



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

IDENTIFICACIÓN DE EPÍTOPOS/MIMOTOPOS ESPECÍFICOS PARA EL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA MEDIANTE EL MÉTODO DE PHAGE

DISPLAY

TESIS

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

ANA MARINA OROZCO RIVERO

TUTOR PRINCIPAL: DRA. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. GOHAR GEVORKIAN MARKOSIAN
Instituto de Ciencias Biomédicas, UNAM

DRA. SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM

México, D. F.

Mayo 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Con todo mi amor y cariño a mis papas María Elena y Fernando y a mis padrinos mi tía Tere y mi tío Román, que sin todo su amor, apoyo y exigencias no estaría aquí.

A mis sobrinos Luna y Emilio, que con esos ojitos y sonrisitas hacen que todo valga la pena.

Muy especialmente quiero dedicar mi trabajo a mi tía Mirna y a mi abuelita Carmelita que iniciaron conmigo esta etapa y no pudieron verla terminada, siempre tuvieron fe en mí y en mi corazón sé que siempre me acompañaron y estuvieron conmigo, ellas fueron mi fortaleza en los momentos difíciles, las extraño mucho.

Agradecimientos.

A mi familia que siempre me han apoyado a pesar de la distancia, mi hermana Ale y mi cuñado Gama que siempre estuvieron al pendiente de mí y por darme la alegría de mis sobrinos Luna y Emilio, a mis primos Elías, Román, Arena, Natalia, Raquel, Güero, Daniel y Tere que aunque estemos separados siempre me animaron y aconsejaron. A mi tía Milita que gracias a esas llamadas inesperadas me hacían el día.

Al diseñador gráfico Luis Rafael Cervantes Ramírez Samperio por la edición de imágenes, preparación de presentaciones, carteles y que siempre me ha apoyado de mil formas incondicionalmente.

A mi tutora, amiga y jefecita Rosa Elena Sarmiento, por toda la confianza que me dio, desde la especialidad hasta la fecha, por aceptarme como su alumna, por apoyarme en cada instante en cada decisión, desde lo académico hasta lo personal, por esos momentos cuando más extrañaba mi Chihuahua me hizo sentir como si estuviera en casa.

A mis tutoras la Dra. Gohar Gevorkian y la Dra. Susana Elisa Mendoza, por su disposición, que con su experiencia, apoyo y confianza me ayudaron a terminar en tiempo y forma la tesis.

A María Elena Munguía y Gonzalo Acero por todo su apoyo y su asesoría técnica en todos mis procedimientos, por su disponibilidad y su ejemplo en la entrega de hacer lo que les gusta y apasiona.

Al Dr. Roberto Cervantes y a la Dra. Cristina Rodríguez que siempre me han apoyado en todos mis proyectos, así como con sus consejos, experiencia y amistad.

A la licenciada Danelia Usó Nava por todo su apoyo y asesoría durante el proyecto, por todas las veces que me tenía que repetir las cosas pero siempre con una sonrisa y mucha paciencia, por su amistad incondicional y sus consejos.

Al departamento de microbiología de la FMVZ-UNAM que me abrió las puertas a todos sus laboratorios, al Dr. Gutiérrez Pabello y a la Dra. Miranda Morales.

Al Laboratorio de Virología de la FMVZ-UNAM, a la Dra. Lilita Valdés y a la Dra. Laura Cobos por todo su apoyo y consejo, a Elvia, Manuel, Armando y Don Mario por ayudarme en todas mis dudas y acompañarme como amigos. A mis compañeros de laboratorio Montse, Tere, hermanito Mario, Ana Laura, Lilita, Diana, Juan Carlos, Chucho, Yatziry, Naomi, Naye, Pablito, Hugo, por estudiar conmigo, apoyarme en mis experimentos, aguantar mi mal humor antes de los tutorales o un examen, festejar conmigo los éxitos y los fracasos, gracias por convertirse en mi familia estos dos años.

A Ale y la Dra. Irasema, siempre tenían una palabra de aliento si te veían triste o un abrazo sanador, muchas gracias hasta el cielo.

A la DGAPA por el apoyo recibido a través del proyecto PAPIIT IA202313.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología por el apoyo económico durante todos mis estudios.

A mi jurado Dr. Abel Ciprian, Dr. Rogelio Alonso, Dra. Rocío Gabriela Tirado y al Dr. Sabino Pacheco, por brindarme el tiempo de leer, corregir y complementar mi trabajo.

Resumen.

El virus de la diarrea viral bovina (VDVB) ha representado por más de medio siglo pérdidas económicas importantes en el ganado bovino. El diagnóstico contribuye en la toma de decisiones para poder implementar medidas adecuadas de prevención y/o control. El aislamiento viral, métodos serológicos y los ensayos de neutralización de la infectividad, son ampliamente usados para la detección de la infección por VDVB. Sin embargo, las técnicas para el diagnóstico son caras debido a su complicada elaboración.

Con la finalidad de identificar mimótopos de epítopes del VDVB, se utilizaron dos bibliotecas de phage display Ph.D.-7 y Ph.D.-C7C, con las que se realizaron 5 rondas de bioselección utilizando como blanco anticuerpos policlonales contra el virus de referencia VDVB (NADL). Se seleccionaron 10 clonas al azar de cada ronda a partir de la 3ª bioselección y se analizaron con suero de conejo inmunizado y no inmunizado para evaluar su especificidad por medio de ensayos de ELISA. Obtuvimos 2 clonas reactivas de la biblioteca Ph.D.-7 (lineal) y 14 clonas reactivas de la biblioteca Ph.D.-C7C (cíclica), cuya densidad óptica fue notablemente mayor a la del control negativo (M13). Las clonas reactivas se secuenciaron y analizaron, se obtuvieron dos secuencias de aminoácidos, "VNKDGEY", y "SNIFAQM", que al realizar el alineamiento mostraron una homología similar a una región de la glicoproteína E2 del VDVB. Sin embargo, no se pueden utilizar a los fagos expresando a estos mimotopos debido a los anticuerpos naturales que poseen los bovinos ante los fagos, no obstante estos mimotopos pueden utilizarse para estudios posteriores.

Palabras clave: Diagnóstico DVB, E2, diarrea viral bovina, pestivirus, Phage Display, mimotopos, biblioteca de péptidos, ELISA.

Abstract.

The virus of bovine viral diarrhea (BVDV) it represents significant economic losses in cattle. The diagnosis helps in decisions to implement appropriate measures to prevent and control. Viral isolation and serological methods, assays of neutralization infectivity, are widely used for the detection of BVDV infection. However, diagnostic techniques are expensive due to the complicated elaboration.

In order to identify mimotopes of the epitopes of BVDV, we used two phage display libraries Ph.D.-7 and Ph.D.-C7C, with which were performed five rounds of biopanning using as target, polyclonal antibodies against BVDV (NADL). We select 10 random clones, from each round starting from the 3rd biopanning and were analyze using rabbit serum immunized and not immunized, to assess their specificity by ELISA.

We obtained 2 reactive clones from Ph.D.-7 library (linear) and 14 reactive clones of Ph.D.-C7C library (cyclic), the optical density was significantly higher than the negative control (M13). The reactive clones were sequenced and analyzed, resulting in two amino acid sequences, "VNKDGEY" and "SNIFAQM", the alignment showed similarity to a region of glycoprotein E2 of BVDV. However, we cannot use the phage expressing these mimotopes, since normal cattle serum contained antibodies against M13 phage, nevertheless these mimotopes can be used for further studies.

Keywords: Diagnosis, BVDV, E2, bovine viral diarrhea virus, pestivirus, mimotopos, Phage Display, ELISA.

Contenido.

Dedicatorias.....	1
Agradecimientos.....	2
Resumen.....	4
Abstract.....	5
1. Introducción.....	8
2. Generalidades.....	10
2.1 Virus de la Diarrea Viral Bovina.....	10
2.2 Glicoproteína E2 del VDVB.....	11
2.3 Patogenia.....	12
2.4 Epidemiología.....	12
2.5 Phage Display.....	13
3. Justificación.....	15
4. Hipótesis.....	15
5. Objetivos.....	16
5.1 General.....	16
5.2 Experimentales.....	16
6. Materiales y Métodos.....	17
6.1 Propagación del virus de referencia y precipitación con polietilenglicol. ...	17
6.2 Purificación por gradiente.....	17
6.3 Obtención de sueros hiperinmunes.....	18
6.4 Titulación de los sueros hiperinmunes.....	18
6.5 Bioselecciones.....	19
6.6 Selección y amplificación de clonas.....	20
6.7 Ensayos de unión.....	20
6.8 ELISA para seleccionar sueros de bovinos negativos y positivos al virus de referencia.....	21
6.9 Ensayos de ELISA para probar clonas seleccionadas con sueros de bovino negativo y positivo al virus de referencia.....	22
6.10 Secuenciación del ADN de los bacteriófagos.....	23

6.11 Pruebas de reactividad y sinergia.	24
7. Resultados.	25
7.1 Virus de referencia VDVB.	25
7.2 Sueros Hiperinmunes.	25
7.3 Bioselecciones.	26
7.4 Ensayos de unión.	27
7.5 Análisis de las clonas secuenciadas.	28
7.6 Pruebas de reactividad y sinergia.	31
7.7 ELISA para seleccionar sueros de bovinos negativos y positivos al virus de referencia.	32
7.8 ELISA para probar clonas seleccionadas con sueros de bovino negativo y positivo al virus de referencia.	33
8. Discusión.	36
9. Conclusión.	39
10. Perspectivas.	40
Anexo A. Abreviaturas.	41
Anexo B. Reactivos.	42
Anexo C. Medios y Soluciones.	43
Lista de figuras.	47
Lista de cuadros.	48
Referencias.	49

1.Introducción.

El virus de la diarrea viral bovina (VDVB) ha representado por más de medio siglo pérdidas económicas importantes en la industria de ganado bovino de leche y carne, así como en otras poblaciones de rumiantes alrededor del mundo (Pogranichniy et al., 2011). La prevalencia de especies y subgenotipos varía según la región geográfica (Ridpath, 2010). Sin embargo, la infección tiende a ser endémica en muchas poblaciones, alcanzando niveles del 1-2% de ganado persistentemente infectado (PI) y 60-85% de seropositividad. Las pérdidas económicas se estiman dependiendo del estado inmune de la población y de la patogenicidad de la cepa del virus. Una cepa de baja virulencia tiene una incidencia de infección aguda del 34% y una pérdida de US\$20 millones, mientras que una cepa altamente virulenta la incidencia es del 65% y pérdidas económicas de hasta US\$57 millones (Houe, 1999).

En México, las enfermedades que causan abortos en el ganado producen pérdidas económicas importantes. Los registros que tenemos en el país de seropositividad contra el VDVB van del 63-71% en producciones lecheras y cárnicas (Suzan et al., 1983).

A pesar de los intensivos programas de control a nivel mundial, la incidencia del VDVB se mantiene alta, en parte, debido a la capacidad del virus para causar infecciones persistentes (Leyh et al., 2011).

El diagnóstico del agente etiológico viral contribuye en la toma de decisiones para poder implementar medidas adecuadas de prevención y/o control. El aislamiento viral y los ensayos de neutralización de la infectividad, son ampliamente usados para la detección de la infección por VDVB, sin embargo; para la determinación de la infección persistente se recomiendan otros métodos como ELISA, RT-PCR e inmunohistoquímica de las biopsias de piel.

Si bien existen métodos de diagnóstico comerciales basados en la técnica de ELISA para VDVB, es importante señalar que se ha demostrado gran

variabilidad genética y antigénica entre diferentes cepas del virus (Vilcek et al., 2004). En el estudio realizado por Meléndez *et. al.* 2010 (Meléndez Soto et al., 2010), se utilizó un ensayo de ELISA (SVANOVIR® BVDV-Ab) para la detección de anticuerpos contra el VDVB, el cual no menciona el antígeno que se utiliza para la sensibilización de las placas. Conocer el antígeno utilizado en estas pruebas es de gran importancia, debido a la gran variabilidad entre las cepas del VDVB de diferentes regiones que podría afectar los resultados de la investigación. Así mismo es el caso de los hatos en los que se aplican vacunas contra los virus del complejo respiratorio, en los cuales se desconocen los valores de protección otorgados por estas vacunas, por lo que consideramos importante implementar técnicas adecuadas para la identificación del VDVB.

