



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE
LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**Estandarización de la Técnica de ELISA indirecta para el
diagnóstico del virus de la Diarrea Epidémica Porcina
usando como antígenos el virus completo o mimótopos
obtenidos mediante la técnica de Despliegue de Fagos.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL**

PRESENTA:

JOSÉ FRANCISCO BECERRA HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL:

**ROSA ELENA SARMIENTO SILVA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

COMITÉ TUTOR:

**MARÍA ELENA TRUJILLO ORTEGA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**SABINO PACHECO GUILLEN
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA, UNAM**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx, Enero 2019.



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.

Agradecimientos.

A la Dra. Grisel Anaya Santillán, al señor Juan y a la señora Mari por proporcionar el suero de conejo.

Al Dr. Rolando Beltrán Figueroa y a la Dra. María Elena Trujillo Ortega por facilitarme los sueros de cerdo utilizados en este proyecto.

A la Dra. Liliana Valdez, Susana Juárez Reyes, al Sr. Mario, Armando, Jorge y Gerardo por el apoyo proporcionado en el laboratorio de Virología.

A María Elena Munguía por el apoyo proporcionado durante el proyecto.

A la Dra. Rosa Elena Sarmiento por su tiempo y paciencia en este proceso de aprendizaje.

Al Dr. Sabino Pacheco Guillen por el tiempo proporcionado durante el proyecto.

Este proyecto fue financiado por el proyecto PAPIIT No. IN220515; modulación de la concentración de las proteínas de fase aguda en cerdos inmunizados con aislados mexicanos del virus de la diarrea epidémica porcina y su asociación con la variación antigénica.

Resumen

La diarrea epidémica porcina es una enfermedad viral entérica altamente contagiosa y mortal que afecta a los cerdos al rededor del mundo. En México, los primeros reportes de la enfermedad se hicieron en Julio del 2013 ante la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Diversas técnicas han sido desarrolladas para el diagnóstico de esta enfermedad, entre ellas la técnica de ELISA utilizando placas sensibilizadas con el virus de la diarrea epidémica porcina (VDEP) o alguna proteína recombinante del virus. Sin embargo, ambas opciones se caracterizan por ser complejas y tener altos costos de producción. En este proyecto se buscó estandarizar una técnica de ELISA para el diagnóstico de esta enfermedad utilizando virus completo obtenido en cultivos celulares y mimótopos seleccionados mediante el despliegue en fagos. La selección de péptidos por despliegue en fagos es un procedimiento sencillo y de bajo costo que permite identificar epítomos de interés al seleccionar bacteriófagos que expresan péptidos con secuencias aleatorias fusionados a proteínas de la cápside viral; por ejemplo, en la proteína pIII cuando se utiliza en fago filamentoso M13. Realizamos una selección de fago-péptidos utilizando como blanco de selección un suero de conejo inmunizado con el VDEP. El análisis de la secuencia de los péptidos desplegados en los fagos seleccionados mostró que pueden funcionar como mimótopos del VDEP. Sin embargo, aún falta verificar si es posible utilizar péptidos sintéticos diseñados a partir de la secuencia obtenida de los fago-péptidos en una técnica de ELISA para su potencial uso diagnóstico. Adicionalmente se logró estandarizar una técnica de ELISA utilizando una cepa

del VDEP circulante en el país, que será de gran utilidad en el diagnóstico de esta enfermedad.

Palabras clave: VDEP, despliegue en fagos, ELISA, mimótopos.

Abstract

Porcine epidemic diarrhea is a highly contagious and fatal enteric viral disease that affects pigs worldwide. In Mexico, the first report of the disease was made in July 2013 to the World Organization for Animal Health (OIE). Several techniques have been developed for the diagnosis of this disease, including the ELISA technique, which uses the porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) or any recombinant viral protein fixed on immunoplates. However, both options are characterized by being complex and have high production costs. The aim of this project was to set up an ELISA technique for diagnosis using mimotopes obtained by phage-display. Phage-display system is a simple and low cost methodology that allows identifying of epitopes by selection of bacteriophages that express randomized peptides fused to any protein of the viral capsid, e.g. pIII protein when M13 phage are used. We carried out the selection of phage-peptides by using rabbit serum anti-PEDV as target. Sequencing analysis showed that the isolated peptides could serve as mimotopes of the PEDV, therefore further studies must be carry out, such as designing of synthetic peptides from the sequence obtained by phage-display in order to set up a ELISA technique for diagnosis. Additionally, an ELISA technique was standardized by using as antigen the PEDV isolated from the country, which will be very useful for diagnosis of this disease.

Key words: PEDV, phage display, ELISA, mimotopes.

Contenido	Pág.
I. Introducción	8
1.1. Antecedentes.....	8
1.2. Virus de la diarrea epidémica porcina.....	9
1.3. Patogénesis.....	10
1.4. Diagnóstico.....	13
II. Justificación	14
III. Hipótesis	15
IV. Objetivo general	15
V. Objetivos específicos	15
VI. Materiales y métodos	15
6.1 Cultivo del VDEP.....	15
6.2. Extracción de RNA y RT-PCR.....	16
6.3. Titulación del VDEP.....	17
6.4. Cuantificación de proteínas de la cosecha viral.....	18
6.5. Ensayo de ELISA utilizando el VDEP.....	18
6.6. Despliegue en Fagos.....	19
6.7. Titulación de fagos.....	21
6.8. Amplificación de colonias para secuenciación.....	22
6.9. Verificación de las clonas obtenidas en el despliegue en fagos.....	22
6.10. Estandarización de la técnica de ELISA utilizando las clonas obtenidas del despliegue en fagos.....	23
VII. Resultados	24
7.1. Cultivo viral.....	24

7.2. Ensayo de ELISA utilizando el VDEP.....	24
7.3. Ensayo de ELISA utilizando los fago-péptidos.....	26
VIII. Discusión.....	30
IX. Conclusión y perspectivas.....	33
X. Referencias.....	34
Anexo 1. Soluciones y reactivos.....	37
Índice de cuadros y figuras	Pág.
Cuadro 1. Mezcla de reacción utilizada en el RT-PCR.....	17
Cuadro 2. Iniciadores utilizados en RT-PCR para verificar la presencia del genoma del VDEP.....	17
Cuadro 3. Condiciones para el RT-PCR utilizadas para amplificar una región del gen M del VDEP.....	17
Cuadro 4. Secuencia de los péptidos reactivos.....	28
Figura 1. Representación esquemática de la organización del genoma del VDEP así como del virión.....	9
Figura 2. Representación esquemática del ciclo de replicación del VDEP.....	12
Figura 3. Estandarización de la ELISA-VDEP.....	19
Figura 4. Despliegue en fagos.....	21
Figura 5. Electroforesis de los productos de la RT-PCR.....	24
Figura 6. Estandarización de la técnica de ELISA con cosecha del VDEP.....	25
Figura 7. ELISA-VDEP.....	26
Figura 8. Ensayo de unión.....	27
Figura 9. ELISA-Bacteriófagos.....	29

Siglas y abreviaturas

DEP: diarrea epidémica porcina.

