genes N^{pro}, C, E2, NS5B y mediante el uso de anticuerpos policlonales y monoclonales, se ha llevado a cabo la caracterización antigénica de los aislamientos virales (Ridpath et al., 1994).

Debido a que la región 5' RNT es la región más conservada dentro del género *Pestivirus* y que además tiene un papel crítico durante la traducción, transcripción y replicación del virus, ha sido objeto de diversos análisis estructurales y filogenéticos, este último es considerado el método más común para realizar la clasificación del género. Actualmente, se han reconocido dos genotipos: VDVB-1 y VDVB-2 (Vilcek et al., 2005). Se ha reportado que el grado de variabilidad para aislados del VDVB-1 es del 83.3%, mientras que para el VDVB-2 es del 83.6%. Estudios genéticos,

sugieren que el genotipo 2 es el resultado de diversas mutaciones y recombinaciones (Deregt et al., 1998).

A su vez, análisis más detallados han permitido segregar al virus en subgenotipos: en el caso del VDVB-1 se tienen reportados desde el subgenotipo 1a hasta 1l; mientras que para el VDVB-2 se tienen reportado los subgenotipos 2a y 2b (Giangaspero et al. 2008; Ridpath y Bolin, 1995). Sin embargo, al comparar secuencias de las regiones con mayor variabilidad dentro del genoma viral, se han logrado establecer 17 subgenotipos para el genotipo 1, en contraste al genotipo 2 que ha sido segregado en 3 subgenotipos (2a, 2b, 2c). Los subgenotipos 2a y 2c, son cepas presentes en ganado bovino, mientras que el subgenotipo 2b, puede infectar tanto a bovinos como ovinos.

Generalmente, el VDVB-1 es el más común aunque se ha descrito que la prevalencia del genotipo 2 en Norteamérica, es casi tan alta como la del genotipo 1. Fulton y colaboradores (2005) han reportado que los subgenotipos más frecuentes aislados de los hatos ganaderos en E.U.A son tres en su mayoría, VDVB-1a y 1b y VDVB-2a; también se ha observado que los VDVB-2 que circulan en el ganado son generalmente NCP y se han asociado con brotes de infección aguda severa y el síndrome hemorrágico (Neill, 2013).

1.7 VDVB GENOTIPO 2

El VDVB-2 inicialmente fue identificado en brotes infecciones agudas y síndrome hemorrágico (caracterizado por trombocitopenia severa con hemorragias) de DVB en la década de 1980 en E.U.A y Canadá en hatos de leche y de engorda. Subsecuentemente, los reportes se extendieron a diversos países de Europa y América del Sur.

Pellerin y colaboradores (1994) así como Ridpath y colaboradores (1994) a través del uso de anticuerpos policlonales y monoclonales así como de la técnica de PCR,

lograron determinar la presencia de un nuevo grupo genotipo del virus, el cual se caracterizaba por ser altamente virulento. En los primeros casos reportados del VDVB-2, los problemas por neumonías eran el diagnóstico más frecuente y se observaba en ganado de diferentes edades. Los reportes de abortos y diarreas eran los signos iniciales, mientras que en la necropsia, se observaban lesiones como úlceras y erosiones gastrointestinales, similar a lo descrito en la Enfermedad de las Mucosas (EM) (Goyal y Ridpath, 2008). A pesar de que la morbilidad fue reportada en un 40%, la mortalidad de estos brotes era de aproximadamente el 20%, los animales sufrían una muerte repentina debido a una infección persistente subclínica.

En este contexto, diversos reportes han detectado que el VDVB-2 es un contaminante común en productos biológicos y en cultivos celulares. El uso de suero fetal bovino como suplemento para el crecimiento y mantenimiento de líneas celulares en la producción de vacunas ha sido el origen de la contaminación, ya que no se garantiza la ausencia de antígeno o anticuerpos contra VDVB o no se encuentren sometidos a procesos de inactivación del suero. Existen reportes de infecciones iatrogénicas en bovinos, como consecuencia del uso de vacunas contaminadas con el virus, tal como sucedió en Holanda en un brote de Síndrome Hemorrágico que se presentó en el ganado posterior a la aplicación de una vacuna de virus vivo modificado contra VHB-1, contaminada con cepas virulentas del VDVB-2 (Giangaspero et al., 2001).

Actualmente, se ha determinado que el VDVB-2 se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial. Específicamente, en el continente Americano, se tienen reportadas prevalencias que van del 40 al 54%, como es el caso de Estados Unidos y Canadá (Ridpath et al., 2000). Reportes obtenidos de hatos de bovinos en el sur de Brasil, indican que a pesar de que el VDVB-1 es el más predominante (57.6%), el VDVB-2 se encuentra presente en las explotaciones ganaderas (42.4%), particularmente el subgenotipo VDVB-2b (Weber et al., 2014). Pizarro-Lucero y col. (2006) realizaron caracterizaciones en aislados obtenidos a partir de muestras de

bovinos aparentemente sanos y con infección clínica en Chile y obtuvieron que el VDVB-2 era el más abundante en las muestras analizadas con un 51.5%, mientras que el VDVB-1 se encontraba en un 48.5%.

1.8 EFECTOS DE LA INFECCIÓN CON EL VDVB EN EL SISTEMA INMUNE

El VDVB presenta tropismo hacia células del sistema inmune, tales como monocitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, linfocitos T y B y células epiteliales. Sus efectos sobre el sistema inmune de un animal infectado involucran una amplia modulación de la respuesta humoral y celular; por ejemplo, se ha observado que en macrófagos alveolares la acción del virus compromete la proliferación de linfocitos, disminuye la actividad microbicida de los neutrófilos así como la expresión de Receptores Tipo Toll (RTT o TLR), expresión del complemento, producción de receptores Fc y quimiocinas, entre otros (Schaut et al., 2016).

Las Células Presentadoras de Antígeno (CPA), principalmente monocitos y células dendríticas, al ser más susceptibles a la infección, presentan disminución en los receptores Fc y en la expresión del receptor C3, moléculas necesarias para la fagocitosis. En monocitos de bovino infectados con VDVB (CP o NCP), se ha demostrado que la expresión de CD80/CD86 en la superficie celular disminuye posterior a las 24 h post-infección, al igual que la expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad II (MHC II) y durante la infección con VDVB-2 NCP, disminuye en células mononucleares de sangre periférica, en tejido linfoide y placas de Peyer, por lo que la presentación de antígeno a los linfocitos T disminuye. En el caso de las células dendríticas, se ha demostrado que la capacidad de presentación de antígeno a linfocitos T cooperadores o la expresión de MHC II no se afecta por la infección de virus CP o NCP (Chase, 2013).

La regulación de la síntesis del IFN α/β , requiere la participación de los Factores Reguladores del IFN 3/7 (FRI o IRF's); posterior a su transcripción, son

transportados al núcleo, donde activarán o reprimirán la expresión del IFN tipo I, con lo que se promueve un estado antiviral en la célula hospedera y la activación de la respuesta inmune adaptativa. Se ha demostrado que N^{pro} es capaz de inhibir la apoptosis inducida por dsARN a través de activar la degradación proteosomal del IRF3, previniendo la transcripción de los genes del IFN β . Otros miembros de la familia *Flaviviridae*, como el Virus de la Hepatitis C (VHC) bloquea RTT-3 impidiendo la fosforilación de IRF3 y la inducción de los genes estimuladores del Interferon (ISG's) (Peterhans and Schweizer, 2013).

RTT-7 depende exclusivamente del adaptador celular MyD88 (Gen 88 responsable de la diferenciación primaria de células mieloides), el cual activa la transcripción de IRF7 necesario para la expresión de los genes de citocinas pro-inflamatorias (IFN α/β). En el caso del Virus de la Fiebre Porcina Clásica, mediante el uso de mutantes virales en el gen de NS4B se ha demostrado que modula la activación de RTT-7 (Seago et al., 2007). En un estudio realizado con el virus VDVB-2, se documentó que NS5A interactúa con MyD88 en macrófagos *in vivo*, por lo que se ha sugerido que inhibe la transcripción de IRF-7 y por lo tanto, la activación de NF κ B (Factor de Necrosis Tumoral kappa Beta) (Schaut et al., 2015).

A nivel citoplasmático, la proteína citoplasmática inducida por el ácido retinoico I (RIG-1) y la proteína del gen asociado a la diferenciación del melanoma 5 (MDA5), se unen con el dsARN, activando una cascada de señales. Ambas proteínas interactúan con el adaptador mitocondrial de señalización antiviral (MAVS) localizado en la superficie externa de la mitocondria y en los peroxisomas, permitiendo la transcripción de NF κ B y AP-1, y finalmente la producción de IFN a nivel nuclear (al activar IRF3/7), así como de citocinas proinflamatorias e inducir a apoptosis en células infectadas a través de la activación de la Caspasa-9 (Peterhans and Schweizer, 2013, Fredericksen et al., 2015). Hansen y colaboradores (2010) observaron que LGP2, una ARN helicasa, es un regulador negativo de RIG-I y se ha identificado en altas concentraciones en la sangre de fetos con infección aguda y en PI's.

La infección inducida por el virus, en particular por un biotipo NCP, en el embrión de bovino en etapas tempranas de la gestación (< día 150), coincide con el desarrollo del sistema inmune, por lo que al ser incapaz de iniciar una fuerte respuesta inmune innata y adaptativa al virus, no reconoce al virus como “extraño” e incorpora al antígeno viral en el repertorio de antígenos del hospedero, permitiendo que la infección persistente del VDVB se inicie. Se ha propuesto que la evasión de la respuesta inmune se origina por la capacidad de los virus NCP de no inducir la producción de IFN tipo I, además de regular negativamente la expresión de Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α) e IL-1 β inhibiendo procesos tales como la inflamación y apoptosis en células infectadas e interfiriendo con la activación de los linfocitos T (Chase, 2013). La inducción de la infección con virus NCP, ha demostrado la disminución del número de linfocitos (linfopenia), inicialmente de linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) seguido de la disminución de los linfocitos T cooperadores (CD4⁺), de la Interleucina 12 (IL-12) e IFN γ (gamma). La producción de IFN γ es fundamental para que suceda una eficiente respuesta inmune ante agentes virales, ya que permite la activación de CPA. A pesar de que la producción de IFN γ es transitoria, su efecto sinérgico aumenta la producción de IFN tipo I e ISG's; esta acción contribuye a la disminución de la viremia fetal durante el desarrollo de la infección fetal persistente (Smirnova et al., 2014, Rhodes et al., 1999).

A pesar de que la respuesta inducida por IFN impide la síntesis de las proteínas virales en las células huésped, existe evidencia que la estimulación crónica de IFN tiene efectos negativos sobre el ciclo celular, inhibiendo la expresión de genes involucrados en el crecimiento celular, tal como sucede en los becerros PI's en etapa intrauterina que sufren disminución en su crecimiento (Smirnova et al., 2012). En este punto, se ha identificado que la quimiocina 4 C-X-C (CXCR4), se expresa en células del sistema inmune, plaquetas y células del SNC. Alteraciones en la unión a su receptor CXCL12 (Factor 1 derivado del estroma, SDF-1 o CXCL12) tiene consecuencias en procesos de importancia biológica como hematopoyesis,

cardiogénesis, vasculogénesis desarrollo neuronal, movimiento de células inmunes, así como muerte embrionaria por defectos en el desarrollo embrionario y defectos en el desarrollo de células B (Weiner et al., 2012, Hansen et al., 2010).

1.9 MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y EPIDEMIOLOGÍA

La infección por el VDVB suele tener diversas consecuencias clínicas dependiendo de las características genéticas y antigénicas del virus. Los cuadros clínicos pueden presentar diversos grados de severidad (desde agudos hasta crónicos e inclusive fatales) dependiendo del sistema afectado; por lo que se ha logrado diferenciar en dos síndromes biológicamente distintos conocidos como “**infección aguda**” y “**Enfermedad de las mucosas**”. La signología clínica asociada a la infección suele ser inespecífica en la mayoría de las ocasiones lo cual dificulta su diagnóstico. Se ha reportado que del 70 al 90% las infecciones presentes en los hatos de bovinos son subclínicas (Rai et al., 2015).

La **Infección aguda** es la presentación inicial; generalmente es consecuencia de una infección por un virus NCP en animales no gestantes, inmunocompetentes y seronegativos al virus de la VDVB (Bachofen et al., 2010). En el tracto respiratorio se ha determinado que agudiza los cuadros respiratorios derivados al Complejo Respiratorio Infeccioso Bovino (CRIB) (Fulton et al., 2005) ya que por sí solo, induce inmunosupresión en el hospedero y puede establecer infección a lo largo del tracto respiratorio. En asociación con el Virus Herpes Bovino tipo 1 (VHB-1), Virus Respiratorio Sincitial Bovino (VRSB) y Virus de la Parainfluenza tipo 3 (VPI-3), se ha observado que disminuye la capacidad de respuesta del sistema inmune, a través de supresión de la actividad fagocítica de macrófagos alveolares así como apoptosis de linfocitos en tejido linfoide asociado a los bronquios, permitiendo el establecimiento de infecciones bacterianas secundarias (Lanyon et al., 2014, Ellis, 2009, Ridpath, 2010a). Diversas investigaciones han demostrado que es el agente viral aislado con mayor frecuencia en tejidos del tracto respiratorio asociado a co-

infecciones bacterianas producidas por *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* y *Mycoplasma bovis* (Gagea et al., 2006, Booker et al., 2008). La interacción entre estos patógenos tiene como resultado, principalmente bronconeumonías, además de otras patologías asociadas al tracto respiratorio en bovinos de diversas edades (Grissett et al., 2015, Rai et al., 2015).

La presentación digestiva frecuentemente se asocia a la forma fatal del VDVB conocido como **Enfermedad de las Mucosas (EM)** (Bachofen et al., 2010). Los animales afectados principalmente son becerros en etapa de destete que cursan con una infección persistente producida por un virus NCP, posteriormente al ser infectados con una cepa CP se deriva una superinfección (Baker, 1995, Brodersen, 2014). Los signos clínicos asociados son: depresión, debilidad, deshidratación, ptialismo, disminución en la rumia, acidosis, timpanismo, diarrea derivada de la interrupción de la actividad nerviosa en el tracto gastrointestinal, ocasionalmente, tenesmo, problemas podales y muerte (Baker, 1995, Lanyon et al., 2014); los hallazgos a la necropsia refieren ulceraciones, erosiones y necrosis en la mucosa de la cavidad oral, faringe, laringe esófago, pre-estómagos, abomaso e intestino delgado y grueso así como del tejido linfoide asociado a estos órganos (Brodersen, 2014).

Se ha descrito que cuando el VDVB afecta el Sistema Nervioso durante el primer tercio de gestación del bovino (80 a 150 días de gestación) el daño al tejido embrionario se caracteriza por la presencia de vasculitis, atrofia e hipoplasia del cerebelo, cavitaciones en la materia blanca (hidrocefalia), microencefalia, hidranencefalia e hipomielinización (Baker, 1995, Lanyon et al., 2014), además de otros defectos congénitos que involucran al sistema músculo esquelético, tegumentario, ocular y endocrino (Ridpath, 2010a). Por otro lado, si una vaca gestante sufre una infección con un virus NCP durante los días 40 hasta 120 de la gestación producirá un becerro inmunotolerante o **Persistentemente Infectados (PI)** (Brodersen, 2014, Larson et al., 2004). Los becerros PI son el principal reservorio del virus; a pesar de ser algunos animales son aparentemente sanos son

los diseminadores más eficientes de la infección dentro del hato, ya que secretan el virus en fluidos corporales (Rai et al., 2015). Se ha reportado que pueden nacer con defectos congénitos fatales y son altamente susceptibles a infecciones secundarias relacionadas a enteritis, neumonías, artritis o Enfermedad de las mucosas, por lo que muchos mueren antes de entrar a la etapa reproductiva (Figura 3) (Shin y Acland, 2001; Valle et al. 2001).

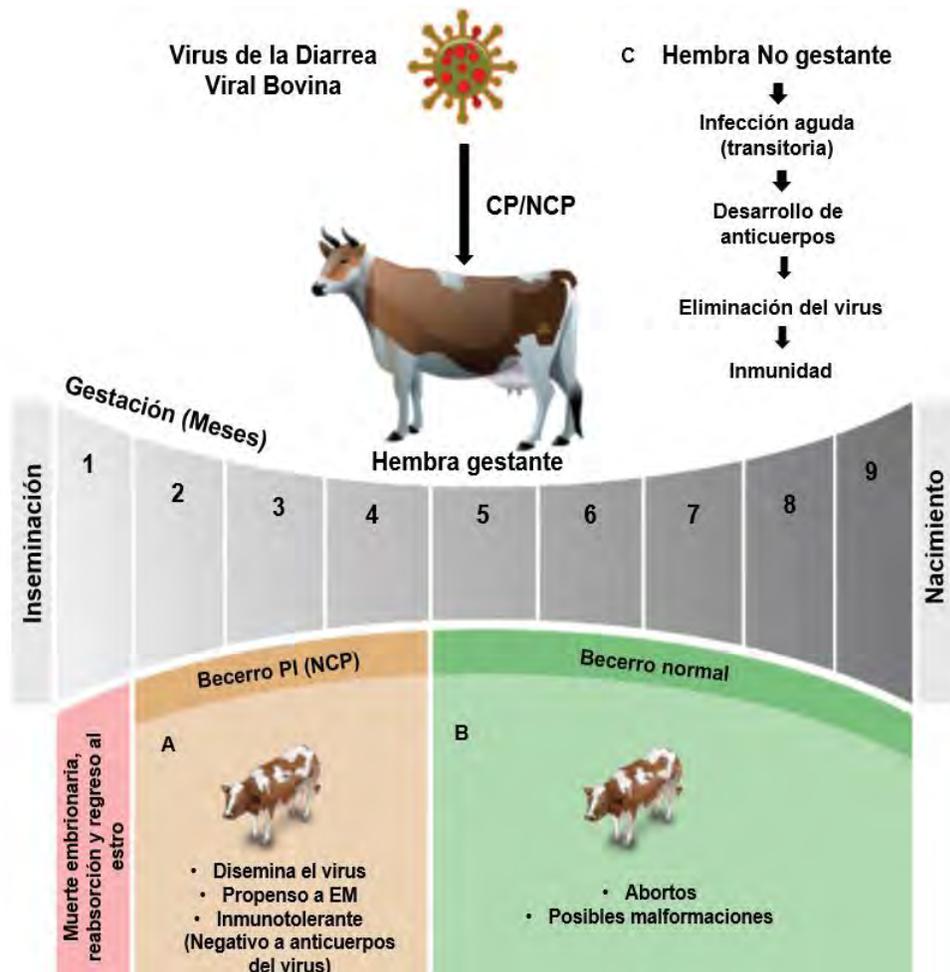


Figura 3. Esquemmatización de los efectos de la infección del VDVB durante la gestación. (A) La infección transplacentaria del feto por virus NCP entre el día 40 y 120 de la gestación puede producir un becerro PI (inmunotolerante) exclusivamente a la cepa infectante y con predisposición a presentar EM. **(B)** La infección durante etapas más avanzadas de la gestación produce becerros con malformaciones, abortos o animales inmunocompetentes que eliminaron la infección. **(C)** En la infección aguda se puede presentar por la infección del VDVB de cualquiera de los dos biotipos, los animales eliminarán el virus y desarrollarán inmunidad (celular y humoral) y estarán protegidos en una re-infección contra la cepa que inicialmente desencadenó la infección. CP: Citopático; NCP: No Citopático; PI: Persistentemente Infectado. **(Modificado de Schweizer y Peterhans 2013).**

Se ha reportado que la prevalencia de animales PI en hatos es generalmente menor al 1%: en becerros que ingresan a las producciones intensivas de engorda, “feedlots” en EE.UU. se ha estimado que la prevalencia oscila de un 0.1 al 0.4%, lo cual es similar con lo reportado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), quienes estiman la prevalencia en 0.17%.

La replicación del virus dentro de los órganos reproductivos de animales con infección aguda y de animales PI, se lleva a cabo particularmente en los ovarios, provocando disfunción ovárica derivada de la inflamación de los ovarios y de los folículos así como de necrosis en las células de la granulosa y del cuerpo lúteo. Como resultado, se disminuye el tamaño y número de los folículos reclutados durante la oleada folicular provocando infertilidad en el ganado (Houe, 1999, Ridpath JF 2006, Yesilbag et al., 2014). La alteración de los parámetros reproductivos suele reflejarse en altas tasas de mortalidad embrionaria, aumento del número de inseminaciones por vaca, aumento de intervalo entre partos, disminución en el número de gestaciones. Se ha reportado que el aborto es la consecuencia más frecuente cuando el virus afecta al sistema reproductivo (Lanyon et al., 2014, Sayers et al., 2015).

Al menos el 60% de los bovinos que habitan en regiones donde la DVB es endémica y que no cuentan con medidas de bioseguridad pueden infectarse en cualquier etapa de su vida productiva. Estudios epidemiológicos han revelado que hatos bovinos infectados con el VDVB muestran mayor riesgo de presentar mastitis clínica, disminución de producción láctea, disminución en la ciclicidad reproductiva, aumento en el intervalo entre partos y por lo tanto se incrementa la inversión en tratamientos contra dichos problemas (Brownlie et al., 2000). Se estima que las pérdidas económicas derivadas de infecciones con el VDVB es de aproximadamente de 40 a 100 mil dólares por hato infectado. En Estados Unidos, las pérdidas económicas se estiman que oscilan de 10 a 57 millones de dólares por un millón de partos (Houe, 1999).

Por otro lado, existen reportes en animales de fauna silvestre seropositivos al VDVB. Se ha propuesto que además de infectarse, los animales silvestres pueden ser vectores y diseminar el virus dentro de sus poblaciones, mantenerse como reservorios de la DVB y establecer infecciones persistentes, tal como sucede en EE.UU. en poblaciones de venados cola blanca, donde la prevalencia aparente de PI es de aproximadamente del 0.3%. En el caso de los venados cola blanca, al ser los rumiantes más abundantes en vida libre en Norte América, se ha especulado que tiene un papel importante como reservorio del virus, infectándose al entrar en contacto con bovinos que se encuentran en condiciones extensivas de pastoreo. Sin embargo, se han identificado el VDVB como endémico en algunas regiones donde no hay presencia de hatos bovinos, y en especies como el Ciervo mula y el Caribou suelen ser seropositivos (Walz et al., 2010).

1.10 DIAGNÓSTICO

Se tienen disponibles una gran diversidad de métodos diagnósticos (aislamiento viral, detección de antígeno por medio de inmunohistoquímica, detección de anticuerpos por medio de ELISA, virus neutralización, detección del genoma por medio de PCR) que son herramientas para establecer las diferencias antigénicas y diferenciar las especies de *Pestivirus*. Sin embargo, el análisis de las secuencias de nucleótidos es el criterio más confiable (Dubovi, 2013).

Las técnicas serológicas dirigidas a la detección de antígenos específicos del virus, son de gran utilidad para determinar el estatus sanitario del hato, al funcionar como indicador de la exposición al virus así como para establecer estrategias de seguimiento y de control de la enfermedad (Sandvi, 1999). A pesar de que los ensayos de Virus Neutralización son considerados como técnica de referencia para determinar los niveles de anticuerpos contra el VDVB, actualmente el ensayo de ELISA, es el más utilizado a nivel de hato y en laboratorios de diagnóstico. Una de las ventajas de esta técnica, es que son de bajo costo y en el rápido procesamiento

de un amplio número de muestras por ensayo, ya sea de suero o leche. A la fecha, existen numerosas variaciones de esta técnica en las pruebas diagnósticas comerciales basadas en técnicas indirectas para la detección de anticuerpos. Niskanen y colaboradores (1989) mediante el uso del ensayo indirecto de ELISA pudo determinar el nivel de anticuerpos contra el VDVB en muestras de tanque de leche y correlacionarlo con la presencia de animales PI en el hato. Sin embargo, los resultados de esta prueba puede variar debido a la diversidad antigénica que existe entre los diferentes aislamientos del VDVB (Saliki J, Dubovi E. 2004).

1.11 CONTROL Y VACUNACIÓN

Las estrategias actuales para reducir las pérdidas causadas por el DVB en hatos infectados incluyen:

- Vacunación: vacunas elaboradas a base de virus vivo modificado o virus inactivados.
- Control de las infecciones agudas en vacas no gestantes e inmunocomprometidos.
- Identificación y eliminación de los animales infectados persistentemente.

A pesar de que en el mercado se encuentran disponibles una gran variedad de vacunas, debido a la amplia variabilidad antigénica y genética de las cepas virales circulantes (Genotipo 1 y 2 así como sus respectivos subgenotipos) se ha observado que existe una pobre protección contra la infección por el virus. En E.U.A, las vacunas con virus vivo modificado y con virus inactivado se encuentran elaboradas con VDVB-1a y VDVB-2a, esta última fue incluida después de un brote con este genotipo en Canadá (Carman et al., 1998, Ridpath et al., 2007).

Con lo anterior se demostró que las vacunas elaboradas a partir del VDVB-1, no provee protección cruzada para el genotipo 2. Paton (1999) y Ridpath (2005) han

reportado que los animales tienen mayor protección cuando se exponen al mismo genotipo por el cual fueron vacunados que cuando se exponen a un genotipo diferente.

En México, las vacunas disponibles en el mercado contienen VDVB-1 y 2 (PLM, 2015). Sin embargo, no cuentan con especificaciones sobre la cepa viral a partir de la cual están elaboradas. Lo anterior podría explicar porque la dificultad del control de los casos clínicos de esta enfermedad en las UPB.

El uso de pruebas de virus neutralización con anticuerpos monoclonales ha permitido el mapeo de epitopos en proteínas inmunodominantes del virus. Por ejemplo, mediante el mapeo de epitopos en la glicoproteína E2 se ha podido demostrar que el VDVB-2 es diferente antigénicamente al VDVB-1 y al mismo tiempo se ha podido definir su estructura antigénica. La diversidad antigénica de las cepas virales debido al cambio en la estructura antigénica de los epitopos, ha permitido comprender el fallo en la vacunación (Zamit et al., 2010). La caracterización de epitopos específicos del virus es el primer paso para el desarrollo de una inmunoterapia contra la DVB. Una herramienta de investigación que ha permitido mapear epítapos es la técnica de Phage Display, la cual ha permitido identificar las variantes en la conformación de los epitopos en anticuerpos específicos, a través de estructuras denominadas mimotopos, las cuales se caracterizan porque mimetizan la estructura conformacional y lineal de los epitopos.

1.12 TECNOLOGÍA DEL DESPLIEGUE EN FAGOS (PHAGE DISPLAY)

La tecnología del Despliegue de Fagos es un método muy eficaz para producir y seleccionar péptidos con ligandos específicos en diversas moléculas de interés biológico. Fue descrita por primera vez en 1985 por George P. Smith, quien utilizó la proteína III (pIII) del bacteriófago filamentoso M13 para fusionar un segmento de la Endonucleasa EcoRI (Arap, 2005). El fundamento de la técnica se basa en la fusión genética de una secuencia de interés con un gen que codifica para una proteína de la envoltura del fago M13. Como resultado, el fago desplegará una proteína “híbrida” que se presentará en la superficie del fago (Kugler et al., 2013; Smith y Petrenko, 1997).

Los sistemas de despliegue en fago más usados son aquellos que se basan en los Fagos filamentosos o Ff (f1, Fd, IKe, M13) (Hyman, 2012). Este grupo infecta una amplia variedad de bacterias Gram negativas que incluyen los géneros de *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Vibrio*, *Thermus*, *Neisseria* y *Escherichia*. Dentro de las ventajas que tienen los Ff como vectores de clonación, encontramos que son estables en un amplio rango de temperaturas y pH; durante su ciclo de replicación, la bacteria infectada puede producir grandes cantidades de virus sin producir su lisis; Se ha observado que los Ff de *Escherichia coli* (*E. coli*) tienen un proceso de propagación y amplificación rápido llegando a producir títulos de 10^{13} fagos/ mL en cultivo de células (Rakonjac et al., 2011). El genoma del virus puede tolerar inserciones de ADN en regiones no esenciales para su replicación, sin alterar su ensamblaje o modifique su capacidad infectividad (Kugler et al., 2013, Pande et al., 2010). El Ff más utilizado en los sistemas de despliegue en fago, es el M13.

1.13 BACTERIÓFAGO FILAMENTOSO M13

El bacteriófago M13 es un virus que pertenece al género *Inovirus*; este fago no es lítico, no es patogénico e infecta específicamente a bacterias *Escherichia coli* que contienen el plásmido conjugativo responsable de la formación del pili F. (Kay et al., 1996).

La estructura del fago M13 se caracteriza por ser altamente flexible, con forma tubular filamentosa de aproximadamente 880 nm a 1µm de largo y de 6.5 nm a 10 nm de diámetro. Su genoma consiste en un ADN circular de cadena sencilla positivo (ssADN+) de aproximadamente 6,400 que codifica para 11 proteínas. Dentro del genoma, se localiza una región denominada intergénica que no codifica para ninguna proteína, sin embargo, contiene el sitio de origen para la síntesis del ADN viral (+) y de la cadena complementaria (-). De igual manera, en esta región se localiza la “señal de ensamblaje o PS” (cerca del gen IV) (Barbas et al., 2004).

Aproximadamente, el 87% del fago está compuesto por proteínas. Los productos de los genes III, VI, VII, VIII y IX constituyen la cápside viral. La proteína VIII (pVIII) es la más abundante en el fago y se denomina proteína mayor de la cápside. Esta proteína de 50 AA recubre al virión a lo largo de su estructura con aproximadamente 2,700 copias adoptando una estructura helicoidal, las cuales encapsulan al genoma del fago (Kay et al., 1996). En los extremos del fago, se localizan cuatro proteínas menores de envoltura: en el extremo donde se localiza la “señal de ensamblaje”, se encuentran de 3 a 5 copias de las proteínas VII (pVII) y IX (pIX) con 32 AA y 33 AA, respectivamente. Ambas son proteínas hidrofóbicas sin embargo, se ha observado que pIX es la única que permite fusiones para realizar despliegue de polipéptidos (Kugler et al., 2013, Endemann and Model, 1995).

Al extremo opuesto de la partícula, se localizan las proteínas VI (pVI) y III (pIII) conformadas por 112 AA y 406 AA, respectivamente. Ambas forman un complejo en la punta del filamento y son necesarias para finalizar el ensamblaje así como mantener la estabilidad del virión. Se ha sugerido que pVI es la más hidrofóbica e

inaccesible de este complejo proteico (Endemann and Model, 1995), por el contrario a pIII, la cual cuenta con porción hidrofílica además de estar involucrada en el proceso de infección. La proteína pIII consiste en tres dominios designados como N1 (D1), N2 (D2) y CT (D3). El dominio N1 y N2 se localizan en la región N-terminal e interactúan con los receptores de la bacteria: N1 cuenta con 68 AA y es el responsable de la translocación del ADN del fago al citoplasma de la bacteria; mientras que N2 contiene de 87 a 217 residuos y su función es la de unión con el pili F. En cuanto al dominio CT, se localiza oculto en el extremo C-terminal y tiene 150 aminoácidos. En conjunto con pVI, interactúa con pVIII dando forma a la punta del fago y manteniendo su estabilidad (Barbas et al., 2004; Rakonjac y Model, 1998). Se tiene reportado que estos dominios están divididos por regiones con secuencias repetidas de glicina, las cuales le confieren flexibilidad a la molécula durante el ensamblaje del virión. En estas regiones se ha tenido éxito para incorporar secuencias exógenas de péptidos dentro de la proteína (Figura 4) (Makowski, 1994).