En México, en el diario oficial de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), se encuentra al VDVB en el Artículo 4º, en el cual se engloban aquellas enfermedades presentes en territorio nacional consideradas como enzoóticas, de notificación mensual obligatoria. La Oficina Internacional de Epizootias (OIE) incluyó al VDVB en la lista de enfermedades de notificación obligatoria en mayo del 2005. Así mismo, en la norma para el proceso zoonosanitario del semen de animales domésticos (NOM-027-ZOO-1995), se solicita como requisito un análisis que determine que el producto esté libre del VDVB.

Las técnicas para el diagnóstico de VDVB son necesarias, sin embargo, tienen un costo elevado debido a su complicada elaboración y en México la mayoría son importadas. En la actualidad, los bacteriófagos son una alternativa para el desarrollo de métodos de diagnóstico debido a su potencial uso como antibacterianos, sistema de despliegue en fago (Ph.D.) y como medios para seleccionar vacunas. La técnica de Phage Display descrita en 1990 por Scott and Smith (Scott and Smith, 1990), permite la expresión de moléculas de interés, como péptidos o proteínas, expresándolas como proteínas de fusión al extremo carboxilo o amino terminal de una proteína presente en la superficie de un bacteriófago, los bacteriófagos más utilizados son los fagos filamentosos (M13)

que infectan cepas de *E.coli* que presenten el pilus sexual (F'), la cual puede producir altos títulos del fago (10^{12} - 10^{13} UFP/ml). Además, los fagos tienen un genoma de ADN de cadena sencilla fácil de manipular y tolera la inserción de fragmentos muy largos de ADN exógenos (Castel et al., 2011). El despliegue de moléculas en la superficie de un fago filamentoso es una metodología para la selección de péptidos y proteínas por su capacidad de unión, incluyendo anticuerpos (Tikunova and Morozova, 2009).

2. Generalidades

2.1 Virus de la Diarrea Viral Bovina.

El VDVB es un virus envuelto cuyo genoma está compuesto por ARN en sentido positivo de alrededor de 12.3 kb, pertenece a la familia *Flaviviridae*. El genoma viral codifica para un polipéptido (NH2- Npro-C, Erns, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B-COOH) de alrededor de 4.000 aminoácidos, la cual se procesa por las proteasas virales y celulares en 4 proteínas estructurales (C, Erns, E1, E2) y en 6 proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B). De acuerdo la capacidad para causar efectos citopáticos (ECP) en cultivos celulares, las cepas del VDVB se pueden clasificar en citopáticas (CP) y no-citopáticas (NCP) (Agapov et al., 2004).

Con base en las secuencias de la región 5' no traducida (NTR) y el gen *Npro* las cepas del VDVB se clasifican en los genotipos 1 y 2 (Avalos-Ramirez et al., 2001; Evermann and Ridpath, 2002). Cada genotipo del VDVB se divide en subgrupos, en la actualidad se han reportado 11 subgenotipos para el VDVB-1 y 2 para el VDVB-2 (Vilcek et al., 2005).

2.2 Glicoproteína E2 del VDVB.

Dentro de las glicoproteínas de envoltura, la E2 es una proteína inmunodominante en los pestivirus e induce la producción de anticuerpos neutralizantes, así también una de las principales funciones de esta glicoproteína es actuar como ligando del receptor celular, por lo que facilita la unión y entrada del virus a la célula (Pande et al., 2005).

La glicoproteína E2 se encuentra en la superficie exterior del virión, es una proteína transmembranal tipo I con una región N-terminal y una α -hélice en el carboxilo terminal anclada a la membrana, E2 es una molécula dimérica que contiene cuatro dominios DA, DB, DC y DD, dispuestos linealmente del extremo N- al C- terminal. Los dominios DA y DB (residuos 4-87 y 88-164) son los más distales de la envoltura viral y es probable que sean los más expuestos en la superficie del virus, el dominio DD es el más conservado entre los pestivirus, los dímeros están covalentemente estabilizados por un puente disulfuro, compuesto por un bucle extendido que une al dominio DC a la β -horquilla (Figura 1) (El Omari et al., 2013). Su papel en la unión celular es corroborado por el hecho de que E2 determina el tropismo celular del virus (Liang et al., 2003).

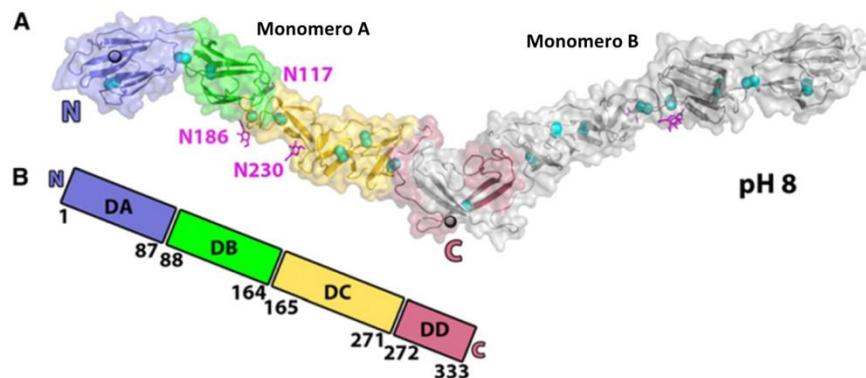


Figura 1. Representación esquemática de la estructura del cristal, mostrando los cuatro dominios DA, DB, DC y DD. A) Representación de la estructura del cristal a pH8. B) Estructura lineal de la gE2 del VDVB. Modificado de (El Omari et al., 2013).

2.3 Patogenia.

La patogénesis de la enfermedad causada por VDVB es compleja y se presenta tanto de forma aguda (infección respiratoria y abortiva), así como de forma de infección persistente (Autio et al., 2007; Svensson et al., 2006). La infección persistente (PI) se presenta como resultado de una infección fetal entre los días 28-125 de la gestación, por la infección con un virus NCP. En este tipo de infección el virus se elimina durante toda la vida del animal. También se ha demostrado que el VDVB tiene un efecto de inmunosupresor, que predispone a los animales enfermos a la infección por otros microorganismos, por lo que es aconsejable retirarlo del hato (Evermann and Ridpath, 2002; Fray et al., 2000). En animales adultos, las infecciones crónicas conducen debilitación y disminuyen el rendimiento de los animales, lo que los conduce al sacrificio (Ackermann et al., 2010).

La forma fatal de VDVB llamada enfermedad de las mucosas, solo ocurre en animales previamente infectados con el biotipo NCP y que son reinfectados con un biotipo CP (Ammari et al., 2010).

2.4 Epidemiología.

El VDVB es de distribución mundial (Ridpath, 2010). La prevalencia varía alrededor del mundo: el VDVB-2 representa alrededor del 50% de los aislados en Norte América, mientras que el VDVB-1 domina en Europa con más del 90%. La presencia de VDVB-2 se ha reportado en Alemania, Bélgica, Francia, Países Bajos, Austria, Eslovaquia, Italia y el Reino Unido, pero no se encuentra en Suecia, Noruega, España, Eslovenia y Dinamarca (Lindberg et al., 2006).

En Estados Unidos de Norte América, se reporta que el VDVB-1 es el virus más comúnmente aislado (Ahn et al., 2005; Tajima and Dubovi, 2005), aunque un estudio reportó que en el noroeste de EUA el VDVB-2 fue el más común (Evermann and Ridpath, 2002).

En México no existen reportes acerca de la caracterización genotípica de los virus circulantes, solo existen estudios sobre seropositividad contra el VDVB y van del 63-71% (Suzan et al., 1983). Para el estado de Yucatán se reportó una seropositividad del 14% en bovinos de carne (Solis-Calderon et al., 2005).

En un estudio realizado en el estado de Aguascalientes se demostró que el VDVB se encuentra entre las enfermedades virales abortivas presentes en México y debido a la alta seroprevalencia encontrada (89.1%) indica que la enfermedad es endémica en la región (Meléndez Soto et al., 2010).

La distribución de los biotipos y genotipos con su presentación clínica es de gran importancia no solo para el control sino para el entendimiento de la enfermedad de VDVB, pero también es de utilidad para elegir antígenos para el desarrollo de técnicas de diagnóstico y vacunas (Ahn et al., 2005).

2.5 Phage Display.

Los bacteriófagos son abundantes entidades en el planeta. Estos virus bacterianos contienen material genético ya sea ADN o ARN, encapsidado por varias proteínas de envoltura. Los bacteriófagos han contribuido en el campo de la biología molecular y biotecnología.

La tecnología de Phage Display se ha convertido en una poderosa herramienta para identificar ligandos para anticuerpos. Se ha demostrado que del tamizado de librerías de fagos con anticuerpos, se pueden obtener mimotopos que mimeticen epítomos lineales o discontinuos del antígeno (Gevorkian et al., 1998). Tomó varios años en apreciar el potencial de esta técnica, pero el número de publicaciones relacionadas a su uso y versatilidad se ha incrementado, tales como el mapeo de epítomos, el aislamiento de proteínas con alta afinidad, ingeniería de proteínas y el descubrimiento de fármacos (Castel et al., 2011).

Esta técnica se ha utilizado exitosamente para seleccionar mimotopos de patógenos virales como Hepatitis B (HBV), Hepatitis C (HCV), inmunodeficiencia

humana (HIV), Puumala hantavirus (PUU), Sarampión (MV), y Sincitial Respiratorio (RSV) (Kalaycioglu et al., 2007).

Además de su utilización para la detección y aislamiento de péptidos altamente específicos con afinidad a proteínas blanco, estos péptidos pueden ser utilizados para el diseño de drogas, como reactivos para entender el reconocimiento molecular, también como agentes terapéuticos inhibiendo la interacción receptor-ligando o actuando como agonista, además se pueden emplear para la detección de patógenos y agentes considerados como potencial amenaza al medio ambiente (Haq et al., 2012).

Los péptidos que se desean desplegar en fagos M13 se pueden fusionar a cualquier proteína de superficie, pero las más utilizadas son las proteínas pIII y pVIII (Castel et al., 2011).

La técnica de Phd puede ser utilizada para obtener fagos que presenten péptidos antigénicos específicos en su superficie. La biblioteca de péptidos puede ser tamizada al antisuero específico para detectar nuevos antígenos y mimotopos (péptidos que mimetizan las propiedades antigénicas y estructuras secundarias de una proteína, carbohidrato o lípido) (Figura 2) (Haq et al., 2012).

El diagnóstico más utilizado para la DVB es serológico, pero este requiere ya sea de proteínas recombinantes o el virus completo, y personal altamente calificado así como instalaciones y equipo adecuado.

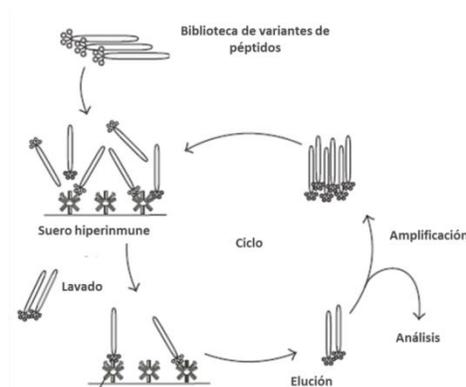


Figura 2. Esquema del sistema de Phage Display modificado (Matsubara, 2012).

3. Justificación.

La infección por el VDVB tiene un impacto económico importante debido a las pérdidas económicas productivas, reproductivas y a que se presenta tanto de forma aguda como persistente, por lo que el diagnóstico es de gran importancia para su control y erradicación (Ammari et al., 2010; Ridpath, 2010).

Sin embargo, las técnicas actuales para el diagnóstico del VDVB, tales como técnicas moleculares, serológicas y aislamientos virales, son costosas debido a su complicada elaboración. En la actualidad se han buscado alternativas, una de ellas es el uso de bacteriófagos para utilizarlos como sistema de despliegue. Esta técnica se puede utilizar para seleccionar mimotopos, que nos permitan la implementación de un diagnóstico del VDVB efectivo y económico sin la necesidad de replicar el virus en líneas celulares en el laboratorio.

4. Hipótesis.

La técnica de Phage Display permitirá seleccionar epítomos/mimotopos específicos del virus de la Diarrea Viral Bovina.

5. Objetivos

5.1 General.

Identificar péptidos específicos para el virus de la Diarrea Viral Bovina por medio de la técnica de Phage Display.

5.2 Experimentales

- Obtener sueros hiperinmunes.
- Identificar péptidos específicos al suero hiperinmune mediante rondas de selección con las bibliotecas Ph.D.-7TM y Ph.D.-C7CTM.
- Analizar la reactividad de las clonas mediante pruebas de ELISA.
- Seleccionar las clonas reactivas para su secuenciación.
- Examinar la reactividad de las clonas seleccionadas con sueros de bovinos positivos y negativos a DVB.