VGET: virus de la gastroenteritis transmisible

VDEP: virus de la diarrea epidémica porcina

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal

ORF: marco de lectura abierto

RNA: ácido desoxirribonucleico

kDa: Kilodaltons

kb: kilobases

ELISA: ensayo de inmuno-absorción ligado a enzimas

DCP: delta coronavirus porcino

DMEM: medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco

PBS: solución amortiguadora de fosfatos salinos

PBST: solución amortiguadora de fosfatos salinos/0.02% Tween-20

PBLT: solución amortiguadora de fosfatos salinos/ 2% leche descremada /0.02% Tritón

TBST: solución salina tamponada con Tris al 0.1 % de Tween 20

TBS: solución salina tamponada con Tris

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa

DICC50%: dosis infectivas en cultivo celular al 50%

TMB: tetrametilbencidina

PEG: polietilenglicol

NaCl: cloruro de sodio

Ufp: unidades formadoras de placas

UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México

I. Introducción

1.1. Antecedentes

La diarrea epidémica porcina (DEP) es una enfermedad entérica de los cerdos altamente contagiosa y mortal. El primer reporte de DEP ocurrió en el año de 1971 en Reino Unido, pero fue hasta 1978 que se descubrió que el agente causal de la enfermedad era un coronavirus diferente al Virus de la Gastroenteritis Transmisible del cerdo (VGET). Durante la década de los setentas, DEP se extendió por el continente Europeo afectando principalmente a cerdos lactantes, pero a partir de 1990 solo se presentaron brotes aislados, convirtiéndose en una enfermedad rara en este continente, por lo que no se desarrolló una vacuna. A partir del 2006 se presentaron brotes epidémicos en Italia, Alemania y otros países europeos productores porcinos (Huang et al., 2013, Jung and Saif, 2015).

En Asia DEP fue reportada desde 1973. En 1974 se desarrollaron vacunas inactivadas y atenuadas que han sido usadas principalmente en China. DEP se volvió endémica en este país y no hubo reporte de brotes a gran escala hasta Octubre del 2010, año en el cual ocurrieron casos severos que provocaron grandes pérdidas económicas. A pesar de la existencia y el uso de vacunas, la mortalidad en cerdos neonatales fue del 50 al 100%, indicando la aparición de variantes virales del Virus de la Diarrea Epidémica Porcina (VDEP), agente causal de la DEP, altamente virulentas. En Corea del Sur, DEP se reporta desde 1992. De 2003 al 2013 los brotes se controlaron con una vacuna oral de una cepa atenuada en cultivo celular (DR13). En Japón han existido casos de DEP desde 1980. Sin embargo, el uso de una vacuna elaborada con una cepa atenuada en 1997 permitió que se dejaran de presentar casos desde 2006. En 2013 Japón confirmó un brote de DEP ante la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) después de siete años de ausencia de la enfermedad en ese país. En agosto del 2014 Taiwán reportó 34 granjas positivas a DEP en las regiones del centro y sur del país (Chang et al., 2017, Lin et al., 2016).

En América, en abril del 2013 se reporta el primer caso de DEP en granjas de Estados Unidos, para 2015 la DEP se había extendido a 36 estados de este país. En el primer año murieron siete millones de cerdos víctimas de la DEP provocando

grandes pérdidas en la industria porcina de este país (Davies, 2015, Stevenson et al., 2013). En México los primeros reportes se hicieron en julio del 2013 y para 2014 la enfermedad fue reportada en 17 de los 32 estados del país ante la OIE y a la fecha siguen existiendo brotes de la enfermedad (Trujillo-Ortega et al., 2016).

1.2. Virus de la diarrea epidémica porcina

El VDEP pertenece al orden *Nidovirales*, familia *Coronaviridae* y al género *Alfacoronavirus*. Es un virus envuelto con un genoma que consta de una cadena sencilla de RNA en sentido positivo de aproximadamente 28 kb de longitud, compuesto por siete marcos de lectura abierto (ORFs por sus siglas en inglés). El primer ORF (dividido en el ORF1a y ORF1b) codifica para proteínas no estructurales que participan en la replicación y transcripción del genoma viral. El resto de los marcos de lectura codifican para cuatro proteínas estructurales y una proteína accesoria y se encuentran en el genoma en el siguiente orden: proteína spike (S) proteína accesoria (ORF3), proteína de la envoltura (E), proteína de la membrana (M) y la proteína de la nucleocápside (N) (Figura 1) (Lin et al., 2016).

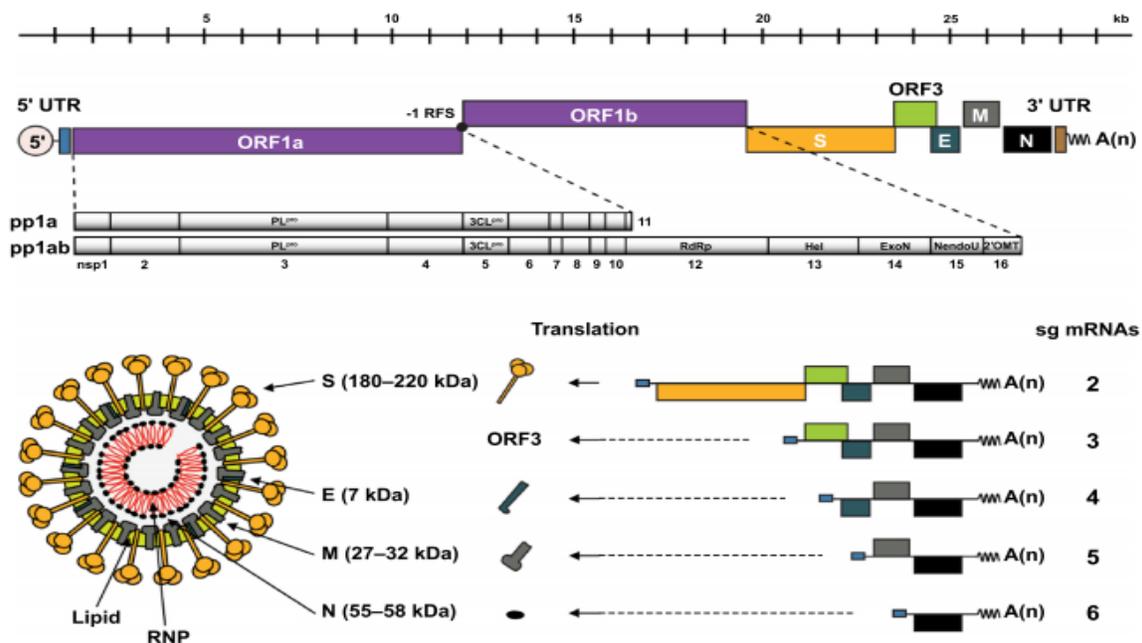


Figura 1. Representación esquemática de la organización del genoma del VDEP así como del virión (Lee, 2015).