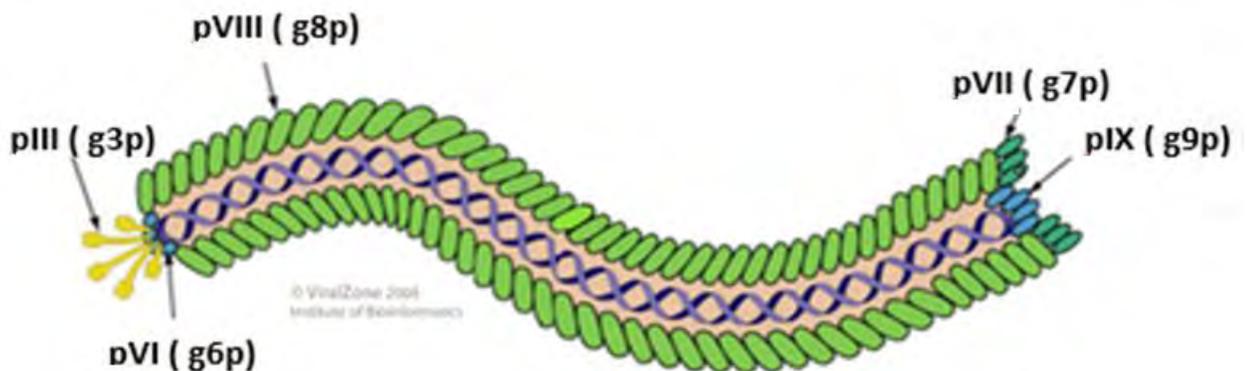


Figura 4. Esquemática del bacteriófago M13 que muestra la disposición de las proteínas de cápside y su ADN (Viralzone: ExPasy.org).

1.14 PROCESO DE INFECCIÓN DEL FAGO M13

El fago M13 inicia su ciclo de infección cuando el dominio N2 de pIII se une a la punta del pili conjugativo F de *E. coli*. Esta acción provoca un cambio conformacional en N2 que permite se libere N1 esta última, pueda interaccionar con la proteína TolA de la membrana bacteriana (Rakonjac et al., 2011, Riechmann and Holliger, 1997). La proteína TolA forma parte del complejo TolQRA, las cuales son proteínas integrales de la membrana citoplasmática, necesarias para mantener la integridad de la membrana externa de la bacteria. También se ha reportado que están involucradas durante la infección en la translocación del ADN al interior del citoplasma y de las proteínas de envoltura dentro de la membrana citoplasmática (Clackson and Lowman, 2004, Lubkowski et al., 1999). Después de que el fago se une al pili, este sufre una serie de retracciones hacia el citoplasma (Figura 5).

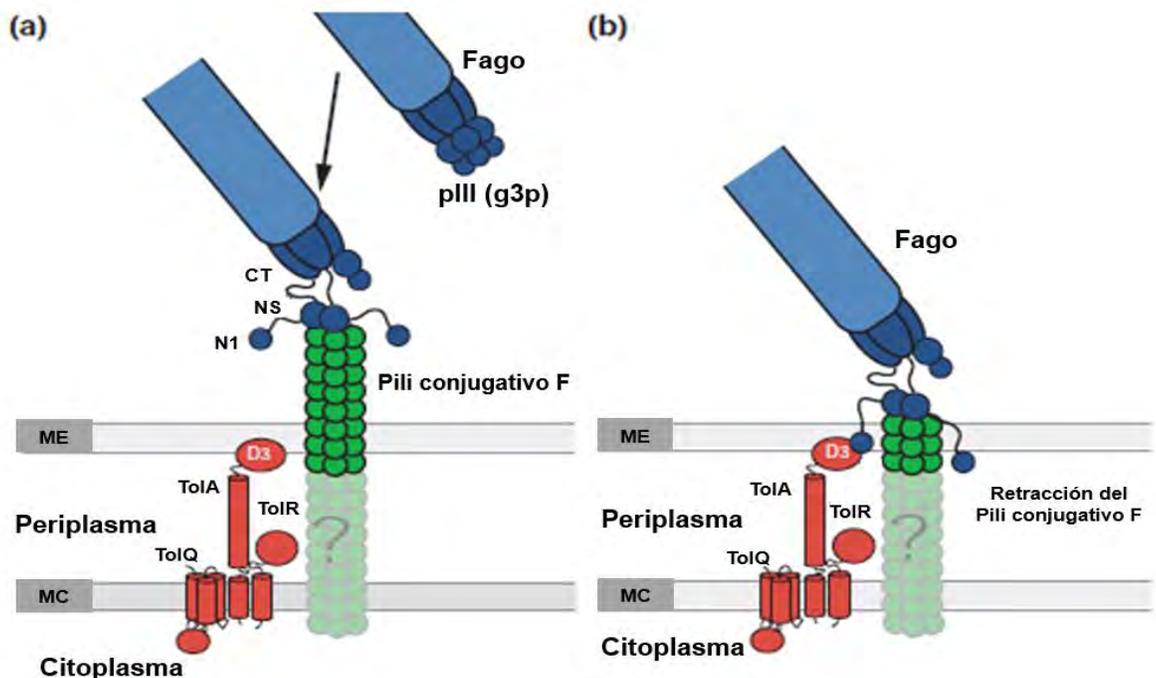


Figura 5. Esquemización del proceso de infección del fago: (a) Unión de la pIII al Pili conjugativo F de la bacteria y (b) Retracción del fago hacia el citoplasma bacteriano (Modificado Lubkowski y col. 1999)

A continuación, las proteínas de la envoltura pVIII, pVII y pIX se incorporan a la membrana citoplasmática (Kay et al., 1996). Mientras tanto, el ssADN+ del fago es translocado al citoplasma, donde se inicia la síntesis de la cadena complementaria (-) mediante enzimas bacterianas, tales como la ADN polimerasa y la Topoisomerasa II; como resultado se obtiene una molécula de ADN de doble cadena superenrollada denominada Forma Replicativa (FR o frADN), la cual es requerida para la replicación de fago (Barbas et al., 2004). La FR sirve como molde para la expresión de los genes que darán origen a las proteínas del fago. En particular la síntesis de pII es crucial para realizar un corte en la región intergénica de la cadena (+) de la FR, dando como resultado que el extremo 3' de la cadena quede libre, sufra una elongación por la ADN polimerasa III de la bacteria y permita la síntesis de una nueva cadena viral utilizando como molde la cadena (-) a través del mecanismo de replicación de ADN conocido como "Circulo rodante". Una vez que pII termina por recircular la cadena (+) de ADN, corta y liga la molécula, y a través de enzimas bacterianas se obtiene una nueva FR que continúa con la producción simultánea de las proteínas virales. A su vez, pX inhibe la función de pII y contribuye a mantener estable las ssADN+ en ese estado (Rakonjac et al., 2011).

En este punto, la pV al encontrarse en altas concentraciones, se une al ssADN naciente formando un complejo que previene la acción de la polimerasa bacteriana y evita su conversión a la FR. Este complejo se dirige hacia zonas específicas de la membrana, y pV es sustituida por las proteínas de la envoltura del fago que se localizan en la membrana citoplasmática (VII, IX, VIII, VI y III), con lo cual se dará origen a la nueva partícula viral. Las proteínas pI, pXI y pIV, son requeridas durante las etapas de ensamblaje del fago, funcionando como un sistema de exportación de proteínas y formando un canal a través del cual será secretado el fago al exterior conservando la integridad de la membrana bacteriana (Rakonjac et al., 2011, Sidhu, 2001).

1.15 BIBLIOTECAS DE PÉPTIDOS DESPLEGADOS EN FAGOS FILAMENTOSOS

Una aplicación importante del Despliegue en Fago ha sido la construcción de bibliotecas de péptidos. La incorporación de miles de millones de combinaciones de péptidos sintéticos sobre la superficie de los fagos ha sido gracias al uso de técnicas de recombinación, con lo cual ha sido posible incrementar la diversidad y eficiencia de estas bibliotecas (Pande et al., 2010). A su vez, esta diversidad da como resultado una “mezcla heterogénea” de fagos que pueden acarrear una secuencia de péptidos al azar en su genoma y a través de la infección a cultivos de bacterias, puede replicar el péptido y producir una progenie uniforme que desplegará el mismo péptido. Las proteínas de envoltura comúnmente usadas son pVIII y pIII, y los péptidos se encuentran fusionados en la porción N-terminal de ambas proteínas (Winter et al., 1994). En el caso de pIII, se realizan inserciones de 6 hasta 43 aminoácidos de longitud sin afectar la infectividad del fago o su ensamblaje (Arap, 2005). Por el contrario, en pVIII el número de inserciones se limita de 6 a 8 aminoácidos ya que se ha demostrado que por arriba de 12 aminoácidos, disminuye la eficiencia de ensamblaje de la partícula (Kay et al., 2001, Makowski, 1994).

Actualmente, las bibliotecas comerciales, pueden estar conformadas por concentraciones de 10^9 - 10^{14} / partículas de fago/mL, lo cual resulta en una gran cantidad de combinaciones simultáneas de péptidos (Nemudraya et al., 2016). Mediante un proceso cíclico conocido como Biopanning o Bioselección, se enriquece una población de fagos que contengan un solo péptido y que a su vez, tenga afinidad por un ligando de interés. Este procedimiento consta de 3 etapas (Hammers and Stanley, 2014):

- 1) Inmovilización del ligando de interés, mediante absorción pasiva y eliminación de los ligandos que no se unieron a través de lavados.

- 2) Interacción con la biblioteca de fagos y los ligandos; aquellos fagos que no se unieron son eliminados a través de una serie de lavados.
- 3) Elución de los fagos unidos a la molécula blanco. Estos fagos son amplificados mediante la infección de bacterias (*E. coli*). Las bacterias infectadas generarán una nueva población de fagos que se someterán a otro ciclo de bioselección.

En la Figura 6 se muestra los pasos en la bioselección con una biblioteca de fagos. Después de 3 o 4 ciclos, se alcanzará un grado de enriquecimiento en el cual se tendrán clonas altamente específicas de las moléculas de interés, y mediante inmunoensayos como la prueba de ELISA, detección de proteínas mediante Western blot y secuenciación de ADN, se realiza la caracterización de las clonas con alta afinidad y especificidad (Pande et al., 2010, Molek et al., 2011).

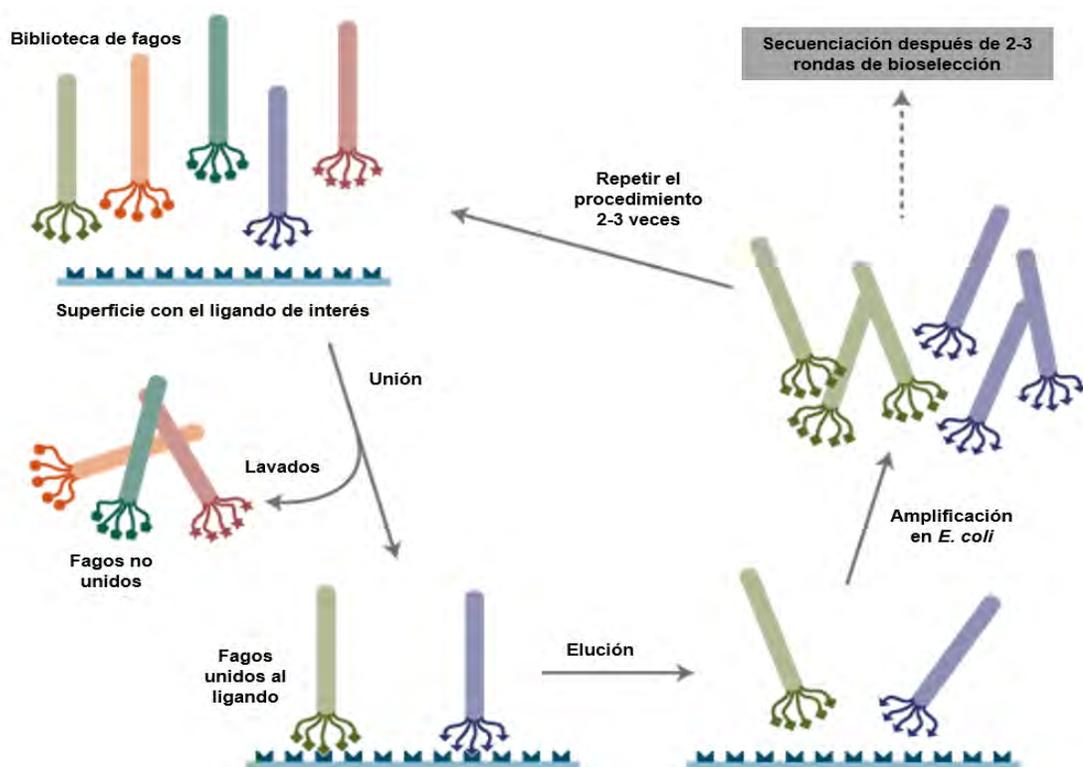


Figura 6. Representación del procedimiento de bioselección con una biblioteca de fagos M13. (Modificado de BioLabs® Inc., New England).

1.16 APLICACIONES DEL DESPLIEGUE EN FAGOS

Esta herramienta ha sido utilizada ampliamente en los campos de la biología molecular, bioquímica y biomedicina, con diversos enfoques tales como: identificación de marcadores específicos sobre tejidos u órganos, en el diseño o descubrimiento de fármacos y moléculas blanco, desarrollo de vacunas, selección *in vitro* de nuevos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos e identificación de agentes para la administración dirigida de fármacos y terapia génica (Molek et al., 2011, Arap, 2005); identificación de enzimas, sus sustratos e inhibidores así como en el diseño de anticuerpos catalíticos y nuevas enzimas (Fernandez-Gacio et al., 2003); análisis de interacciones proteína-proteína, mapeo de epitopos y de paratopos en anticuerpos (Pande et al., 2010).

En este último ejemplo, la tecnología del Phage Display es considerado un método rápido y accesible para realizar el mapeo de epitopos en antígenos o proteínas inmunogénicas (Kugler et al., 2013). La identificación de secuencias de aminoácidos en epitopos lineales o conformacionales es fundamental para el diagnóstico e inmunoterapia de enfermedades, así como para el desarrollo de vacunas.

Las bibliotecas de péptidos son una alternativa en la investigación que han permitido seleccionar moléculas que mimetizan la estructura de epitopos y compiten con la proteína natural en el sitio de unión a anticuerpos. A estos péptidos se les denomina mimotopos. Los mimotopos son pequeños péptidos, que imitan las características esenciales del epitopo. Sin embargo, no necesariamente tienen la misma secuencia primaria de aminoácidos, ya que su secuencia puede ser discontinua, pero son capaces de producir una respuesta antigénica similar o mayor a la del epitopo natural (Meloan et al., 2000, Wu et al., 2016, Pande et al., 2010).

Como antecedente, el mapeo de epítopos/mimotopos, péptidos y/o fragmentos específicos mediante Phage Display ha sido reportada para enfermedades autoinmunes en humanos, identificación de mimotopos de la toxina del cólera (Yu et al., 2016), en agentes parasitarios como *Fasciola hepática* y neurocisticercosis

por *Taenia solium* (Villa-Mancera et al., 2008, Manoutcharian et al., 2004); en agentes virales tales como el Virus del Papiloma Humano, virus de la Influenza aviar H5N1, el SARS, Virus del Citomegalovirus Humano (VCMH) y en el virus de la Inmunodeficiencia Humana causante del SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Humana Adquirida) (Wu et al., 2016). En cuanto a patógenos virales de interés veterinario encontramos investigaciones realizadas con el Virus de la Fiebre Porcina Clásica (VFPC), Virus del Síndrome Respiratorio Reproductivo Porcino (PRSS), Virus de Aujeszky o virus de la Pseudorabia, Virus de la Lengua Azul (VBT), el virus de la Rabia así como para el Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) genotipo 1, entre otros (Kugler et al., 2013, Gazarian et al., 2011, Jelsma et al., 2013, Zamit et al., 2010).

II. JUSTIFICACIÓN

En México, existen pocos estudios que revelen la prevalencia del virus en el ganado bovino y en otras especies susceptibles a la infección. Se ha demostrado que la seroprevalencia en ganado bovino es de aproximadamente un 15%, en contraste con animales de vida silvestre, donde la seroprevalencia oscila en un 55 %. El VDVB genotipo 2, se ha identificado en Norte América (Estados Unidos y Canadá) en las últimas dos décadas con una prevalencia reportada del 40 a 43 % asociado a brotes de “Enfermedad de las mucosas”, abortos, síndrome hemorrágico y alta mortalidad en el ganado bovino. A pesar de que en México se carece de información sobre su epidemiología, se cuenta con aislamientos del VDVB-2 obtenidos de hatos bovinos del país (No. GenBank:).

Una herramienta de investigación que ha permitido mapear epítomos es la técnica de Despliegue en fago (Phage Display), la cual permite identificar variaciones en la conformación de los epítomos al ser expresados por un anticuerpo específico. La identificación y selección de secuencias de péptidos expresados por un bacteriófago en sus proteínas de envoltura (pIII o pVIII), con la capacidad de mimetizar la actividad inducida por los epítomos naturales inmunodominantes del virus permitirán el desarrollo de una nueva generación de vacunas y métodos diagnósticos contra la DVB.

III. HIPÓTESIS

Los péptidos identificados mediante Phage Display serán específicos para los anticuerpos contra el Virus de la Diarrea Viral Bovina genotipo 2 (VDVB-2) circulantes en México.

IV. OBJETIVO GENERAL

- I. Identificar mimotopos del Virus de la Diarrea Viral Bovina genotipo 2 mediante la técnica de Phage Display.

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Generar anticuerpos policlonales específicos para VDVB- 2 Mex en conejos y verificar la reactividad utilizando como antígeno la cepa viral VDVB-2 Mex.
- Seleccionar péptidos que mimeticen epitopos del VDVB-2 mediante Phage Display con la biblioteca Ph.D.7 TM.
- Estandarizar la prueba de ELISA, utilizando el suero de conejo hiperinmune para verificar la reactividad de los péptidos seleccionados.
- Secuenciar los péptidos reactivos seleccionados.
- Identificar sueros positivos al VDVB mediante prueba comercial de ELISA (IDEXX).
- Implementar y estandarizar una prueba de ELISA con fines de diagnóstico para identificar el VDVB-2 Mex con los péptidos seleccionados.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Virus

Previo a la realización de este estudio, se obtuvo un aislado del Virus de la Diarrea Viral Bovina genotipo 2 (VDVB-2 Mex) a partir de un bovino de una UPP localizada al sur de la Ciudad de México. El aislamiento viral se realizó mediante la técnica de co-cultivo en células de la línea Madin Darby Bovine Kidney (MDBK catálogo **CLL-22 de American Type Culture Collection**), y a través de ensayos de discriminación alélica por PCR en tiempo real y por RT-PCR duplex en punto final de la región 5' RNT, y secuenciación de ácidos nucleicos de la muestra, se realizó la caracterización del virus y la determinación del genotipo viral.

6.2 Crecimiento de la línea celular

La línea celular MDBK fue descongelada a 4 °C. Se centrifugó (**Eppendorf** Centrifuge 5415 R) a 1,500 revoluciones por minuto (rpm) durante 10, para eliminar el DMSO. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en medio de crecimiento Dulbecco's Modified Eagle's Medium adicionado con 4.5 g/L de glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio (DMEM, 1x **CORNINIG** ref. 10-013-CV) suplementado con suero equino (SE, Horse serum, **Gibco** 26050-088) a una concentración del 12%. Las células se propagaron en botellas de cultivo celular de 25 cm² (**Sarstedt** 83.1810), en atmosfera de CO₂ del 5% y a 37 °C (**NUAIRE** US Autoflow automatic CO2 incubator: UN-4750).

Como procedimiento de rutina, se corroboró que tanto la línea celular como el SE no presentarán contaminación con ARN del VDVB, por un ensayo de RT-PCR específico para la región 5' RNT.

6.3 Propagación del virus

Se utilizó el aislado del VDVB-2 Mex (No. GenBank:) y se propagó en células MDBK suplementadas con SE al 2% e incubando durante 48-72 h a 37°C. Adicionalmente a la verificación del Efecto Citopático (ECP), se utilizó la pastilla y sobrenadante de las cosechas para realizar un ensayo de RT-PCR específico para la región 5' RNT y verificar la presencia de genoma viral.

6.4 Precipitación del virus con polietilenglicol (PEG)

El virus colectado en el sobrenadante de las cosechas, fue concentrado en PEG 8,000 (Poly-ethyleneglycol **Sigma-Aldrich** SLBD2822V wt 8,000) al 8%: se colocó en agitación durante 24 horas a 4°C (Hotplate Stirrer **LabTech** LMS-100). A continuación, se centrifugó a 10,300 rpm durante 2 h a 4°C y se descartó el sobrenadante. Finalmente, el precipitado fue resuspendido en 2 mL de solución amortiguadora TNE (Tris-EDTA-NaCl, pH 7.4).

A partir de la suspensión obtenida, se dializó en una membrana (MWCO: 12-14,000 KDa **SPECTRUM Spectra/Por®** membranes 21798), en solución amortiguadora (PBS 1x) y en agitación a 4°C. El producto dializado fue colectado y almacenado a -80°C hasta su uso.

6.5 Purificación del virus

El virus fue purificado mediante un gradiente de sacarosa al 60%, 45% y 30% en solución amortiguadora TN (Tris-NaCl, pH 7.4). Se colocó en tubos Beckman (**XL90 ultracentrifuge SW40 Ti Rotor**), se centrifugó a 23,000 rpm por 3 h a 4°C (Optima™XPN-90k RPM **ultracentrifuge Beckman Coulter**). La fracción viral (banda) obtenida se transfirió a un tubo Beckman nuevo (**XL90 ultracentrifuge SW40 Ti Rotor**) y se realizó otro ciclo de ultracentrifugación a 20,000 rpm durante 1 h a 4°C. Finalmente, se descartó el sobrenadante y se adicionaron 200 µL de

solución TN para resuspender la pastilla. La suspensión obtenida fue almacenada a -80°C hasta el momento de su uso.

6.6 Titulación de virus por el método de Dosis Infecciosa en Cultivo Celular 50 (DICC_{50%}/mL)

Para determinar la infectividad del virus purificado, se utilizaron monocapas de células MDBK crecidas en placas de 96 pozos en medio de infección (DMEM con SE al 2%). En la Figura 7 se esquematiza el procedimiento para realizar la titulación: los pozos fueron infectados con diluciones decuples seriadas a partir de la suspensión viral 1:10 en medio DMEM con un volumen final de 100µL hasta una dilución final 1x10⁻⁹. Se incubaron durante 1 h en agitación (Agitador orbital, Fine PCR, *Daigger* CR 100) para permitir la adsorción del virus. Las placas fueron incubadas hasta la visualización del ECP en la monocapa (hasta 72 horas). Cada ensayo se realizó por cuadruplicado. El título viral se determinó mediante la fórmula de Reed-Müench, y se expresó en DICC_{50%}/mL.

La fórmula del método de dilución límite de Reed-Müench se expresa como:

$$\text{Dilución donde ECP es } >50\% + \frac{(\% \text{ positivos arriba de } 50\%) - 50}{(\% \text{ positivos arriba de } 50\%) - (\% \text{ positivos debajo del } 50\%)} \times \text{Log } 10^{10}$$

6.7 Obtención de sueros hiperinmunes

Los sueros hiperinmunes fueron donados generosamente por la MVZ. Esp. Ma. Grisel Anaya Santillán (**Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia- UNAM**), obtenidos a partir de la inmunización con el purificado del VDVB-2 Mex en conejos de raza Nueva Zelanda de 2.0-3.0 kg de peso, clínicamente sanos y seronegativos al VDVB por una prueba comercial de ELISA (Bovine Viral Diarrhoea Virus –BVDV- Antibody Test Kit/ **IDEXX BVDV Total Ab** Cat.99-44000).

6.8 Determinación de proteínas del purificado viral por medio del ensayo de Bio-Rad® (Azul Brillante de Coomassie G-250):

Se utilizó Albúmina Sérica Bovina (ASB **EQUINOTECH-BIO, INC.** EE.UU. Catalogo. BAC62) como proteína de referencia para la calibración de la curva estándar para la determinación de la concentración de proteínas del purificado del VDVB-2.

El concentrado de Bio-Rad® (azul Brillante de Coomassie G-250 **Bio-Rad®** No. catálogo 500-0006) fue preparado conforme especifica el fabricante.

Se realizó la curva estándar de acuerdo a lo especificado por el fabricante con algunas modificaciones. A partir de una “solución stock” de 100 mg/mL de ASB, se realizaron 6 diluciones en el rango de 20 a 120 µg/mL de proteína, en un volumen final de 200 µL. A estas diluciones se les adicionó 1 mL del concentrado de Bio-Rad®. Se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente y en obscuridad; posteriormente, se realizó la lectura de absorbancia a 595nm con un espectrofotómetro (**Pharmacia Biotech Ultrospec 3000 UV/Visible**).

Una vez obtenida la curva de referencia con ASB, se realizó la cuantificación de proteínas del purificado del VDVB-2 Mex. A una muestra con concentración desconocida de 10 µL sin diluir, se le adicionó 1 mL del concentrado de Bio-Rad®. Se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y en obscuridad; posteriormente, se realizó la lectura de absorbancia con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

Los resultados fueron analizados mediante el programa estadístico IBM® SPSS® Statistics v.23 y Microsoft Excel®.

6.9 Titulación de sueros hiperinmunes contra el VDVB-2 Mex:

Se sensibilizó una placa de microtitulación (Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96 well solid plates **Thermo Scientific** No. producto M9410) para ELISA con 100 µL del purificado del VDVB-2 Mex a un título de 1×10^7 DICC_{50%}/mL en solución de carbonatos (dilución 1: 272) y se incubó toda la noche a 4°C.

Una vez concluida la incubación, se colocó la placa en un lavador de placas (**Thermo Scientific**, Waltham, USA), donde se aspiró el contenido y realizaron 4 ciclos de lavado con 300 µL de la solución de lavado elaborada con PBS Tween-20 (Polyoxyethylene-20, **Biotech**, CAS#9005-64-5) al 0.2% (PBS-T) a temperatura ambiente. A continuación, se adicionaron 200 µL de solución de bloqueo elaborada con PBS 1x, leche descremada al 2%, Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, No. T8787) al 0.2% (PBL-T) y se incubó durante 1 h a 37°C. Al concluir la incubación, se realizaron 4 ciclos de lavado con 300 µL de la solución de lavado PBS-T a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron diluciones quíntuples seriadas (5x) de los sueros hiperinmunes anti-VDVB-2 (iniciando con una dilución 1:50, en donde la dilución final fue 1: 3,906, 250) en PBL-T; se adicionaron 100 µL de cada dilución por duplicado y se incubó 1 h a 37°C. Nuevamente, se realizaron 4 ciclos de lavado con 300 µL de la solución de lavado PBS-T a temperatura ambiente. Al finalizar el lavado de la placa, se adicionaron 100 µL de anticuerpo monoclonal contra la fracción Fc de la inmunoglobulina G (IgG) de conejo hecho en cabra conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (**Sigma-Aldrich** No. producto A9169-2ML) en dilución 1:2,500 en solución de PBL-T y se dejó en incubación durante 1 h a 37°C. Se realizaron 4 ciclos de lavado con 300 µL de la solución de PBS-T a temperatura ambiente. Finalmente, se adicionaron 100 µl de sustrato 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB Single Solution **Life Technologies**, Cat. 00-2023) a los pozos correspondientes y se incubó a 37°C. Se midió la absorbancia a longitud de onda de 405 nm en un espectrofotómetro Multiskan (**Thermo Scientific**, Waltham, USA) cada 10 min hasta máximo 40 minutos (Figura 7).

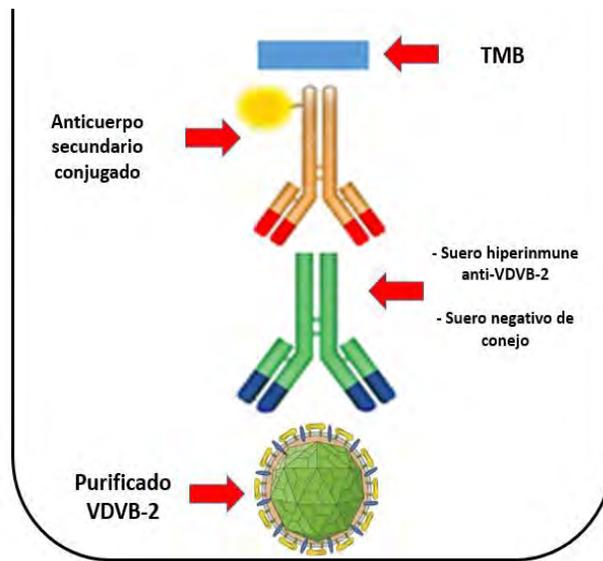


Figura 7. Formato de ELISA indirecta para verificar la reactividad y titular los sueros hiperinmunes anti VDVB-2 Mex hechos en conejo.

6.10 Despliegue en fago (Phage Display)

6.10.1 Bioselecciones

Las bioselecciones se realizaron siguiendo las especificaciones del manual Ph.D.[™] Phage Display Libraries: Instruction Manual New England Bio Labs v1.0, con algunas modificaciones:

Se sensibilizaron 4 pozos de una placa de microtitulación para ELISA con un anticuerpo monoclonal contra la fracción Fc de la IgG de conejo hecho en cabra sin conjugar (Pierce[®] Antibody No. producto 31216, **Thermo Scientific**) en solución de carbonatos (NaHCO₃ pH 8.6) en dilución 1:300; se adicionaron 100 µL por pozo y se incubó toda la noche a 4°C. Concluida la incubación, se decantó la placa y se realizaron 4 lavados con solución Tris-HCl 50mM pH 7.5 adicionado con Tween-20 al 0.1% (TBST) a temperatura ambiente. Posteriormente, se bloquearon los 4 pozos con 200 µL de solución de bloqueo TBS adicionada con leche descremada al 1%

durante 1h a 37°C. Se decantó el contenido de los pozos, se realizaron 4 lavados con 1 mL de TBST a temperatura ambiente y a continuación, se agregó el suero hiperinmune anti VDVB-2 diluido en solución de carbonatos a concentración de 1:300 en la 1ª bioselección y solución TBST en las bioselecciones subsecuentes, con 100 µL por pozo durante 1h a 37°C.