6. Materiales y Métodos.

6.1 Propagación del virus de referencia y precipitación con polietilenglicol.

Se propagó el virus de referencia ATCC de Diarrea Viral Bovina en células MDBK crecidas con medio para cultivo celular. Una vez que se observó el ECP en las células infectadas, se recuperaron y se lisaron por sonicación durante 10 min a 40KHz (BransonTM Ultrasonic Cleaners Model 5510), para permitir la completa liberación del virus. Posteriormente se centrifugó a 3,000 rpm a 4°C por 15 min (Sorvall Legen march 1.6R rotor Cat. No. 75002006). Se recuperaron 6 ml del sobrenadante y se almacenaron a -80°C. Para recuperar los virus del volumen restante, se adicionó PEG 8% y se dejó en agitación toda la noche a 4°C. Pasado el tiempo, se centrifugó a 10,300 rpm durante 2 hrs a 4°C y la pastilla se resuspendió en solución amortiguadora TNE. Finalmente los virus fueron dializados 3 veces (membrana MVCO: 12-14,000 kDa) en PBS y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

6.2 Purificación por gradiente.

Los virus se purificaron por gradiente discontinuo de sacarosa (30, 45 y 60%) en solución TN. En tubos Beckman (XL90 ultracentrifuge SW40 Ti Rotor) se preparó el gradiente de sacarosa y se agregó el virus. Se centrifugó a 23,000 rpm (OptimaTMXPN-90k RPM ultracentrifuge Beckman Coulter) a 4°C durante 3 hrs. Terminado el tiempo se observó una banda, la cual se recolectó en otro tubo y se volvió a centrifugar, esta vez a 20,000 rpm durante 1hr a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla con 200 µl de solución TN.

Posteriormente se tituló el virus purificado por medio del método de Reed Muench (Duignan et al., 1994).

6.3 Obtención de sueros hiperinmunes.

Los sueros hiperinmunes se adquirieron por la donación de la QFB. Elvia Lazo García, los cuales se obtuvieron de conejos Nueva Zelanda inmunizados con el VDVB purificado por gradiente.

6.4 Titulación de los sueros hiperinmunes.

Se sensibilizó una placa de ELISA (Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96 well solid plates) con VDVB a un título de 10^5 DICC_{50%}/ml en PBS y se dejó toda la noche a 4°C. Al siguiente día se realizaron 4 lavados con 250 µl de PBS Tween al 0.2%, después se agregaron 200 µl de solución de bloqueo y se dejó incubar 1 hr a 37°C. Pasado el tiempo de incubación se realizaron 4 lavados con 250 µl de PBS Tween al 0.2%. Después se agregaron (por duplicado) los sueros hiperinmunes en diluciones seriadas 2X comenzando con la primer dilución 1:200 en PBS+leche2%+triton y se incubó 1 hr a 37°C. Se realizaron 4 lavados con 250 µl de PBS Tween al 0.2%, se adicionaron 100 µl de anti-conejo peroxidado a una concentración de 1/10,000 en PBS/leche/triton y se incubó por 1 hr a 37°C. Después se realizaron lavados con 250 µl de PBS Tween al 0.2% a cada pozo 4 veces. Posteriormente se agregó el sustrato TMB (100 µl) a todos los pozos y se realizó su lectura cada 5 min en un lector de ELISA a 650nm (Figura 3).

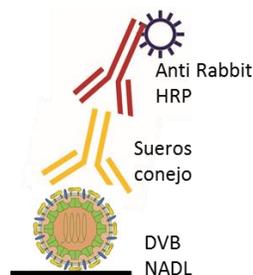


Figura 3. Formato utilizado para la titulación de los sueros hiperinmunes.

6.5 Bioselecciones.

Las bioselecciones se realizaron siguiendo las indicaciones del manual Ph.D.TM Phage Display Libraries/Instruction Manual New England Bio Labs (Kay et al., 1996). En 4 pozos de una placa de ELISA (Nunc-ImmunoTM MicroWellTM 96 well solid plates) se inmovilizó el anti-conejo hecho en cabra en solución de carbonatos (100 µl) durante toda la noche a 4°C. Después se hicieron lavados con TBST (TBS+0.1%Tween-20 v/v). Después se bloqueó con 200 µl de solución de bloqueo por 1hr a 4°C. Se hicieron lavados con TBST (6 veces). Se agregaron 100 µl del suero de conejo anti-VDVB diluido en solución de carbonatos (1:300) y se incubó 1hr a 37°C. Se realizaron 6 lavados con TBST. Se adicionaron las bibliotecas de fagos (Ph.D. 7 y C7C, BioLabs® Inc., New England), en base al manual Ph.D.TM Phage Display Libraries/Instruction Manual New England Bio Labs con título de 2×10^{13} ufp en TBST (1:200) y se agregaron 100 µl a cada pozo e incubaron 1 hr a temperatura ambiente. Pasado el tiempo se hicieron lavados a los pozos con TBST (10 veces).

Para la elución de los fagos se agregaron 100 µl de Glicina-HCl 0.2 M (pH 2.2) y se incubó por 15 min a temperatura ambiente. El eluido se recuperó y se pasó a un tubo con Tris-HCl 1 M pH 9.1 (por cada 100 µl de eluido se adicionaron 15 µl de Tris-HCl). Una vez obtenido el eluido se procedió a su titulación. Se prepararon diluciones seriadas 1:1000 del eluido en caldo LB. Una fracción de estas diluciones se mezclaron con 200 µl de un cultivo de la bacteria *E. coli* 2738 en fase exponencial y se permitió la infección por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 4 ml de Top Agar atemperado de 50-55°C, se mezcló y se pasó el contenido sobre una placa de agar LB. Se dejó solidificar y se incubaron a 37°C durante 24hrs.

Una vez obtenido el título del eluido, para amplificar los fagos se tomaron 350 µl y se pusieron en un matraz con 50ml de LB y se adicionaron 500 µl de *E.coli* 2738, y se incubaron en agitación a 37°C durante 4.5 horas. Terminado el tiempo se separaron las células centrifugando a 3,000 rpm por 15 min. El sobrenadante se recuperó y se agregó 1/6 del volumen de PEG/NaCl se mezcló y

se dejó precipitando a 4°C al menos 2 hr, preferentemente toda la noche. Al día siguiente se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en TBS (1 ml) Después se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se realizó una segunda precipitación con el mismo procedimiento. Ambos sedimentos fueron resuspendidos en 200 µl de TBS y los fagos fueron titulados como se describió antes.

6.6 Selección y amplificación de clonas.

De las últimas tres rondas de bioselección (3, 4 y 5), se seleccionaron al azar 10 clonas de cada biblioteca (Ph.D. 7, y Ph.D. C7C BioLabs® Inc., New England). Cada clona fue amplificada, purificada y titulada como se describió previamente.

6.7 Ensayos de unión.

Las pruebas de ELISA se realizaron con cada una de las clonas seleccionadas. Se sensibilizó una placa de ELISA (Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96 well solid plates) con 100 µl del suero anti-conejo diluido en solución de carbonatos (1:400) y se incubó toda la noche a 4°C. Al siguiente día se realizaron 4 lavados con PBS Tween al 0.2%, después se agregaron 300 µl de solución de bloqueo y se dejó incubar 1 hr a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación se hicieron 4 lavados con PBS Tween al 0.2%. Posteriormente se agregaron 100 µl del suero de conejo anti-VDVB y un suero de conejo negativo al virus (NEG Gonzalo) en PBS/leche 2%/tritón 0.2% (1:300), se incubó 1 hr a 37°C. Se realizaron 4 lavados con PBS Tween al 0.2%. Después (por duplicado) se agregaron las clonas amplificadas en PBS+leche 2%+tritón 0.2% (1:8) y se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizaron 4 lavados con PBS Tween 0.2%. Posteriormente se adicionaron 100 µl del anticuerpo anti-M13

conjugado en PBS/leche2%/tritón 0.2% (1:5,000), se incubó 1 hr a 37°C (Figura 4). Se realizaron 4 lavados con PBS Tween 0.2%. Posteriormente se agregó el sustrato TMB (100 µl) a todos los pozos y se realizó su lectura cada 5 min en un lector de ELISA a 650nm.

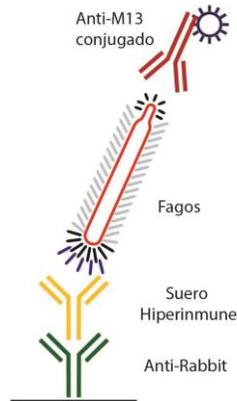


Figura 4. Formato utilizado para los ensayos de unión.

6.8 ELISA para seleccionar sueros de bovinos negativos y positivos al virus de referencia.

Se sensibilizó una placa de ELISA (Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96 well solid plates) con VDVB a una concentración 10^5 en PBS y se dejó toda la noche a 4 °C. Al siguiente día se realizaron 4 lavados con 250 µl PBS Tween al 0.2%. Después se agregaron 200 µl de solución de bloqueo y se dejó incubar 1 hr a 37°C. Pasado el tiempo de incubación se realizaron 4 lavados con 250 µl PBS Tween al 0.2%. Después se agregaron (por duplicado) 9 sueros de bovino de distintas regiones (dos sueros de bovino procedentes del CEDISACH-Chihuahua negativos a VDVB por una ELISA comercial, 4 sueros del centro de la FMVZ CEPIPSA Topilejo, donde se han tenido casos positivos por aislamiento y ELISA al VDVB y los sueros de conejo positivo y negativo al VDVB), en diluciones dobles seriadas comenzando con la primer dilución 1:200 en PBS+leche 2%+tritón 0.2% y se incubó 1 hr a 37°C. Se realizaron 4 lavados con 250 µl de PBS Tween al 0.2%. Se

adicionaron 100 µl de anti-Bovino marcado (1/10,000) en PBS/leche/tritón y se incubó 1 hr a 37°C, después se realizaron 4 lavados con 250 µl de PBS Tween al 0.2%. Posteriormente se agregó el sustrato TMB (100 µl) a todos los pozos y se realizó una lectura cada 5 minutos en un lector de ELISA a 650nm (Figura 5).

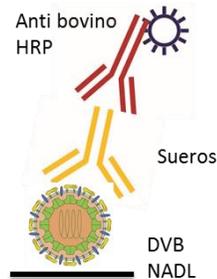


Figura 5. Formato utilizado para probar los sueros de bovino con virus de referencia.

6.9 Ensayos de ELISA para probar clonas seleccionadas con sueros de bovino negativo y positivo al virus de referencia.

Se sensibilizó una placa de ELISA (Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96 well solid plates) con anti-M13 sin marcar (1:5000) en solución de carbonatos, se dejó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizaron 4 lavados con 250 µl de PBS Tween al 0.2%, después se agregaron 200 µl de solución de bloqueo y se dejó incubar 1 hr a 37°C. Pasado el tiempo se realizaron 4 lavados con 250 µl PBS Tween al 0.2%. Después se agregaron 100 µl (por cuadruplicado) de las clonas reactivas a una concentración de 1:10 en PBS/leche 2%/tritón y se incubó toda la noche a 4°C. Después se realizaron 4 lavados con 250 µl de PBS Tween al 0.2%, y se adicionaron 100 µl de los sueros de bovino negativo y positivo respectivamente, incubando 1 hr a 37°C. Posteriormente se realizaron 4 lavados con PBS Tween al 0.2%, y se agregó el anti-Bovino marcado (1/5,000) en PBS/leche 2%/tritón 0.2% y se incubó 1 hr a 37°C. Después se realizaron 4 lavados con 250 µl PBS Tween al 0.2%. Posteriormente se agregó el sustrato TMB (100 µl) a todos los pozos y se realizó una lectura cada 5 minutos en un lector de ELISA a 650nm. También se

realizaron dos formatos más de la misma manera del anterior pero con la excepción de que en uno se sensibilizó con el suero de bovino directamente, para después exponer las clonas y revisar la reactividad con un anticuerpo Anti M13 conjugado y en el otro formato se sensibilizó con las clonas reactivas para después exponer a los sueros de bovino y revelar con un anticuerpo Anti bovino conjugado (Figura 6).