La proteína S participa en el reconocimiento y unión al receptor celular, además de intervenir en la fusión de membranas para la entrada viral. En esta proteína se encuentran los principales sitios antigénicos para la unión de anticuerpos neutralizantes. La proteína M participa en el ensamblaje viral. La proteína N se une al RNA viral para formar la nucleocapside además de participar en la transcripción y replicación del genoma (Sun et al., 2015).

Basados en los análisis filogenéticos de la proteína S, las variantes virales del VDEP pueden ser divididos en dos genotipos, el genogrupo 1 con cepas clásicas o de baja patogenicidad, y el genogrupo 2, con cepas epidémicas o pandémicas de alta patogenicidad. Estos genogrupos son antigénicamente y genéticamente distintos. Alrededor del mundo se han encontrado cepas del VDEP que presentan inserciones y deleciones en la región N-terminal de la proteína S, llamadas cepas S INDEL y aunque la secuencia de la proteína S es parecida a las cepas clásicas (cepas que aparecieron antes del 2010), el resto de la secuencia genética de estos virus es similar a los de las cepas virulentas (cepas aparecidas después del 2010), por lo que filogenéticamente se agrupan con estas (Sun et al., 2015, Jarvis et al., 2016). Aunque estas cepas con 92% de homología presentan grandes diferencias genéticas, se ha demostrado que pueden ser reconocidas por anticuerpos dirigidos hacia las cepas virulentas o de reciente aparición, ya que conservan homología entre los epítomos neutralizantes (Chen et al., 2016).

1.3. Patogénesis

La principal vía de transmisión del virus es la ruta fecal-oral. Las heces, el vómito, el alimento contaminado y fómites, tales como los camiones de transporte contaminados con heces, pueden servir como fuente de transmisión del VDEP. También se ha demostrado que este virus se puede propagar por aerosoles y algunos estudios demuestran que animales adultos infectados con el VDEP pueden servir como reservorios al no presentar signos de la enfermedad (Huang et al., 2013, Jung and Saif, 2015).

El VDEP puede infectar cerdos de cualquier edad, los signos clínicos se caracterizan por diarrea y vómito, acompañados por anorexia y depresión. La morbilidad es del 100% en cerdos lactantes pero puede variar en cerdos adultos.

El periodo de incubación es de dos días pero puede ser de hasta ocho días. La eliminación fecal del virus puede ser detectada desde las primeras 48 horas que comenzaron los signos clínicos y durar hasta cuatro semanas. La severidad de la enfermedad está relacionada con la edad del cerdo. La infección del VDEP en cerdos de una semana de edad provoca diarrea severa y vómito por cuatro días seguida por deshidratación que conlleva a la muerte. En promedio la mortalidad es del 50% pero puede alcanzar el 100% en cerdos menores de 3 días (Jung and Saif, 2015, Lee, 2015).

Las lesiones se localizan principalmente en intestino delgado, donde se observa adelgazamiento de las paredes intestinales con contenido amarillo acuoso. En el estómago podemos encontrar coágulos de leche y los linfonodos mesentéricos se hallan edematosos. La deshidratación es fácilmente detectable por ojos sumidos y la pérdida de la elasticidad de la piel. Microscópicamente, las lesiones se caracterizan por acortamiento y fusión de las vellosidades intestinales, así como infiltración de linfocitos en la lámina propia. En los animales el VDEP se replica en los enterocitos, estas células expresan en la porción apical una proteína transmembranal tipo II, la aminopeptidasa N o CD13. Esta molécula funciona como receptor para el virus y es reconocida por la glicoproteína S viral (Huan et al., 2015, Belouzard et al., 2012, Li et al., 2007). La glicoproteína S es una glicoproteína de fusión clase I de aproximadamente 180 a 200 kDa que se encuentra en la envoltura viral formado un homotrímero, esta se sintetiza como un precursor S0 que debe ser procesado en dos subunidades S1 y S2 que permanecen unidas por puentes disulfuro, el procesamiento proteolítico es esencial para la entrada del virus a la célula. La subunidad S1 se localiza en el extremo N-terminal y la S2 en el extremo C-terminal de la proteína, la porción S1 contiene el dominio de unión al receptor mientras que la subunidad S2 es responsable de la actividad fusogénica, pues contiene el péptido de fusión. La actividad fusogénica es indispensable para la entrada del virus a la célula hospedera al permitir la fusión de la membrana viral con la membrana celular (o con la membrana del endosoma) (Shirato et al., 2011, Spaan et al., 1988, Sturman et al., 1985, Bosch et al., 2003). La fusión de membranas es iniciada por cambios conformacionales mediados por la unión de la proteína S con su receptor celular

(Belouzard et al., 2012, Park et al., 2014). Una vez que el virus logra entrar a la célula el genoma es liberado y el ORF1a/1b se traduce en una poliproteína que es procesada para producir la RNA polimerasa viral y otras proteínas que participan en la síntesis del RNA. La RNA polimerasa viral utiliza como molde el RNA viral para sintetizar moléculas de RNA de cadena negativa que sirve para sintetizar RNA de cadena positiva, el cual es utilizado en la síntesis de las proteínas virales y como RNA genómico para los viriones que van a ser formados. La proteína N y el RNA genómico se unen en el citoplasma para formar la nucleocápside helicoidal. La proteína M se transporta del retículo endoplásmico y se ancla en el aparato de Golgi donde se unen a la nucleocápside. La proteína S y E también se transportan del retículo endoplásmico al aparato de Golgi donde interactúan con la proteína M para desencadenar la gemación de los viriones. El exceso de proteína S que no se incorpora a los viriones es transportado a la membrana plasmática, la activación proteolítica de esta proteína provoca la fusión de membranas celulares formando una célula gigante multinucleada llamada sincitio, permitiéndole al virus infectar células vecinas y la evasión del sistema inmune. La salida del virus de la célula se produce mediante exocitosis, y gracias a la acción de proteasas es liberado, ya que queda unido a la membrana celular (Figura 2) (Belouzard et al., 2012, Fields, 2001, Shirato et al., 2011, Zhu et al., 2013).