Mientras tanto, los fagos (Ph.D. 7 NEB #E8100S **BioLabs® Inc., New England**) con título inicial de 1×10^{13} UFP (Unidades Formadoras de Placa) fueron pre-incubados en solución de bloqueo TBS a un volumen final de 100 µL durante 1 h a 37°C. A continuación, se le adicionó el suero hiperinmune anti-VDVB-1 NADL (obtenido previamente por Orozco, 2015) en solución TBS (1:300) y se incubó 1 h a 37°C (**bioselección negativa**). Se centrifugó a la máxima velocidad (14,000 rpm por 30 min a 4°C), se colectó el sobrenadante y se resguardo hasta su uso.

Concluida la incubación del suero hiperinmune anti-VDVB-2 Mex en la placa de ELISA, se realizaron 6 lavados con 1 mL de TBST y se adicionaron 100 µL a cada pozo de la solución con los fagos (recuperados en el sobrenadante) e incubaron 1h a 37°C (**bioselección positiva**). Posteriormente, se hicieron 10 lavados con 1 mL TBST a los pozos (en la primera bioselección se realizaron 10 lavados con TBST, en las bioselecciones subsecuentes se aumentaron el número de lavados: para la segunda se realizaron 15 lavados con TBST y 3 con TBS, y para la tercera 25 lavados con TBST y 2 con TBS).

Para realizar la elución de los fagos, se agregaron 100 µL por pozo de Glicina-HCl 0.2 M pH 2.2 y se incubó por 15 min a temperatura ambiente. Los fagos eluidos fueron colectados y se les adicionó Tris-HCl 1 M pH 9.1 (por cada 100 µL de eluido se adicionaron 15 µL de Tris-HCl).

Se realizó la titulación del eluido como se describe a continuación: Se prepararon diluciones seriadas 1:1000 del eluido en medio YT 2x y una fracción de estas diluciones se utilizaron para infectar 100 µL de un cultivo de la bacteria *Escherichia*

coli cepa TG1 en fase exponencial, por lo que para realizar una infección eficaz, se verificó que el número de células viables de *E. coli* no excediera 10^8 células/mL, lo cual equivale a una absorbancia de 0.4 a una longitud de onda de 600nm. Las diluciones se mezclaron por vórtex y se incubaron durante 15 min a 37°C para permitir la infección; a continuación, se adicionó a 4 mL de Top Agar atemperado de 45°C, se mezcló por vórtex y el contenido se vertió sobre una placa de agar Luria Bertani (LB). Una vez solidificado, se incubó durante un periodo de 24 h a 37°C.

Una vez que se obtuvo el título del eluido, se amplificaron los fagos. En un matraz se agregaron 200 µl de *Escherichia coli* TG1 en una dilución 1:100 de medio YT 2x con volumen final de 20 mL, se adicionaron 400 µl de eluido y se incubaron en agitación 37°C durante 4.5 a 5 horas. Con la finalidad de separar fagos y bacterias, se centrifugó (**Sorvall Legend RT**) a 8,000 rpm por 20 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante (fagos) y se le adicionó PEG/NaCl al 20% en proporción de 1/6 del volumen, se mezcló por inversión 5 veces y dejó precipitando a 4°C toda la noche.

Al día siguiente se centrifugó a 10,000 rpm por 45 min a 4°C; se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1mL de TBS. Se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm durante 15 min a 4°C (Microcentrifuga **Thermo Fisher Heraeus Fresco 17** Cat. No. 75002421); se recuperó el sobrenadante y se realizó otra precipitación agregando 1/5 del volumen de solución de precipitación (PEG/NaCl), se mezcló por inversión 5 veces y se incubó en frío durante 1h. Se volvió a centrifugar 14,000 rpm por 15 min a 4°C; se desechó el sobrenadante y la pastilla obtenida fue resuspendida en 200 µl de TBS. Por último, se realizó la titulación de los fagos como fue descrito. Se realizaron tres rondas de bioselección.

6.10.2 Selección y amplificación de clonas.

Se seleccionaron 73 clonas de la 2ª y 21 clonas de la 3ª ronda de bioselección (94 clonas) con la biblioteca Ph.D. 7 BioLabs® Inc., New England. Cada clona fue amplificada, purificada y titulada como se describe a continuación:

En un matraz se agregaron 350 μ L de *Escherichia coli* TG1 en fase exponencial en una dilución 1:100 de medio YT 2x con volumen final de 35 mL y se adicionaron 350 μ L a una placa de 96 pozos con capacidad de 0.5 mL (Costar No. Lote.35511007 **Corning Incorporated**).

Se seleccionaron UFP individuales (visualizadas en las placas de agar LB que contenían al fago eluido), se depositaron en la placa de 96 pozos. Se dejó incubación a 37°C de 12 a 16 h y finalizado el tiempo, se incubó en agitación a 37°C durante 2 h.

Con la finalidad de separar fagos y bacterias, se centrifugó a 3,000 rpm por 5 min a 23°C. Concluida la centrifugación, se recuperaron 300 μ L de sobrenadante (fagos) aproximadamente y se transfirió a otra placa de 96 pozos de 0.5 mL (“Stock de fagos”) y se resguardo a 4°C hasta su uso.

Una vez obtenido el “Stock de fagos” se realizó lo siguiente: en un matraz se agregaron 7 mL de *Escherichia coli* TG1 en fase exponencial en una dilución 1:10 de medio YT 2x con volumen final de 70 mL y se adicionaron 700 μ L a una placa de 96 pozos con capacidad de 1.0 mL (Costar No. Lote.24012006 **Corning Incorporated**). A partir del “Stock de fagos”, se tomaron 30 μ L y se agregaron a la placa; se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Al día siguiente se centrifugó a 3,000 rpm por 15 min a 4°C; se recolectó el sobrenadante y se transfirió a otra placa de 96 pozos de 1.0 mL. A continuación, se le adicionó solución de precipitación en proporción de 1/6, se mezcló por pipeteo 5 veces y dejó precipitando a 4°C toda la noche. Concluida la incubación, se centrifugó a 3,000 rpm durante 20 min a 4°C; se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 100 μ L de solución TBS. Cada clona fue titulada como se describió previamente

6.10.3 Ensayos de unión.

Este ensayo se realizó a partir de las clonas seleccionadas, previamente amplificadas, purificadas y tituladas:

Se sensibilizó una placa de microtitulación para ELISA con anticuerpo monoclonal contra la fracción Fc de la IgG de conejo hecho en cabra sin conjugar diluido (Pierce® Antibody No. producto 31216, **Thermo Scientific**) en solución de carbonatos (NaHCO₃ pH 9.6) en dilución 1:300, se agregaron 100 µL por pozo y se incubó durante 1 h a 37°C. Una vez concluida la incubación, se colocó la placa en un lavador de placas, donde se aspiró el contenido y se realizaron 3 ciclos de lavado con 300 µL de la solución de lavado PBS-T a temperatura ambiente. Después se agregaron 200 µL de solución de bloqueo (PBS 1x, Leche descremada 2%) y se incubó por 1 h a 37°C. Se removió el contenido de la placa mediante 3 ciclos de lavado con 300 µL de PBS-T a temperatura ambiente.

Con la finalidad de verificar la especificidad de las clonas seleccionadas se usó el suero hiperinmune anti-VDVB-1 (cepa NADL). Se diluyó tanto el suero hiperinmune anti-VDVB-1 NADL como el suero hiperinmune anti-VDVB-2 Mex (1:300) en solución PBS-T con volumen final de 5mL y se mezcló por vórtex. Se dividió la placa de microtitulación, de tal forma que una mitad correspondía al suero hiperinmune anti-VDVB-1 NADL y la otra mitad al suero hiperinmune anti-VDVB-2 Mex; se adicionaron por duplicado los sueros adicionando 100 µL por pozo y se dejaron incubar durante 1 h a 37°C.

Mientras tanto, se pre-incubaron las clonas seleccionadas en solución de PBS-T (dilución 1:10) en un volumen final de 500 µL a temperatura ambiente hasta su uso.

Finalizado el tiempo de incubación, se realizó el lavado de la placa mediante 3 ciclos de lavado con 300 µL de PBS-T a temperatura ambiente; a continuación, se adicionaron 100 µL las clonas amplificadas por duplicado con ambas versiones de

los sueros hiperinmunes. La placa se dejó en incubación durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, se realizó un lavado manual con 100 µL de PBS- T y posteriormente, se adicionaron 200 µL de solución PBL-T Nuevamente se realizaron 3 ciclos de lavado con 300 µL de PBS-T a temperatura ambiente.

Se agregaron 100 µL por pozo de anticuerpo policlonal contra las proteínas de envoltura del fago M13 hecho en ratón conjugado con peroxidasa de rábano (anti-M13-HRP) (GE Healthcare 27-9421-01) diluido en PBL-T (1:2,500) y se incubó 1 hr a 37°C. Se realizaron 3 ciclos de lavado con 300 µL de PBS-T a temperatura ambiente y finalmente, se adicionaron 100 µL de sustrato TMB. Se midió y registró la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm cada 10 min hasta máximo 40 minutos. Los formatos usados en cada ensayo se esquematizan en la Figura 8.

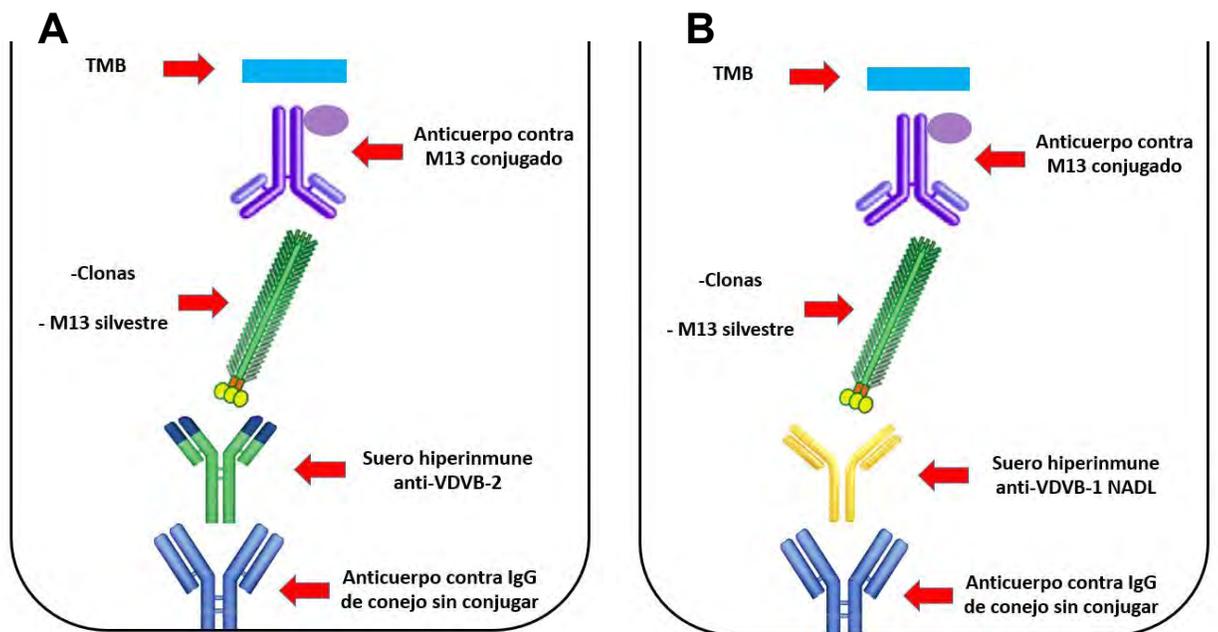


Figura 8. Formatos de ELISA indirecta para los ensayos de unión (Phage ELISA) utilizando el suero hiperinmune anti-VDVB-2 Mex (A) y anti-VDVB-1 NADL (B).

6.10.4 Secuenciación del ADN de los bacteriófagos

Se realizó la extracción de ADN siguiendo las indicaciones del manual de Phage Display con algunas modificaciones (Kay et al., 1996):

Se utilizaron 8 clonas (seis positivas reactivas al suero hiperinmune anti-VDVB-2 Mex, una positiva a ambas versiones de los sueros y una clona negativa) previamente amplificadas y purificadas. La muestra de fago se encontraba resuspendida en 100 µL de solución de TBS. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 20 min a 4°C y se verificó la formación de una pastilla que contenía al fago. Se decantó el contenido y a continuación, se adicionaron 200 µL solución de Ioduro de sodio (Tris.HCl 10 mM pH 8, EDTA 1mM, Ioduro de sodio 4M) y se agitó vigorosamente. Posteriormente, se agregaron 500 µL de etanol absoluto para precipitar el ADN, se mezcló por vórtex y se dejó incubar 10 min a temperatura ambiente. Concluida la incubación, se centrifugó a 13,300 rpm por 10 min a 4°C; se descartó el sobrenadante y se adicionaron 500 µL de etanol al 70% para lavar la pastilla; se centrifugó a 13,300 rpm durante 10 min a 4°C. Para secar completamente la muestra, se le aplicó vacío dentro de una campana de flujo laminar. Una vez seca, la pastilla fue resuspendida en 20 µL de agua desionizada (Milli-Q®, **Merck Millipore**).

Se verificó la presencia de ADN de cadena sencilla del bacteriófago en geles de agarosa al 1% (16500100 **Ultrapure Agarose, Invitrogen**) por electroforesis (Power Pac™ HC **Bio-Rad**) corridos a 80 Volts. Para ello, se tomaron 2 µL de muestra diluida en 3 µL de agua desoinizada con 1 µL de buffer de carga 6X (10482028 rackIt Cyan/Orange Loading Buffer 6x, **Invitrogen**), se homogeneizó mediante pipeteo y se depositó en cada pozo del gel; adicionalmente se cargó 3 µL de marcador de peso molecular (GeneRuler™, **Thermo Scientific**, Cat.SM0241). Se dejó correr a 80 volts, durante 40 min. Finalmente, se tiñó con una solución de bromuro de etidio (**Research Organics Inc.** Cat. 9575E) para observar la integridad del ADN.

Adicionalmente, se realizó la cuantificación del ADN en un espectrofotómetro (**Epoch Biotek™**) para determinar la concentración de ácidos nucleicos.

La amplificación de los genes de interés se realizó con el iniciador -28 gIII (5'-^HOCCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3') seguido de la secuenciación del ADN fue realizado en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB-UNAM): Unidad de Secuenciación por la Dra. Patricia de la Torre. Los electroferogramas obtenidos de la secuenciación fueron analizados en los programas **Chromas v2.4.4**, **AliView v1.17.1**, **Multialin v5.4.1**, **Translate tool de ExPASy**: Bioinformatics Resource Portal. Las secuencias depuradas se compararon conforme a las secuencias del virus reportadas en la base de datos en línea **GenBank®** (International Nucleotide Sequence Database Collaboration).

6.11 Ensayo con prueba comercial de ELISA para seleccionar los sueros positivos a VDVB

A partir de 547 muestras de suero de bovino con signología positiva al VDVB provenientes de los estados de Oaxaca, Tabasco, Chiapas, Estado de México y Ciudad de México (antes D.F), se realizó una prueba de ELISA indirecto comercial (Bovine Viral Diarrhoea Virus –BVDV- Antibody Test Kit/ **IDEXX BVDV Total Ab Cat.99-44000**), para la detección de anticuerpos específicos del VDVB, conforme a las especificaciones del proveedor.

La validación del ensayo se determinó cuando la diferencia entre la media del Control Positivo y la media del Control Negativo no fuese menor o igual a 0,150 de Absorbancia y cuando la media del Control Negativo fuese menor o igual a 0,250 de Absorbancia. Se obtuvo el cociente de las Muestras Positivas (M/P) el cual se calculó a partir del valor de la absorbancia de la muestra (a 450 nm) y de la absorbancia del control positivo, corregidas con la absorbancia del control negativo. A partir de los resultados anteriores, se interpretó como Muestra Negativa, Dudosa o Positiva (Cuadro 1):

Cuadro 1. Parámetros de interpretación de resultados de la prueba comercial de ELISA especificados por el proveedor (IDEXX Laboratories Inc, Suiza).

Parámetro del cociente de M/P	Interpretación
Muestras con valores de M/P MENORES a 0.20	NEGATIVAS
Muestras con valores de M/P MAYORES a 0.20 pero MENORES a 0.30	DUDOSAS
Muestras con valores de M/P MAYORES o IGUALES a 0.30	POSITIVAS

6.12 Ensayo de ELISA con clonas anti-VDVB-2 Mex y sueros de bovinos para la identificación de sueros positivos al VDVB-2

Con la finalidad de verificar la habilidad de las clonas para reconocer anticuerpos específicos al VDVB-2 en sueros de bovino, se realizó un ensayo de ELISA con las clonas anti-VDVB-2 (2A, 6H, 8C), una clona reactiva al suero hiperinmune anti-VDVB-1 NADL (4C3), una clona que no mostro reactividad (negativa) a ambos sueros hiperinmunes (4A) y fago M13 silvestre como control negativo. Antes de realizar este ensayo, se verificó nuevamente la reactividad de las clonas con los sueros hiperinmunes anti-VDVB-1 NADL y anti-VDVB-2 Mex, como se mencionó anteriormente.

Previamente los sueros de bovinos fueron caracterizados como positivos y negativos a anticuerpos del VDVB y adicionalmente, las muestras de donde provenían estos sueros fueron analizadas mediante un ensayo de PCR Múltiple para determinar la presencia de los cuatro virus involucrados en el CRIB (Virus de la Diarrea Viral Bovina, Virus Herpes Bovino-1, Virus Respiratorio Sincitial Bovino y Virus de la Parainfluenza-3) como prueba tamiz. Aquellas muestras positivas a

VDVB, fueron analizadas por la prueba de discriminación alélica y PCR dúplex en punto final para determinar el genotipo de la muestra.

A partir de estos resultados se seleccionaron las siguientes muestras para ser incluidas en el ensayo de ELISA descrito en este apartado (Cuadro 2).

Cuadro 2. Parámetros de inclusión en la selección de sueros para la prueba de ELISA con clonas anti VDVB-2 Mex.

Identificación de la muestra (suero)	ELISA (IDEXX BVDV Total Ab)	PCR Múltiplex para virus del CRIB	Genotipificación por prueba de discriminación alélica y PCR dúplex en punto final
95	Positivo	Negativo VDVB	VDVB G2
96	Positivo	Positivo VDVB	VDVB G1 y G2
97	Positivo	Positivo VDVB	VDVB G2
102	Positivo	Positivo VDVB	VDVB G1 y G2
104	Positivo	Positivo VDVB	VDVB G2
343	Sospechoso	Negativo VDVB	Negativo
168	Negativo	Negativo VDVB	Negativo
337	Negativo	Negativo VDVB	Negativo
98	Positivo	Positivo VDVB	VDVB G2

CRIB: Complejo Respiratorio Infeccioso Bovino; G1: Genotipo 1 VDVB; G2: Genotipo 2 VDVB.

La metodología utilizada en el ensayo de ELISA con clonas anti- VDVB-2 para la identificación de sueros positivos a VDVB-2, se describe a continuación:

Se sensibilizó una placa de microtitulación para ELISA con anticuerpo policlonal de captura contra las proteínas de envoltura del fago M13 hecho en conejo sin conjugar (**Novus Biologicals** NB 100-1633) en solución de carbonatos (NaHCO₃ pH 9.6) en dilución 1:10,000, adicionando 100 µL por pozo y se incubó durante 1 h a 37°C. Una vez concluida la incubación, se colocó la placa en un lavador de placas, donde se

aspiró el contenido y se realizaron 3 ciclos de lavado con 300 μ L de la solución de lavado PBS-T a temperatura ambiente. Después se agregaron 200 μ L de solución de bloqueo (PBS 1x, Leche descremada 2%) y se incubó por 1 h a 37°C. Se removió el contenido de la placa mediante 3 ciclos de lavado con 300 μ L de PBS-T a temperatura ambiente.

Se pre-incubaron las clonas anti-VDVB-2 y la clona negativa (M13 silvestre) en solución de PBL-T en dilución 1:10 en, se mezclaron por vórtex y se incubaron a temperatura ambiente durante 1h. Una vez concluida la incubación, se adicionaron 100 μ L por pozo de las clonas, por duplicado en la placa de microtitulación. Se incubaron 1h a 37°C. Mientras tanto, se realizó una pre-incubación del fago M13 silvestre en dilución 1:10 en solución PBL-T por 1 h a 37°C. Finalizada la incubación, al fago pre-incubado M13 silvestre, se le adicionó suero de bovino en dilución 1:4 durante 1h a 37°C en agitación continua. A continuación, se centrifugó a 13,300 rpm por 30 min a 4°C y se adicionó a la placa de microtitulación, por duplicado adicionando 100 μ L por pozo. Se realizó una incubación durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, se retiró el contenido de los pozos manualmente y se realizaron 3 ciclos de lavado con 300 μ L de PBS-T a temperatura ambiente; a continuación, se bloqueó la placa con 200 μ L de solución PBL-T. Nuevamente se realizaron 3 ciclos de lavado con 300 μ L de PBS-T a temperatura ambiente usando un lavador de placas. Se agregaron 100 μ L por pozo de anticuerpo monoclonal contra la fracción Fc de la IgG de bovino hecho en conejo conjugado con peroxidasa de rábano (**Novus Biologicals** NBPI – 73581) en solución PBL-T en dilución 1:2,500 y se incubó 1 hr a 37°C. Se aspiró el contenido y realizaron 3 ciclos de lavado con 300 μ L de PBS-T a temperatura ambiente con un lavador de placas y finalmente, se adicionaron 100 μ L de sustrato TMB a todos los pozos (Figura 9).

La absorbancia a una longitud de onda de 405 nm y se registró cada 10 min hasta máximo 40 min.

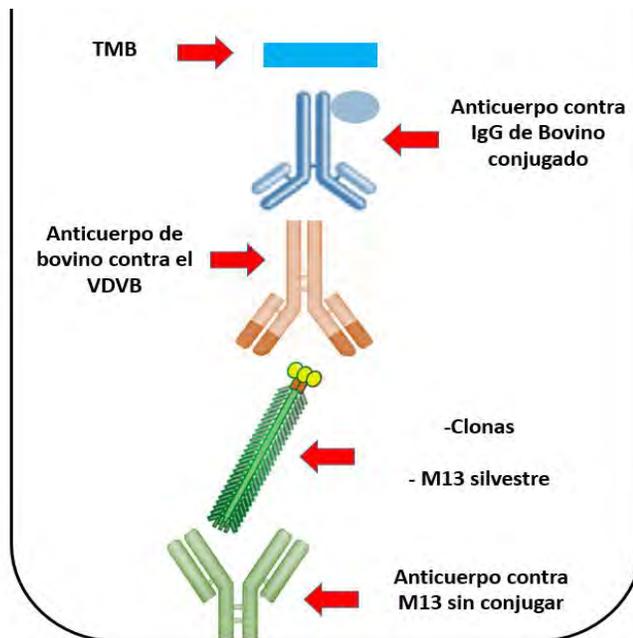


Figura 9. Formato de ELISA con clonas anti-VDVB-2 y sueros de bovinos para la identificación de sueros positivos a VDVB-2.

VII. RESULTADOS

7.1 Caracterización del VDVB-2 Mex

El aislamiento viral se obtuvo mediante la técnica de co-cultivo en células MDBK, realizando pases ciegos hasta observar el ECP y posteriormente, con un ensayo de RT-PCR específico para la región 5' RNT, se verificó la presencia de ARN del VDVB. El fragmento de 393 pb indicativo de la presencia de ARN del VDVB se secuenció en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB-UNAM). La secuencia obtenida se comparó con lo reportado en el GenBank y se caracterizó como un aislado mexicano del Virus de la Diarrea Viral Bovina genotipo 2 (No. acceso GenBank:). Se confirmó la identidad del aislado mediante ensayos de discriminación alélica con el uso de sondas Taqman en PCR en tiempo real estandarizado (ensayos realizados por el MVZ. MC. Mario Palma Zepeda). Adicionalmente se utilizó un ensayo RT-PCR duplex en punto final capaz de identificar dos regiones de la región 5'RNT específicas para genotipo 1 y genotipo 2 en una muestra (ensayos realizados por el MVZ. MC. Juan Carlos Martínez Neria; Laboratorios Tornel S.A.).

Posteriormente, se determinó la presencia del VDVB-2 Mex en células MDBK mediante la observación de ECP a las 72 horas post- infección (p.i). (Figura 10).

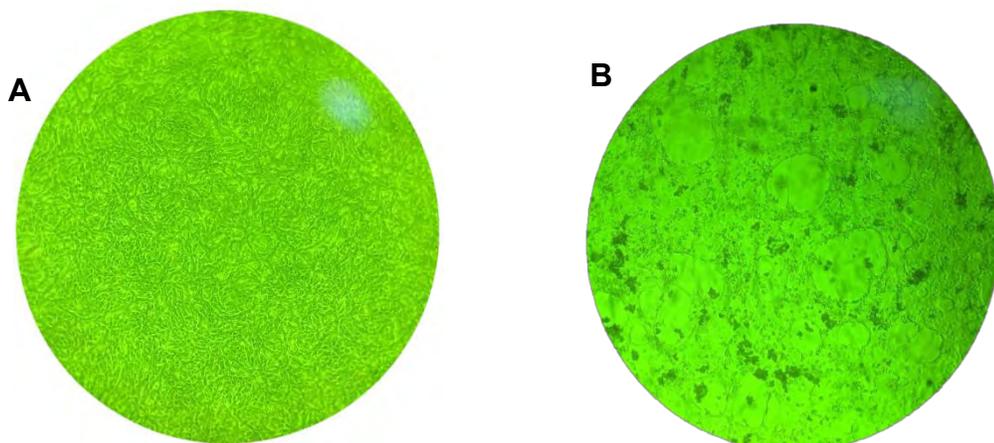


Figura 10. (A) Células MDBK no infectadas. (B) Células MDBK infectadas con VDVB-2 Mex a las 72 h p.i.

Los virus fueron purificados por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa y como resultado se obtuvieron tres fracciones (Figura 11), las cuales fueron colectadas por separado.

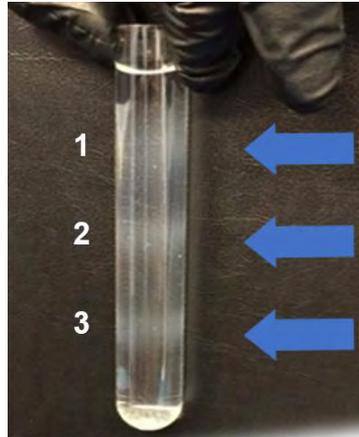


Figura 11. Fracciones obtenidas de la en gradientes de sacarosa a partir del virus concentrado con PEG.

Para verificar la fracción que contenía componentes virales, se infectaron células MDBK con cada una de ellas y se evaluó la presencia de ECP a las 48 h p.i. (Figura 12). Se determinó que la fracción ubicada en el centro del tubo (Figura 11, fracción 2), contenía al virus, este resultado se confirmó por RT-PCR mediante la amplificación de la región 5' RNT.

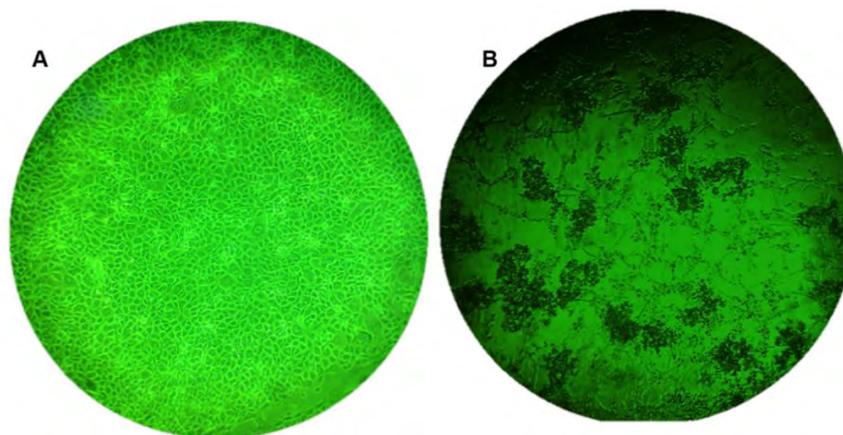


Figura 12. Efecto CP en células MDBK p.i. del purificado del VDVB-2 Mex.
(A) Células MDBK normales con monocapa confluyente al 90%. B: Células MDBK a las 48 h p.i. infectadas con la fracción “2” del purificado VDVB-2 Mex

Se realizó la titulación de la infectividad del virus purificado, el cual obtuvo un título de 1.2×10^7 DICCC_{50%}/mL.

Adicionalmente, se realizó la cuantificación de proteínas totales a partir del purificado viral utilizando una curva estándar de albúmina y se obtuvo un valor de 25.25 µg/mL de proteína.

7.2 Titulación de los sueros hiperinmunes contra el VDVB-2 Mex

Después del esquema de inmunización, se obtuvo el suero sanguíneo de los conejos y la titulación de anticuerpos se realizó mediante la técnica de ELISA, usando el virus purificado como antígeno (0.0092 µg/µL/ pozo). Los resultados obtenidos son el resultado del promedio de las lecturas a una longitud de onda de 405 nm.

Se obtuvieron sueros hiperinmunes de tres conejos y se realizaron diluciones seriadas, el mismo procedimiento se realizó con el suero de un conejo no inmunizado y este se utilizó como control negativo al VDVB. La Figura 13 muestra los resultados de la reactividad de los sueros de conejo inmunizados con el purificado del VDVB-2 Mex. Los resultados mostraron que los sueros hiperinmunes presentaron especificidad al VDVB-2 Mex y que el título óptimo de anticuerpos se encontró en la dilución 1:1,250. Debido a que no se observaron diferencias importantes entre los tres sueros, se decidió utilizar el suero hiperinmune 2 anti VDVB-2 Mex.