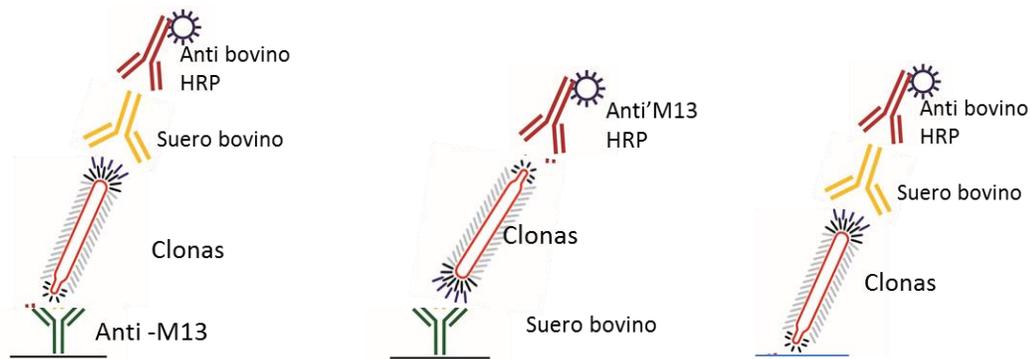


Figura 6. Formatos utilizados para probar clonas con sueros de bovino negativo y positivo.

6.10 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 suspendió con 150 μ l la pastilla de fago (previamente amplificado y purificado) con solución de loduro y se agitó vigorosamente, después se agregaron 500 μ l de alcohol absoluto, se mezcló y se dejó incubar 10 min a temperatura ambiente. Terminado el tiempo se centrifugó a la máxima velocidad (Microcentrifuge Thermo Fisher Heraeus Fresco 17 Cat. No. 75002421) durante 10 min, se descartó el sobrenadante al vacío y se agregaron 500 μ l de alcohol al 70% y se centrifugó 10 min a la máxima velocidad, después se secó al vacío y se dejó secar completamente en una campana de flujo laminar durante aproximadamente 30 min, posteriormente se resuspendió la pastilla en 20 μ l de H₂O. El producto

obtenido se corrió en un gel de agarosa para electroforesis al 1%, para observar la integridad de la extracción de ADN de cadena sencilla del bacteriófago y se determinó la concentración en el espectrofotómetro Epoch Biotek™.

Determinada la concentración se enviaron las clonas para su secuenciación en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, Unidad de Secuenciación, UNAM, con el primer para secuenciación -96 gIII (5'-^{HO}CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3'). Una vez obtenidos los resultados de las secuencias se realizó su análisis mediante los programas Bio-Edit, Clone Manager y Multalin version 5.4.1.

6.11 Pruebas de reactividad y sinergia.

Una vez obtenidas las secuencias de las clonas reactivas se realizaron pruebas de ELISA cubriendo la placa con diluciones de los fagos para observar a que dilución obtenemos una mejor densidad óptica sin saturar la reacción, así mismo se realizó una mezcla de las dos clonas con las secuencias de interés, la clona 4C3 de la biblioteca con péptidos lineales (Ph.D.TM-7) y de la 3C10 de la biblioteca flanqueada por cisteínas (Ph.D.TM-C7C) para probar si existía sinergia entre ellas y mejora la reactividad con el suero hiperinmune de conejo y disminuye la reacción con el suero de conejo negativo.

7. Resultados.

7.1 Virus de referencia VDVB.

Al propagar el virus de referencia VDVB cepa NADL, obtuvimos un título de 10^9 DICC_{50%}/ml, una vez purificado por gradiente de sacarosa obtuvimos un título de $10^{6.5}$ DICC_{50%}/ml.

7.2 Sueros Hiperinmunes.

Los sueros hiperinmunes de 3 conejos donados por la QFB. Elvia Lazo García (Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, UNAM), se probaron y titularon por medio de ELISA con el virus de referencia VDVB NADL, el título obtenido fue de 1:1600, al mismo tiempo se probaron dos sueros de conejo inoculados con adyuvante únicamente como controles negativos (Neg 250609 y Neg Gonzalo) (Figura 7).

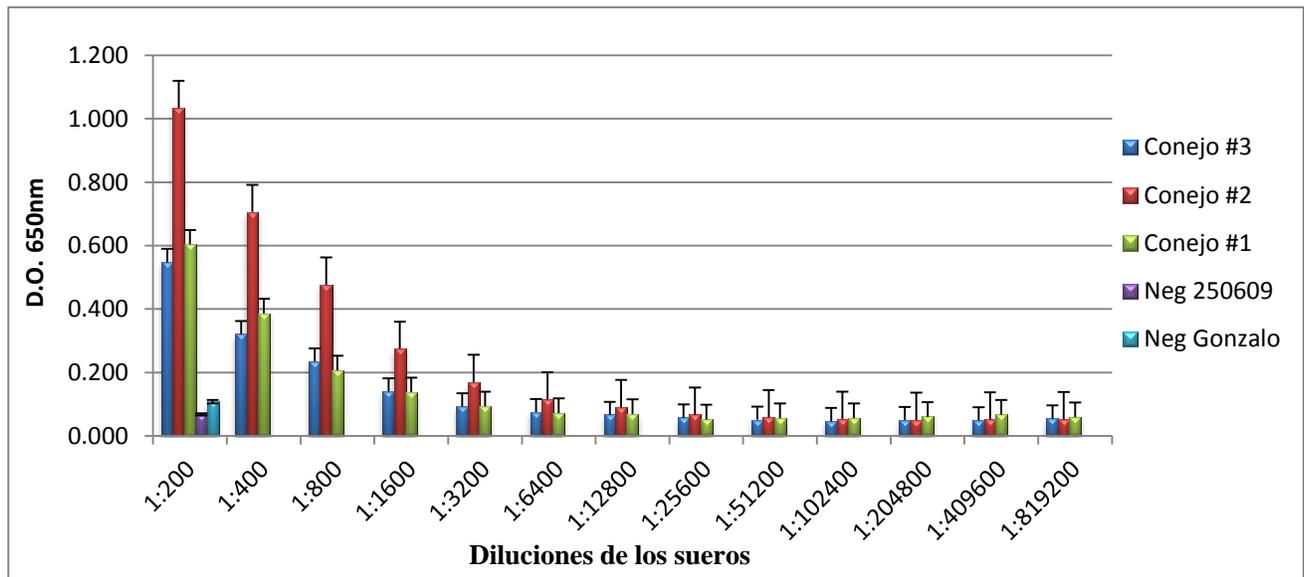


Figura 7. Ensayo de ELISA para la titulación de sueros hiperinmunes. Se inmovilizó el virus y se probaron varias diluciones de los sueros de conejo, positivos y negativos al VDVB.

7.3 Bioselecciones.

Las bibliotecas de Phage Display, son fagos (M13) utilizados como vectores modificados en su genoma para que desplieguen péptidos de fusión en la proteína pIII, sin afectar su infectividad ya que esta proteína modula la infectividad del fago ya que se une al pilus sexual (F') de la célula bacteriana, el fago expresa 5 copias de esta proteína y cada copia puede transportar los péptidos desplegados. Todas las librerías tienen una complejidad de 10^9 clonas independientes, lo que nos permite codificar casi todas las posibles combinaciones de 7 nucleótidos. Para realizar las rondas de bioselección se utilizó como antígeno de captura el suero de conejo hiperinmune número 3 inoculado con VDVB NADL, (Se eligió este suero debido a que de este nos proporcionaron mayor cantidad). Se realizaron 5 rondas de selección de las bibliotecas Ph.D.TM-7, y Ph.D.TM-C7C (BioLabs® Inc., New England) al final de cada ronda de bioselección se realizó la titulación correspondiente. El aumento en el título de los fagos eluidos nos indica el aumento en la especificidad de los péptidos que estamos obteniendo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Título de fagos de salida durante la selección contra anticuerpos de VDVB (suero hiperinmune) con librerías comerciales.

Ronda de Bioselección	Número de fagos eluidos (UFP)	
	Ph.D.-7 TM	Ph.D.-C7C TM
1	1.5×10^5	1.5×10^5
2	2.3×10^5	1.36×10^7
3	7.8×10^6	6.80×10^7
4	8.4×10^7	7.20×10^7
5	1.02×10^{10}	5.40×10^7

*UFP= Unidades formadoras de placa.

7.4 Ensayos de unión.

Se seleccionaron 10 clonas al azar de cada ronda a partir de la 3^a bioselección. Estas clonas fueron retadas con suero de conejo inmunizado y no inmunizado para evaluar su especificidad por medio de pruebas de ELISA. En la selección de la biblioteca Ph.D.-7 obtuvimos dos clonas reactivas, una de la 4^a ronda y otra de la 5^a ronda (clona 4C3 y 5C4) (Figura 8). En la selección de la biblioteca Ph.D.-C7C, la cual despliega péptidos flanqueados por cisteínas dándole una conformación de bucle unidos por puentes disulfuro, obtuvimos reactividad en 5 clonas de la 3^a ronda, 8 de la 4^a ronda y 9 de la 5^a ronda (clona 3C1, 3C3, 3C7, 3C9, 3C10, 4C6, 4C7, 4C8, 5C2, 5C3, 5C5, 5C6, 5C7, 5C8) (Figura 9). Como control negativo se utilizó el fago M13 silvestre, el cual fue retado con los sueros utilizados y en ambos casos la densidad óptica observada se mantuvo por debajo de las clonas que consideramos como positivas. (Figuras 8 y 9).

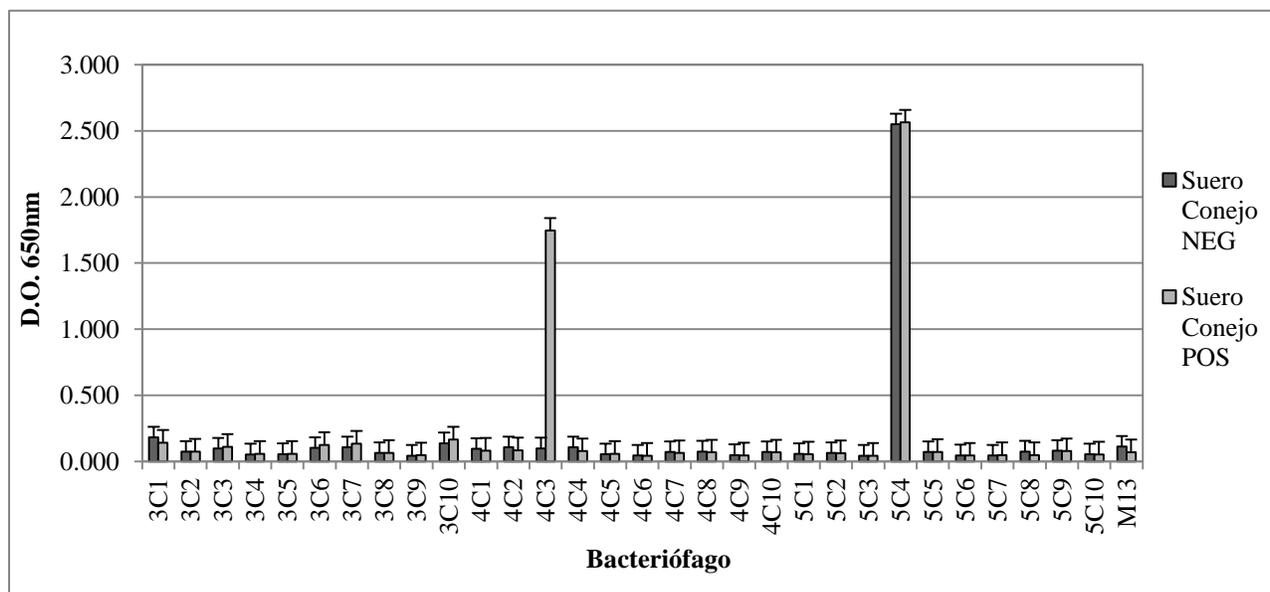


Figura 8. Ensayo de ELISA para determinar la unión con la Biblioteca Ph.D.TM-7, se utilizaron como blanco los sueros de conejo negativo y positivo al VDVB, y se probaron las clonas obtenidas en las bioselecciones.