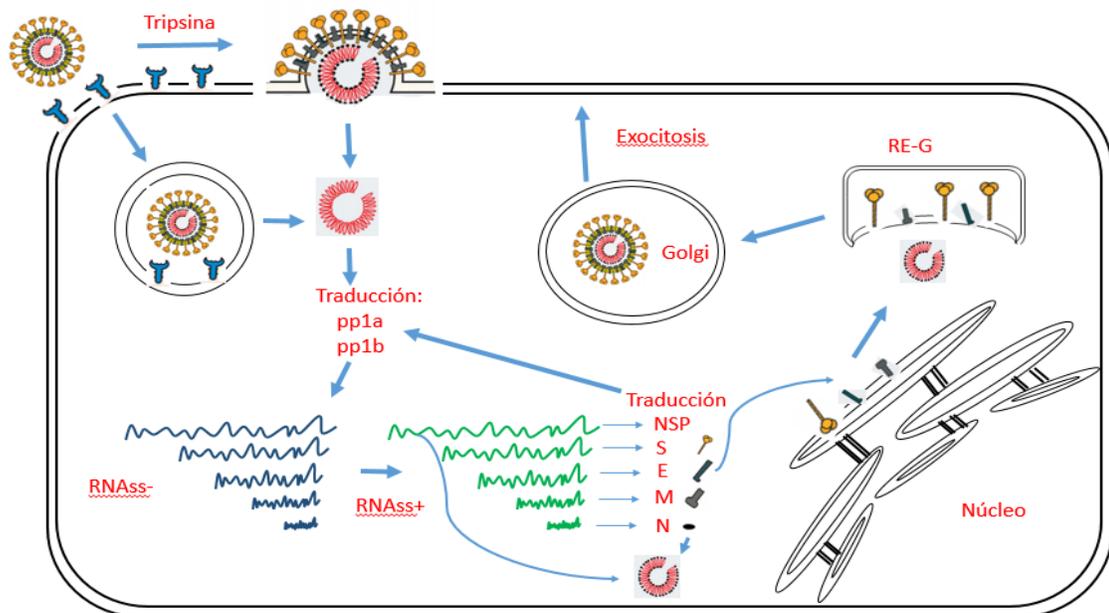


Figura 2. Representación esquemática del ciclo de replicación del VDEP (Lee, 2015)

1.4. Diagnóstico

Los métodos de diagnóstico para el VDEP están basados en la detección del virus, su genoma o anticuerpos inducidos durante la respuesta a la infección. La prueba contundente para el diagnóstico viral es el aislamiento del VDEP, para lo cual se han utilizado principalmente células Vero en medio suplementado con tripsina, enzima que facilita la infección al activar la proteína viral S, procesándola en las subunidades S1 y S2. El efecto citopático característico de la infección por VDEP es la formación de sincitios celulares, pero para confirmar la presencia del virus se debe recurrir a otros ensayos diagnósticos como inmunofluorescencia o RT-PCR (Kusanagi et al., 1992). La necesidad de suplementar el medio de cultivo con proteasas exógenas, así como la baja tasa de éxito, hacen del aislamiento una técnica complicada aunque necesaria, pues los aislados se requieren para el estudio de la patogénesis de esta enfermedad, el desarrollo de ensayos diagnósticos y la producción de vacunas. La inmunofluorescencia y la inmunohistoquímica son pruebas que nos permiten la detección temprana del virus en muestras de tejido de cerdos infectados o en cultivos celulares para confirmar el aislamiento (Song and Park, 2012, Diel et al., 2016).

Los ensayos moleculares como el RT-PCR y el RT-PCR en tiempo real son las técnicas de elección para el diagnóstico del VDEP, dada la sensibilidad y la rapidez de estas pruebas. Además estas pruebas son utilizadas en análisis epidemiológicos y filogenéticos del virus. Para la detección de anticuerpos generados durante la infección por el VDEP se han utilizado métodos como la inmunofluorescencia indirecta, la neutralización viral y el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Esta última técnica puede ser utilizada para la detección de anticuerpos o para la detección del virus en heces. Para la detección del antígeno viral se utiliza una prueba de ELISA tipo sándwich, la cual consiste en la inmovilización de anticuerpos en placas de poliestireno que reconocen epítopos del VDEP, una vez que el virus presente en las muestras se ha unido a los anticuerpos inmovilizados o de captura, un segundo anticuerpo reconoce y se une al VDEP capturado por el anticuerpo primario. Esta unión es visualizada al añadir un tercer anticuerpo conjugado con enzimas y su respectivo sustrato. La detección del VDEP en heces puede ser afectada por el tiempo de

almacenamiento de las muestras, así como por las condiciones ambientales en las que se mantuvieron. Para la detección de anticuerpos en muestras de suero se utiliza una prueba de ELISA indirecta, la cual consiste en inmovilizar el antígeno viral, ya sea el virus o alguna proteína recombinante expresada en bacterias, en una placa sólida de poliestireno e incubarlo con la muestra de suero sospechosa para permitir la unión antígeno-anticuerpo, y posteriormente evidenciar dicha unión mediante un segundo anticuerpo conjugado con una enzima y su respectivo sustrato (Diel et al., 2016, Guscetti et al., 1998, Hou et al., 2007, Kweon et al., 1999).

II. Justificación

Los signos clínicos así como las lesiones ocasionadas por el VDEP son similares a las provocadas por el virus de la gastroenteritis transmisible (VGET) y al deltacoronavirus porcino (DCP), por lo que el diagnóstico diferencial entre estos virus debe basarse en pruebas moleculares y ensayos serológicos. La técnica de ELISA indirecta es ampliamente utilizada para el diagnóstico de diferentes enfermedades virales, además de que nos permite conocer el estado inmunológico de un individuo o una granja, por lo que desarrollar esta técnica es de gran importancia para el diagnóstico y control de la Diarrea Epidémica Porcina. Utilizar el antígeno completo en el caso del VDEP para estandarizar esta técnica, tiene como desventaja que la tasa de aislamiento es baja, el aislamiento es una técnica costosa y además se requiere de mucho tiempo para obtener la cantidad suficiente del antígeno. Actualmente se dispone de metodologías que nos permiten sustituir el antígeno viral, como el despliegue en fagos, técnica que se basa en la identificación de secuencias de péptidos expresados en la cápside de bacteriófagos filamentosos. Estos péptidos pueden ser utilizados para estandarizar una prueba de diagnóstico del VDEP por ELISA. La ventaja de este enfoque es que la producción del antígeno viral, en un formato de fago-péptido, es más sencilla, rápida y menos costosa que la obtención de antígeno mediante cultivo celular, por lo que identificar péptidos que mimeticen el VDEP puede ser de gran utilidad en el diagnóstico de esta enfermedad.