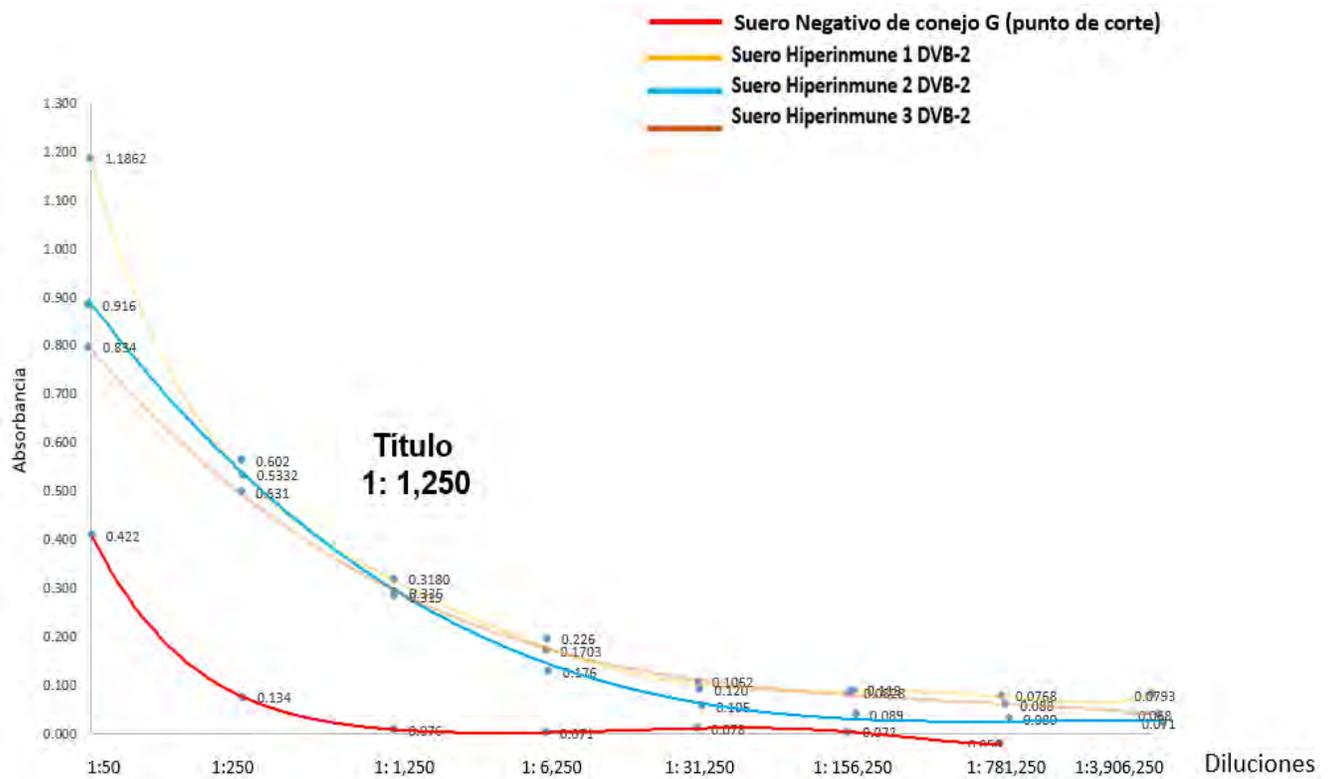


Figura 13. Ensayo de ELISA de los sueros hiperinmunes anti-VDVB-2 Mex. En la gráfica se muestran los promedios de absorbancia de tres ensayos. El punto de corte de la prueba se muestra con una línea roja (suero negativo de conejo no inmunizado).

7.3 Bioselecciones

Se utilizó la biblioteca Ph.D.TM-7 (BioLabs® Inc., New England), la cual expresa una secuencia lineal de 7 aminoácidos fusionados en la proteína III del fago M13 (pIII), para identificar mimotopos naturales utilizando como blanco anticuerpos policlonales específicos del VDVB-2 Mex. Esto se realizó mediante 3 rondas de bioselección. Dado que el objetivo de este trabajo fue identificar mimotopos específicos del VDVB-2, fue necesario realizar una bioselección negativa; para ello la biblioteca de fagos fue pre-incubada con anticuerpos policlonales del anti-VDVB-1 NADL, seguido de una bioselección positiva con el suero hiperinmune con el anti-

VDVB-2 Mex. Después de realizar 3 rondas de selección obtuvimos que el título de fagos se incrementó de 1×10^5 en la 1ª ronda hasta 1×10^8 en la 3ª ronda (Cuadro 3).

Cuadro 3. Título de fagos de salida de las tres rondas de selección con el suero hiperinmune anti-VDVB-2 Mex

Ronda de Bioselección	Número de fagos eluidos (UFP)
1	1×10^5
2	1×10^6
3	1×10^8

UFP= Unidades Formadoras de Placa.

7.4 Selección y amplificación de clonas

Después de tres rondas de bioselección, se seleccionaron 94 clonas: 73 clonas provenientes de la 2ª ronda y 21 clonas de la 3ª ronda. Estas clonas fueron re-amplificadas y purificadas. Después de titular los fagos, obtuvimos un resultado de aproximadamente 1.6×10^{10} UFP de todas ellas.

Stock	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	C1A	C2A	C3A	C4A	C5A	C6A	C7A	C8A	C9A	C10A	C11A	C12A	3a bioselección (21 clonas)
B	C1B	C2B	C3B	C4B	C5B	C6B	C7B	C8B	C9B	C10B	C11B	C12B	
C	C1C	C2C	C3C	C4C	C5C	C6C	C7C	C8C	C9C	C10C	C11C	C12C	
D	C1D	C2D	C3D	C4D	C5D	C6D	C7D	C8D	C9D	C10D	C11D	C12D	2a bioselección (73 clonas)
E	C1E	C2E	C3E	C4E	C5E	C6E	C7E	C8E	C9E	C10E	C11E	C12E	
F	C1F	C2F	C3F	C4F	C5F	C6F	C7F	C8F	C9F	C10F	C11F	C12F	
G	C1G	C2G	C3G	C4G	C5G	C6G	C7G	C8G	C9G	C10G	C11G	M13	
H	C1H	C2H	C3H	C4H	C5H	C6H	C7H	C8H	C9H	C10H	C11H		

Figura 14. Disposición de los fagos purificados a partir de la 2ª y 3ª ronda de bioselección a partir del suero hiperinmune del VDVB-2 Mex con una biblioteca comercial de 7 aminoácidos lineales en placa de 96 pozos.

7.5 Ensayos de unión

Mediante una prueba de ELISA, se analizó la reactividad de las 94 clonas purificadas obtenidas en las bioselecciones con los sueros hiperinmunes del VDVB-1 NADL y VDVB-2 Mex.

Con la finalidad de distinguir las clonas positivas, para este ensayo se determinó el punto de corte, al usar el fago M13 silvestre como control negativo con los sueros hiperinmunes anti-VDVB-2 Mex y el suero anti-VDVB-1 NADL. En las Figuras 15, 16 y 17 se muestra el punto de corte (promedio de ocho ensayos por duplicado con una línea roja continua y tres desviaciones estándar con una línea roja discontinua); en barras azules se encuentran representadas las clonas reactivas al suero hiperinmune del VDVB-2 Mex, mientras que en las barras naranjas, se muestran las clonas reactivas al suero hiperinmune del VDVB-1 NADL.

Se encontró que 72 clonas (76.59% del total) mostraron reactividad al retarlos contra ambos sueros hiperinmunes (Figura 15), mientras que 16 clonas (17.02 %) no mostraron reactividad a ningún suero, por lo que se consideraron como negativas (Figura 16); por último, 6 clonas (dos de la 3ª bioselección y cuatro de la 2ª bioselección) mostraron reactividad exclusivamente al suero hiperinmune del VDVB-2 Mex (Figura 17).

Las clonas positivas al suero hiperinmune del VDVB-2 Mex fueron nombradas como: 2A, 3B (obtenidas de la 3ª ronda de bioselección), 5E, 6H, 8C y 8E (provenientes de la 2ª ronda de bioselección). En la Figura 17 se observa una notable diferencia entre los valores de absorbancia obtenidas de entre el suero hiperinmune anti-VDVB-2 Mex (barras azules) y el anti-VDVB-1 NADL (barras naranjas)

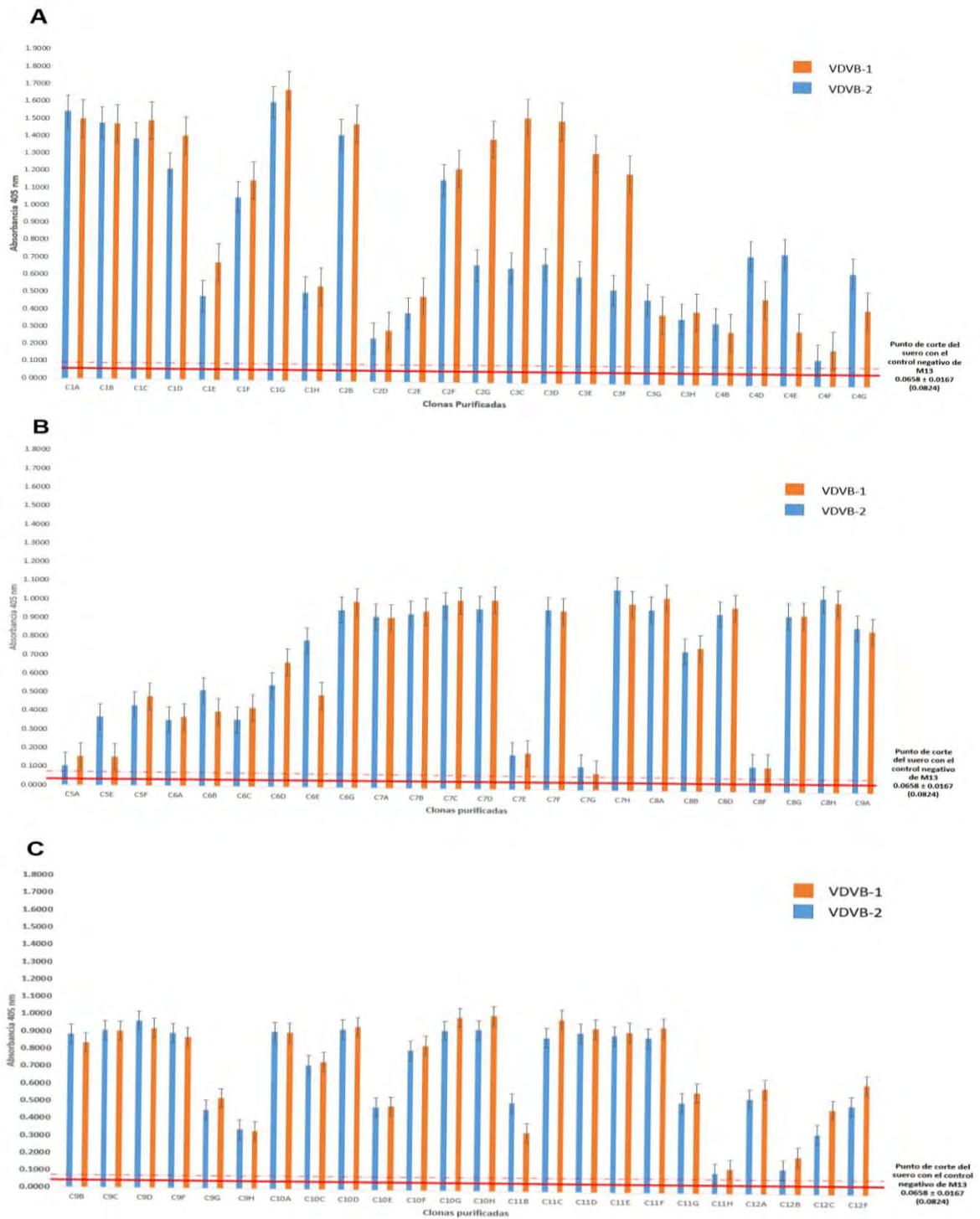


Figura 15. Ensayo ELISA con 72 las clonas purificadas reactivas al suero hiperinmune anti VDVB-2 Mex (azul) y al suero hiperinmune anti-VDVB-1 NADL (naranja). Promedios de absorbancia 405 nm de las clonas C1A-C4G (A), clonas C5A-C9A (B) y clonas C5A-C9A (C). El punto de corte con el control negativo de M13, se muestra con una línea roja (0.0658) y tres desviaciones estándar con una línea roja discontinua (± 0.0167).

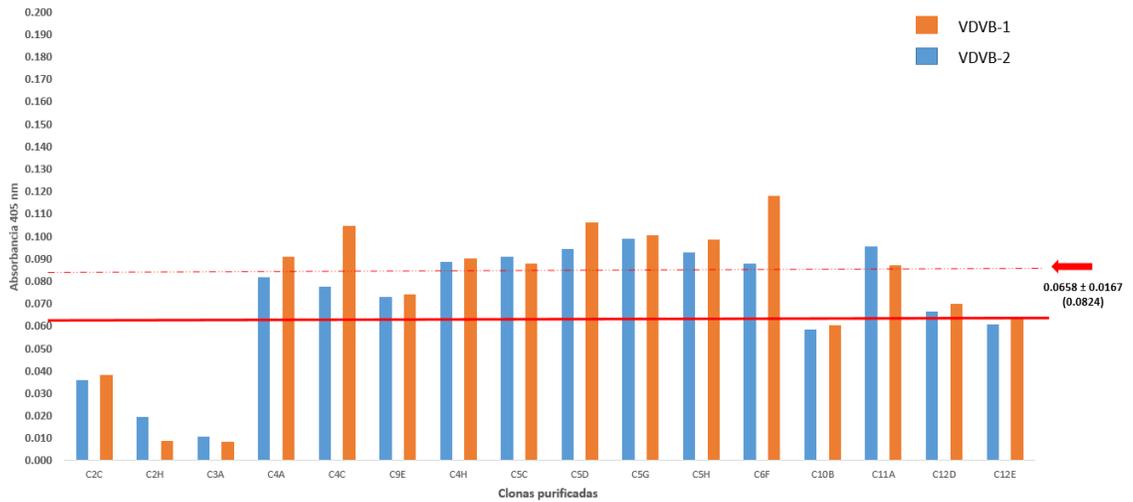


Figura 16. Ensayo ELISA con las 16 clonas purificadas no reactivas (negativas) al suero hiperinmune anti VDVB-2 Mex (azul) y al suero hiperinmune anti-VDVB-1 NADL (naranja). El punto de corte con el control negativo de M13, se muestra con una línea roja (0.0658) y tres desviaciones estándar con una línea discontinua (± 0.0167).

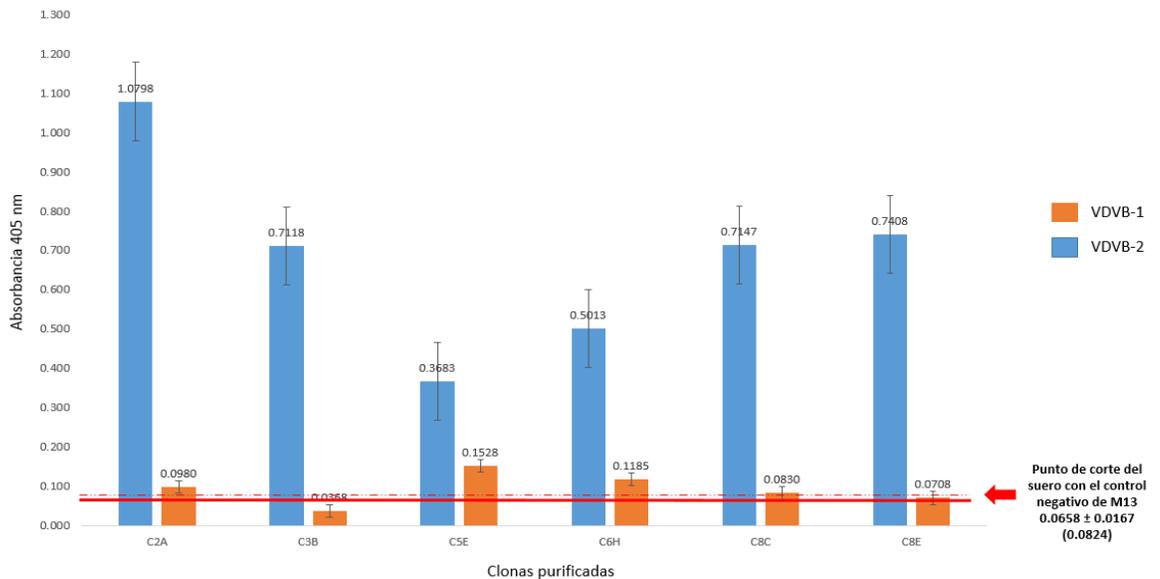


Figura 17. Ensayo de ELISA con las 6 clonas purificadas reactivas al suero hiperinmune anti VDVB-2 Mex (azul) comparado con el suero hiperinmune anti VDVB-1 NADL (naranja). Promedio de absorbancia 405 nm de las clonas. El punto de corte con el control negativo del fago M13 silvestre, se muestra con una línea roja (0.0658) y tres desviaciones estándar con una línea discontinua (± 0.0167).

7.6 Secuenciación del ADN de los bacteriófagos

Se seleccionaron las clonas reactivas al suero hiperinmune anti VDVB-2 Mex (2A, 3B, 5E, 6H, 8C y 8E), una clona reactiva a los dos sueros hiperinmunes anti-VDVB 1 NADL y anti VDVB-2 Mex (7C) y una clona negativa (4A). Se realizó la extracción del ADN de las 8 clonas seleccionadas y se realizó la cuantificación del ADN de cadena sencilla a través de un espectrofotometría; los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 4:

Cuadro 4. Cuantificación del ADN de cadena sencilla ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de 6 clonas reactivas al suero hiperinmune del VDVB-2, 1 clona reactiva a ambos sueros y 1 clona negativa

Resultados de extracción ADN de cadena sencilla (ssADN)			
Reconoce	Clona	260/280	$\mu\text{g}/\mu\text{L}$
Suero hiperinmune anti-VDVB-2 Mex	2A	1.67	207.46
	3B	1.95	87.37
	5E	2.54	167.86
	6H	1.615	67.65
	8C	1.64	65.26
	8E	1.97	62.13
Suero hiperinmune anti-VDVB-2 Mex y anti-VDVB-1 NADL	7C	1.80	51.99
Clona negativa	4A	2.24	109.10

Una vez verificada la concentración de las muestras, así como la relación de D.O. 260/280, la cual es un estimador del grado de pureza de la muestra (rangos menores a 1.8 indican presencia de proteínas y mayores de 2.0 indican contaminación de la muestra con fenol), se envió el ADN de cadena sencilla al Instituto de Investigaciones Biomédicas: Unidad de Secuenciación (IIB-UNAM) para su secuenciación.

7.7 Análisis del ADN de las clonas reactivas

Los péptidos obtenidos de las secuencias de las clonas se compararon haciendo alineamientos con secuencias de proteínas del VDVB reportadas en la base de datos en línea **GenBank® (International Nucleotide Sequence Database Collaboration)**. Esta información fue corroborada realizando nuevamente los alineamientos con los programas **AliView v1.17** y **Multialin v5.4.1**.

En el Cuadro 5, se muestran los resultados de las 6 clonas reactivas al suero anti-VDVB-2 Mex, y se observó que cada secuencia poseía un porcentaje de identidad con proteínas del VDVB, tales como la glicoproteína de estructura E2, y las proteínas no estructurales N^{pro} y NS3.

Cuadro 5. Caracterización de la secuencia de AA de las 6 clonas positivas al suero hiperinmune VDVB-2 Mex.

Clonas positivas al suero anti VDVB-2								
SECUENCIA A			SECUENCIA B			SECUENCIA C		
"G T V P N T S"			"L V S L S R R"			"W R A P Q P M"		
ID clona 2A 3B 5E			ID clona 6H			ID clona 8C 8E		
% de identidad	Proteína	Organismo	% de identidad	Proteína	Organismo	% de identidad	Proteína	Organismo
71.4%	Glicoproteína E2	VDVB	85.7 %	Npro	VDVB-1	57.1 %	NS3	VDVB-1 VDVB-2

(A) Secuencia de AA desplegados en proteína pIII de las clonas del fago 2A, 3B, 5E, así como la proteína y el porcentaje de identidad con el VDVB. **(B)** Secuencia de AA desplegados en proteína pIII de las clonas del fago 6H, así como la proteína y el porcentaje de identidad con el VDVB. **(C)** Secuencia de AA desplegados en proteína pIII de las clonas del fago 8C y 8E así como la proteína y el porcentaje de identidad con el VDVB.

El análisis de la secuencia de la clona 7C, la cual presentó reactividad a los dos sueros hiperinmunes anti-VDVB 1 NADL y anti-VDVB-2 Mex, se observó que su secuencia de AA, tenía un 71.42% de identidad con una región de la proteína viral NS4B. El alineamiento también mostró que poseía un 42.8% de identidad con la glicoproteína E2 y NS5B. Los resultados de los alineamientos realizados se muestran en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Caracterización de la secuencia de AA desplegados en proteína pIII de la clona del fago 7C positiva al suero hiperinmune VDVB-1 NADL y VDVB-2, así como la proteína y el porcentaje de identidad con el VDVB.

Clona positiva al suero anti VDVB-1 NADL y anti VDVB-2		
SECUENCIA	"K T L S L T R"	
ID clona	7C	
% de identidad	Proteína	Organismo
71.42 %	NS4B	VDVB
42.8 %	Glicoproteína E2	
42.8 %	NS5B	

El análisis realizado a la secuencia de aminoácidos de la clona negativa (4A), demostró que no poseía porcentaje de identidad con secuencias de AA reportadas previamente para el VDVB (Cuadro 7).

Cuadro 7. Caracterización de la secuencia de AA desplegados en proteína pIII de la clona del fago 4A negativa al suero hiperinmune VDVB-1 NADL y VDVB-2 Mex.

Clona negativa a ambos sueros	
SECUENCIA	"H S N Y Y A S"
ID clona	4A
Organismo	No se encontró homología con secuencias de AA del VDVB reportados previamente

7.8 Mapeo de los mimotopos

Tomando en cuenta las estructuras de proteínas cristalizadas del VDVB y proteínas homólogas de virus relacionados al género *Pestivirus* reportadas en **RCSB Protein Data Bank** se localizaron los epitopos/ mimotopos utilizando el programa **Pymol™** **1.7.4.5 Edu program.**

Para identificar los epitopos, en el caso de la proteína E2 se utilizó la estructura del monómero de la glicoproteína E2 cristalizado reportada por El Omari y col. (2013) (Código PDB: 4JNTB), en la cual se hace referencia de los dominios que conforman la glicoproteína (DA, DB, DC, DD). De igual forma, se utilizó la proteína no estructural NS3 cristalizada del Virus de la Fiebre Porcina Clásica (VFPC) reportada por Tortorici y col. (2015) (Código PDB: 4CBG) y la estructura cristalizada reportada por Zogg y colaboradores (2013) de la proteína no estructural N^{pro} del Virus de la Diarrea Viral Bovina genotipo 3 (Código PDB: 3ZFN), para realizar el mapeo de los mimotopos.

- **Mimotopo “GTVPNTS”, “LVSLSRR” y “KTLSSLTR”**

Los mimotopos obtenidos en este trabajo, provenientes de las clonas 2A, 3B y 5E (“GTVPNTS”), 6H (“LVSLSRR”) y 7C (“KTLSSLTR”). En el caso de la secuencia “LVSLSRR” de la clona 6H, demostró poseer un porcentaje de identidad con la glicoproteína E2 en un 57.14%, al igual que la secuencia “KTLSSLTR” con un porcentaje de identidad del 42.8%, por lo cual se decidió incluirla en este ensayo.

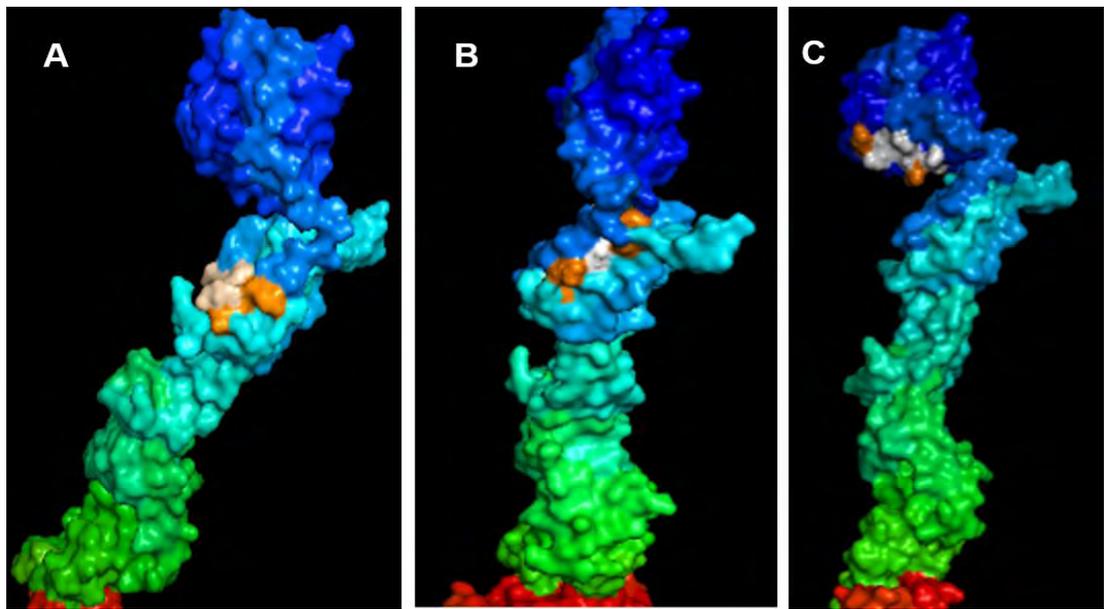


Figura 18. Localización de mimotopos en las regiones inmunogénicas de la glicoproteína E2 del VDV. (A) Mimotopo “GTVPNTS” (naranja). (B) mimotopo “LVSLSR” (naranja). (C) Mimotopo “KTLSLTR” (naranja).

Las tres secuencias fueron localizadas en la región del DA y DB de la glicoproteína E2 (en la Figura 18 se observan en color azul y color cian), las cuales son regiones altamente expuestas *in vivo* al sistema inmune y en donde se han reportado la presencia de epitopos lineales tanto para el VDV como del VFPC (Figura 18).

- **Mimotopo “LVSLSR”**

La clona 6H con el mimotopo “LVSLSR” mostró un 86% de identidad con una región de la proteína no estructural N^{pro} del VDV. El análisis de la secuencia permitió identificar al epitopo/mimotopo dentro del dominio de unión al zinc de la proteína, tal como se muestra en la Figura 19.

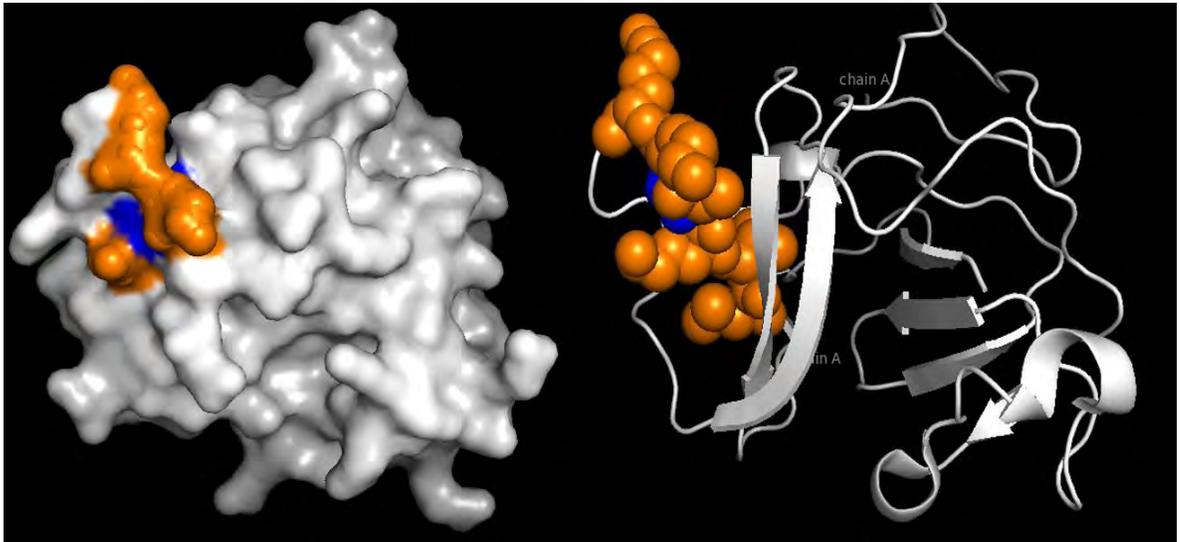


Figura 19. Identificación del mimotopo “LVLSLRR” en la estructura cristalizada de N^{pro} del VDVB-3 (naranja).

En este estudio, se realizó el mapeo de la secuencia del epítipo en la estructura de la proteína de N^{pro} del Virus de la Diarrea Viral genotipo 3. Se decidió utilizar la estructura de este genotipo, debido a que actualmente no se ha reportado el cristal de la proteína N^{pro} en los genotipos 1 y 2 del VDVB, además de poseer un alto porcentaje de homología con ambos genotipos (mayor al 93%).

- **Mimotopo “WRAPQPM”**

Debido a que la estructura de la proteína NS3 del VDVB aún no se encuentra reportada, se decidió utilizar la estructura de la proteína NS3 del Virus de la Fiebre Porcina Clásica, debido a las similitudes que guarda con el VDVB. Se identificó que el mimotopo reportado en este trabajo, se ubicaba en el dominio A de la helicasa (Figura 20)

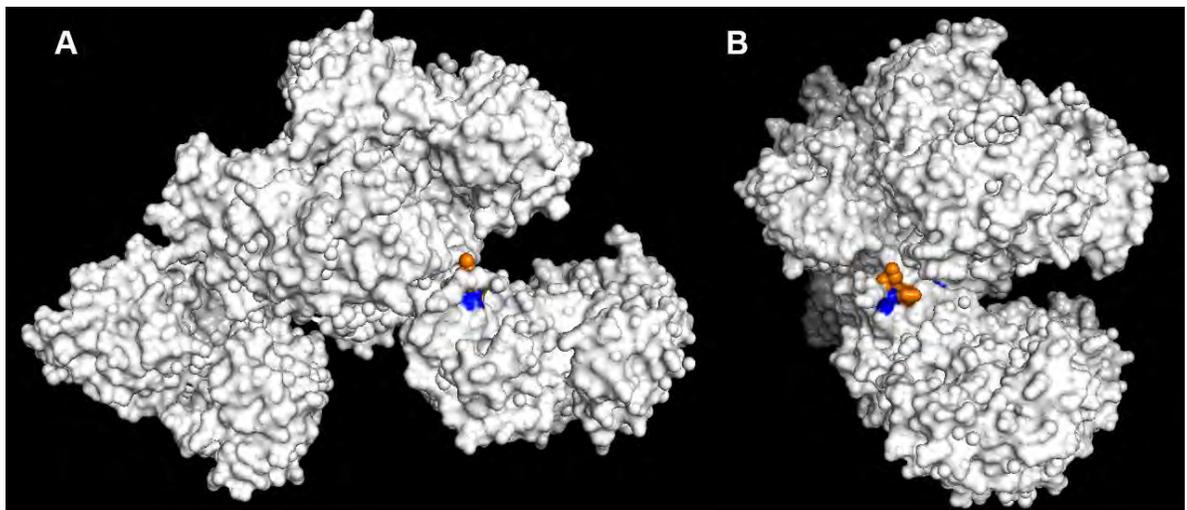


Figura 20. Identificación del mimotopo “WRAPQPM” en la estructura cristalizada de NS3 del VFPC (naranja). (A) Vista frontal; (B) Vista lateral.