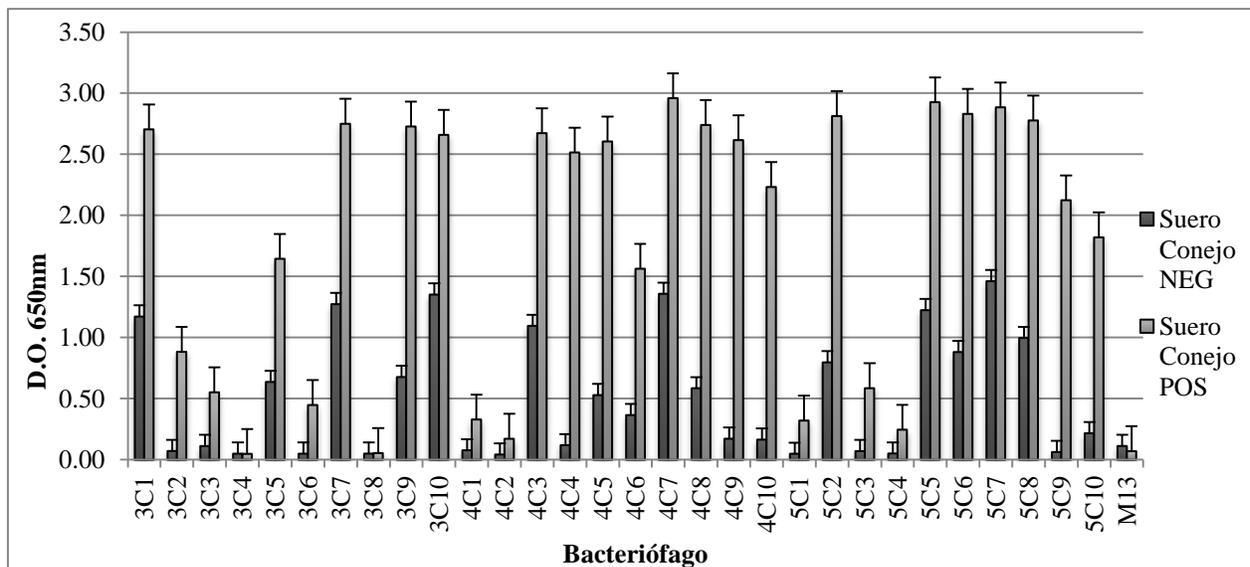


Figura 9. Ensayo de ELISA para determinar la unión con la Biblioteca Ph.D.TM-C7C y suero de conejo positivo y negativo al VDVB. Se seleccionaron 14 clones (clona 3C1, 3C3, 3C7, 3C9, 3C10, 4C6, 4C7, 4C8, 5C2, 5C3, 5C5, 5C6, 5C7, 5C8).

7.5 Análisis de las clonas secuenciadas.

Se seleccionaron las clonas más reactivas de cada biblioteca para su secuenciación. El criterio de selección fue debido a su alta densidad óptica y reproducibilidad en los ensayos de ELISA, seleccionando así 2 clonas de la biblioteca Ph.D-7TM (Clonas 4C3 y 5C4) y 14 de la biblioteca Ph.D.-C7CTM (clonas 3C1, 3C3, 3C7, 3C9, 3C10, 4C6, 4C7, 4C8, 5C2, 5C3, 5C5, 5C6, 5C7, 5C8). Adicionalmente se decidió secuenciar dos clonas no reactivas en el ensayo de unión como controles negativos, una clona de cada biblioteca.

De las secuencias obtenidas de la biblioteca Ph.D.-C7CTM, se observó que la secuencia de los péptidos desplegados por las clonas fueron idénticas (“VNKDG EY”). En el caso de las secuencias obtenidas de la biblioteca Ph.D.-7TM, donde obtuvimos dos clonas reactivas, se observó en la clona 4C3 una secuencia de aminoácidos “SNIFAQM” y en la clona 5C4 la secuencia “KNISITR”. Ninguna

de las dos secuencias de las clonas negativas estuvo relacionada con las positivas (Figura 10).

4C3 PhD.7 Pos													
		1	2	3	4	5	6	7					
TCT		AAT	ATT	TTT	GCT	CAG	ATG	GGT	GGT	GGA	GGT	TCG	
Ser		Asn	Ile	Phe	Ala	Gln	Met	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
S		N	I	F	A	Q	M	G	G	G	G	S	

3C10 3C1, 3C3, 3C7, 3C9, 3C10, 4C7, 4C8, 5C2, 5C3, 5C5, 5C7, 5C8, 5C6, 4C6

PhD-C7C Pos														
		1	2	3	4	5	6	7						
TCT	GCT	TGT	GTG	AAT	AAG	GAT	GGT	GAG	TAT	TGC	GGT	GGA	GGT	TCG
Ser	Ala	Cys	Val	Asn	Lys	Asp	Gly	Glu	Tyr	Cys	Gly	Gly	Gly	Ser
S	A	C	V	N	K	D	G	E	Y	C	G	G	G	S

4R PhD.7 no reactiva													
		1	2	3	4	5	6	7					
TCT		CAG	GGG	TCG	TTG	GCT	CGG	ACG	GGT	GGA	GGT	TCG	
Ser		Gln	Gly	Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Gly	Gly	Gly	Ser	
S		Q	G	S	L	A	R	T	G	G	G	S	

3C2 PhD-C7C no reactiva														
		1	2	3	4	5	6	7						
TCT	GCT	TGT	CTT	CAG	TCG	CTG	ATT	AGG	CAT	TGC	GGT	GGA	GGT	TCG
Ser	Ala	Cys	Leu	Gln	Ser	Leu	Ile	Arg	His	Cys	Gly	Gly	Gly	Ser
S	A	C	L	Q	S	L	I	R	H	C	G	G	G	S

5C4 PhD.7 reactiva con suero pos y neg													
		1	2	3	4	5	6	7					
TCT		AAG	AAT	ATT	TCT	ATT	ACG	CGG	GGT	GGA	GGT	TCG	
Ser		Lys	Asn	Ile	Ser	Ile	Thr	Arg	Gly	Gly	Gly	Ser	
S		K	N	I	S	I	T	R	G	G	G	S	

Figura 10. Resultados de la secuenciación. Señalados en rojo y en verde está el último aminoácido de los sitios de restricción, en color gris los aminoácidos antes y después de la secuencia de interés dependiendo de la biblioteca utilizada y al centro en negritas se encuentran los 7 aminoácidos insertados.

Al realizar un alineamiento de las secuencias obtenidas con la base de datos del GenBank, encontramos similitudes con la glicoproteína E2 del VDVB (Cuadro 2 y Figura 11). La figura 11B muestra el esquema de la gE2, en donde observamos que los mimotopos seleccionados en la región DA y DB.

Cuadro 2. Análisis de las secuencias obtenidas.

Clona de Fago	Biblioteca	Aminoácidos a)	DVB 1 GenBank: JQ418634.1	DVB 2 GenBank U18059.1
3C1, 3C3, 3C7, 3C9, 3C10, 4C7, 4C8, 5C2, 5C3, 5C5, 5C7, 5C8, 5C6, 4C6	Ph.D.-C7C™	VNK DGEY	Bovine viral diarrhea virus 1 structural glycoprotein E2 protein gene	Bovine viral diarrhea virus 2 isolate, Border disease virus strain C413
4C3	Ph.D.-7™	NIF AQMG	Bovine viral diarrhea virus 1 E2 gene for structural glycoprotein E2	Bovine viral diarrhea virus 2 isolate, Classical swine fever virus strain 85-12A, Border disease virus strain C413

a) Los aminoácidos conservados con VDVB-I y VDVB-II en los péptidos seleccionados se muestran en rojo.

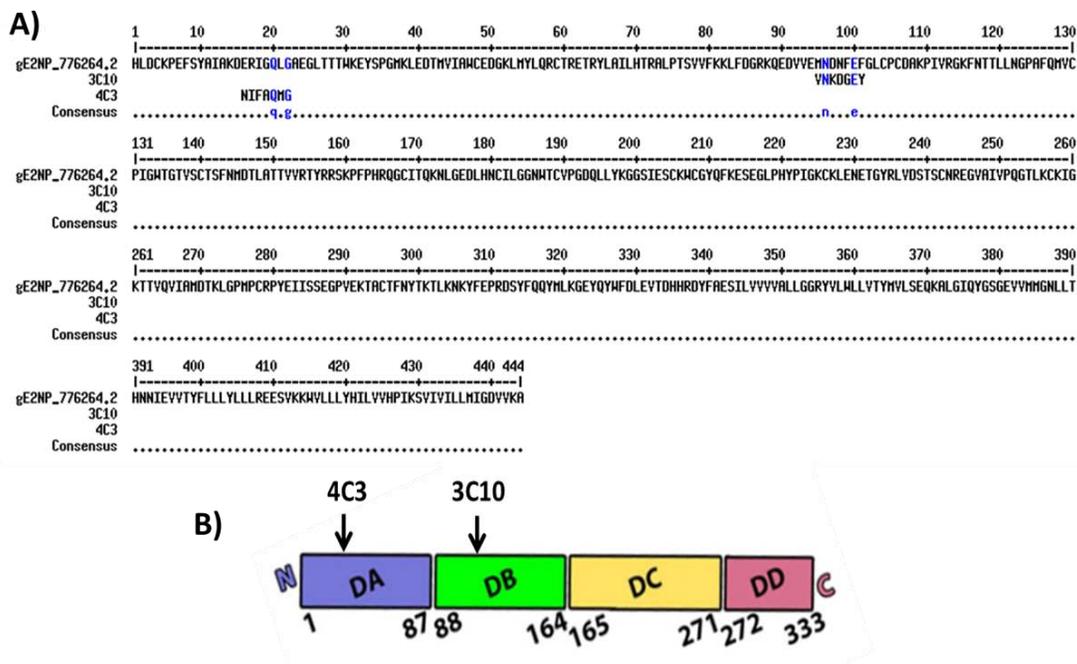


Figura 11. Alineamiento de las secuencias de los péptidos seleccionados. A) Alineamiento de las clonas reactivas 4C3 y 3C10 con la secuencia de la glicoproteína E2 del VDVB y B) Representación esquemática del sitio donde se encuentran los mimotopos seleccionados.

7.6 Pruebas de reactividad y sinergia.

Una vez obtenidos los resultados de las secuencias de las clonas, decidimos trabajar con el fago 4C3 de la biblioteca Ph.D.-7, y el fago 3C10 como representativo de la biblioteca Ph.D.-C7C. Se realizaron varias diluciones de los fagos y fueron fijados en placas de ELISA, posteriormente estos fueron detectados con suero de conejo inmune y no inmune al VDVB (1:300). Observamos una mayor especificidad con el fago 4C3, ya que este no era reconocido en ninguna condición por el suero no inmune, mientras que con el suero inmune se observó una disminución de la señal dependiente de la dilución. La clona 3C10 sí fue reconocida por el suero no inmune, sin embargo; la señal fue disminuyendo con las diluciones del fago, mientras que la señal del suero inmune permaneció constante. El mismo efecto se observó al mezclar ambas clonas, vemos que con cada dilución nuestro suero positivo logra mantenerse y bajamos la reactividad del negativo (Figura 12).

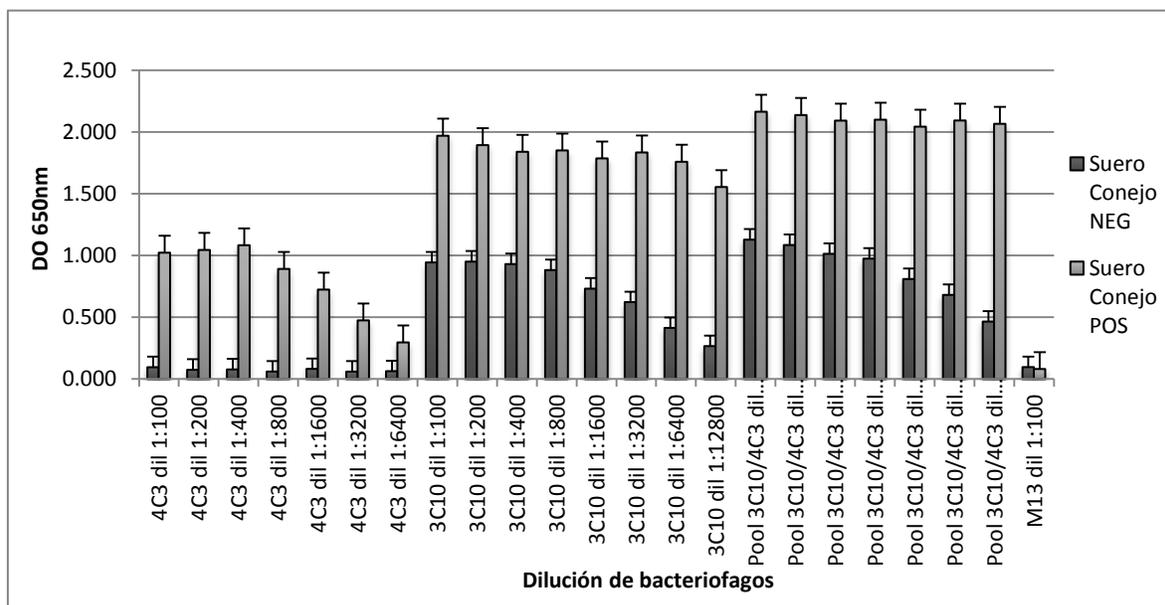


Figura 12. Ensayo de ELISA para determinar la reactividad de las clonas 4C3 y 3C10 en diferentes diluciones. Utilizando como blanco los sueros de conejo y una mezcla de ambas (Pool 3C10/4C3).