III. Hipótesis

El VDEP circulante en México aislado de cerdos infectados, o péptidos que mimeticen determinantes antigénicos del VDEP, son antígenos potenciales para utilizarlos en pruebas de ELISA para el diagnóstico de DEP.

IV. Objetivo general

Estandarizar una prueba de ELISA para el diagnóstico de la diarrea epidémica porcina inmovilizando el VDEP o péptidos que mimeticen a este virus.

V. Objetivos específicos

Realizar la selección de fago-péptidos que mimeticen al VDEP.

Estandarizar una prueba de ELISA utilizando los fago-péptidos seleccionados.

Cultivar y propagar el VDEP.

Estandarizar una prueba de ELISA utilizando el VDEP.

VI. Materiales y métodos

6.1 Cultivo del VDEP

El VDEP cepa Mx_EdoMexC2A1S_2014 (No. GenBank KM044335.1) fue cultivado en células Vero. Una vez que las monocapas celulares presentaron un 80% de confluencia se retiró el medio de mantenimiento DMEM (medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco) enriquecido con 10% de suero fetal bovino por decantación y se realizaron tres lavados con solución amortiguadora de fosfatos salinos (PBS). Para la infección se inoculó el cultivo celular con 300 µl de suspensión viral con un título de 1×10^8 DIC50%/ml y se incubó por 60 minutos. Posteriormente se agregaron 5 ml de DMEM enriquecido con 1 µg/ml de tripsina. La cosecha viral se llevó a cabo cuando el efecto citopático provocado por el virus se presentó en el 90% de la monocapa celular, para esto se realizaron tres ciclos de congelando y descongelando del cultivo y posteriormente se recolectó el sobrenadante. Los virus fueron almacenados a -70°C hasta su uso.

6.2. Extracción de RNA y RT-PCR

A 500 µl de la cosecha viral se le agregaron 700 µl de TRIZOL®, se mezclaron por pipeteo y se incubó por 15 min a temperatura ambiente. A continuación, se agregaron 250 µl de cloroformo y se mezclaron durante 15 seg en vortex, seguido de una incubación de 15 min. Al concluir la incubación se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min para después colectar la fase acuosa, a la cual se le agregó un volumen igual de isopropanol y se dejó precipitar 12 hr a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min, se decantó y la pastilla de RNA resultante se lavó con 500 µl de etanol al 75%. La muestra se centrifugó bajo las mismas condiciones y al finalizar se decantó. La pastilla de RNA se dejó secar completamente y se resuspendió en 30 µl de agua con DEPC (dietil pirocarbonato) y finalmente se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Para realizar la RT-PCR se utilizó el kit OneStep (Qiagen) mezclando los reactivos que se muestran en el cuadro 1.

Reactivo.	Cantidad (µL).	Concentración final.
Buffer	2.5	0.625 mM Mg ²⁺
dNTPs	0.5	100 µM de cada dNTP
Iniciadores	0.5 de cada uno	10 µM
Enzima Mix.	0.5	-----
Inhibidor de RNAsas	0.2	8 U
Agua libre de RNAsas	4.8	-----
RNA	3.0	-----

Cuadro 1. Mezcla de reacción utilizada en la RT-PCR.

En el cuadro 2 se muestra la secuencia de los iniciadores utilizados, los cuales amplifican una región del genoma de la proteína M. Las condiciones que se siguieron para realizar la RT-PCR (Cuadro 3) fueron establecidas por Kweon y colaboradores (Kweon et al., 1997).

Identificación.	Secuencia.	Ubicación.	Fragmento amplificado (pb)
PED3F	5' - GGA CAC ATT CTT GGT GGT CT - 3'	25995-26364	370
PED3R	5' - GTT TAG ACT AAA TGA AGC ACT TTC - 3'		

Cuadro 2. Iniciadores utilizados en la RT-PCR para verificar la presencia del genoma del VDEP.

Los productos de la RT-PCR se verificaron por electroforesis utilizando geles de agarosa al 2% teñidos con una solución de bromuro de etidio.

Temperatura (°C).	Tiempo (Minutos).	Etapas.	Número de Ciclos.
50	1	Pre calentamiento.	
50	30	Retrotranscripción (RT).	1
95	15	Inactivación de la RT.	
94	2	Desnaturalización.	
58	2	Alineación.	40
72	2	Extensión.	
72	10	Extensión final.	1

Cuadro 3. Condiciones para el RT-PCR utilizadas para amplificar una región del gen M del VDEP.

6.3. Titulación del VDEP

Para la titulación del VDEP se preparó una placa de 96 pozos con cultivo de células Vero. Por otra parte, en una placa de 96 pozos se realizaron diluciones decuples seriadas de la suspensión viral en medio DMEM enriquecido con 10 µg/ml de tripsina. Posteriormente 100 µl de cada dilución de VDEP se utilizaron para infectar las células Vero de la placa previamente preparada y después de 96

hr se observó el efecto citopático. El título fue determinado por el método de Reed-Müench, en el cual se estima el 50% de células infectadas y se expresa en Dosis Infeccivas en Cultivo Celular al 50% por mililitro (DICC50%/ml). El ensayo se realizó por cuadruplicado (Chen et al., 2014).

6.4. Cuantificación de proteínas de la cosecha viral

Para determinar la concentración de proteínas de la cosecha viral se utilizó el kit Qubit™ Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. A 190 µl de la solución de trabajo Qubit® se le agregaron 10 µl de la cosecha viral, se mezclaron por vortex y se dejó incubar durante 15 min a temperatura ambiente, el ensayo se realizó por duplicado. La lectura se realizó en el fluorómetro Qubit® 3.0.

6.5. Ensayo de ELISA utilizando el VDEP

Se realizaron diluciones dobles seriadas de la cosecha viral en solución amortiguadora de carbonatos, partiendo de 20 µg/ml hasta 0.625 µg/ml y se depositaron 100 µl de cada dilución en una placa para ELISA. La placa se incubó por 18 hr a 4°C y después se realizaron tres lavados con la solución PBST (PBS, Tween 20 al 0.2%).

Para disminuir las uniones no específicas se adicionaron 150 µL de solución PBLT (PBS, 2% de leche descremada, 0.02% Triton X-100) y se incubó durante 1 hr a 37°C. Al concluir la incubación, se realizaron tres lavados con PBST.

Los sueros testigos, negativos y positivo al VDEP, los cuales fueron verificados previamente con el kit ID Screen® PEDV Indirect (ID-Vet), se diluyeron 1/10, 1/50 y 1/100 en solución PBLT y se colocaron 100 µl en cada pozo de la placa previamente preparada. Cada dilución se retó con las diferentes concentraciones de proteína viral. Posteriormente se incubó por 60 min a 37°C y al finalizar se realizaron tres lavados con PBST. La figura 3 muestra un esquema del formato que se utilizó para estandarizar esta técnica.