El análisis de la secuencia demostró que este mimotopo poseía un 57% de identidad con la proteína No Estructural NS3 del VDVB. En la Figura 22 se muestran los sitios en donde las secuencias del péptido 8C y 8E tienen similitud, con una región expuesta sobre la superficie de la proteína NS3 del VFPC.

7.9 Ensayo con prueba comercial de ELISA para seleccionar los sueros positivos a VDVB

En un estudio previo realizado en el Laboratorio de Virología de la FMVZ-UNAM (proyecto “**Desarrollo de una vacuna autóctona Boviral 5**” Núm. Registro **197928 CONACYT- Laboratorios Tornel S.A.**), se obtuvieron sueros de bovinos con signología respiratoria y sin antecedentes de vacunación contra agentes virales respiratorios, provenientes de diferentes zonas ganaderas de cinco estados de la República Mexicana. En el presente trabajo, se analizaron estas muestras con una prueba comercial de ELISA (**IDEXX BVDV Total Ab**).

Los resultados mostraron que de los 539 bovinos muestreados, 240 animales fueron seropositivos (44.5%) al VDVB. En el Cuadro 8 se muestran los resultados de seropositividad al VDVB al clasificar las muestras por estado.

Estado	Negativo	Positivo	Total	Prevalencia (%)	Total
Estado de México	12	8	20	40	
Tabasco	108	41	149	27.5	
Chiapas	117	44	161	27.3	
Ciudad de México	40	52	92	56.6	
Oaxaca	22	95	117	81.2	539 muestras

Cuadro 8. Resultado de la prueba de ELISA (IDEXX BVDV Total Ab), En el cuadro se muestra el número de animales positivos y negativos a anticuerpos del VDVB, así como la prevalencia expresada en porcentaje en cada uno de los cinco estados muestreados.

La distribución de las muestras positivas, negativas y sospechosas por Estado en relación al cociente de M/P, se muestran en la Figura 21.

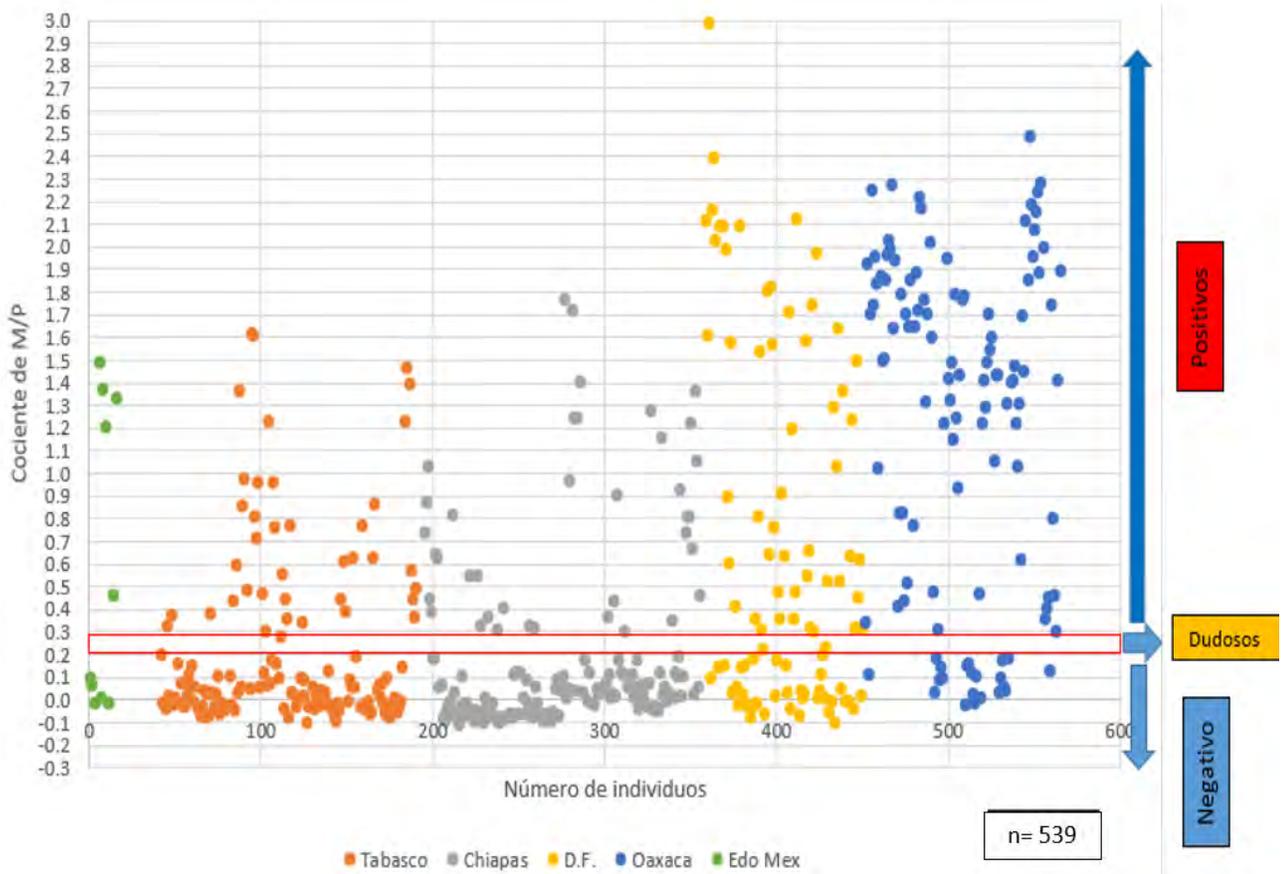


Figura 21. Distribución de los resultados de acuerdo al cociente M/P obtenido por Estado. Valor de M/P menor a 0.20 es Negativo, Valor de M/P mayor a 0.20 pero menor a 0.30 es Dudoso y valor de M/P mayores o iguales a 0.30 son Positivos. Verde: Estado de México; Naranja: Tabasco; Gris: Chiapas; Amarillo: Ciudad de México (D.F); Azul: Oaxaca. n= número de sueros de bovinos

En el Cuadro 9, se muestran la seropositividad de bovinos en relación al fin zootécnico: en relación a las producciones con ganado de leche (57%) y doble propósito (50.8%) se asocian a una mayor presencia de anticuerpos contra el virus DVB.

Cuadro 9. Seropositividad de anticuerpos al VDVB por fin zootécnico

Fin zootécnico	Positivos	Total de población	Prevalencia (%)
Leche	57	100	57
Carne	5	23	21.7
Doble propósito	135	266	50.8
Pie de cría	36	140	25.7

En cuanto a la presencia de animales positivos a anticuerpos al VDVB en relación al rango de edades, se observó que los animales de 19-24 meses (61.2%) y de 25-48 meses (61%), siendo el grupo de los animales de 7-18 meses (31.9%) quienes presentarán el menor porcentaje de positividad (Cuadro 10).

Cuadro 10. Seropositividad de anticuerpos al VDVB en bovinos con distintos rangos de edad.

Rango de edad	Positivos	Total de la población	Prevalencia por edad (%)
1-6 meses	75	166	45.2
7-18 meses	65	204	31.9
19-24 meses	98	60	61.2
25-48 meses	41	25	61
49 o más	11	21	54.2

7.10 Ensayo de ELISA con clonas reactivas a anticuerpos anti- VDVB-2 para la identificación de sueros de bovinos positivos a VDVB-2.

Se desarrolló y estandarizó un ensayo de ELISA para evaluar la reactividad de los fago-péptidos obtenidos en este trabajo para detectar anticuerpos al anti-VDVB-2 Mex con sueros de bovinos caracterizados previamente como positivos y negativos al VDVB, con la prueba de ELISA comercial. Por experiencia previa, se observó que los sueros de bovinos, sin importar si eran negativos o positivos al VDVB, presentaban reactividad al fago M13 silvestre (Orozco, 2015); por lo que con la finalidad de disminuir reacciones inespecíficas en la prueba, se decidió realizar una reacción de pre-tratamiento (pre-absorción) en los sueros de bovinos (positivos y negativos) con el bacteriófago M13 silvestre.

Para este ensayo se utilizaron los fagos-péptidos reactivos al suero hiperinmune anti-VDVB-2 Mex (2A, 6H, 8C), el fago-péptido reactivo al suero hiperinmune anti VDVB-1 NADL (4C3), el fago-péptido que no mostro reactividad (negativa) a ambos sueros hiperinmunes (4A) y el fago M13 silvestre como control negativo. Antes de realizar el ensayo de detección de anticuerpos anti-VDVB con los fago péptidos, se verificó nuevamente la reactividad de dichas clonas (Figura 22).

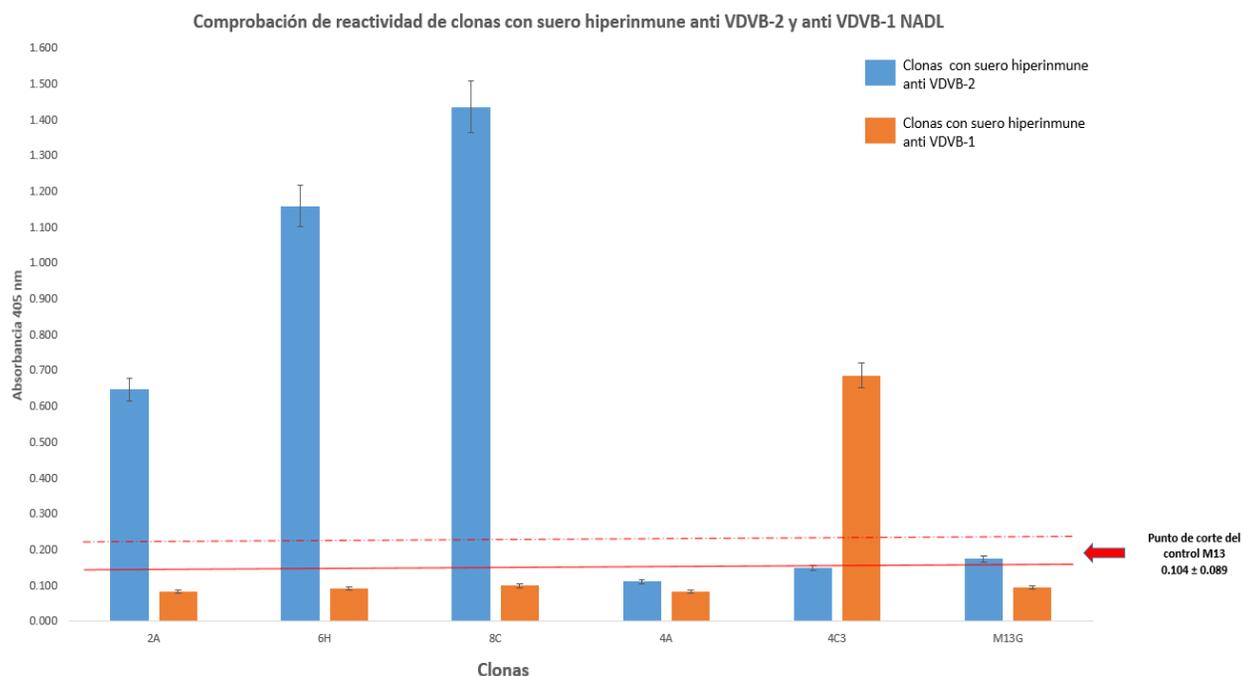


Figura 22. Ensayo de ELISA que muestra la reactividad de las clonas con los sueros hiperinmunes anti VDV-B-1 NADL y anti VDV-B-2 Mex. Promedio de absorbancia de las clonas 2A, 6H, 8C reactivas al suero hiperinmune del VDV-B-2, comparadas con la clona 4C3 positiva al suero hiperinmune del VDV-B-1 NADL, y clona 4A negativa. Punto de corte del control negativo M13 silvestre señalado con una línea roja (0.104) y la desviación estándar (± 0.089) en una línea roja discontinua.

Se realizó la prueba de ELISA con los fago-péptidos 2A, 6H, 8C, 4C3 y 4^a. Los sueros caracterizados como negativos y positivos a anticuerpos de la DVB con la prueba comercial de ELISA también fueron analizados con una prueba tamiz de PCR Multiplex con la cual fue posible determinar la presencia de los virus del CRIB simultáneamente en una sola reacción (iniciadores patente MX/E/2012/081439). Adicionalmente, aquellas muestras positivas al VDV-B, fueron genotipificadas por ensayos de discriminación alélica y RT-PCR dúplex en punto final, con la finalidad de detectar las muestras con genotipo 2 de la DVB e incluirlas en este ensayo (Martínez, 2015). En el Cuadro 2, se indican las muestras incluidas en este ensayo así como los parámetros de inclusión.

Para cada uno de los ensayos, se determinó el punto de corte de la prueba utilizando un suero negativo de la prueba de ELISA comercial (Idexx-) con el fago M13 silvestre (en las Figuras 23, 24, 25, 26 y 27 se muestra señalado con la línea roja). Otro control que se consideró fue la reactividad del fago M13 silvestre con el suero positivo de la prueba comercial de IDEXX (Idexx+) (en las Figuras 23, 24, 25, 26 y 27 se muestra señalado con la línea azul). Finalmente, con el objetivo de verificar que no existían reacciones inespecíficas entre los reactivos de la prueba, se adicionó un anticuerpo monoclonal contra la fracción Fc de la IgG de bovino hecho en conejo conjugado con peroxidasa de rábano (señalado con la línea verde en las Figuras 23, 24, 25, 26 y 27) como control negativo de la prueba.

Cabe mencionar que mediante el ensayo de discriminación alélica, estas muestras resultaron positivas para el VDVB G2, mientras que el suero 102 corresponde a una muestra positiva a los G1 y G2 del VDVB (Martínez, 2015). Se seleccionó el suero 343, debido a que a la prueba de ELISA (**IDEXX**) fue considerada como sospechosa y al ensayo de RT-PCR fue negativa. Adicionalmente, se utilizaron los sueros 168 y 337 considerados como negativos a la prueba de ELISA (**IDEXX**), a la prueba de PCR Múltiplex y a los ensayos de genotipificación. En este análisis también se incluyó el suero negativo (Idexx-) que provee el kit de ELISA **IDEXX**.

7.10.1 Ensayo de ELISA con la clona 2A anti-VDVB-2 Mex.

En este ensayo se utilizó el fago-péptido 2A en presencia de sueros positivos, sospechosos y negativos al VDVB.

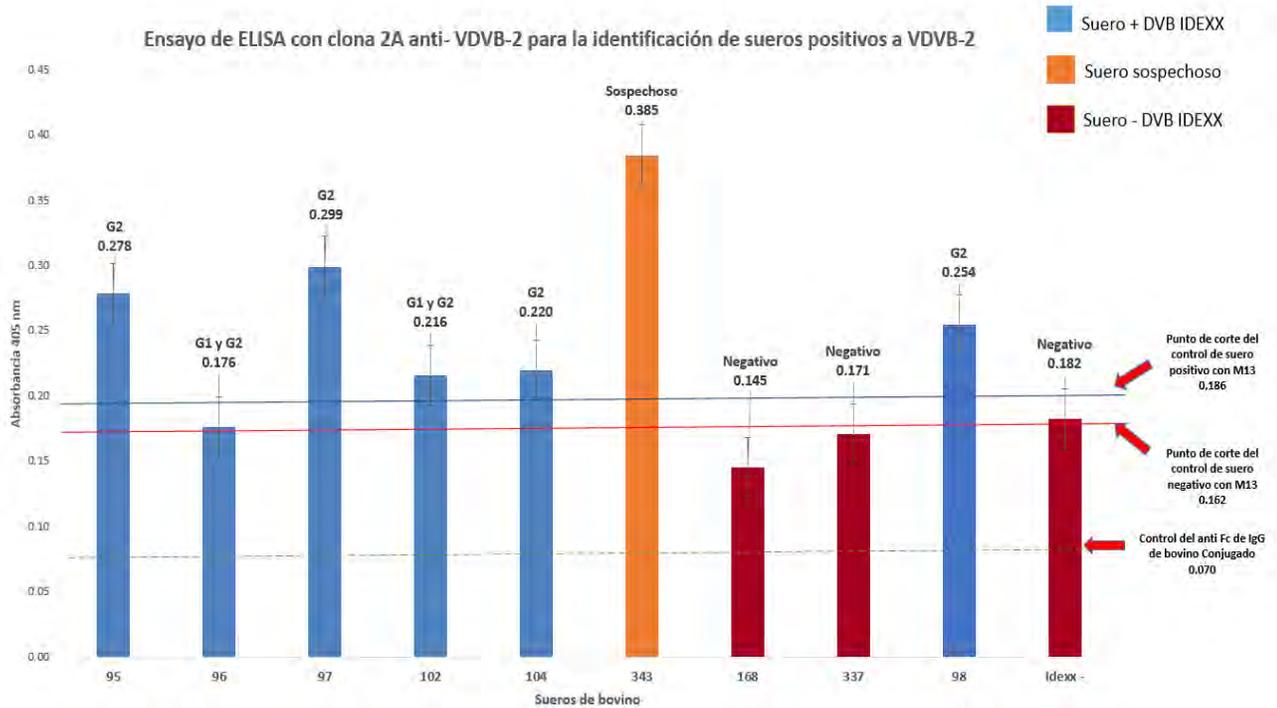


Figura 23. Ensayo de ELISA que muestra la reactividad de los sueros de bovino con la clona 2A. Promedio de absorbancia con clona 2A reactiva al suero hiperinmune anti VDVB-2 con sueros de bovino positivos (azul), sospechoso (naranja) y negativo (rojo) al VDVB pre-absorbidos con fago M13 silvestre. Punto de corte del suero positivo con M13 silvestre (línea azul: 0.186) y punto de corte del suero negativo con M13 silvestre (línea roja: 0.162).

En la Figura 23 se muestra los resultados obtenidos en esta prueba, en donde es posible observar que al utilizar el fago-péptido 2A es capaz de detectar los sueros positivos al VDVB-2: 95, 97, 98, 102, 104 (barras en azul) y 343 (naranja). Este fago-péptido confirmó como negativos los sueros 168 y 337 (barras en rojo), al igual que la muestra del control negativo incluido en el kit IDEXX. Estos resultados se encuentran correlacionados con lo antes observado en los ensayos RT-PCR de genotipificación.

7.10.2 Ensayo de ELISA con la clona 6H anti-VDVB-2 Mex:

En la Figura 24, se muestran los resultados de la prueba de ELISA con el fago-péptido 6H.

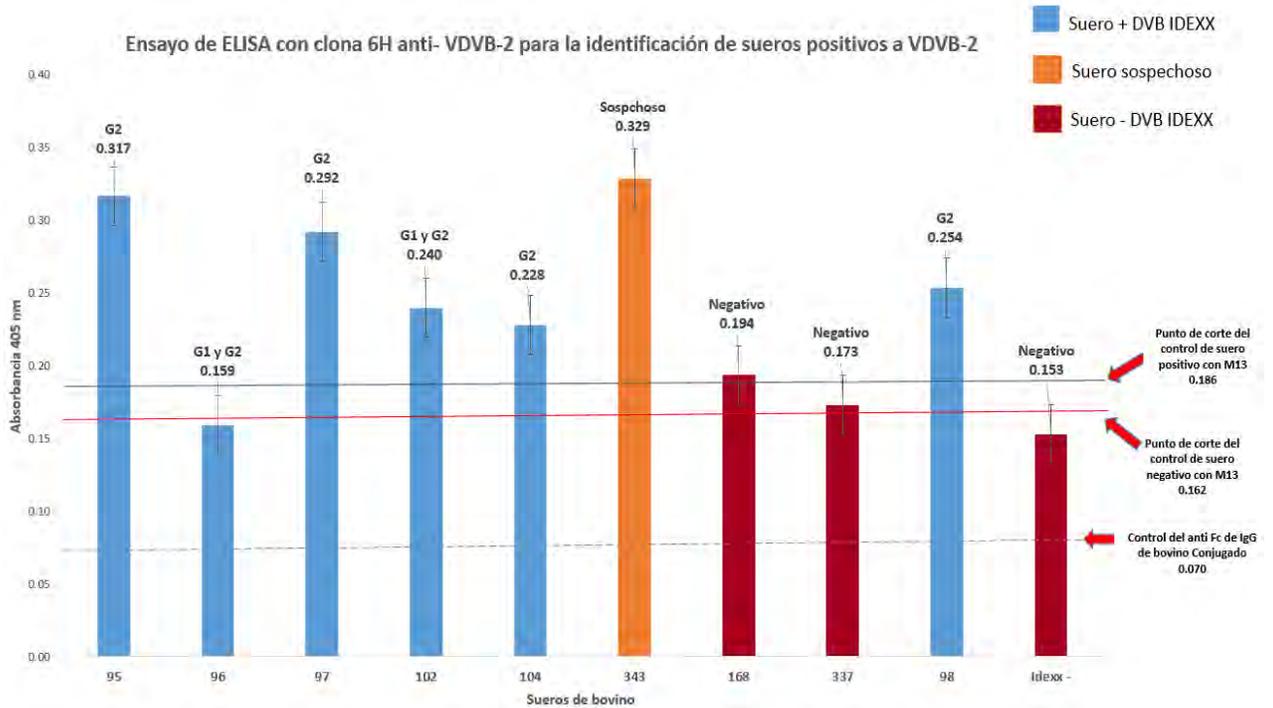


Figura 24. Ensayo de ELISA que muestra la reactividad de los sueros de bovino con la clona 6H. Promedio de absorbancia con clona 6H reactiva al suero hiperinmune anti VDVB-2 con sueros de bovino positivos (azul), sospechoso (naranja) y negativo (rojo) al VDVB pre-absorbidos con fago M13 silvestre. Punto de corte del suero positivo con M13 silvestre (línea azul: 0.186) y punto de corte del suero negativo con M13 silvestre (línea roja 0.162).

En la Figura 24, es posible observar que al utilizar el fago-péptido 6H específico al anti-VDVB-2 Mex, los sueros 95, 97, 98, 102, 104 (barras en azul) y 343 (barra en naranja) fueron positivos al VDVB-2, mientras que los sueros 168, 337 y la muestra del control de negativo de IDEXX (barra en rojo) se confirman como negativos, al ser comparados con el punto de corte. Lo anterior se confirma con los resultados obtenidos en los ensayos RT-PCR de genotipificación del VDVB.

7.10.3 Ensayo de ELISA con la clona 8C anti-VDVB-2 Mex:

En la Figura 25, se muestran los resultados obtenidos con el fago-péptido 8C en presencia de sueros positivos, sospechosos y negativos al VDVB, determinados por la prueba comercial de ELISA (IDEXX BVDV Total Ab).

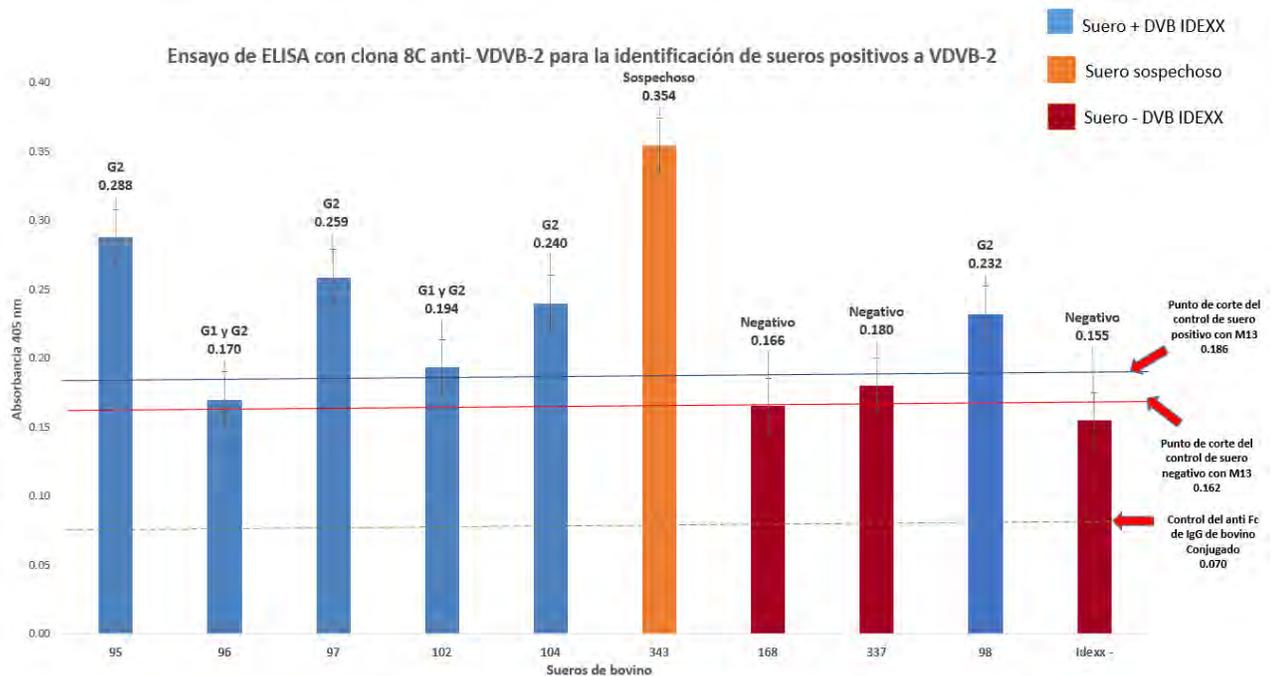


Figura 25. Ensayo de ELISA que muestra la reactividad de los sueros de bovino con la clona 8C. Promedio de absorbancia con clona 8C reactiva al suero hiperinmune anti VDVB-2 con sueros de bovino positivos (azul), sospechoso (naranja) y negativo (rojo) al VDVB pre-absorbidos con fago M13 silvestre. Punto de corte del suero positivo con M13 silvestre (línea azul: 0.186) y punto de corte del suero negativo con M13 silvestre (línea roja: 0.162).

Los resultados mostraron los sueros 95, 97, 98, 104 (barras en azul) y 343 (barra en naranja) fueron positivos al VDVB-2, mientras que los sueros 168 y 337 fueron confirmados como negativos así como la muestra del control de negativo de IDEXX (rojo). El suero 102 (azul) se consideró como sospecho en este ensayo, debido a que se encuentra en el rango intermedio de ambos puntos de corte para el control negativo de IDEXX y el control positivo de IDEXX, ambos con fago M13 silvestre.

7.10.4 Ensayo de ELISA con la clona 4C3 anti-VDVB-1 NADL:

En la Figura 26, se muestran los resultados obtenidos con el fago-péptido 4C3 en presencia de sueros positivos, sospechosos y negativos al VDVB por la prueba de ELISA (IDEXX BVDV Total Ab).

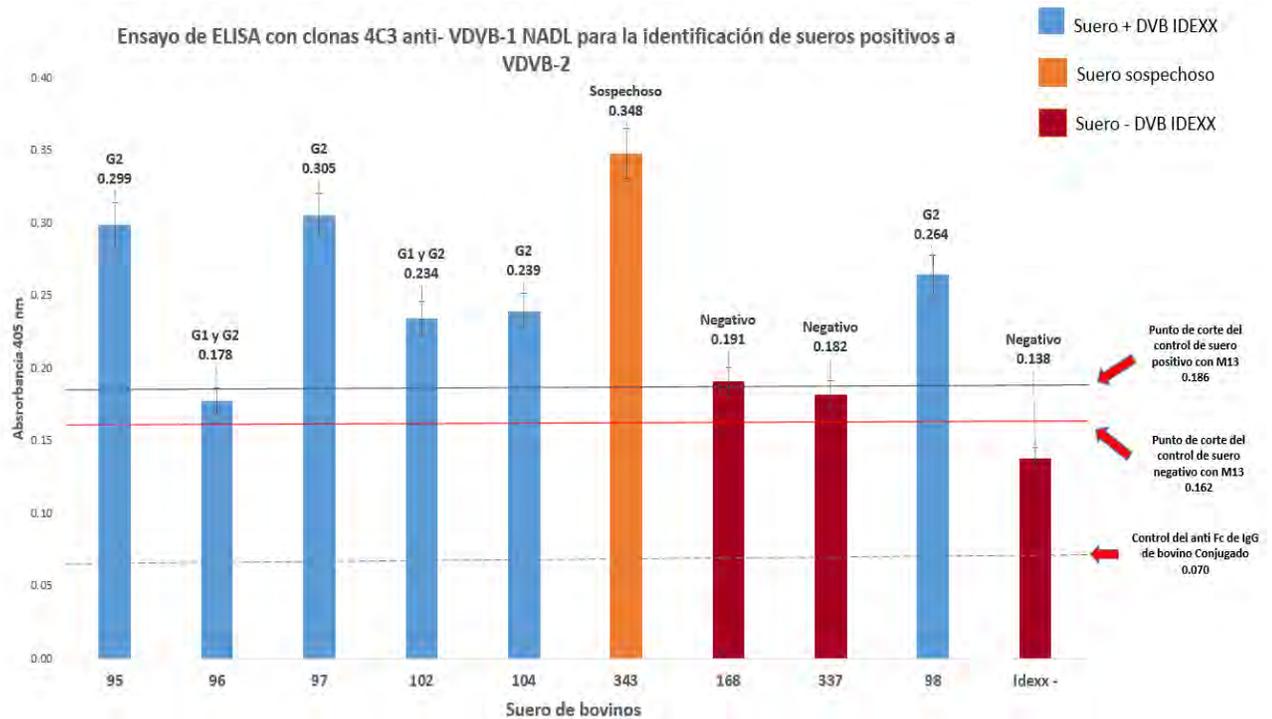


Figura 26. Ensayo de ELISA que muestra la reactividad de los sueros de bovino con la clona 4C3. Promedio de absorbancia con clona 4C3 reactiva al suero hiperinmune anti VDVB-1 NADL con sueros de bovino positivos (azul), sospechoso (naranja) y negativo (rojo) al VDVB pre-absorbidos con fago M13 silvestre. Punto de corte del suero positivo con M13 silvestre (línea azul: 0.186) y punto de corte del suero negativo con M13 silvestre (línea roja: 0.162).

Los resultados mostraron que al utilizar el fago-péptido 4C3 específico al anti-VDVB-1 NADL, los sueros 95, 97, 98, 102, 104 (barras azules) y 343 (barra naranja) se confirman como positivos al VDVB-2, mientras que los sueros 168, 337 y la muestra del control de negativo de IDEXX (barras en rojo), fueron considerados como negativos. El suero 102 (azul) se consideró como sospecho en este ensayo, debido a que se encuentra en el rango intermedio de ambos puntos de corte para el control negativo de IDEXX y el control positivo de IDEXX, ambos con fago M13 silvestre.