Para corroborar nuestros resultados se realizó un ensayo probando dos diluciones distintas de cada clona, de la clona 4C3 se eligió la dilución 1:100 y de la clona 3C10 la dilución 1:6400, que son las condiciones en donde observamos mayor reactividad en el suero positivo y menor en el suero negativo. Se probaron las clonas individualmente y en combinación y observamos que no se encuentra un efecto sinérgico, ni aditivo (Figura 13).

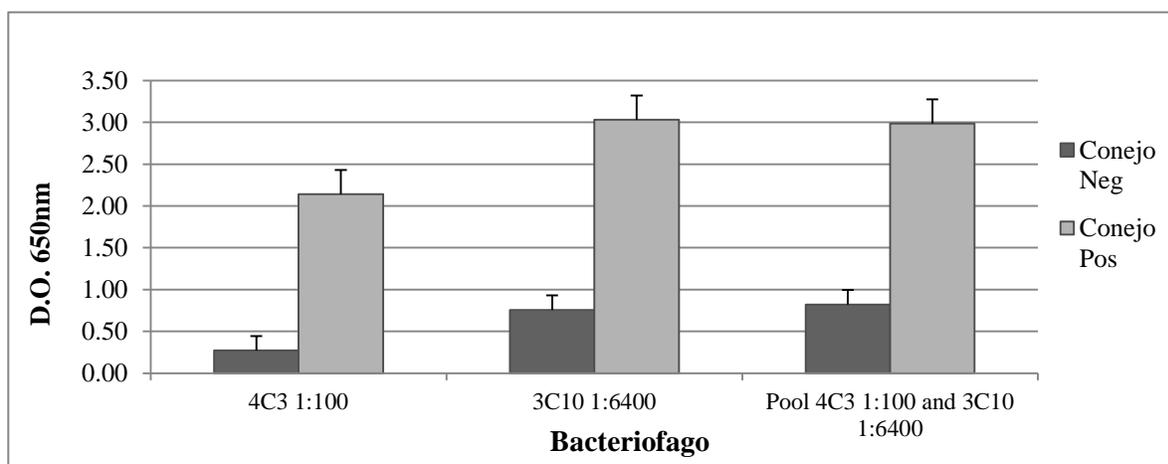


Figura 13. Ensayo de ELISA para determinar el efecto de sinergia usando las clonas 4C3 y 3C10 en condiciones óptimas. Se usaron como blanco los sueros de conejo y se realizó una mezcla de 4C3 y de 3C10.

7.7 ELISA para seleccionar sueros de bovinos negativos y positivos al virus de referencia.

Con la finalidad de seleccionar sueros de bovino negativos y positivos al VDVB se realizó un ensayo de ELISA con el virus de referencia con sueros previamente analizados mediante una ELISA comercial (IDEXX). De los 9 sueros de bovino, los que nos interesaron fueron: el suero de bovino del centro de CEPIPSA con el número de identificación 3361, el cual tuvo una lectura de densidad óptica de 0.809 en la dilución 1:200, que debido a su estabilidad y

reactividad se escogió como control positivo de suero de bovino para los ensayos posteriores de ELISA, y el suero 12 del CEDISACH Chihuahua del cual obtuvimos una densidad óptica de 0.084, como control negativo de bovino (Figura 14).

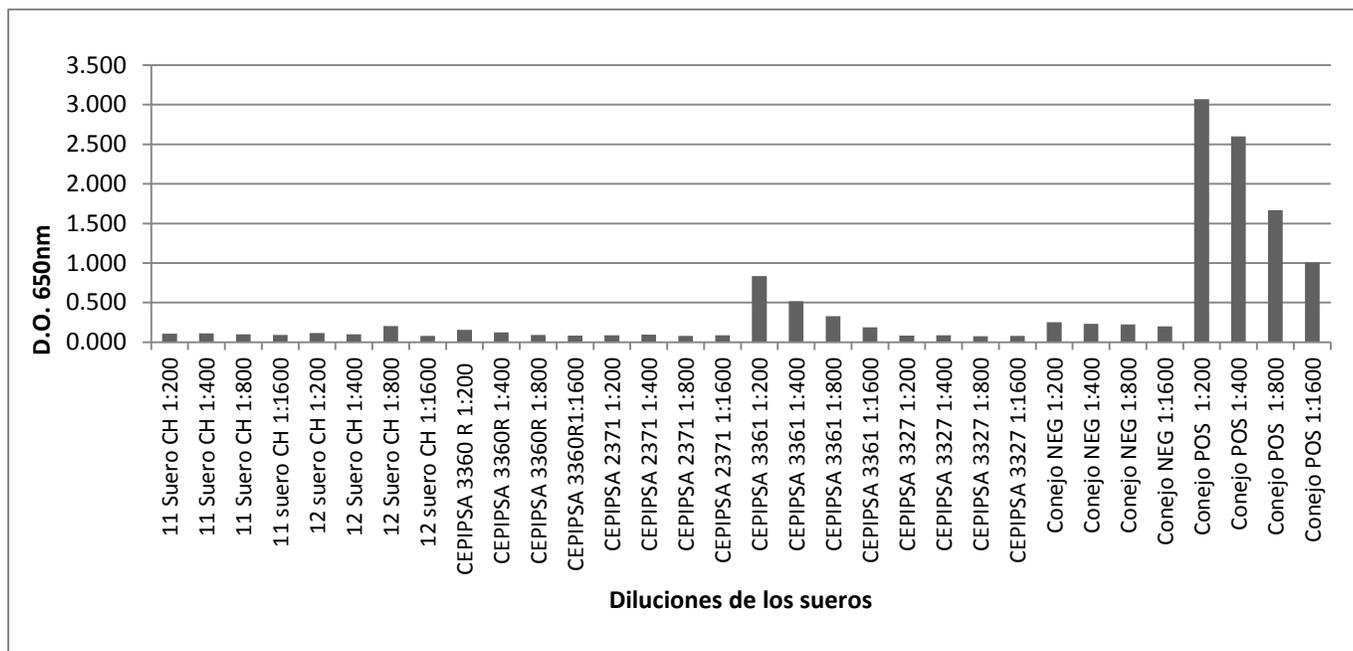


Figura 14. Ensayo de ELISA con el virus de referencia VDVB, para seleccionar sueros de bovino negativos (CEDISACH-Chihuahua) y positivos (FMVZ CEPIPSA Topilejo), adicionalmente se usaron los sueros de conejo positivo y negativo al VDVB como referencia.

7.8 ELISA para probar clonas seleccionadas con sueros de bovino negativo y positivo al virus de referencia.

Al realizar las pruebas de unión por medio de distintos formatos de ELISA para evaluar las clonas con mayor reactividad con los sueros de bovino, observamos que la señal obtenida es mayor o igual que con el fago M13 silvestre. También se analizaron clonas que fueron negativas a la prueba de unión al suero de conejo hiperinmune, esto nos indica que los sueros de bovino poseen de manera natural reactividad contra el fago M13 (Figura 15, 16 y 17).

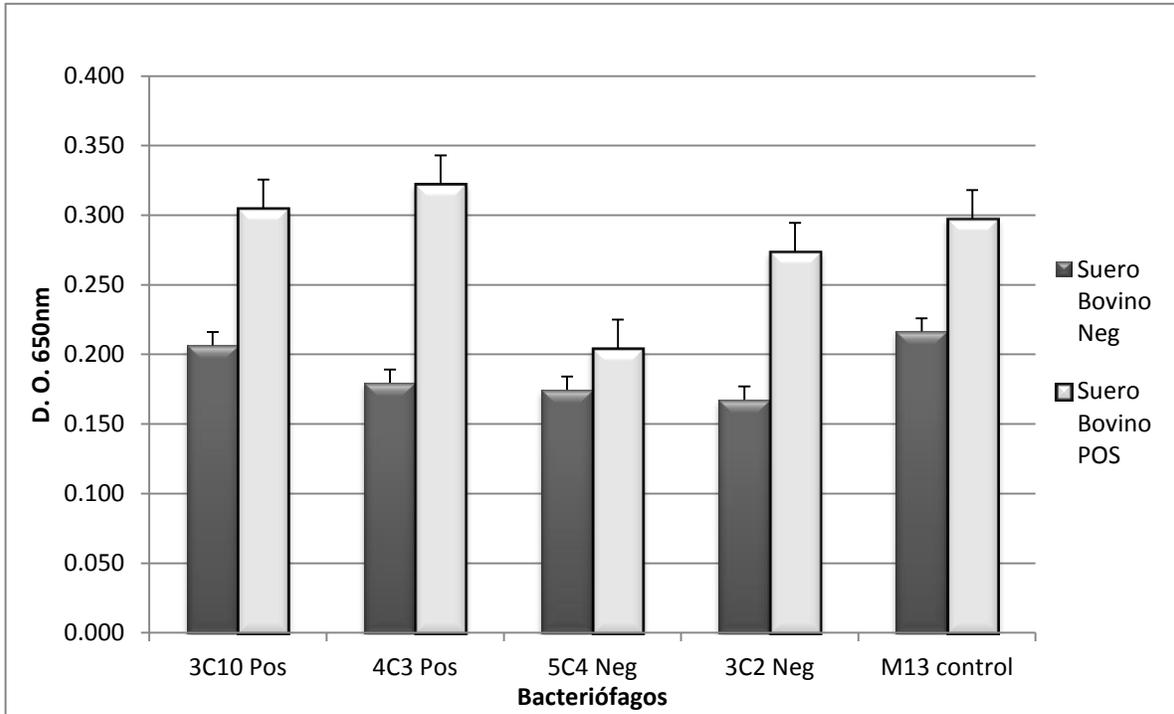


Figura 15. Ensayo de ELISA con suero positivo y negativo de bovino, sensibilizando con anti-M13, probando clonas reactivas y clonas negativas, así como un fago silvestre.

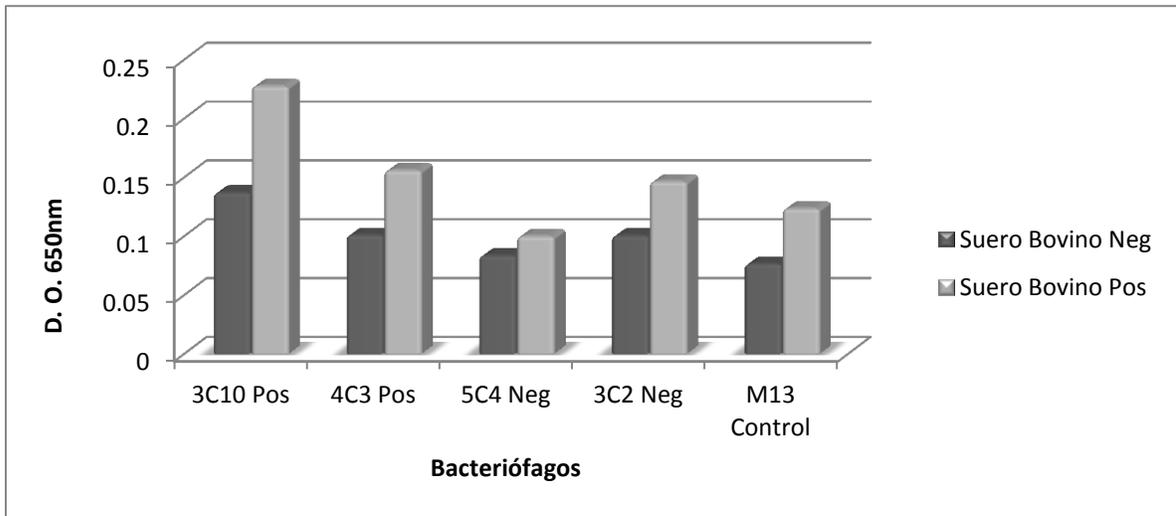


Figura 16. Ensayo de ELISA sensibilizando con los sueros positivo y negativo de bovino, probando las clonas negativas y positivas en las bioselecciones así como un fago silvestre.