		Ag positivo						
	Columna	1	2	3	4	5	6	7
	Concentración Ag (ug/ml)	20	10	5	2.5	1.25	Sin Ag	Sin Ag
Fila	Dilución suero							
A	1:10							
B	1:10							
C	1:50							
D	1:50							
E	1:100							
F	1:100							
G	Sin Ac primario						Blanco	Blanco
H	Sin Ac primario						Blanco	Blanco

Figura 3. Estandarización de la ELISA-VDEP. Para encontrar las condiciones de trabajo optimas en un ensayo de ELISA para el diagnóstico del VDEP, diferentes concentraciones de proteínas de una suspensión viral se enfrentaron a diferentes diluciones de sueros de cerdo tanto positivos como negativos a este virus.

Se agregaron 100 µl por pozo del anticuerpo secundario Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Swine IgG (Jackson ImmunoResearch) diluido 1/10,000, se dejó en incubación 60 min a 37°C y al finalizar la incubación se realizaron tres lavados con PBST.

Posteriormente se agregaron 100 µl de Novex HRP Chromogenic Substrate -TMB (Thermo Fisher Scientific) y se incubó a 37°C. La absorbancia se midió a 450 nm en un espectrofotómetro Multiskan EX (Thermo Fisher Scientific) cada 15 min hasta máximo 45 min.

6.6. Despliegue en Fagos

Para llevar a cabo la bioselección se utilizó la biblioteca comercial de fago-péptidos Ph.D.TM-C7C (New England Biolabs) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Se sensibilizaron cuatro pozos de una placa para ELISA con 100 µl de una dilución 1/100 de anticuerpo de cabra anti IgG de conejo (Thermo Scientific) en solución de carbonatos durante 12 hr a 4°C. Después se realizaron tres lavados con TBST (solución salina tamponada con Tris al 0.1 % de Tween 20) y se agregaron 100 µl de solución de bloqueo (0.1M NaHCO₃, 5 mg/ml de BSA, 0.02%NaN₃) y se incubó por 60 min a 4°C. Posteriormente se realizó el lavado de la placa como se describió anteriormente y se agregaron 100 µl de una dilución

1/10 de suero de conejo anti-VDEP (proporcionados por el laboratorio de serología, FMVZ, UNAM) en solución de carbonatos y se incubó por 60 min. Después se lavó la placa y se agregaron 100 µl de una dilución 1/100 de la biblioteca de fagos en TBS (solución salina tamponada con Tris), seguido de una incubación de 60 min a temperatura ambiente.

Se desechó el contenido de los pozos y se realizaron 10 lavados con TBST como se describió anteriormente. Para eluir los fagos unidos a los anticuerpos se adicionaron 100 µl de una solución 0.2 M de glicina-HCl, pH 2.2 y se incubó por 15 min. Posteriormente se agregaron 15 µl de una solución 1 M de Tris-HCl y el eluido se colectó.

Los fagos eluidos se amplificaron en 20 ml de un cultivo de *E. coli* cepa TG1 en fase logarítmica temprana (D.O. 0.05 nm), dejándolo incubar durante 4.5 h a 37°C en agitación. Después el cultivo se centrifugó por 10 min a 12,000 g a 4°C y se recuperó el 80% del sobrenadante. Se agregaron 1/6 del volumen de una solución de polietilenglicol (PEG) al 20% y 2.5 M de NaCl.

Se permitió que los fagos precipitaran durante 18 hr a 4°C y posteriormente se centrifugó a 12,000 g por 15 min. El sobrenadante se desechó y la pastilla de fagos obtenidos se resuspendió en 1 ml de TBS. Se repitió la precipitación nuevamente con PEG/NaCl durante 60 min y se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min. La pastilla resultante se resuspendió en 400 µl de TBS, y los fagos se utilizaron para realizar la siguiente ronda de bioselección.

Se realizaron dos rondas de bioselección adicionales siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. La concentración de Tween 20 en la solución de lavado aumentó a 0.5% en las siguientes rondas de bioselección. La figura 4 muestra una representación esquemática del proceso del despliegue en fagos.

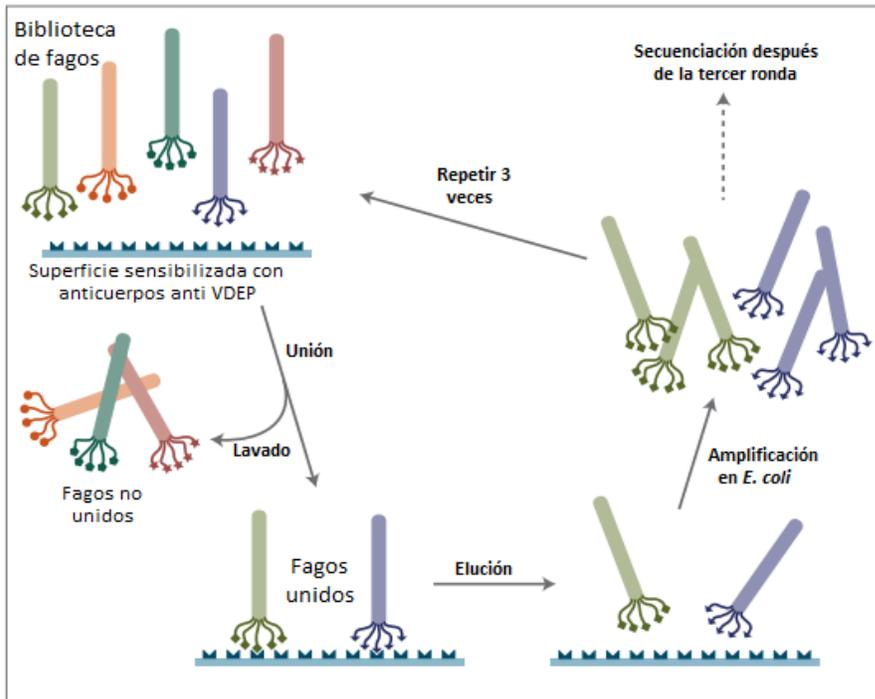


Figura 4. Despliegue en fagos. Representación esquemática del proceso del despliegue en fagos (New England Biolabs).