7.10.5 Ensayo de ELISA con la clona 4A negativa al suero anti-VDVB-2 Mex y al suero anti-VDVB-1 NADL:

En la Figura 27, se muestran los resultados del fago-péptido 4A (negativa tanto al anti-VDVB-2 Mex y al anti-VDVB-1 NADL) en presencia de sueros positivos, sospechosos y negativos al VDVB por la prueba de ELISA (**IDEXX BVDV Total Ab**).

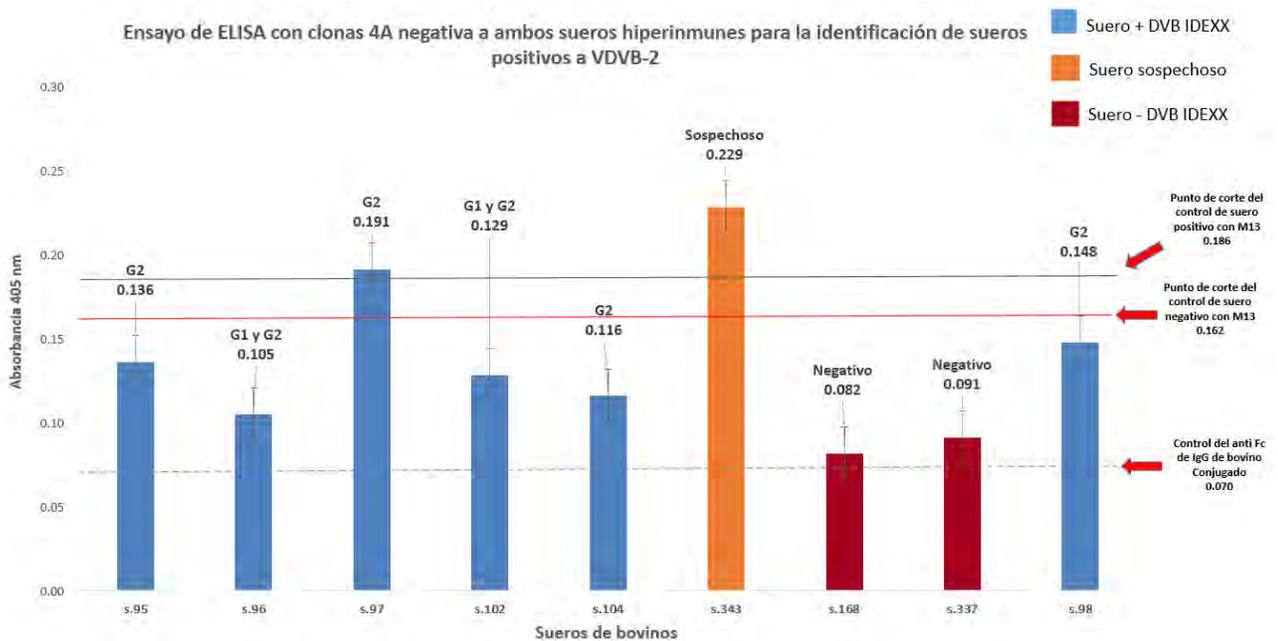


Figura 27. Ensayo de ELISA que muestra la reactividad de los sueros de bovino con la clona 4A. Promedio de absorbancia con clona 4A reactiva al suero hiperinmune anti VDVB-1 NADL con sueros de bovino positivos (azul), sospechoso (naranja) y negativo (rojo) al VDVB pre-absorbidos con fago M13 silvestre. Punto de corte del suero positivo con M13 silvestre (línea azul: 0.186) y punto de corte del suero negativo con M13 silvestre (línea roja: 0.162).

Los resultados mostraron que el fago-péptido 4A determinó que los sueros 95, 96, 98, 102 y 104 (barras azules), al igual que los sueros 168 y 337 (barras en rojo) como negativos. El suero 97 (azul), se consideró como sospecho en este ensayo, debido a que se encuentra en el rango intermedio de ambos puntos de corte para el control negativo de IDEXX y el control positivo de IDEXX, ambos con fago M13 silvestre. En el caso del suero 343 (naranja), presentó reactividad al fago-péptido 4A, por lo que se consideró como positivo en este ensayo.

VIII. DISCUSIÓN

El Virus de la Diarrea Viral Bovina es un patógeno con alta prevalencia en las poblaciones de rumiantes a nivel mundial. La signología clínica reportada es diversa al comprometer una gran variedad de órganos y desencadenar diversas patologías en el ganado bovino. Los genotipos virales 1 y 2, se han asociado a infecciones agudas en ganado; en particular, el VDVB-2 también ha sido asociado a brotes de Síndrome Hemorrágico en EE.UU., Canadá, en diversas zonas de Europa, Japón y Sur América (Pizarro-Lucero et al., 2006).

En este estudio, se identificaron tres péptidos que mimetizan la estructura de epitopos (mimotopos) de proteínas estructurales y no estructurales del VDVB-2 Mex. Esto se logró mediante la técnica de Phage Display usando una biblioteca comercial de fagos que expresan 7 aminoácidos lineales la cual fue tamizada utilizando como blanco de selección sueros hiperinmunes anti-VDVB-2 (anticuerpos policlonales).

La tecnología de Despliegue en fago, ha permitido la selección de péptidos o proteínas con un uso potencial para el desarrollo de terapéuticos y pruebas de diagnóstico. Mediante anticuerpos obtenidos por inmunización con patógenos de interés médico (antígenos) y bibliotecas de péptidos desplegados en fagos, es posible seleccionar secuencias de aminoácidos que mimeticen epitopos naturales en proteínas e incluso, epitopos conformacionales en virus por medio de linfocitos B. Se ha observado que algunos de estos péptidos, pueden imitar la estructura de epitopos de proteínas, unirse y competir por el sitio de unión con los anticuerpos; y aunque no necesariamente, presentan la estructura y secuencia de aminoácidos original del antígeno, mimetizan tanto la actividad como las características esenciales del epitopo permitiendo la inducción de la respuesta humoral en animales. Actualmente, esta tecnología es considerada una importante alternativa tanto para el diagnóstico así como para la elaboración de vacunas (HaiXiu et al., 2015, Zamit et al., 2010).

En este estudio, se utilizaron anticuerpos policlonales (sueros hiperinmunes elaborados en conejos) específicos al VDVB-2 Mex, con la finalidad de utilizarlos en la bioselecciones de fagos-péptidos. La caracterización de epitopos/ mimotopos frecuentemente se basa en el uso de anticuerpos monoclonales; sin embargo, se ha reportado que clones de fagos obtenidos de anticuerpos monoclonales no reconocen ni mimetizan al epitopo natural, lo cual dificulta la detección de genotipos, subgenotipos o serovariedades de un virus (Amin et al., 2009). El uso de sueros hiperinmunes, provee información importante de un antígeno al reflejar la capacidad inmunogénica de los epitopos presentes en un antígeno, optimiza la detección de epitopos que no fueron reconocidos por anticuerpos monoclonales y la selección de anticuerpos que favorezcan la detección de respuestas positivas en los inmunoensayos (Nakazawa et al., 2016, Gazarian et al., 2011).

En el caso del VDVB, se ha demostrado que los genotipo 1 y 2 cuentan con diferencias genéticas que generalmente se observan en la diversidad antigénica del virus y que de manera práctica durante la vacunación, les confiere una baja protección entre ambos genotipos e inclusive entre subgenotipos. La determinación de estas variaciones ha sido evaluada a través de anticuerpos monoclonales y ensayos de seroneutralización cruzada permitiendo determinar relaciones serológicas dentro del virus (Alpay y Yesilbag, 2015). En este trabajo, fue posible obtener anticuerpos policlonales específicos al VDVB-2 Mex y al VDVB-1 NADL, estos últimos obtenidos en un estudio previo realizado por Orozco (2015), los cuales mostraron especificidad al genotipo del que fueron elaborados.

BIOSELECCIONES

La bioselección de fagos (biopanning) tiene como ventajas que al ser un proceso dinámico permite seleccionar clones que cuenten con alta afinidad y especificidad a un ligando. El uso del fago M13 en esta técnica, permite disminuir los costos de producción de cepas virales en cultivo celular, al ser resistente a solventes

orgánicos, agentes desnaturalizantes y al calor, facilita su propagación y mantenimiento, y tal vez la más importante, cuenta con una alta capacidad inmunogénica para desencadenar por sí solo, una respuesta a nivel humoral. Estas características lo hacen un candidato importante para el desarrollo de vacunas, terapias basadas en bacteriófagos y pruebas diagnósticas (Houimel y Dellagi, 2009; Makowski, 1994).

La estrategia usada en este trabajo, se basó inicialmente en la aplicación de una bioselección negativa usando el suero hiperinmune específicos al VDVB-1 NADL, con lo cual se descartaron aquellos fagos específicos a este genotipo; seguido de una bioselección positiva a través de la selección del suero hiperinmune del VDVB-2 Mex. Con este procedimiento fue posible retirar aquellos fagos con uniones débiles o baja afinidad, y recuperar sólo los fagos más específicos al genotipo 2. Esto se realizó durante 3 rondas de bioselección, y el análisis del título de fagos eluidos permitió observar el enriquecimiento de fagos en las diferentes rondas: en la primera bioselección fue de 1×10^5 UFP /mL y finalizó en la tercera con 1×10^8 UFP/ mL. Este resultado es similar a lo indicado por las especificaciones del fabricante, quien reporta que después de 2 o 3 rondas de bioselección, es posible enriquecer las clonas con capacidad de unión al blanco de selección. De igual forma, resulta similar a lo reportado por Zamit y colaboradores (2010), quienes utilizaron una biblioteca comercial con 12 aminoácidos lineales para identificar epitopos/ mimotopos de la proteína E2 del VDVB-1. En este trabajo, como resultado del proceso de bioselección, se purificaron y amplificaron 94 clonas provenientes de las 2^a y 3^a ronda de bioselección.

ENSAYOS DE UNIÓN

Mediante múltiples ensayos de unión por ELISA de los fago-péptidos contra los sueros hiperinmunes de ambos genotipos virales, fue posible discriminar aquellas clonas reactivas al suero anti-VDVB-2 Mex: de las 96 clonas purificadas, 72 clonas

mostraron reactividad a ambos sueros y finalmente 6 clonas (2A, 3B, 5E, 6H, 8C, 8E) mostraron reactividad exclusivamente a los anticuerpos policlonales específicos al VDVB-2 Mex, lo cual sugiere que estos péptidos desplegados en fago contienen secuencias que mimetizan epítomos naturales de las proteínas del VDVB-2 Mex. Esto se corroboró al comparar la actividad de estas clonas con el suero anti VDVB-1 NADL, en donde no mostraron reactividad. Sin embargo un dato interesante en nuestros resultados fue que este sistema de selección nos permitió verificar la presencia de fago-péptidos que reconocen anticuerpos específicos para ambos genotipos virales, e inclusive descartar aquellas clonas seleccionadas con componentes irrelevantes presentes en ambos sueros (Gazarian et al., 2011). Las 6 clonas específicas (2A, 3B, 5E, 6H, 8C, 8E) fueron objeto de secuenciación, y adicionalmente, se caracterizó una clona reactiva a ambos sueros (7C) y una negativa a ambos sueros hiperinmunes (4H).

ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS DE LAS CLONAS REACTIVAS

Las secuencias de los péptidos de las 6 clonas reactivas obtenidas a partir de la biblioteca de 7 aminoácidos lineales se analizaron mediante alineamientos y compararon con estructuras de proteínas reportadas del VDVB:

1. “GTVPNTS” y “LVSLSRR”

Las secuencias “**GTVPNTS**” de las clonas 2A, 3B, 5E y la secuencia “**LVSLSRR**” de la clona 6H, mostraron homología con la glicoproteína E2, en un 71% y, 57.14%, respectivamente. Las clonas 2A, 3B, 5E constituyen un grupo homólogo, lo que nos hace suponer que representan una estructura muy abundante y activa en el suero hiperinmune y a su vez, inmunodominante.

La glicoproteína E2 es una proteína estructural localizada en la envoltura del virión, cuya función se encuentra asociada a la unión del receptor CD46 en la superficie

celular. Además se ha identificado que participa en la fusión de membrana, el ensamblaje del virus y maduración de los viriones (Wang et al., 2015).

Se ha reportado que dentro del género *Pestivirus*, la glicoproteína E2 es la más inmunodominante, por lo que es objeto del desarrollo de vacunas y herramientas diagnósticas; sin embargo, es la más variable, ya que sufre diversas mutaciones debido a que se encuentra sujeta a mayor presión de selección por parte del sistema inmunológico, y por lo tanto sus epítomos neutralizantes varían entre especies. Mediante el uso de anticuerpos monoclonales se ha realizado el mapeo de epítomos de la glicoproteína E2, demostrando que el VDVB-2 es diferente antigénicamente al VDVB-1. Deregt y colaboradores (1998) identificaron tres dominios neutralizantes denominados A, B y C en la proteína E2 que cuentan con al menos 5 epítomos que son reconocidos por anticuerpos monoclonales del VDVB-2. Además, se han identificado la presencia de epítomos neutralizantes en un solo dominio del VDVB 1, por lo que para el genotipo 2, se ha sugerido que la región inmunodominante se encuentra en el dominio A (Jelsma et al., 2013)

Omari K y colaboradores (2013) reportaron la estructura cristalizante de la región N-Terminal de la glicoproteína E2, en donde identificaron 4 dominios (D) estructuralmente importantes: DA (AA 1-87), DB (AA 88-164), DC (AA 165-271) y DD (AA 272-333), similar a lo reportado por Wang y colaboradores (2015).

Los mimotopos obtenidos en este trabajo, procedentes de las clonas 2A, 3B, 5E y 6H, fueron localizados en la región del DA y DB respectivamente, lo cual coincide con la región de epítomos lineales observados tanto en el VDVB y el Virus de la Fiebre Porcina Clásica (Figura 20). Estos resultados nos permiten proponer a estos mimotopos como inmunógenos o para incluirlos en sistema de diagnóstico (ELISA).

2. “LVLSRR”

Adicionalmente, la clona 6H “LVLSRR” mostró un 86% de homología con la proteína no estructural N^{pro}. Esta proteína no tiene contraparte en otros miembros

de la familia *Flaviviridae*. Tiene actividad proteolítica (cisteína proteasa), la cual es determinante en la replicación viral debido a que se puede autoprocasar y permitir la liberación de la proteína C de la poliproteína. Su principal actividad es sobre el sistema inmune donde suprime la transcripción de los genes del IFN α/β al bloquear la acción de IRF-3/7. Se ha reportado que su acción proteolítica, es independiente a la degradación del IRF-3 y la inhibición del Interferon tipo I.

Esta proteína cuenta con dos dominios: uno catalítico localizado en N-terminal (dominio de proteasa) que se extiende hasta el AA 100 y del AA 163 al 168; los residuos que lo conforman se encuentran altamente conservados, por lo que mutaciones o sustituciones de aminoácidos inactivan la proteasa (Ruggli et al., 2009, Hilton et al., 2006). El segundo dominio, es el de unión al zinc ubicado en C-terminal que va desde el AA 101 al 156. En este estudio, se realizó el mapeo de la secuencia del mimotopo en el cristal de la proteína de N^{pro} y fue posible identificarlo entre los AA 139 y 145 dentro del dominio de unión al zinc (Figura 22). Se ha reportado que la importancia de este dominio de N^{pro} radica en que es requerido para la unión al IRF-3 que en conjunto con el dominio proteasa, el cual se une a proteínas celulares responsables de la ubiquitinación de IRF-3, promueven su degradación a nivel proteosomal (Gottipati et al., 2013).

Dada la relevancia en la acción de N^{pro} como supresor del IFN tipo I, la identificación de esta estructura e inhibición de su función a nivel celular, la convierte en el blanco para la elaboración de biológicos que permitan la prevención de su acción y frenen el establecimiento de la infección persistente.

3. “WRAPQPM”

La secuencia “**WRAPQPM**” de las clonas 8C y 8E, obtuvo un 57% de similitud con la proteína No Estructural NS3 del VDVB. Se ha descrito que NS3 es una proteína que contiene la mayor cantidad de epitopos antigénicos y es conservada en los

Pestivirus, por lo que es considerada el antígeno de elección en inmunoensayos para la detección de anticuerpos del VDVB. Se ha observado que en células infectadas con el VDVB biotipo Citopático, esta proteína es abundantemente secretada, detectándose altos niveles de esta proteína 4h post infección.

Posee dos dominios cuyas funciones son indispensables para la replicación del virus: proteasa en su dominio N-Terminal responsable del procesamiento proteolítico de la poliproteína viral en el Reticulo Endoplasmático (exceptuando la de NS2/3) y ATPasa y ARN helicasa en su dominio C-Terminal (la cual corresponde a casi dos tercios de la proteína). Esta última ha sido identificada como el dominio más inmunodominante en la proteína. La caracterización de este dominio ha permitido definir regiones dentro de la estructura: el dominio A o 1 (AA 205-369) y el dominio B o 2 (AA 368-549) ambos utilizados para pruebas diagnósticas (Deregt et al., 2005), y para el mapeo de epitopos conservados, con la capacidad de inducir una reacción antígeno- anticuerpo (Mishra et al., 2008).

Tortorici y colaboradores (2015) reportaron el cristal de proteína NS3 del Virus de la Fiebre Porcina Clásica, cuya estructura se caracteriza por contener 3 dominios: D1 (AA 193- 356), D2 (AA 357 -527) y D3 (528 al 683). Los dominios se encuentran separados por profundas hendiduras, y al centro de estas, cuenta con un sitio de unión a los ácidos nucleicos (NABG). Los D1 y D2 corresponden a la helicasa y conservan un 20 y 30% de similitud con VHC y Virus del Dengue; en contraste, D3 es el menos conservado al presentar un 10% de similitud con las helicasa de NS3 de los mismos virus, sin embargo se ha observado que participa activamente en el desenrollamiento del genoma durante la replicación.

En este trabajo mediante la localización del mimotopo, fue posible determinar que se ubicaba en el dominio A de la helicasa entre los AA 214 y 224 de secuencias reportadas de NS3 de VDVB-2 (Figura 21). Este resultado es similar a lo reportado por Deregt et al (2005), quien al utilizar anticuerpos monoclonales mapeo dos sitios

antigénicos en la proteína tanto en G1 y G2 del VDVB, localizados entre los AA 205 al 549.

El mapeo de los epitopos de NS3 es proceso complicado, debido a que es una proteína altamente conformacional y sus epitopos escapan a péptidos sintéticos. Se ha reportado que incluso la técnica de Phage Display es frecuentemente ineficiente para su localización. Sin embargo, estudios realizados con el VHC, utilizando bibliotecas de 12 aminoácidos, se ha logrado el mapeo de la región antigénica de NS3.

Algunas vacunas con virus inactivados disponibles en el mercado para el VDVB, cuentan con deleciones específicas sobre el gen de NS3, por lo que a la vacunación no induce anticuerpos detectables contra NS3 (vacunas marcadoras) y no interfieren con el desarrollo de anticuerpos en suero en las subsecuentes infecciones con el virus (Kuijk et al., 2008, Bhatia et al., 2008).

Por lo que al ser una proteína fácilmente detectable después de la infección natural con el virus, y de que los anticuerpos desarrollados contra la helicasa de NS3 son los primeros en aparecer al inicio de la respuesta inmune, consideramos que este mimotopo tiene el potencial para ser incluido en el desarrollo de una prueba diagnóstica para el monitoreo del estado inmunológico de los hatos y así poder diferenciar a los animales vacunados como los que están infectados con virus circulantes, así como el biotipo del virus que produjo la infección.

4. “KTLSLTR”

La secuencia “**KTLSLTR**” provenía de una clona (7C) que mostró reactividad a ambos sueros hiperinmunes anti VDVB. Al analizar su secuencia presentó una homología un 71.4 % con la proteína NS4B, cuyas funciones están asociadas a la replicación de genoma viral junto con otras proteínas no estructurales (NS3, NS5A, NS5B). Adicionalmente, obtuvo un 48.2 % de similitud con NS5B y la glicoproteína E2, por lo que podemos suponer que esta clona contenía secuencias similares a

estructuras conservadas en ambos genotipos del virus y a su vez, abundantes en ambos sueros hiperinmunes.

5. “HSNYYAS”

Los alineamientos realizados con estructuras reportadas en el **GenBank**[®], demostraron que esta secuencia no contaba con similitudes con estructuras virales relacionadas a la familia *Flaviviridae*, ni con el género *Pestivirus*, y en particular, no mostró homología con el VDVB.

ANÁLISIS DE LA ESPECIFICIDAD DE LAS CLONAS

Con la finalidad de verificar si las secuencias encontradas en este trabajo eran propias del VDVB o compartían homología con otros virus que infectarán a bovinos, se realizaron alineamientos con secuencias reportadas en el **GenBank**[®]. Los resultados arrojaron que la secuencia “**GTVPNTS**” de las clonas 2A, 3B y 5E, tenía un 71.4% de homología con las proteínas E1 y de la Cápside del Virus de la Hepatitis C (VHC). La secuencia “**LVSLSRR**” de la clona 6H presentó un 85.7% y un 71.4% de similitud con las proteínas NS1, NS5A y NS5B del VHC, respectivamente. El VHC es un virus ARN que pertenece al género *Hepacivirus* de la familia *Flaviviridae*; produce una infección asintomática y crónica en el hígado en humanos. Actualmente no hay evidencia de que el virus pueda infectar poblaciones de animales y sea transmitido al humano (zoonosis). Sin embargo, existe evidencia de la presencia de “Hepacivirus de No Primates” identificados en animales domésticos (perros y caballos) así como una gran diversidad de *Hepacivirus* (“Virus parecidos al VHC”) en roedores y murciélagos de Europa, Asia, África y Centroamérica (Pfaender et al., 2014).

Cabe señalar que los alineamientos de las secuencias “**GTVPNTS**” y “**WRAPQPM**”, mostraron también homología con secuencias reportadas de las proteínas NS3 (57%) y NS5B (71.4%), respectivamente, del Hepacivirus bovino. En años recientes,

se identificó una nueva especie de *Hepacivirus* desconocido hasta ahora en ganado bovino en Alemania y que actualmente se sabe se encuentra ampliamente en los hatos de ese país. A pesar de que se desconoce si puede ser transmitido al humano, no se descarta como una potencial zoonosis (Baechlein et al., 2015). En México, no existen reportes de que este virus se encuentre circulando en hatos de bovinos.

Mientras que la secuencia “**WRAPQPM**” proveniente de las clonas 8C y 8E, presentó un 71.4% de homología con la proteína NS1 del Virus de Zika (ZIKV). Este virus pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus* y es transmitido por mosquitos del género *Aedes*. En fechas recientes se ha encontrado involucrado en brotes en América, induciendo estados febriles en los individuos infectados, defectos congénitos (microcefalia) y otros problemas en sistema nervioso en fetos de madres infectadas con ZIKV (Samy et al., 2016). De manera experimental se ha demostrado que este virus se replica en células de ratones, primates no humanos (mono *Rhesus*) y en células del sistema nervioso y epiteliales de cerdos recién nacidos (Li et al., 2016, Karniychuk et al., 2016). Sin embargo, no se ha reportado que infecte a animales domésticos de manera natural. Es interesante señalar, que la proteína NS1 de los *Flavivirus*, es considerada como un “biomarcador”, ya que al encontrarse en altas cantidades en sueros al inicio de la infección permite detectar a pacientes infectados, tal como sucede con el Virus del Dengue (DENV) (Cecchetto et al., 2016). Por lo que la secuencia de esta clona podría contribuir al desarrollo de una prueba diagnóstica enfocada en *Flavivirus* de importancia en la salud pública.

ANÁLISIS DE SUEROS DE BOVINOS POR LA TÉCNICA DE ELISA (IDEXX)

Con el propósito de contar con sueros positivos y negativos de bovinos al VDVB, se realizó un muestreo que abarcó diversas zonas ganaderas de cinco estados del país, donde fue posible obtener sueros de animales sin historial de vacunación y con signología respiratoria positiva al VDVB. Estas muestras fueron analizadas con una prueba comercial de ELISA disponible en el mercado para el monitoreo del

VDVB en hatos. Los resultados indican que el VDVB está ampliamente distribuido en las regiones ganaderas muestreadas. En México, existen escasos reportes que se han demostrado que la seropositividad al VDVB va desde el 15% hasta el 70 % en hatos con diferentes estatus zosanitarios en zonas muy específicas del país (Solis-Calderon et al., 2005, Escamilla et al., 2007).

En este estudio fue posible determinar que la presencia de anticuerpos contra la DVB aumenta dependiendo al tipo de producción y función zootécnica de donde provenían los bovinos, siendo las UPB con ganado de leche y de doble propósito donde se registraron diferencias significativas (57% y 50.8% respectivamente). Se ha reportado que las condiciones medioambientales, las instalaciones en donde se alojan los bovinos y las medidas de manejo en estas producciones, predisponen al desarrollo de inmunosupresión en el ganado bovino y a su vez, la presentación de enfermedades respiratorias asociadas a bacterias y agentes virales (CRIB) (Roland et al., 2016).

En cuanto a los diferentes grupos de edades, se observó que entre los 19 a 24 meses y de 25 a 48 meses de edad, se localiza la mayor cantidad de animales positivos a anticuerpos contra DVB (61.2% y 61%). Se ha reportado que durante este periodo de tiempo, se concentra la mayor cantidad de eventos estresantes para el ganado en producción, debido a que coincide con la edad al primer parto (24 meses aproximadamente), inicio de la lactación y cambios en la homeostasis del ganado, cuya consecuencia es la alteración en las concentraciones hormonales y poblaciones celulares del sistema inmune, aumento en la demanda metabólica, y finalmente, inmunosupresión (Sordillo, 2016). En el caso de los bovinos de 1 a 6 meses de edad, el porcentaje de seropositividad fue alto considerando que no se encontraban vacunados (45.2%), por lo que esto puede ser un indicador de las buenas prácticas durante las crianza como es la administración de calostro de buena calidad o de la presencia de infecciones persistentes en el hato provenientes del contacto con animales mayores que cursen una infección aguda (Thompson et al., 2006).

Los animales seronegativos deben ser tomados con precaución, ya que en ellos pueden existir animales PI's que faciliten la diseminación del virus dentro de la población de bovinos, por lo que para descartar esta condición es importante el uso de pruebas diagnósticas adicionales (RT-PCR y aislamiento viral) que nos permitan ampliar la visión del estatus zoonosarios del hato y a su vez, nos den la pauta para descartar o confirmar la persistencia del virus.

EVALUACIÓN DE LAS CLONAS REACTIVAS CON SUEROS DE BOVINO

Se decidió evaluar su reactividad de los fago-péptidos 2A, 6H, 8C, 4A obtenidas en este estudio, y adicionalmente, el fago-péptido 4C3 (obtenido previamente y que era reactiva al anti-VDVB-1 NADL), para identificar los genotipos 1 y 2 en sueros de bovino.

En ensayos previos realizados con sueros de bovinos y clonas reactivas al genotipo 1 del VDVB, se observaron reacciones inespecíficas en ensayos de ELISA (falsos positivos), por lo que se sugirió que los sueros de bovinos podría contener anticuerpos contra el fago M13 de manera natural interfiriendo en la exactitud de los resultados (Orozco, 2015). Debemos recordar que los fagos son virus que infectan bacterias y que al ser ubicuos en la naturaleza están presentes en plantas y como comensales en la microbiota de humanos y animales. De igual forma, *E. coli*, es una enterobacteria comensal en el tracto gastrointestinal de diversas especies de animales domésticos, incluyendo bovinos. Reportes han identificado en heces de bovinos diversos bacteriófagos de la familia *Myoviridae* (Anand et al., 2015, Nyambe et al., 2016), sin embargo, a la fecha no existen reportes de la presencia de bacteriófagos de la familia *Inoviridae* en bovinos. Se ha reportado que en sueros de humano, ha sido posible identificar anticuerpos anti-M13, por lo que una estrategia sugerida es el uso de péptidos sintéticos, con la finalidad de mejorar la sensibilidad y precisión de ensayos de ELISA (Tafi et al., 1997).

En este trabajo, se propuso una estrategia basada en el pre-tratamiento (pre-absorción) de los sueros de bovino con el fago M13 silvestre.

Los ensayos demostraron que los fago-péptidos 2A, 6H y 8C, fueron reactivos y capaces de identificar a las muestras positivas a VDVB G2 posterior a la pre-absorción de los sueros (Figuras 23, 24 y 25). Así mismo, se tuvo la oportunidad de evaluar el comportamiento de las clonas ante sueros que contenían co-infecciones de G1 y G2 (suero 96 y 102). La presencia de co-infecciones por ambos genotipos ha sido reportada previamente por Martínez (2015), quien identificó en animales de pie de cría en México la presencia de co-infecciones entre el VDVB 1 y VDVB-2. Además en este estudio se encontró que el VDVB-2 era más predominante que el VDVB-1. En el presente trabajo se encontró que al evaluar el suero 96, obtuvo baja reactividad con las clonas anti-VDVB-2 Mex (2A, 6H y 8C); sin embargo con la clona anti-VDVB-1 NADL, 4C3, aumentó su reactividad, lo cual sugiere que posiblemente este suero es positivo a anticuerpos específicos de G1. En el caso del suero 102, al ser evaluado por las clonas 2A, 8C y 4C3 se consideró como positivo en la prueba. Sin embargo con la clona 6H fue considerado como sospechoso. Una explicación a este resultado, podría radicar en que al existir competencia de ambos genotipos en las muestras, habría mayor presencia de anticuerpos de un genotipo sobre el otro y por lo tanto, un genotipo sería más fácil de identificar. De igual forma no debe descartarse la presencia de animales PI a un genotipo en específico, desarrollando anticuerpos para uno de los genotipos. En el caso de los sueros negativos, se observó que en cada uno de los ensayos, se encontraban por debajo del punto de corte establecido con base a los controles de fago M13 silvestre en presencia de controles positivos y negativos de suero (**IDEXX BVDV Total Ab**). Con lo cual se demuestra que este ensayo es capaz de discriminar a los sueros negativos al VDVB.

En cuanto a la clona 4C3 obtenida de bioselecciones a partir del anti VDVB-1 NADL, se demostró que presentaba homología con secuencias reportadas de la glicoproteína E2 de ambos genotipos. En los resultados, es posible observar que puede identificar a los sueros positivos al VDVB, indistintamente si son positivos al G1 o G2. De igual forma, que en los ensayos anteriores, los sueros negativos no

tuvieron reactividad con esta clona además de encontrarse por debajo del punto de corte de la prueba (Figura 26).

Finalmente, la clona 4A (negativa) mostró baja reactividad tanto para sueros positivos a G2, a sueros con co-infecciones y para sueros negativos (Figura 27). Cabe señalar, que el suero 343 fue considerado como positivo en este ensayo. En particular, esta muestra en las pruebas de PCR Múltiplex, que identifica a los 4 virus del CRIB (VDVB, VHB-1, VRSB y PI-3) y los a los ensayos de genotipificación por RT-PCR, fue negativa al virus DVB y a ambos genotipos. Sin embargo, al analizar los resultados de la prueba tamiz de PCR Múltiplex, se encontró que era positivo al Virus Herpes Bovino-1 (VHB-1 antes IBR).