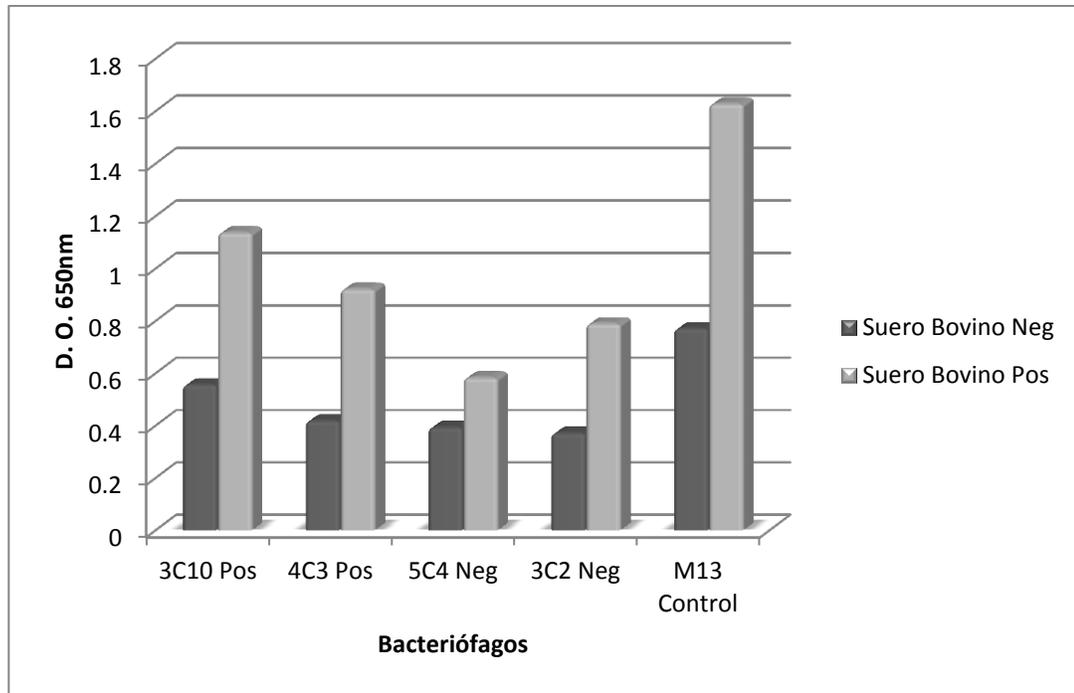


Figura 17. Ensayo de ELISA con los sueros positivo y negativo de bovino sensibilizando con los fagos positivos y negativos en las bioselecciones así como un fago silvestre.

8. Discusión.

El virus de la diarrea viral bovina ha representado por más de medio siglo pérdidas económicas importantes en la industria de ganado bovino de leche y carne, así como en otras poblaciones de rumiantes alrededor del mundo (Pogranichniy et al., 2011). La prevalencia de especies, subgenotipos y variantes antigénicas varía según la región geográfica (Ridpath, 2010), lo que complica el diagnóstico serológico, diversos estudios se han realizado con la finalidad de desarrollar técnicas con una alta sensibilidad y especificidad, sin embargo algunos son costosos, ya sea por el uso de anticuerpos monoclonales, la obtención de antígenos recombinantes o el trabajar con aislados virales.

El objetivo de nuestro trabajo fue buscar mimotopos para el virus de la VDVB, mediante la técnica de Phage Display, lo cual nos evita el crecimiento del virus, así como la disminución de los costos para un laboratorio de diagnóstico o inclusive la producción de vacunas.

En nuestro trabajo la selección de fagos en la biblioteca de péptidos flanqueados por cisteínas resultó más específica, es decir, solo obtuvimos una secuencia, en repetidas ocasiones y en diferentes clonas **“VNKDGEY”** (3C10), mientras que en la biblioteca de 7 aminoácidos lineal, obtuvimos dos clonas diferentes altamente reactivas con diferente secuencia, 4C3 **“NIFAQMG”** y 5C4 **“KNISITR”**. La clona 5C4 se consideró inespecífica debido a que mostró una alta reactividad tanto en sueros de conejo positivo y negativo a VDVB (Fig. 8).

Las clonas altamente reactivas (3C10 **“VNKDGEY”** y 4C3 **“NIFAQMG”**) se compararon con secuencias de aminoácidos de los dos genotipos virales (VDVB 1 y 2), observamos homología con regiones que se encuentran en glicoproteína estructural E2 del virus, la cual se considera la más inmunogénica. E2 es una glicoproteína estructural que se encuentra en la envoltura del virión, y que tiene

una función muy importante en la unión con los receptores de la superficie celular, se sabe que su principal ligando es el CD46 presente en diversos ungulados, también participa en la fusión de membrana, el ensamblaje del virus y maduración de los viriones. Durante el ensamblaje del virus se forman homodímeros E2 tempranos, mientras que los heterodímeros de E1-E2 se forman más tarde después de la liberación de E1 en el retículo endoplásmico (El Omari et al., 2013). Ésta glicoproteína consiste de 444 aminoácidos, un ectodominio N terminal y un C terminal, en éste último se encuentran 30 aminoácidos que funcionan como anclaje (Donofrio et al., 2006). Ésta proteína es genética y antigénicamente variable (Kalaycioglu et al., 2012), el contar con mimótopos de sitios antigénicos de esta proteína que puedan ser utilizados para el diagnóstico provee una herramienta muy útil.

Cabe señalar que la glicoproteína E2 induce la producción de anticuerpos neutralizantes (Donofrio et al., 2006; Van Rijn et al., 1997), se ha demostrado que el dominio N terminal es el más inmunogénico y posee epítopes variables que pueden ser usados para estudiar la diversidad molecular y serológica de los virus de VDVB.

Omari K. *et al* 2013, reportó la estructura del cristal correspondiente a la región N terminal de la glicoproteína E2, en donde es posible localizar 4 regiones estructuralmente importantes, la región DA (AA 1-87), DB (AA 88-164), DC (AA 165-271) y DD (AA 272-333), los mimotopos obtendios de las clonas 4C3 y 3C10 tienen homología con las regiones DA y DB respectivamente, por lo que consideramos que nuestros resultados pueden funcionar como mimótopos de sitios antigénicos y poder ser utilizados en el desarrollo de un sistema de ELISA.

En la búsqueda de alineamientos en el Gene Bank, también observamos cierta homología con regiones conservadas de otros pestivirus, en el caso de la 3C10 de la biblioteca flanqueada por cisteínas con el virus de enfermedad de las fronteras y en la biblioteca lineal 4C3 con el virus de fiebre porcina clásica, por lo

que para verificar la especificidad de nuestros mimotopos es necesario enfrentarlos con sueros positivos y negativos a estos dos virus.

Cuando se probaron las clonas 4C3 y 3C10 para verificar su reactividad con sueros de bovino negativos y positivos al VDVB, pudimos observar reactividad en algunos casos con sueros negativos y con el fago M13 silvestre (Figuras, 15, 16 y 17), para comprobar si este efecto era real, se utilizaron varios formatos de ensayos de ELISA (Figura 6), obteniendo los mismos resultados. Una posible explicación es que el suero de bovino contiene naturalmente anticuerpos contra el fago M13. Por lo que, consideramos que es necesario sintetizar los péptidos y de esta manera se podrían utilizar como antígenos en una prueba de ELISA, eliminando de esta manera reacciones inespecíficas. Como se ha utilizado en Fiebre Porcina Clásica (Batonick et al., 2013).

Con la finalidad de tomar una decisión en cuanto a la síntesis de los péptidos probamos una mezcla de ellos (4C3 y 3C10), que podría resultar en un efecto sinérgico o aditivo. Para lo cual se realizaron ensayos de ELISA usando una mezcla de las clonas (Figura 13), en los cuales observamos que no se encontró un efecto sinérgico ni aditivo, la clona 3C10 es más reactiva sin mostrar un aumento o disminución.

Consideramos que los péptidos que reportamos se pueden utilizar para una prueba diagnóstica para identificar si existen anticuerpos contra el virus del VDBV en sueros de bovino. Un posible uso adicional es en el desarrollo de vacunas específicas.

9. Conclusión.

Mediante la técnica de Phage Display se seleccionaron péptidos específicos al VDVB por medio de sueros hiperinmunes de conejos inoculados con la cepa NADL. Al analizar la reactividad de las clonas y su secuencia, obtuvimos 2 clonas de interés, que mostraron una alta reactividad y homología similar a una región de la gE2 del virus.

Consideramos que los péptidos que reportamos se pueden utilizar para una prueba diagnóstica para identificar si existen anticuerpos contra el virus del VDBV en sueros de bovino, sin embargo no se pueden utilizar a los fagos expresando a estos mimotopos debido a los anticuerpos naturales que poseen los bovinos ante los fagos, no obstante estos mimotopos pueden utilizarse para estudios posteriores.

Por lo que se puede concluir que el uso de phage display permite la identificación de epítomos/mimotopos específicos para el virus de la diarrea viral bovina.

10. Perspectivas.

Se mandarn sintetizar cada péptido por triplicado incluyendo tres glicinas después de cada secuencia y como sugerencia en el manual de Phage Display adicionar una cola de lisinas en el carboxilo terminal (Batonick et al., 2013), esto para aumentar la solubilidad del péptido durante la síntesis (Cuadro 3).

Una vez obtenidos los péptidos para confirmar su habilidad para unirse a los anticuerpos contra el VDVB, se deberá realizar una prueba de ELISA, cubriendo con cada péptido sintetizado para evaluar su reactividad con el suero de conejo positivo y negativo al VDVB. Para después probar con los sueros de bovino positivo y negativo y evaluar si se puede utilizar como prueba diagnóstica. Así como, verificar su especificidad mediante el uso de sueros positivos y negativos a los virus de fiebre porcina clásica y enfermedad de las fronteras.

Así mismo otro uso que podemos hacer de estos péptidos sintetizados es inocularlos en ratones, para evaluar si estos producen anticuerpos contra el virus y realmente comprobar que mimetizan epítopos del virus.

Cuadro 3. Secuencia de los péptidos seleccionados.

Nombre del péptido	Secuencia del péptido
3C10	ACVNKDGEYCGGGACVNKDGEYCGGGACVNKDGEYCGKKK
4C3	NIFMQMGGGGNIFMQMGGGGNIFMQMGGKKK

Anexo A. Abreviaturas.

1. ADN: Ácido desoxirribonucleico.
2. ARN: Ácido ribonucleico.
3. ATCC: Por sus siglas en inglés American Type Culture Collection.
4. CP: Citopático.
5. DMEM: Por sus siglas en inglés; Dulbecco's Modified Eagle's Medium.
6. DICC: Dosis infectantes en cultivo celular.
7. ECP: Efecto citopático.
8. g: gramos.
9. HRP: Peroxidasa de rábano.
10. Kb: kilobase.
11. Lt: Litros.
12. MDBK: Línea celular de epitelio de riñón de bovino.
13. ml: mililitro.
14. NCP: No citopático.
15. Ph.D: Phage Display.
16. rpm: Revoluciones por minuto.
17. TMB: 3,3',5,5;-Tetramethylbenzidine.
18. UFP: Unidades Formadoras de Placa.
19. VDVB: Virus de la Diarrea Viral Bovina.

Anexo B. Reactivos.

- Virus de referencia ATCC de Diarrea Viral Bovina cepa NADL (Catálogo No. VR-1422).
- Células Madin-Darby bovine kidney (MDBK CCL-22).
- Anti-conejo sin conjugar (Goat anti-Rabbit IgG Fc fragment unconjugated Pierce® Product 31216).
- Anti-Conejo conjugado (Goat anti-Rabbit Sigma-Aldrich anti-rabbit IgG (Whole molecule)-peroxidase antibody).
- Anti-fago M13 conjugado (Mouse anti M13 [HRP] (gpVIII) monoclonal conjugado. GE Healthcare 27-9421-01.
- Anti-bovino sin conjugar (Rabbit anti-bovine IgG, Fc (unconjugated) Novus Biologicals NBP1 – 72769.
- Anti-bovino conjugado (Rabbit anti-bovine IgG, Fc [HRP] polyclonal Novus Biologicals NBPI – 73581.
- Anti- fago M13 sin conjugar (Rabbit anti M13 bacteriófago unconjugated, phage coat proteins of fd phage. Polyclonal. Novus Biologicals NB 100-1633.
- Polietilenglicol (PEG 8000, Sigma-Aldrich, P5413, St. Louis, USA).
- Tween 20 (Polyoxyethylene-20, Biotech, CAS#9005-64-5).
- TMB Single Solution (Ready-to-use) Life Technologies, Cat. 00-2023.
- Leche descremada (Skim Milk, DIFCO, Cat. 232100).
- TMB solución simple cromógeno para ELISA (TMB Single Solution, Life Technologies, Cat.2023).