6.7. Titulación de fagos

Para la titulación de los fagos eluidos y amplificados, 5 ml de medio YT2X fue inoculado con *E. coli* cepa TG1 y se dejó incubar hasta que alcanzó la fase logarítmica media (D.O. 0.5 nm). Se tomaron 200 μ l de este cultivo y las bacterias fueron infectadas con 10 μ l de diluciones decuples de fagos en medio YT2X durante 5 min. Después las células infectadas se transfirieron a 3 ml de top agar precalentado a 45°C, se mezclaron por vortex y se vaciaron en placas de agar YT2x/IPTG/Xgal. Se incubaron a 37°C durante 12 hr y al día siguiente se contaron las colonias azules y se multiplicó el valor obtenido por el factor de la dilución de los fagos para obtener el título en unidades formadoras de placas (ufp) por 10 μ l.

6.8. Amplificación de colonias para secuenciación

Se inocularon 20 ml de medio YT2X con *E. coli* cepa TG1 y se dejaron en incubación toda la noche a 37°C en agitación. Al día siguiente se realizó una dilución 1/100 del cultivo y se dispuso 1 ml en un tubo por cada colonia a amplificar obtenida de la titulación del tercer eluido proveniente de las bioselecciones.

Con una punta para pipeta estéril se tomó una colonia de los cultivos de titulación para inocular las células bacterianas y se incubaron durante 4.5 hr a 37°C en agitación. Después de la incubación los tubos se centrifugaron a 14 000 rpm por un minuto, los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos y se les agregó 200 µl de una solución al 20% de PEG/ 2.5 M de NaCl seguido de una incubación de 15 min a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación los tubos se centrifugaron a 14 000 rpm durante 10 min, el sobrenadante fue desechado y la pastilla resultante fue resuspendida en 100 µl de solución de yoduro (10mM Tris-HCl, 1Mm EDTA, 4 M NaI). Posteriormente se agregaron 250 µl de etanol puro y se procedió a una incubación de 20 min a temperatura ambiente, al finalizar la incubación los tubos se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue desechado, la pastilla se lavó con 0.5 ml de etanol al 70% y se centrifugo nuevamente, se desechó el etanol y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente para posteriormente ser resuspendida en 30 µl de PBS. Las muestras fueron secuenciadas en el Instituto de Biomédicas de la UNAM.

6.9. Verificación de las clonas obtenidas en el despliegue en fagos

Para verificar la unión de las clonas obtenidas mediante el despliegue en fagos con el suero de conejo anti VDEP con el que fueron seleccionadas, una placa de ELISA fue sensibilizada con una dilución 1/10 de este suero en solución de carbonatos durante 18 hr a 4°C.

Posteriormente se realizaron tres lavados con PBST y se agregaron 100 µl de solución PBLT y se incubó por 60 min a 37°C. Al finalizar la incubación se lavó tres veces con PBST.

Posteriormente se realizaron diluciones decuples seriadas de los diferentes fago-péptidos seleccionados en solución PBLT. De cada dilución se agregaron 100 µl por pozo de la placa de ELISA y se dejó incubar 60 min a 37°C.

Al finalizar la incubación se realizaron tres lavados con solución PBST y se agregaron 100 µl de una dilución 1/5000 del anticuerpo HRP/Anti-M13 Monoclonal Conjugate (GE) seguido de una incubación de 60 min a 37°C. Después se realizaron tres lavados y se agregaron 100 µl de Novex HRP Chromogenic Substrate -TMB (Thermo Fisher Scientific). La absorbancia se midió a 450 nm en un espectrofotómetro Multiskan EX (Thermo Fisher Scientific) cada 15 min hasta máximo 45 minutos.

6.10. Estandarización de la técnica de ELISA utilizando las clonas obtenidas del despliegue en fagos

Cada fago-péptido fue diluido en solución de carbonatos para obtener un título de 10^{12} ufp/ml. Posteriormente 100 µl de cada dilución fue utilizada para sensibilizar cuatro pozos de una placa para ELISA (el ensayo se realizó por triplicado) durante 18 hr a 4°C.

Se realizaron tres lavados con PBST y posteriormente se agregaron 100 µl de solución PBLT a cada pozo sensibilizado seguido de una incubación de 60 min a 37°C. Al finalizar la incubación la placa de ELISA fue lavada tres veces y se agregaron 100 µl de una dilución 1/100 de sueros de cerdo utilizados previamente en solución PBLT, se utilizaron dos sueros negativos y dos sueros positivos al VDEP. Después se incubó 60 min a 37°C seguido de tres lavados con PBST.

Se agregaron 100 µl por pozo del anticuerpo secundario Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Swine IgG (Jackson ImmunoResearch) diluido 1/10,000, se dejó en incubación 60 min a 37°C y después se realizaron tres lavados con PBST.

Posteriormente se agregaron 100 µl por pozo de Novex HRP Chromogenic Substrate -TMB (Thermo Fisher Scientific) y se incubó a 37°C. La absorbancia se midió a 450 nm en un espectrofotómetro Multiskan EX (Thermo Fisher Scientific) cada 15 min hasta máximo 45 minutos.

VII. Resultados

7.1. Cultivo viral

Para verificar la presencia del virus en los cultivos infectados se realizó la prueba de Rt-PCR resultando un fragmento del tamaño esperado de acuerdo a los iniciadores utilizados (Figura 5).



Para poder estandarizar la técnica de ELISA se cuantifico el contenido de proteínas y el título del cultivo viral resultando una concentración de 104 µg/ml de proteínas con un título de 1×10^7 DICCC50%.

7.2. Ensayo de ELISA utilizando el VDEP

Para elegir la concentración de proteínas presentes en el cultivo viral que serían inmovilizadas en la placa de poliestireno así como la dilución de suero optima a utilizar en el ensayo de ELISA, se sensibilizaron placas con diferentes concentraciones de proteínas y se enfrentaron a diferentes diluciones de suero tanto negativo como positivo al VDEP.

El criterio de selección fue elegir el punto donde el suero negativo diera una densidad óptica menor o igual a 0.2 y el suero positivo una densidad óptica mayor o igual a 1, encontrando este punto en una concentración de proteínas de cultivo viral en 2.5 ug/ml con una dilución del suero 1/100 (Figura 6).