La clona 4A se determinó que contenía la secuencia “HSNYYAS”. Inicialmente, al realizar alineamientos con estructuras reportadas en el **GenBank**[®], no se encontró que tuviera homología con virus relacionado a la familia *Flaviviridae* y con el género *Pestivirus*, en particular, con el VDVB. Sin embargo, un análisis más minucioso, mostró que contaba con un 57.14% de similitud con la proteína mayor de la cápside del Virus Herpes bovino tipo 1.1 (respiratorio) y 1.2 (reproductivo). El VHB-1 es un agente inmunosupresor comúnmente aislado en el ganado bovino en problemas respiratorios asociados al CRIB desencadenando infecciones secundarias bacterianas por producidas por *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* y *Mycoplasma bovis*, además de producir lesiones en tracto reproductivo y en sistema nervioso (Grissett et al., 2015). Las co-infecciones virales asociadas al CRIB son muy frecuentes en ganado con problemas respiratorios, por lo que al tener una clona cuya secuencia tiene el potencial de identificar sueros con VHB-1 y del VDVB (G1, G2) nos permitirá desarrollar una prueba diagnóstico dirigido a la identificación de agentes virales de importancia en la ganadería.

IX. CONCLUSION

La técnica de Phage Display es un enfoque versátil y altamente específico para la identificación de péptidos propios de diversos antígenos. En este estudio, utilizamos esta tecnología para la identificación de péptidos específicos al VDVB-2, el cual es un agente viral de importancia clínica y económica dentro de la ganadería enfocada a producción lechera y cárnica en México y a nivel mundial.

Los objetivos de este estudio se cubrieron en su totalidad, al identificar tres péptidos que mimetizaban la estructura de epitopos (mimotopos) de proteínas estructurales (glicoproteína E2) y no estructurales (N^{pro}, NS3) del VDVB-2 Mex, y al evaluar su reactividad en ensayos para la identificación de anticuerpos al VDVB, mostraron resultados relevantes al identificar tanto para G1 como G2 en sueros de bovinos positivos a DVB. Nuestros resultados sugieren que los tres péptidos seleccionados tienen características inmunológicas importantes y podrán ser utilizados para el desarrollo de herramientas diagnósticas para la detección de anticuerpos contra el VDVB así como para el G2 en sueros de bovinos. Adicionalmente, las partículas de fago al acarrear estos péptidos (mimotopos del VDVB), podrían ser incluidos en ensayos de la respuesta inmune en modelos animales para verificar la acción de estos mimotopos al inducir la producción de anticuerpos contra el VDVB, y de igual forma incluirlos en el diseño de inmunoterapias y/o vacunas contra este patógeno a futuro. El desarrollo de pruebas diagnósticos sensibles y específicas (ELISA) para la detección de la DVB, que impliquen un costo menor al de las pruebas comerciales disponibles en el mercado, contribuirá a la detección oportuna y control del virus en los hatos, y en consecuencia, la disminución de las pérdidas económicas relacionadas a la DVB.

Finalmente, este trabajo abre la posibilidad del uso de estos péptidos en ensayos para la identificación de otros patógenos de importancia en salud pública (ZIKV, DENV) y en salud animal (VHB-1, Hepacivirus bovino) en estudios posteriores.

X. REFERENCIAS

- AGAPOV, E. V., MURRAY, C. L., FROLOV, I., QU, L., MYERS, T. M. & RICE, C. M. 2004. Uncleaved NS2-3 is required for production of infectious bovine viral diarrhoea virus. *J Virol*, 78, 2414-25.
- AMIN, N., AGUILAR, A., CHAMACHO, F., VAZQUEZ, Y., PUPO, M., RAMIREZ, J. C., IZQUIERDO, L., DAFHNIS, F., STOTT, D. I., PEREZ, E. M. & ACOSTA, A. 2009. Identification of Dengue-specific B-Cell Epitopes by Phage-display Random Peptide Library. *Malays J Med Sci*, 16, 4-14.
- ANAND, T., VAID, R. K., BERA, B., BARUA, S., RIYESH, T., VIRMANI, N., YADAV, N. & MALIK, P. 2015. Isolation and characterization of a bacteriophage with broad host range, displaying potential in preventing bovine diarrhoea. *Virus Genes*, 51, 315-21.
- ARAP, M. A. 2005. Phage display technology: applications and innovations. *Genetics and Molecular Biology*, 28, 1-9.
- ARNAL, M., FERNANDEZ-DE-LUCO, D., RIBA, L., MALEY, M., GILRAY, J., WILLOUGHBY, K., VILCEK, S. & NETTLETON, P. F. 2004. A novel pestivirus associated with deaths in Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*). *J Gen Virol*, 85, 3653-7.
- AVALOS-RAMIREZ, R., ORLICH, M., THIEL, H.-J. & BECHER, P. 2001. Evidence for the Presence of Two Novel Pestivirus Species. *Virology*, 286, 456-465.
- BACHOFEN, C., BRAUN, U., HILBE, M., EHRENSPERGER, F., STALDER, H. & PETERHANS, E. 2010. Clinical appearance and pathology of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus of different genetic subgroups. *Vet Microbiol*, 141, 258-67.
- BACHOFEN, C., GRANT, D. M., WILLOUGHBY, K., ZADOKS, R. N., DAGLEISH, M. P. & RUSSELL, G. C. 2014. Experimental infection of rabbits with bovine viral diarrhoea virus by a natural route of exposure. *Vet Res*, 45, 34.
- BAECHLEIN, C., FISCHER, N., GRUNDHOFF, A., ALAWI, M., INDENBIRKEN, D., POSTEL, A., BARON, A. L., OFFINGER, J., BECKER, K., BEINEKE, A., REHAGE, J. & BECHER, P. 2015. Identification of a Novel Hepacivirus in Domestic Cattle from Germany. *J Virol*, 89, 7007-15.
- BAKER, J. C. 1995. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 11, 425-45.
- BARBAS, C. F., BURTON, D. R., SCOTT, J. K. & SILVERMAN, G. J. 2004. *Phage Display: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- BECHER, P., ORLICH, M., KOSMIDOU, A., KÖNIG, M., BAROTH, M. & THIEL, H.-J. 1999. Genetic Diversity of Pestiviruses: Identification of Novel Groups and Implications for Classification. *Virology*, 262, 64-71.
- BEHRENS, S. E., GRASSMANN, C. W., THIEL, H. J., MEYERS, G. & TAUTZ, N. 1998. Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. *J Virol*, 72, 2364-72.
- BHATIA, S., SOOD, R., MISHRA, N., PATNAIK, B. & PRADHAN, H. K. 2008. Development and evaluation of a MAbs based competitive-ELISA using helicase domain of NS3 protein for sero-diagnosis of bovine viral diarrhoea in cattle and buffaloes. *Res Vet Sci*, 85, 39-45.
- BOOKER, C. W., ABUTARBUSH, S. M., MORLEY, P. S., GUICHON, P. T., WILDMAN, B. K., JIM, G. K., SCHUNICHT, O. C., PITTMAN, T. J., PERRETT, T., ELLIS, J. A.,

- APPLEYARD, G. & HAINES, D. M. 2008. The effect of bovine viral diarrhoea virus infections on health and performance of feedlot cattle. *Can Vet J*, 49, 253-60.
- BRANZA-NICHITA, N., LAZAR, C., DURANTEL, D., DWEK, R. A. & ZITZMANN, N. 2002. Role of disulfide bond formation in the folding and assembly of the envelope glycoproteins of a pestivirus. *Biochem Biophys Res Commun*, 296, 470-6.
- BRODERSEN, B. W. 2014. Bovine viral diarrhoea virus infections: manifestations of infection and recent advances in understanding pathogenesis and control. *Vet Pathol*, 51, 453-64.
- BROWNLIE, J., THOMPSON, I. & CURWEN, A. 2000. Bovine virus diarrhoea virus - strategic decisions for diagnosis and control. *In Practice*, 22, 176-187.
- BRUSCHKE, C. J., HULST, M. M., MOORMANN, R. J., VAN RIJN, P. A. & VAN OIRSCHOT, J. T. 1997. Glycoprotein E2 of pestiviruses induces apoptosis in lymphocytes of several species. *J Virol*, 71, 6692-6.
- CARMAN, S., VAN DREUMEL, T., RIDPATH, J., HAZLETT, M., ALVES, D., DUBOVI, E., TREMBLAY, R., BOLIN, S., GODKIN, A. & ANDERSON, N. 1998. Severe acute bovine viral diarrhoea in Ontario, 1993-1995. *J Vet Diagn Invest*, 10, 27-35.
- CECCHETTO, J., FERNANDES, F. C., LOPES, R. & BUENO, P. R. 2016. The capacitive sensing of NS1 Flavivirus biomarker. *Biosens Bioelectron*, 87, 949-956.
- CLACKSON, T. & LOWMAN, H. B. 2004. *Phage Display: A Practical Approach*, OUP Oxford.
- COLLETT, M. S., ANDERSON, D. K. & RETZEL, E. 1988. Comparisons of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus with members of the flaviviridae. *J Gen Virol*, 69 (Pt 10), 2637-43.
- CHASE, C. C. 2013. The impact of BVDV infection on adaptive immunity. *Biologicals*, 41, 52-60.
- CHRISTMAS, S. E., DE LA MATA ESPINOSA, C. T., HALLIDAY, D., BUXTON, C. A., CUMMERSON, J. A. & JOHNSON, P. M. 2006. Levels of expression of complement regulatory proteins CD46, CD55 and CD59 on resting and activated human peripheral blood leucocytes. *Immunology*, 119, 522-8.
- DEREGT, D. 2008. BVDV: Diagnosis, Management, and Control. *BVDV: Diagnosis, Management, and Control*. Blackwell Publishing Ltd.
- DEREGT, D., DUBOVI, E. J., JOLLEY, M. E., NGUYEN, P., BURTON, K. M. & GILBERT, S. A. 2005. Mapping of two antigenic domains on the NS3 protein of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Vet Microbiol*, 108, 13-22.
- DEREGT, D., VAN RIJN, P. A., WIENS, T. Y. & VAN DEN HURK, J. 1998. Monoclonal antibodies to the E2 protein of a new genotype (type 2) of bovine viral diarrhoea virus define three antigenic domains involved in neutralization. *Virus Res*, 57, 171-81.
- DUBOVI, E. J. 2013. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals*, 41, 8-13.
- EL OMARI, K., IOURIN, O., HARLOS, K., GRIMES, J. M. & STUART, D. I. 2013. Structure of a pestivirus envelope glycoprotein E2 clarifies its role in cell entry. *Cell Rep*, 3, 30-5.
- ELBERS, K., TAUTZ, N., BECHER, P., STOLL, D., RUMENAPF, T. & THIEL, H. J. 1996. Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7. *J Virol*, 70, 4131-5.
- ELLIS, J. A. 2009. Update on viral pathogenesis in BRD. *Anim Health Res Rev*, 10, 149-53.
- ENDEMANN, H. & MODEL, P. 1995. Location of filamentous phage minor coat proteins in phage and in infected cells. *J Mol Biol*, 250, 496-506.

- ESCAMILLA, H. P., MARTINEZ, M. J., MEDINA, C. M. & MORALES, S. E. 2007. Frequency and causes of infectious abortion in a dairy herd in Queretaro, Mexico. *Can J Vet Res*, 71, 314-7.
- FERNANDEZ-GACIO, A., UGUEN, M. & FASTREZ, J. 2003. Phage display as a tool for the directed evolution of enzymes. *Trends Biotechnol*, 21, 408-14.
- FIELDS, B. N., KNIPE, D. M. & HOWLEY, P. M. 2007. *Fields' Virology*, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- FREDERICKSEN, F., CARRASCO, G., VILLALBA, M. & OLAVARRIA, V. H. 2015. Cytopathic BVDV-1 strain induces immune marker production in bovine cells through the NF-kappaB signaling pathway. *Mol Immunol*, 68, 213-22.
- FULTON, R. W., RIDPATH, J. F., CONFER, A. W., SALIKI, J. T., BURGE, L. J. & PAYTON, M. E. 2003. Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmes. *Biologicals*, 31, 89-95.
- FULTON, R. W., RIDPATH, J. F., ORE, S., CONFER, A. W., SALIKI, J. T., BURGE, L. J. & PAYTON, M. E. 2005. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subgenotypes in diagnostic laboratory accessions: distribution of BVDV1a, 1b, and 2a subgenotypes. *Vet Microbiol*, 111, 35-40.
- GAGEA, M. I., BATEMAN, K. G., SHANAHAN, R. A., VAN DREUMEL, T., MCEWEN, B. J., CARMAN, S., ARCHAMBAULT, M. & CASWELL, J. L. 2006. Naturally occurring *Mycoplasma bovis*-associated pneumonia and polyarthritis in feedlot beef calves. *J Vet Diagn Invest*, 18, 29-40.
- GAZARIAN, K., GAZARIAN, T., BETANCOURT, J. I. & ALONSO MORALES, R. A. 2011. Immunogenic peptides from phage display libraries with potential of protecting mice against the Pseudorabies virus. *Vet Microbiol*, 154, 29-36.
- GIANGASPERO, M., HARASAWA, R., WEBER, L. & BELLOLI, A. 2008. Genoepidemiological evaluation of Bovine viral diarrhea virus 2 species based on secondary structures in the 5' untranslated region. *J Vet Med Sci*, 70, 571-80.
- GIANGASPERO, M., HARASAWA, R., ZECCONI, A. & LUZZAGO, C. 2001. Genotypic characteristics of bovine viral diarrhea virus 2 strains isolated in northern Italy. *J Vet Med Sci*, 63, 1045-9.
- GIL, L. H., ANSARI, I. H., VASSILEV, V., LIANG, D., LAI, V. C., ZHONG, W., HONG, Z., DUBOVI, E. J. & DONIS, R. O. 2006. The amino-terminal domain of bovine viral diarrhea virus Npro protein is necessary for alpha/beta interferon antagonism. *J Virol*, 80, 900-11.
- GOENS, S. D. 2002. The evolution of bovine viral diarrhea: a review. *Can Vet J*, 43, 946-54.
- GOTTIPATI, K., RUGGLI, N., GERBER, M., TRATSCHIN, J. D., BENNING, M., BELLAMY, H. & CHOI, K. H. 2013. The structure of classical swine fever virus N(pro): a novel cysteine Autoprotease and zinc-binding protein involved in subversion of type I interferon induction. *PLoS Pathog*, 9, e1003704.
- GOYAL, S. M. & RIDPATH, J. F. 2008. *Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management, and Control*, Wiley.
- GRASSMANN, C. W., ISKEN, O., TAUTZ, N. & BEHRENS, S. E. 2001. Genetic analysis of the pestivirus nonstructural coding region: defects in the NS5A unit can be complemented in trans. *J Virol*, 75, 7791-802.
- GRISSETT, G. P., WHITE, B. J. & LARSON, R. L. 2015. Structured literature review of responses of cattle to viral and bacterial pathogens causing bovine respiratory disease complex. *J Vet Intern Med*, 29, 770-80.

- GRUMMER, B., GROTHA, S. & GREISER-WILKE, I. 2004. Bovine viral diarrhoea virus is internalized by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 51, 427-32.
- HAIXIU, W., ENCHENG, S., QINGYUAN, X., TAO, Y., QIN, Z., YUFEI, F., JUNPING, L., SHUANG, L., LIANG, S., JING, S. & DONGLAI, W. 2015. Analysis of murine B-cell epitopes on bluetongue virus 12 nonstructural protein 1. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99, 1309-21.
- HAMMERS, C. M. & STANLEY, J. R. 2014. Antibody phage display: technique and applications. *J Invest Dermatol*, 134, e17.
- HANSEN, T. R., SMIRNOVA, N. P., VAN CAMPEN, H., SHOEMAKER, M. L., PTITSYN, A. A. & BIELEFELDT-OHMANN, H. 2010. Maternal and fetal response to fetal persistent infection with bovine viral diarrhoea virus. *Am J Reprod Immunol*, 64, 295-306.
- HARADA, T., TAUTZ, N. & THIEL, H. J. 2000. E2-p7 region of the bovine viral diarrhoea virus polyprotein: processing and functional studies. *J Virol*, 74, 9498-506.
- HILTON, L., MOGANERADJ, K., ZHANG, G., CHEN, Y. H., RANDALL, R. E., MCCAULEY, J. W. & GOODBOURN, S. 2006. The NPro product of bovine viral diarrhoea virus inhibits DNA binding by interferon regulatory factor 3 and targets it for proteasomal degradation. *J Virol*, 80, 11723-32.
- HOU, L., WILKERSON, M., KAPIL, S., MOSIER, D., SHUMAN, W., REDDY, J. R., LOUGHIN, T. & MINOCHA, H. C. 1998. The effect of different bovine viral diarrhoea virus genotypes and biotypes on the metabolic activity and activation status of bovine peripheral blood mononuclear cells. *Viral Immunol*, 11, 233-44.
- HOUE, H. 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet Microbiol*, 64, 89-107.
- HOUIMEL, M. & DELLAGI, K. 2009. Peptide mimotopes of rabies virus glycoprotein with immunogenic activity. *Vaccine*, 27, 4648-55.
- HYMAN, P. 2012. Bacteriophages and nanostructured materials. *Adv Appl Microbiol*, 78, 55-73.
- IQBAL, M., FLICK-SMITH, H. & MCCAULEY, J. W. 2000. Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein Erns with cell surface glycosaminoglycans. *Journal of General Virology*, 81, 451-459.
- IQBAL, M. & MCCAULEY, J. W. 2002. Identification of the glycosaminoglycan-binding site on the glycoprotein E(rns) of bovine viral diarrhoea virus by site-directed mutagenesis. *J Gen Virol*, 83, 2153-9.
- JELSMA, H., LOEFFEN, W. L., VAN BEUNINGEN, A. & VAN RIJN, P. A. 2013. Preliminary mapping of non-conserved epitopes on envelope glycoprotein E2 of Bovine viral diarrhoea virus type 1 and 2. *Vet Microbiol*, 166, 195-9.
- JOHNSON, C. M., PEREZ, D. R., FRENCH, R., MERRICK, W. C. & DONIS, R. O. 2001. The NS5A protein of bovine viral diarrhoea virus interacts with the alpha subunit of translation elongation factor-1. *J Gen Virol*, 82, 2935-43.
- KARNIYCHUK, U., LAI, K., WILSON, D., WALKER, S. & GERDTS, V. 2016. Zika virus infection in neonatal pigs. In: *VIROLOGY*, A. S. F. (ed.). Squires Haymarket Theatre, Virginia Tech, Blacksburg, EE.UU.
- KAY, B. K., KASANOV, J. & YAMABHAI, M. 2001. Screening phage-displayed combinatorial peptide libraries. *Methods*, 24, 240-6.
- KAY, B. K., WINTER, J. & MCCAFFERTY, J. 1996. *Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual*, Academic Press.

- KING, A. M. Q., LEFKOWITZ, E., ADAMS, M. J. & CARSTENS, E. B. 2011. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier Science.
- KREY, T., HIMMELREICH, A., HEIMANN, M., MENGE, C., THIEL, H. J., MAURER, K. & RUMENAPF, T. 2006. Function of bovine CD46 as a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus is determined by complement control protein 1. *J Virol*, 80, 3912-22.
- KUGLER, J., ZANTOW, J., MEYER, T. & HUST, M. 2013. Oligopeptide m13 phage display in pathogen research. *Viruses*, 5, 2531-45.
- KUIJK, H., FRANKEN, P., MARS, M. H., BIJ DE WEG, W. & MAKOSCHEY, B. 2008. Monitoring of BVDV in a vaccinated herd by testing milk for antibodies to NS3 protein. *Vet Rec*, 163, 482-4.
- KUMMERER, B. M., TAUTZ, N., BECHER, P., THIEL, H. & MEYERS, G. 2000. The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses. *Vet Microbiol*, 77, 117-28.
- LACKNER, T., MULLER, A., KONIG, M., THIEL, H. J. & TAUTZ, N. 2005. Persistence of bovine viral diarrhoea virus is determined by a cellular cofactor of a viral autoprotease. *J Virol*, 79, 9746-55.
- LAI, V. C., KAO, C. C., FERRARI, E., PARK, J., USS, A. S., WRIGHT-MINOGUE, J., HONG, Z. & LAU, J. Y. 1999. Mutational analysis of bovine viral diarrhoea virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol*, 73, 10129-36.
- LANYON, S. R., HILL, F. I., REICHEL, M. P. & BROWNLIE, J. 2014. Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis. *Vet J*, 199, 201-9.
- LARSON, R. L., GROTELUESCHEN, D. M. & BROCK, K. V. 2004. Bovine Viral Diarrhoea (BVD): Review for Beef Cattle Veterinarians. *Bov Pract* 38, 93-102.
- LATTWEIN, E., KLEMENS, O., SCHWINDT, S., BECHER, P. & TAUTZ, N. 2012. Pestivirus virion morphogenesis in the absence of uncleaved nonstructural protein 2-3. *J Virol*, 86, 427-37.
- LI, L., WU, R., ZHENG, F., ZHAO, C. & PAN, Z. 2015. The N-terminus of classical swine fever virus (CSFV) nonstructural protein 2 modulates viral genome RNA replication. *Virus Research*, 210, 90-99.
- LI, X. F., DONG, H. L., HUANG, X. Y., QIU, Y. F., WANG, H. J., DENG, Y. Q., ZHANG, N. N., YE, Q., ZHAO, H., LIU, Z. Y., FAN, H., AN, X. P., SUN, S. H., GAO, B., FA, Y. Z., TONG, Y. G., ZHANG, F. C., GAO, G. F., CAO, W. C., SHI, P. Y. & QIN, C. F. 2016. Characterization of a 2016 Clinical Isolate of Zika Virus in Non-human Primates. *EBioMedicine*.
- LIN, C., WU, J. W., HSIAO, K. & SU, M. S. 1997. The hepatitis C virus NS4A protein: interactions with the NS4B and NS5A proteins. *J Virol*, 71, 6465-71.
- LUBKOWSKI, J., HENNECKE, F., PLUCKTHUN, A. & WLODAWER, A. 1999. Filamentous phage infection: crystal structure of g3p in complex with its coreceptor, the C-terminal domain of TolA. *Structure*, 7, 711-22.
- LUSSI, C. & SCHWEIZER, M. 2016. What can pestiviral endonucleases teach us about innate immunotolerance? *Cytokine Growth Factor Rev*.
- MACOVEI, A., ZITZMANN, N., LAZAR, C., DWEK, R. A. & BRANZA-NICHITA, N. 2006. Brefeldin A inhibits pestivirus release from infected cells, without affecting its assembly and infectivity. *Biochem Biophys Res Commun*, 346, 1083-90.
- MACHADO, G., EGOICHEAGA, R. M., HEIN, H. E., MIRANDA, I. C., NETO, W. S., ALMEIDA, L. L., CANAL, C. W., STEIN, M. C. & CORBELLINI, L. G. 2016. Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) in Dairy Cattle: A Matched Case-Control Study. *Transbound Emerg Dis*, 63, e1-13.

- MAHMOODI, P., SEYFI ABAD SHAPOURI, M. R., GHORBANPOUR, M., HAJI HAJIKOLAEI, M. R., LOTFI, M., POURMAHDI BOROUJENI, M. & DAGHARI, M. 2015. Simple Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Detect Antibodies Against Bovine Viral Diarrhea Virus, Based on Prokaryotically Expressed Recombinant MBP-NS3 Protein. *Jundishapur J Microbiol*, 8, e14311.
- MAKOWSKI, L. 1994. Phage display: structure, assembly and engineering of filamentous bacteriophage M13. *Current Opinion in Structural Biology*, 4, 225-230.
- MANOUTCHARIAN, K., DIAZ-OREA, A., GEVORKIAN, G., FRAGOSO, G., ACERO, G., GONZALEZ, E., DE ALUJA, A., VILLALOBOS, N., GOMEZ-CONDE, E. & SCIUTTO, E. 2004. Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Vet Immunol Immunopathol*, 99, 11-24.
- MARTÍNEZ, N. 2015. *Caracterización genética de aislamientos de la Diarrea Viral Bovina circulantes en México*. Maestro en Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- MAURER, K., KREY, T., MOENNIG, V., THIEL, H. J. & RUMENAPF, T. 2004. CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus. *J Virol*, 78, 1792-9.
- MELOEN, R. H., PUIJK, W. C. & SLOOTSTRA, J. W. 2000. Mimotopes: realization of an unlikely concept. *J Mol Recognit*, 13, 352-9.
- MEYERS, G. & THIEL, H. J. 1996. Molecular characterization of pestiviruses. *Adv Virus Res*, 47, 53-118.
- MISHRA, N., PITALE, S. & PRADHAN, H. 2008. Genetic Analysis and Expression of NS3 Gene of Bovine Viral Diarrhoea Virus 1 from India for Detection of Antibodies in Cattle. *Journal of Applied Animal Research*, 33, 99-103.
- MOES, L. & WIRTH, M. 2007. The internal initiation of translation in bovine viral diarrhoea virus RNA depends on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon. *Virology*, 365, 376-89.
- MOLEK, P., STRUKELJ, B. & BRATKOVIC, T. 2011. Peptide phage display as a tool for drug discovery: targeting membrane receptors. *Molecules*, 16, 857-87.
- MOULIN, H. R., SEUBERLICH, T., BAUHOFER, O., BENNETT, L. C., TRATSCHIN, J. D., HOFMANN, M. A. & RUGGLI, N. 2007. Nonstructural proteins NS2-3 and NS4A of classical swine fever virus: essential features for infectious particle formation. *Virology*, 365, 376-89.
- MULLER, A., RINCK, G., THIEL, H. J. & TAUTZ, N. 2003. Cell-derived sequences in the N-terminal region of the polyprotein of a cytopathogenic pestivirus. *J Virol*, 77, 10663-9.
- NAKAMURA, S., SAKAMOTO, K., SAKODA, Y., SHIMAZAKI, T., INOUE, Y., OGAWA, N. & FUKUSHO, A. 1997. Variation from cytopathogenic biotype to non-cytopathogenic biotype is correlated with the deletion of cellular sequence from bovine viral diarrhoea viruses. *J Vet Med Sci*, 59, 361-70.
- NAKAZAWA, M., MUKUMOTO, M. & MIYATAKE, K. 2016. Production and Purification of Polyclonal Antibodies. *Methods Mol Biol*, 1474, 49-59.
- NEILL, J. D. 2013. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals*, 41, 2-7.
- NEMUDRAYA, A. A., RICHTER, V. A. & KULIGINA, E. V. 2016. Phage Peptide Libraries As a Source of Targeted Ligands. *Acta Naturae*, 8, 48-57.
- NEWCOMER, B. W., NEILL, J. D., MARLEY, M. S., RIDPATH, J. F. & GIVENS, M. D. 2013. Mutations induced in the NS5B gene of bovine viral diarrhoea virus by antiviral treatment convey resistance to the compound. *Virus Res*, 174, 95-100.

- NYAMBE, S., BURGESS, C., WHYTE, P. & BOLTON, D. 2016. Survival studies of a temperate and lytic bacteriophage in bovine faeces and slurry. *J Appl Microbiol*, 121, 1144-51.
- OROZCO, R. 2015. *Identificación de epitopos/mimotopos específicos para el Virus de la Diarrea Viral Bovina mediante el método de Phage Display*. Maestra en Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México
- PANDE, J., SZEWCZYK, M. M. & GROVER, A. K. 2010. Phage display: concept, innovations, applications and future. *Biotechnol Adv*, 28, 849-58.
- PANKRAZ, A., THIEL, H. J. & BECHER, P. 2005. Essential and nonessential elements in the 3' nontranslated region of Bovine viral diarrhoea virus. *J Virol*, 79, 9119-27.
- PATON, D. J., SHARP, G. & IBATA, G. 1999. Foetal cross-protection experiments between type 1 and type 2 bovine viral diarrhoea virus in pregnant ewes. *Vet Microbiol*, 64, 185-96.
- PELLERIN, C., VAN DEN HURK, J., LECOMTE, J. & TIJSSEN, P. 1994. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*, 203, 260-8.
- PESTOVA, T. V. & HELLEN, C. U. T. 1999. Internal Initiation of Translation of Bovine Viral Diarrhoea Virus RNA. *Virology*, 258, 249-256.
- PETERHANS, E. & SCHWEIZER, M. 2013. BVDV: a pestivirus inducing tolerance of the innate immune response. *Biologicals*, 41, 39-51.
- PFAENDER, S., BROWN, R. J., PIETSCHMANN, T. & STEINMANN, E. 2014. Natural reservoirs for homologs of hepatitis C virus. *Emerg Microbes Infect*, 3, e21.
- PIZARRO-LUCERO, J., CELEDON, M. O., AGUILERA, M. & DE CALISTO, A. 2006. Molecular characterization of pestiviruses isolated from bovines in Chile. *Vet Microbiol*, 115, 208-17.
- PLM 2015. *PLM, Prontuario de Especialidades Veterinarias PEV. Diccionario De Productos Farmacéuticos*.
- QU, L., MCMULLAN, L. K. & RICE, C. M. 2001. Isolation and characterization of noncytopathic pestivirus mutants reveals a role for nonstructural protein NS4B in viral cytopathogenicity. *J Virol*, 75, 10651-62.
- RAI, A. N., EPPERSON, W. B. & NANDURI, B. 2015. Application of Functional Genomics for Bovine Respiratory Disease Diagnostics. *Bioinform Biol Insights*, 9, 13-23.
- RAKONJAC, J., BENNETT, N. J., SPAGNUOLO, J., GAGIC, D. & RUSSEL, M. 2011. Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications. *Curr Issues Mol Biol*, 13, 51-76.
- RAKONJAC, J. & MODEL, P. 1998. Roles of pIII in filamentous phage assembly. *J Mol Biol*, 282, 25-41.
- RHODES, S. G., COCKSEGE, J. M., COLLINS, R. A. & MORRISON, W. I. 1999. Differential cytokine responses of CD4+ and CD8+ T cells in response to bovine viral diarrhoea virus in cattle. *J Gen Virol*, 80 (Pt 7), 1673-9.
- RIDPATH, J. 2010a. The contribution of infections with bovine viral diarrhoea viruses to bovine respiratory disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 26, 335-48.
- RIDPATH, J. F. 2005. Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: impact of biotype and genotype on U.S. control programs. *Prev Vet Med*, 72, 17-30; discussion 215-9.
- RIDPATH, J. F. 2010b. Bovine viral diarrhoea virus: global status. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 26, 105-21, table of contents.
- RIDPATH, J. F. 2015. Emerging pestiviruses infecting domestic and wildlife hosts. *Anim Health Res Rev*, 16, 55-9.