Anexo C. Medios y Soluciones.

Medio para cultivo celular

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium Cellgro Cat. No. 50-003-PB)
- Suero fetal equino (Cat. No. H1270 Sigma)

Se prepara el medio DMEM con agua destilada y se adiciona el 10% de suero equino, se ajusta el pH de 7.2 - 7.4 para después esterilizarse por filtración con membrana de 0.22 μ m y se resguarda en oscuridad a 4°C.

Medio Mínimo 1Lt 10x

- Na₂HPO₄ 60g
- Na₂HPO₄7H₂O 128g
- KH₂PO₄ 30g
- NaCl 5g
- NH₄Cl 10g.
- Glucosa 0.2% v/v.
- Glucosa 400 μ l al 20%
- Ajustar pH a 7.4 con NaOH.
- Agregar Tiamina al 1% (20 μ l a cada caja).
- Mg₂SO₄ 1M (40 μ l a cada caja).

Medio LB 1Lt

- Bacto Triptona 10g
- Extracto de Levadura 5g
- NaCl (cloruro de Sodio) 5g

Autoclavear y guardar a Temperatura Ambiente.

Agar LB

- Al medio LB agregar 15gr de agar bacteriológico.
- Autoclavear y guardar a Temperatura Ambiente.

IPTG/Xgal Stock

- IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside) 1.25g.
- Xgal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) 1g.
- Mezclar en 25ml de DMF (dimethyl formamide).
- Guardar a -20°C.

Placas LB/IPTG/Xgal

- Medio LB 1Lt.
- Agar 15g.

Autoclavear y enfriar a $>70^{\circ}\text{C}$ y agregar 1ml IPTG/Xgal Stock por litro y plaquear, guardar a 4°C en obscuridad.

TOP Agar

- Bacto Triptona 10g
- Extracto de levadura 5g
- NaCl 5g
- Agar bacteriológico 7g

Solución de Bloqueo para bioselecciones

- NaHCO_3 0.1 M (pH 8.6)
- Leche descremada 5%
- Esterilizar por filtrado y guardar a 4°C

Solución de Bloqueo para ELISA

- PBS
- Leche descremada 2%

Mezclar y utilizar en el momento.

TBS

- Tris-HCl 50 mM (pH 7.5).
- NaCl 150 mM.

Autoclavear, guardar a temperatura ambiente.

PEG/NaCl

- Polyethylene glycol-8000 (w/v) 20%.
- NaCl 2.5 M.

Autoclave, mezclar bien y combinar las capas mientras este tibio. Guardar a temperatura ambiente.

Solución de carbonatos

- 0.1M NaHCO₃ pH8.6

Solución TN

- Tris-HCl 50 mM.
- NaCl 0.1 M
- pH 7.5

Solución TNE

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

PBS 1 Lt

- NaCl 8gr
- KCl 0.2gr
- Na₂HPO₄ 0.96gr
- KH₂PO₄ 0.2gr

Aforar a 1Lt pH 7.4 esterilizar autoclave.

Solución de Ioduro

- Tris-HCl 10mM (pH 8.0)
- Ioduro de Sodio (NaI) 4M
- EDTA 1mM

Mezclar y conservar a temperatura ambiente en la oscuridad.

Lista de figuras.

Figura 1. Representación esquemática de la estructura del cristal mostrando los cuatro dominios DA, DB, DC y DD.

Figura 2. Esquema del sistema de Phage Display.

Figura 3. Formato utilizado para la titulación de los sueros hiperinmunes.

Figura 4. Formato utilizado para los ensayos de unión.

Figura 5. Formato utilizado para probar sueros de bovino con virus de referencia.

Figura 6. Formatos utilizados para probar clonas con sueros de bovino negativo y positivo.

Figura 7. Ensayo de ELISA para la titulación de sueros hiperinmunes de conejo.

Figura 8. Ensayo de ELISA para la determinar la unión con la Biblioteca Ph.D.TM-7.

Figura 9. Ensayo de ELISA para la determinar la unión con la Biblioteca Ph.D.TM-C7C.

Figura 10. Resultados de la secuenciación.

Figura 11. Alineamiento de las clonas reactivas 4C3 y 3C10 con la glicoproteína E2.

Figura 12. Ensayo de ELISA para determinar la reactividad en diferentes diluciones y sinergia.

Figura 13. Ensayo de ELISA para determinar el efecto de sinergia.

Figura 14. Ensayo de ELISA con el virus DVB NADL para seleccionar sueros de bovino.

Figura 15. Ensayo de ELISA sensibilizando con M13.

Figura 16. Ensayo de ELISA sensibilizando con los sueros de bovino.

Figura 17. Ensayo de ELISA sensibilizando con fagos.

Lista de cuadros.

Cuadro 1. Título de fagos de salida durante la selección contra anticuerpos de VDVB (suero hiperinmune) con librerías comerciales.

Cuadro 2. Análisis de las secuencias obtenidas.

Cuadro 3. Secuencia de los péptidos seleccionados.

Referencias.

Ackermann, M.R., Derscheid, R., Roth, J.A., 2010. Innate immunology of bovine respiratory disease. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 26, 215-228.

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. *Journal of virology* 78, 2414-2425.

Ahn, B.C., Walz, P., Kennedy, G.A., Kapil, S., 2005. Biotype, Genotype, and Clinical Presentation Associated With Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) Isolates From Cattle. *JOURNAL OF APPLIED RESEARCH IN VETERINARY MEDICINE* 3, 319.

Ammari, M., McCarthy, F.M., Nanduri, B., Pinchuk, L.M., 2010. Analysis of Bovine Viral Diarrhoea Viruses-infected monocytes: identification of cytopathic and non-cytopathic biotype differences. *BMC bioinformatics* 11, S9.

Autio, T., Pohjanvirta, T., Holopainen, R., Rikula, U., Pentikäinen, J., Huovilainen, A., Rusanen, H., Soveri, T., Sihvonen, L., Pelkonen, S., 2007. Etiology of respiratory disease in non-vaccinated, non-medicated calves in rearing herds. *Veterinary microbiology* 119, 256-265.

Avalos-Ramirez, R., Orlich, M., Thiel, H.-J., Becher, P., 2001. Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology* 286, 456-465.

Batonick, M., Loeffen, W., Metwally, S.A., Mayr, G.A., 2013. Identification and characterization of mimotopes of classical swine fever virus E2 glycoprotein using specific anti-E2 monoclonal antibodies. *Virus research* 175, 12-19.

Castel, G., Chtéoui, M., Heyd, B., Tordo, N., 2011. Phage display of combinatorial peptide libraries: application to antiviral research. *Molecules* 16, 3499-3518.

Donofrio, G., Bottarelli, E., Sandro, C., Flammini, C.F., 2006. Expression of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E2 as a soluble secreted form in a Mammalian cell line. *Clinical and vaccine immunology* 13, 698-701.

Duignan, P.J., Saliki, J.T., St. Aubin, D.J., House, J.A., Geraci, J.R., 1994. Neutralizing antibodies to phocine distemper virus in Atlantic walrus (*Odobenus rosmarus rosmarus*) from Arctic Canada. *Journal of Wildlife Diseases* 30, 90-94.

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 reports* 3, 30-35.

Evermann, J.F., Ridpath, J.F., 2002. Clinical and epidemiologic observations of bovine viral diarrhoea virus in the northwestern United States. *Veterinary microbiology* 89, 129-139.

Fray, M., Paton, D., Alenius, S., 2000. The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. *Animal Reproduction Science* 60, 615-627.

Gevorkian, G., Manoutcharian, K., Almagro, J.C., Govezensky, T., Dominguez, V., 1998. Identification of autoimmune thrombocytopenic purpura-related epitopes using phage-display peptide library. *Clinical immunology and immunopathology* 86, 305-309.

Haq, I.U., Chaudhry, W.N., Akhtar, M.N., Andleeb, S., Qadri, I., 2012. Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. *Virol J* 9.

Houe, H., 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections. *Veterinary microbiology* 64, 89-107.

Kalaycioglu, A.T., Russell, P.H., Howard, C.R., 2007. Selection of mimotopes of Bovine Viral Diarrhoea Virus using a solid-phase peptide library. *Vaccine* 25, 7081-7086.

Kalaycioglu, A.T., Russell, P.H., Howard, C.R., 2012. The characterization of the neutralizing bovine viral diarrhea virus monoclonal antibodies and antigenic diversity of E2 glycoprotein. *The Journal of veterinary medical science/the Japanese Society of Veterinary Science* 74, 1117-1120.

Kay, B.K., Winter, J., McCafferty, J., 1996. *Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual*. Academic Press.

Leyh, R.D., Fulton, R.W., Stegner, J.E., Goodyear, M.D., Witte, S.B., Taylor, L.P., Johnson, B.J., Step, D.L., Ridpath, J.F., Holland, B.P., 2011. Fetal protection in heifers vaccinated with a modified-live virus vaccine containing bovine viral diarrhea virus subtypes 1a and 2a and exposed during gestation to cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus subtype 1b. *American journal of veterinary research* 72, 367-375.

Liang, D., Sainz, I.F., Ansari, I.H., Gil, L.H., Vassilev, V., Donis, R.O., 2003. The envelope glycoprotein E2 is a determinant of cell culture tropism in ruminant pestiviruses. *Journal of general virology* 84, 1269-1274.

Lindberg, A., Brownlie, J., Gunn, G., Houe, H., Moennig, V., Saatkamp, H., Sandvik, T., Valle, P., 2006. The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe: today and in the future. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 25, 961-979.

Matsubara, T., 2012. Potential of peptides as inhibitors and mimotopes: selection of carbohydrate-mimetic peptides from phage display libraries. *Journal of nucleic acids* 2012.

Meléndez Soto, R.M., Valdivia Flores, A.G., Rangel Muñoz, E.J., Díaz Aparicio, E., Segura-Correa, J.C., Guerrero Barrera, A.L., 2010. Factores de riesgo asociados a la presencia de aborto y desempeño reproductivo en ganado lechero de Aguascalientes, México. *Revista mexicana de ciencias pecuarias* 1, 391-401.

Pande, A., Carr, B., Wong, S., Dalton, K., Jones, I., McCauley, J., Charleston, B., 2005. The glycosylation pattern of baculovirus expressed envelope protein E2

affects its ability to prevent infection with bovine viral diarrhoea virus. *Virus research* 114, 54-62.

Pogranichniy, R.M., Schnur, M.E., Raizman, E.A., Murphy, D.A., Negrón, M., Thacker, H.L., 2011. Isolation and Genetic Analysis of Bovine Viral Diarrhea Virus from Infected Cattle in Indiana. *Veterinary medicine international* 2011.

Ridpath, J.F., 2010. Bovine viral diarrhoea virus: global status. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 26, 105-121.

Scott, J.K., Smith, G.P., 1990. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 249, 386-390.

Solis-Calderon, 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. *Preventive veterinary medicine* 72, 253-262.

Suzan, V.M., Onuma, M., Aguilar, R.E., Murakami, Y., 1983. Prevalence of bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3, bovine rotavirus, bovine viral diarrhoea, bovine adenovirus-7, bovine leukemia virus and bluetongue virus antibodies in cattle in Mexico. *The Japanese journal of veterinary research* 31, 125-132.

Svensson, C., Linder, A., Olsson, S.-O., 2006. Mortality in Swedish dairy calves and replacement heifers. *Journal of dairy science* 89, 4769-4777.

Tajima, M., Dubovi, E.J., 2005. Genetic and clinical analyses of bovine viral diarrhoea virus isolates from dairy operations in the United States of America. *Journal of veterinary diagnostic investigation* 17, 10-15.

Tikunova, N., Morozova, V., 2009. Phage display on the base of filamentous bacteriophages: application for recombinant antibodies selection. *Acta naturae* 1, 20.

Van Rijn, P., Van Gennip, H., Leendertse, C., Brusckhe, C., Paton, D., Moormann, R., Van Oirschot, J., 1997. Subdivision of the *Pestivirus* Genus Based on Envelope Glycoprotein E2. *Virology* 237, 337-348.

Vilcek, S., Durkovic, B., Kolesárová, M., Greiser-Wilke, I., Paton, D., 2004. Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV-1 genetic group. *Veterinary research* 35, 609-615.

Vilcek, S., Durkovic, B., Kolesarova, M., Paton, D., 2005. Genetic diversity of BVDV: consequences for classification and molecular epidemiology. *Preventive veterinary medicine* 72, 31-35.