- RIDPATH, J. F. & BOLIN, S. R. 1995. The genomic sequence of a virulent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) from the type 2 genotype: detection of a large genomic insertion in a noncytopathic BVDV. *Virology*, 212, 39-46.
- RIDPATH, J. F., BOLIN, S. R. & DUBOVI, E. J. 1994. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology*, 205, 66-74.
- RIDPATH JF, H. B., NEILL JD. 2006. Parameters of Ear Notch Samples for BVDV Testing: Stability, Size Requirements and Viral Load.
- RIDPATH, J. F., NEILL, J. D., FREY, M. & LANDGRAF, J. G. 2000. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. *Vet Microbiol*, 77, 145-55.
- RIDPATH, J. F., NEILL, J. D. & PETERHANS, E. 2007. Impact of variation in acute virulence of BVDV1 strains on design of better vaccine efficacy challenge models. *Vaccine*, 25, 8058-66.
- RIECHMANN, L. & HOLLIGER, P. 1997. The C-terminal domain of TolA is the coreceptor for filamentous phage infection of E. coli. *Cell*, 90, 351-60.
- ROLAND, L., DRILLICH, M., KLEIN-JOBSTL, D. & IWERSEN, M. 2016. Invited review: Influence of climatic conditions on the development, performance, and health of calves. *J Dairy Sci*, 99, 2438-52.
- RUGGLI, N., SUMMERFIELD, A., FIEBACH, A. R., GUZYLACK-PIRIOU, L., BAUHOFER, O., LAMM, C. G., WALTERSPERGER, S., MATSUNO, K., LIU, L., GERBER, M., CHOI, K. H., HOFMANN, M. A., SAKODA, Y. & TRATSCHIN, J. D. 2009. Classical swine fever virus can remain virulent after specific elimination of the interferon regulatory factor 3-degrading function of Npro. *J Virol*, 83, 817-29.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SAMY, A. M., THOMAS, S. M., WAHED, A. A., COHOON, K. P. & PETERSON, A. T. 2016. Mapping the global geographic potential of Zika virus spread. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 111, 559-60.
- SAYERS, R. G., BYRNE, N., O'DOHERTY, E. & ARKINS, S. 2015. Prevalence of exposure to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and bovine herpesvirus-1 (BoHV-1) in Irish dairy herds. *Res Vet Sci*, 100, 21-30.
- SCHAUT, R. G., MCGILL, J. L., NEILL, J. D., RIDPATH, J. F. & SACCO, R. E. 2015. Bovine viral diarrhoea virus type 2 in vivo infection modulates TLR4 responsiveness in differentiated myeloid cells which is associated with decreased MyD88 expression. *Virus Res*, 208, 44-55.
- SCHAUT, R. G., RIDPATH, J. F. & SACCO, R. E. 2016. Bovine Viral Diarrhoea Virus Type 2 Impairs Macrophage Responsiveness to Toll-Like Receptor Ligation with the Exception of Toll-Like Receptor 7. *PLoS One*, 11, e0159491.
- SCHWEIZER, M. & PETERHANS, E. 2001. Noncytopathic bovine viral diarrhoea virus inhibits double-stranded RNA-induced apoptosis and interferon synthesis. *J Virol*, 75, 4692-8.
- SEAGO, J., HILTON, L., REID, E., DOCEUL, V., JEYATHEESAN, J., MOGANERADJ, K., MCCAULEY, J., CHARLESTON, B. & GOODBOURN, S. 2007. The Npro product of classical swine fever virus and bovine viral diarrhoea virus uses a conserved mechanism to target interferon regulatory factor-3. *J Gen Virol*, 88, 3002-6.
- SIDHU, S. S. 2001. Engineering M13 for phage display. *Biomol Eng*, 18, 57-63.
- SMIRNOVA, N. P., WEBB, B. T., BIELEFELDT-OHMANN, H., VAN CAMPEN, H., ANTONIAZZI, A. Q., MORARIE, S. E. & HANSEN, T. R. 2012. Development of fetal

- and placental innate immune responses during establishment of persistent infection with bovine viral diarrhoea virus. *Virus Res*, 167, 329-36.
- SMIRNOVA, N. P., WEBB, B. T., MCGILL, J. L., SCHAUT, R. G., BIELEFELDT-OHMANN, H., VAN CAMPEN, H., SACCO, R. E. & HANSEN, T. R. 2014. Induction of interferon-gamma and downstream pathways during establishment of fetal persistent infection with bovine viral diarrhoea virus. *Virus Res*, 183, 95-106.
- SMITH, G. P. & PETRENKO, V. A. 1997. Phage Display. *Chem Rev*, 97, 391-410.
- SOLIS-CALDERON, J. J., SEGURA-CORREA, V. M. & SEGURA-CORREA, J. C. 2005. Bovine viral diarrhoea virus in beef cattle herds of Yucatan, Mexico: seroprevalence and risk factors. *Prev Vet Med*, 72, 253-62.
- SORDILLO, L. M. 2016. Nutritional strategies to optimize dairy cattle immunity. *J Dairy Sci*, 99, 4967-82.
- TAFI, R., BANDI, R., PREZZI, C., MONDELLI, M. U., CORTESE, R., MONACI, P. & NICOSIA, A. 1997. Identification of HCV core mimotopes: improved methods for the selection and use of disease-related phage-displayed peptides. *Biol Chem*, 378, 495-502.
- TAUTZ, N., ELBERS, K., STOLL, D., MEYERS, G. & THIEL, H. J. 1997. Serine protease of pestiviruses: determination of cleavage sites. *J Virol*, 71, 5415-22.
- TELLINGHUISEN, T. L., PAULSON, M. S. & RICE, C. M. 2006. The NS5A protein of bovine viral diarrhoea virus contains an essential zinc-binding site similar to that of the hepatitis C virus NS5A protein. *J Virol*, 80, 7450-8.
- TEWS, B. A. & MEYERS, G. 2007. The pestivirus glycoprotein Erns is anchored in plane in the membrane via an amphipathic helix. *J Biol Chem*, 282, 32730-41.
- THEZE, J., LOWES, S., PARKER, J. & PYBUS, O. G. 2015. Evolutionary and Phylogenetic Analysis of the Hepaciviruses and Pegiviruses. *Genome Biol Evol*, 7, 2996-3008.
- THOMPSON, J. A., DE MIRANDA HENRIQUES LEITE, R., GONCALVES, V. S., LEITE, R. C., BANDEIRA, D. A., HERRMANN, G. P., MOREIRA, E. C., PRADO, P. E., LOBATO, Z. I., DE BRITO, C. P. & LAGE, A. P. 2006. Spatial hierarchical variances and age covariances for seroprevalence to *Leptospira interrogans* serovar hardjo, BoHV-1 and BVDV for cattle in the State of Paraiba, Brazil. *Prev Vet Med*, 76, 290-301.
- TOPLIFF, C. L. & KELLING, C. L. 1998. Virulence markers in the 5' untranslated region of genotype 2 bovine viral diarrhoea virus isolates. *Virology*, 250, 164-72.
- TORTORICI, M. A., DUQUERROY, S., KWOK, J., VONRHEIN, C., PEREZ, J., LAMP, B., BRICOGNE, G., RUMENAPF, T., VACHETTE, P. & REY, F. A. 2015. X-ray structure of the pestivirus NS3 helicase and its conformation in solution. *J Virol*, 89, 4356-71.
- VAN RIJN, P. A., VAN GENNIP, H. G., LEENDERTSE, C. H., BRUSCHKE, C. J., PATON, D. J., MOORMANN, R. J. & VAN OIRSCHOT, J. T. 1997. Subdivision of the pestivirus genus based on envelope glycoprotein E2. *Virology*, 237, 337-48.
- VILCEK, S., DURKOVIC, B., KOLESAROVA, M. & PATON, D. J. 2005. Genetic diversity of BVDV: consequences for classification and molecular epidemiology. *Prev Vet Med*, 72, 31-5; discussion 215-9.
- VILCEK, S., KOLESAROVA, M. & JACKOVA, A. 2007. Genetic variability of bovine viral diarrhoea virus subtypes at 3'-nontranslated region. *Virus Genes*, 34, 31-5.
- VILLA-MANCERA, A., QUIROZ-ROMERO, H., CORREA, D., IBARRA, F., REYES-PEREZ, M., REYES-VIVAS, H., LOPEZ-VELAZQUEZ, G., GAZARIAN, K., GAZARIAN, T. & ALONSO, R. A. 2008. Induction of immunity in sheep to *Fasciola hepatica* with mimotopes of cathepsin L selected from a phage display library. *Parasitology*, 135, 1437-45.

- WALZ, P. H., GROOMS, D. L., PASSLER, T., RIDPATH, J. F., TREMBLAY, R., STEP, D. L., CALLAN, R. J. & GIVENS, M. D. 2010. Control of bovine viral diarrhoea virus in ruminants. *J Vet Intern Med*, 24, 476-86.
- WANG, F. I., DENG, M. C., HUANG, Y. L. & CHANG, C. Y. 2015. Structures and Functions of Pestivirus Glycoproteins: Not Simply Surface Matters. *Viruses*, 7, 3506-29.
- WEBER, M. N., SILVEIRA, S., MACHADO, G., GROFF, F. H., MOSENA, A. C., BUDASZEWSKI, R. F., DUPONT, P. M., CORBELLINI, L. G. & CANAL, C. W. 2014. High frequency of bovine viral diarrhoea virus type 2 in Southern Brazil. *Virus Res*, 191, 117-24.
- WEINER, C. M., SMIRNOVA, N. P., WEBB, B. T., VAN CAMPEN, H. & HANSEN, T. R. 2012. Interferon stimulated genes, CXCR4 and immune cell responses in peripheral blood mononuclear cells infected with bovine viral diarrhoea virus. *Res Vet Sci*, 93, 1081-8.
- WEISKIRCHER, E., ALIGO, J., NING, G. & KONAN, K. V. 2009. Bovine viral diarrhoea virus NS4B protein is an integral membrane protein associated with Golgi markers and rearranged host membranes. *Virology*, 6, 185.
- WINTER, G., GRIFFITHS, A. D., HAWKINS, R. E. & HOOGENBOOM, H. R. 1994. Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol*, 12, 433-55.
- WU, C. H., LIU, I. J., LU, R. M. & WU, H. C. 2016. Advancement and applications of peptide phage display technology in biomedical science. *J Biomed Sci*, 23, 8.
- YESILBAG, K., FORSTER, C., OZYIGIT, M. O., ALPAY, G., TUNCER, P., THIEL, H. J. & KONIG, M. 2014. Characterisation of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from an outbreak with haemorrhagic enteritis and severe pneumonia. *Vet Microbiol*, 169, 42-9.
- YU, H., GRASSMANN, C. W. & BEHRENS, S. E. 1999. Sequence and structural elements at the 3' terminus of bovine viral diarrhoea virus genomic RNA: functional role during RNA replication. *J Virol*, 73, 3638-48.
- YU, R. K., USUKI, S., ITOKAZU, Y. & WU, H. C. 2016. Novel GM1 ganglioside-like peptide mimics prevent the association of cholera toxin to human intestinal epithelial cells in vitro. *Glycobiology*, 26, 63-73.
- ZAMIT, A. L., MATIAS OSTROWSKI, NORBERTO FONDEVILA, ANDRES WIGDOROVITZ, ROMERA, A. & ANA C. BRATANICH 2010. Use of Phage Displayed Peptides Libraries for Epitope Mapping of Bovine Viral Diarrhoea Virus E2 Protein. *Research Journal of Immunology*, 3, 31-36.
- ZOGG, T., SPONRING, M., SCHINDLER, S., KOLL, M., SCHNEIDER, R., BRANDSTETTER, H. & AUER, B. 2013. Crystal structures of the viral protease Npro imply distinct roles for the catalytic water in catalysis. *Structure*, 21, 929-38.
- ZURCHER, C., SAUTER, K. S., MATHYS, V., WYSS, F. & SCHWEIZER, M. 2014a. Prolonged activity of the pestiviral RNase Erns as an interferon antagonist after uptake by clathrin-mediated endocytosis. *J Virol*, 88, 7235-43.
- ZURCHER, C., SAUTER, K. S. & SCHWEIZER, M. 2014b. Pestiviral E(rns) blocks TLR-3-dependent IFN synthesis by LL37 complexed RNA. *Vet Microbiol*, 174, 399-408.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la morfología y componentes estructurales del VDVB	9
Figura 2. Representación esquemática de la organización de las Proteínas Estructurales y las No Estructurales que conforman al genoma del VDVB	10
Figura 3. Esquema de los efectos de la infección del VDVB durante la gestación.	27
Figura 4. Esquematación del bacteriófago M13 que muestra la disposición de las proteínas de cápside y su ADN.....	34
Figura 5. Esquematación del proceso de infección del fago	35
Figura 6. Representación del procedimiento de bioselección con una biblioteca de fagos M13	38
Figura 7. Formato de ELISA indirecta para verificar la reactividad y titulación de los sueros hiperinmunes anti-VDVB-2 hechos en conejo.....	48
Figura 8. Formatos de ELISA indirecta para los ensayos de unión (Phage ELISA) utilizando el suero hiperinmune anti-VDVB-2 y anti-VDVB-1 NADL	53
Figura 9. Formato de ELISA con clonas anti- VDVB-2 y sueros de bovinos para la identificación de sueros positivos a VDVB-2.....	59
Figura 10. (A) Células MDBK no infectadas. (B) Células MDBK infectadas con VDVB-2 Mex las 72 h p.i.....	60
Figura 11. Fracciones obtenidas de la purificación en gradientes de sacarosa a partir del virus concentrado con PEG	61
Figura 12. Efecto CP en células MDBK p.i. del purificado del VDVB-2 Mex. (A) Células MDBK normales con monocapa confluyente al 90%. B: Células MDBK a las 72 h p.i. infectadas con la banda “2” del purificado VDVB-2 Mex.	61
Figura 13. Ensayo de ELISA de los sueros hiperinmunes anti-VDVB-2 Mex.....	63
Figura 14. Disposición de los fagos purificados de la 2ª y 3ª ronda de bioselección a partir del suero hiperinmune del VDVB-2 con una biblioteca comerciales de 7 aminoácidos lineales en placa de 96 pozos.....	64

- Figura 15.** Ensayo ELISA con las 72 clonas purificadas reactivas al suero hiperinmune anti VDVB-2 Mex (azul) y al suero hiperinmune anti-VDVB-1 NADL (naranja). Promedios de absorbancia 405 nm de las clonas C1A-C4G (A), clonas C5A-C9A (B) y clonas C5A-C9A (C). El punto de corte con suero con el control negativo de M13, se muestra con una línea roja (0.0658) y la desviación estándar con una línea roja discontinua (± 0.0167) 66
- Figura 16.** Ensayo ELISA con las 16 clonas purificadas no reactivas (negativas) al suero hiperinmune anti VDVB-2 Mex (azul) y al suero hiperinmune anti-VDVB-1 NADL (naranja). El punto de corte con suero con el control negativo de M13, se muestra con una línea roja (0.0658) y la desviación estándar con una línea discontinua (± 0.0167)..... 67
- Figura 17.** Ensayo ELISA con las 6 clonas purificadas reactivas al suero hiperinmune anti VDVB-2 (azul) comparado con el suero hiperinmune anti-VDVB-1 NADL (naranja). Promedio de absorbancia 405 nm de las clonas. El punto de corte con el control negativo del fago M13 silvestre, se muestra con una línea roja (0.0658) y la desviación estándar con una línea discontinua (± 0.0167)..... 67
- Figura 18.** Localización de mimotopos en las regiones inmunogénicas de la glicoproteína E2 del VDVB. (A) Mimotopo “GTVPNTS” (naranja). (B) mimotopo “LVSLSR” (naranja). (C) Mimotopo “KTLSLTR” (naranja)..... 72
- Figura 19.** Identificación del mimotopo “LVSLSR” en la estructura cristalizada de N^{pro} del VDVB-3 (naranja)..... 73
- Figura 20.** Identificación del mimotopo “WRAPQPM” en la estructura cristalizada de NS3 del VFPC (naranja). (A) Vista frontal; (B) Vista lateral. 74
- Figura 21.** Distribución de los resultados de acuerdo al cociente M/P obtenido por Estado. Valor de M/P menor a 0.20 es Negativo, Valor de M/P mayor a 0.20 pero menor a 0.30 es Dudoso y valor de M/P mayores o iguales a 0.30 son Positivos. Verde: Estado de México; Naranja: Tabasco; Gris: Chiapas; Amarillo: Ciudad de México (D.F); Azul: Oaxaca 76
- Figura 22.** Ensayo de ELISA que muestra la reactividad de las clonas con los sueros hiperinmunes anti VDVB-1 NADL y anti VDVB-2 Mex. Promedio de absorbancia de las clonas 2A, 6H, 8C reactivas al suero hiperinmune del VDVB-2, comparadas con la clona 4C3 positiva al suero hiperinmune del VDVB-1 NADL, y clona 4A negativa. Punto de corte del control negativo M13 silvestre señalado con una línea roja (0.104) y la desviación estándar (± 0.089) en una línea roja discontinua..... 79

- Figura 23.** Ensayo de ELISA que muestra la reactividad de los sueros de bovino con la clona 2A. Promedio de absorbancia con clona 2A reactiva al suero hiperinmune anti VDVB-2 con sueros de bovino positivos (azul), sospechoso (naranja) y negativo (rojo) al VDVB pre-absorbidos con fago M13 silvestre. Punto de corte del suero positivo con M13 silvestre (línea azul: 0.186) y punto de corte del suero negativo con M13 silvestre (línea roja: 0.162)..... 81
- Figura 24.** Ensayo de ELISA que muestra la reactividad de los sueros de bovino con la clona 6H. Promedio de absorbancia con clona 6H reactiva al suero hiperinmune anti VDVB-2 con sueros de bovino positivos (azul), sospechoso (naranja) y negativo (rojo) al VDVB pre-absorbidos con fago M13 silvestre. Punto de corte del suero positivo con M13 silvestre (línea azul: 0.186) y punto de corte del suero negativo con M13 silvestre (línea roja 0.162)..... 82
- Figura 25.** Ensayo de ELISA que muestra la reactividad de los sueros de bovino con la clona 8C. Promedio de absorbancia con clona 8C reactiva al suero hiperinmune anti VDVB-2 con sueros de bovino positivos (azul), sospechoso (naranja) y negativo (rojo) al VDVB pre-absorbidos con fago M13 silvestre. Punto de corte del suero positivo con M13 silvestre (línea azul: 0.186) y punto de corte del suero negativo con M13 silvestre (línea roja: 0.162)..... 83
- Figura 26.** Ensayo de ELISA que muestra la reactividad de los sueros de bovino con la clona 4C3. Promedio de absorbancia con clona 4C3 reactiva al suero hiperinmune anti VDVB-1 NADL con sueros de bovino positivos (azul), sospechoso (naranja) y negativo (rojo) al VDVB pre-absorbidos con fago M13 silvestre. Punto de corte del suero positivo con M13 silvestre (línea azul: 0.186) y punto de corte del suero negativo con M13 silvestre (línea roja: 0.162)..... 84
- Figura 27.** Ensayo de ELISA que muestra la reactividad de los sueros de bovino con la clona 4A. Promedio de absorbancia con clona 4A reactiva al suero hiperinmune anti VDVB-1 NADL con sueros de bovino positivos (azul), sospechoso (naranja) y negativo (rojo) al VDVB pre-absorbidos con fago M13 silvestre. Punto de corte del suero positivo con M13 silvestre (línea azul: 0.186) y punto de corte del suero negativo con M13 silvestre (línea roja: 0.162)..... 85

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Parámetros de interpretación de resultados de la prueba comercial de ELISA especificados por el proveedor (IDEXX Laboratories Inc, Suiza)	56
Cuadro 2. Parámetros de inclusión en la selección de sueros para la prueba de ELISA con clonas anti VDVB-2 Mex. CRIB: Complejo Respiratorio Infeccioso Bovino; G1: Genotipo 1 DVB; G2: Genotipo 2 DVB.....	57
Cuadro 3. Título de fagos de salida de las tres rondas de selección con el suero hiperinmune anti VDVB-2 Mex.....	64
Cuadro 4. Cuantificación del ADN de cadena sencilla ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de 6 clonas reactivas al suero hiperinmune del VDVB-2, 1 clona reactiva a ambos sueros y 1 clona negativa	68
Cuadro 5. Caracterización de la secuencia de AA de las 6 clonas positivas al suero hiperinmune VDVB-2. (A) Secuencia de aminoácidos desplegados en proteína pIII de las clonas del fago 2A, 3B, 5E, así como la proteína y el porcentaje de identidad con el VDVB. (B)Secuencia de aminoácidos desplegados en proteína pIII de las clonas del fago 6H, así como la proteína y el porcentaje de identidad con el VDVB. (C) Secuencia de aminoácidos desplegados en proteína pIII de las clonas del fago 8C y 8E así como la proteína y el porcentaje de identidad con el VDVB	69
Cuadro 6. Caracterización de la secuencia de AA desplegados en proteína pIII de la clona del fago 7C positiva al suero hiperinmune VDVB-1 NADL y VDVB-2, así como la proteína y el porcentaje de identidad con el VDVB	70
Cuadro 7. Caracterización de la secuencia de AA desplegados en proteína pIII de la clona del fago 4A negativa al suero hiperinmune VDVB-1 NADL y VDVB-2	70
Cuadro 8. Resultado de la prueba de ELISA (IDEXX BVDV Total Ab), En el cuadro se muestra el número de animales positivos y negativos a anticuerpos del VDVB, así como la prevalencia expresada en porcentaje en cada uno de los cinco estados muestreados	75
Cuadro 9. Seropositividad de anticuerpos al VDVB por fin zootécnico	77
Cuadro 10. Seropositividad de anticuerpos al VDVB en bovinos con distintos rangos de edad.....	77

ANEXO 1.

SECUENCIAS DE LAS CLONAS OBTENIDAS A PARTIR DE LA BIBLIOTECA Ph.D.™ 7 (BIOLABS® INC., NEW ENGLAND).

CLONAS 2A, 3B, 5E

TCT CAC TCT	GGG ACT GTT CCT AAT ACG TCT	GGT GGA
Ser His Ser	Gly Thr Val Pro Asn Thr Ser	Gly Gly
S H S	G T V P N T S	G G

CLONA 6H

TCT CAC TCT	CTT GTT TCT CTG AGC CGC AGG	GGG
Ser His Ser	Leu Val Ser Leu Ser Arg Arg	Gly
S H S	L V S L S R R	G

CLONAS 8C, 8E

TCT CAC TCT	TGG CGT GCT CCG CAG CCG ATG	GGT GGA
Ser His Ser	Trp Arg Ala Pro Gln Pro Met	Gly Gly
S H S	W R A P Q P M	G G

Secuencias de nucleótidos y su traducción a aminoácidos de las clonas positivas al suero anti VDVB-2 (amarillo): 2A, 3B, 5E, 6H, 8C y 8E. En los extremos de la secuencia de los 7 aminoácidos de interés, se señalan los sitios de restricción de pIII (rojo) especificados por el proveedor (BioLabs® Inc., New England).

CLONA 7C

TCT	CAC	TCT	AAG	ACT	CTT	TCG	CTG	ACG	AGG	GGT
Ser	His	Ser	Lys	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Arg	Gly
S	H	S	K	T	L	S	L	T	R	G

Secuencias de nucleótidos y su traducción a aminoácidos de la clona positiva a ambas versiones de los sueros hiperinmunes (amarillo), 7C. En los extremos de la secuencia de los 7 aminoácidos de interés, se señalan los sitios de restricción de pIII (rojo), especificados por el proveedor (BioLabs® Inc., New England).

CLONA 4H

TCT	CAC	TCT	CAT	AGT	AAT	TAT	TAT	GCT	TCT	GGT	GGA
Ser	His	Ser	His	Ser	Asn	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Gly	Gly
S	H	S	H	S	N	Y	Y	A	S	G	G

Secuencias de nucleótidos y su traducción a aminoácidos de la clona negativa a ambas versiones de los sueros hiperinmunes (amarillo), 4H. En los extremos de la secuencia de los 7 aminoácidos de interés, se señalan los sitios de restricción de pIII (rojo), especificados por el proveedor (BioLabs® Inc., New England).

ANEXO 2.

REACTIVOS

- Células Madin Darby Bovine Kidney (MDBK catálogo **CLL-22 de American Type Culture Collection**).
- Anticuerpo monoclonal contra la fracción Fc de la inmunoglobulina G (IgG) de conejo hecho en cabra conjugado con peroxidasa de rábano (**Sigma-Aldrich** No. producto A9169-2ML)
- Anticuerpo monoclonal contra la fracción Fc de la IgG de conejo hecho en cabra sin conjuguar (Pierce® Antibody No. producto 31216, **Thermo Scientific**).
- Anticuerpo policlonal contra las proteínas de envoltura del fago M13 hecho en ratón conjugado con peroxidasa de rábano (**GE Healthcare** 27-9421-01)
- Anticuerpo policlonal de captura contra las proteínas de envoltura del fago M13 hecho en conejo sin conjuguar (**Novus Biologicals** NB 100-1633)
- Anticuerpo monoclonal contra la fracción Fc de la IgG de bovino hecho en conejo conjugado con peroxidasa de rábano (**Novus Biologicals** NBPI – 73581)
- Biblioteca de fagos Ph.D. 7 (NEB #E8100S **BioLabs® Inc., New England**)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium adicionado con 4.5 g/L de glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio (DMEM, 1x **CORNINIG** ref. 10-013-CV).
- Suero Equino (SE) Horse serum, **Gibco** 26050-088
- Tripsina
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1x **Gibco** 25 200-072
- PEG 8,000 (Poly-ethyleneglycol **Sigma-Aldrich** SLBD2822V wt 8,000)
- Albúmina Sérica Bovina (ASB **EQUINOTECH-BIO, INC.** EE.UU. Catalogo. BAC62).
- Azul Brillante de Coomassie G-250 (**Bio-Rad®** No. catálogo 500-0006).
- Tween-20 (Polyoxyethylene-20, **Biotech**, CAS#9005-64-5).
- Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, No. T8787)

- 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB Single Solution **Life Technologies**, Cat. 00-2023).
- Agua desionizada (Milli-Q®, **Merck Millipore**).
- Agarosa (16500100 **Ultrapure Agarose, Invitrogen**)
- Buffer de carga 6X (10482028 rackIt Cyan/Orange Loading Buffer 6x, **Invitrogen**).
- Marcador de peso molecular (GeneRuler™, **Thermo Scientific**, Cat.SM0241).
- Bromuro de etidio (**Research Organics Inc.** Cat. 9575E).
- Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas indirecto (Bovine Viral Diarrhoea Virus –BVDV- Antibody Test Kit/ **IDEXX BVDV Total Ab** 99-44000)

ANEXO 3.

MEDIOS Y SOLUCIONES

1. Solución amortiguadora de fosfatos (**PBS 10X**)

- **Cloruro de sodio (NaCl)** **80 g**
- **Cloruro de potasio (KCl)** **2 g**
- **Fosfato de sodio dibásico anhidro (Na₂HPO₄)** **9.1 g**
- **Fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄)** **1.2 g**

Aforar con 1L de agua destilada; pH 7-7.4 y esterilizar por autoclave.

2. Solución amortiguadora TNE

- **Tris-HCl 50mM pH 7.5**
- **NaCl 0.1M**
- **EDTA 10mM**

Ajustar el pH a 7.5 y esterilizar en autoclave.

3. Solución amortiguadora TN

- **Tris-HCl 50mM**
- **NaCl 0.1M**

Ajustar el pH a 7.5 y esterilizar en autoclave

Titulación sueros hiperinmunes anti VDVB-2:

4. Solución amortiguadora de carbonatos

- **Bicarbonato de sodio (NaHCO₃) 0.1M**

Ajustar el pH a 8,6 y esterilizar en autoclave. Guardar a 4°C.

5. Solución de bloqueo (PBLT)

- **PBS 1x**
- **Leche al 2%**
- **Tritón X-100 al 0.2%**

Estilizar por filtración y almacenar a 4°C

6. Solución de lavado (PBS-T)

- **PBS 1x**
- **Tween-20 al 0.2%**

Almacenar a 4°C.

Bioselecciones:

7. Solución amortiguadora de bloqueo (TBS)

- **Tris-HCl 50mM**
- **NaCl 150 mM**
- **Agua destilada**

Ajustar pH 7.5 y estilizar por autoclave.

- **Adicionar Leche descremada al 1%**

Esterilizar por filtración y guardar a 4°C.

8. Solución de lavado (TBS-T)

- **Agua destilada**
- **Tris-HCl 50mM**
- **NaCl 150 mM**
- **Tween-20 al 0.1%**

Ajustar pH a 7.5 y estilizar por autoclave.

9. Medio Luria Bertani (LB)

Para 1L:

- **Bacto Triptona** 10 g
- **Extracto de Levadura** 8 g
- **NaCl** 5 g
- **Agua destilada**

Esterilizar por autoclave y guardas a temperatura ambiente.

10. Agar LB

Para 1L de medio LB:

- Adicionar **15 g de Agar bacteriológico**

Esterilizar por autoclave y guardar a 4°C.

11. Top Agar

Para 100 mL:

- **Peptona de caseína** 1 g
- **Extracto de levadura** 0.5 g
- **NaCl** 0.5 g
- **Agar bacteriológico** 0.75 g
- **Agua destilada**

Esterilizar por autoclave y guardar a temperatura ambiente.

12. Medio YT2x

Para 1L:

- **Bacto Triptona** 16 g
- **Extracto de levadura** 10 g
- **NaCl** 5 g
- **Agua destilada**

Ajustar el pH a 7, esterilizar por autoclave y guardar a temperatura ambiente.

13. Solución de elución

- **Glicina – HCl 0.2M**
- **Agua destilada**

Ajustar el pH a 2,2 y esterilizar por autoclave. Guardar a temperatura ambiente.

14. Solución de neutralización

- **Tris – HCl 1M**
- **Agua destilada**

Ajustar el pH a 9.1 y esterilizar por autoclave. Guardar a temperatura ambiente.

15. Solución de precipitación (PEG/NaCl)

- **Polietilenglicol 8000 wt (PEG) al 20%**
- **NaCl 2.5M**
- **Agua destilada**

Agitar toda la noche hasta disolver el PEG y esterilizar por autoclave. Guardar a 4°C.

Ensayos de unión (Phage ELISA)

16. Solución amortiguadora de carbonatos

- **Bicarbonato de sodio (NaHCO₃) 0.1M**

Ajustar el pH a 9.6 y esterilizar en autoclave. Guardar a 4°C.

Extracción de ADN de bacteriófagos

17. Solución de Ioduro de sodio

- **Tris- HCl 10 mM pH 8**
- **Ioduro de sodio 4M**
- **EDTA 1M**
- **Agua destilada**

Mezclar y conservar a temperatura ambiente en oscuridad.