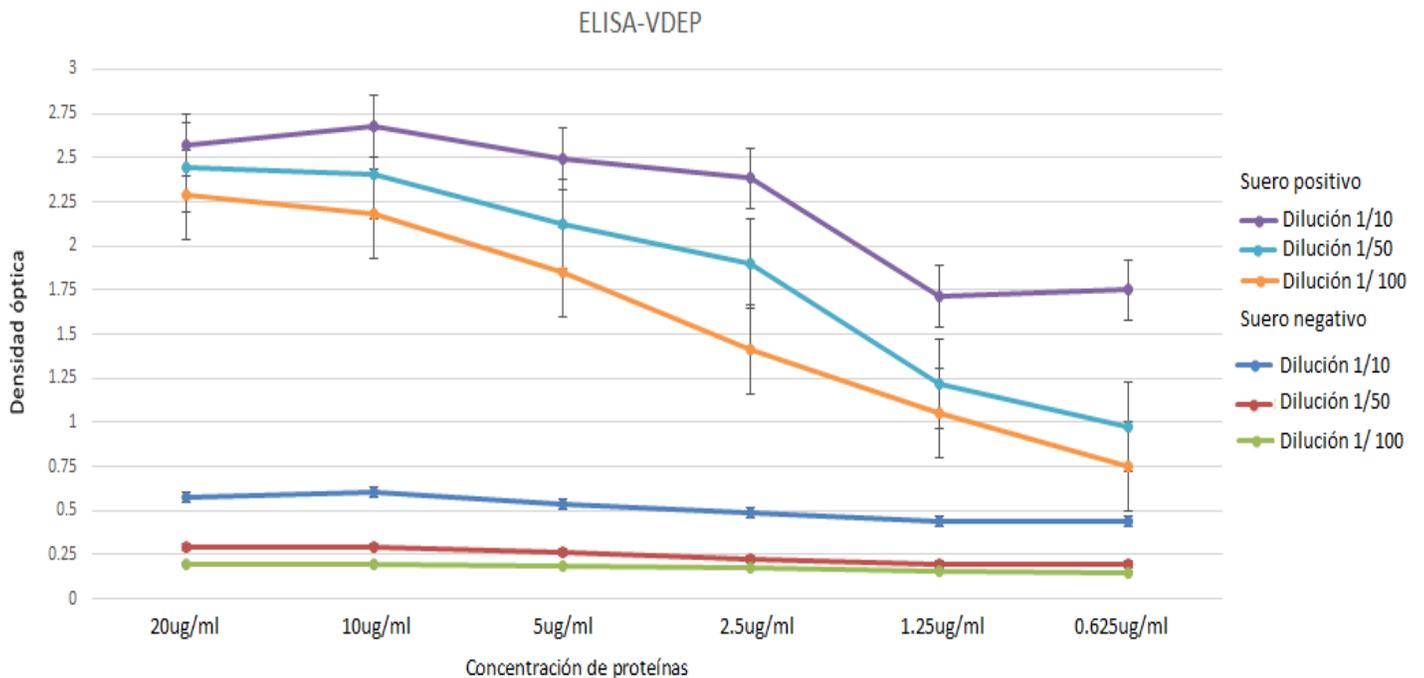


Figura 6. Estandarización de la técnica de ELISA con cosecha del VDEP. Una placa para ELISA se sensibilizó con diferentes concentraciones de proteínas proveniente de una suspensión del VDEP y se enfrentó a diferentes diluciones de suero reactivo y no reactivo al VDEP para identificar la concentración de proteínas y la dilución óptima del suero a usar en el ensayo de ELISA.

Para corroborar los resultados anteriores se probaron otros siete sueros positivos y siete sueros negativos al VDEP con las condiciones seleccionadas anteriormente encontrando que existe una clara diferencia entre los sueros negativos y positivos al VDEP en este ensayo (figura 7).

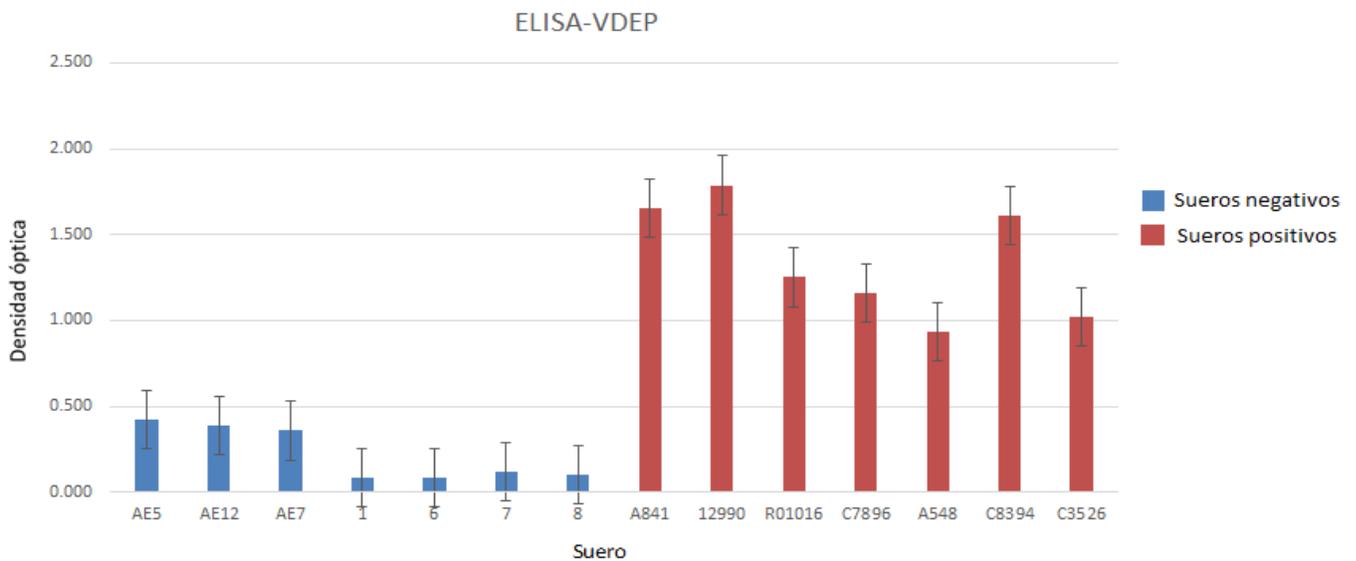


Figura 7. ELISA-VDEP. Siete muestras de suero positivas y siete muestras de suero negativas al VDEP se utilizaron para verificar que las condiciones elegidas en la estandarización del ensayo de ELISA fueron las adecuadas, encontrando que existe una clara diferencia en los resultados.

7.3. Ensayo de ELISA utilizando los fago-péptidos

De las bioselecciones se obtuvieron cinco clones y se verificó su unión con el suero de conejo anti VDEP que se utilizó para seleccionarlas sensibilizando placas de ELISA con este suero para posteriormente enfrentarlos a diluciones decuples de los bacteriófagos iniciando con un título de 10^{12} ufc/ml. La unión se reveló utilizando un anticuerpo monoclonal reactivo a bacteriófago M13 conjugado con peroxidasa y su respectivo sustrato (tetrametilbencidina). Se observó que conforme aumenta la dilución de los bacteriófagos disminuye la densidad óptica obtenida para cada clona. La clona que presenta una mejor unión con los anticuerpos reactivos al VDEP es la clona cuatro pues es en la que se obtuvo una densidad óptica mayor (figura 8).

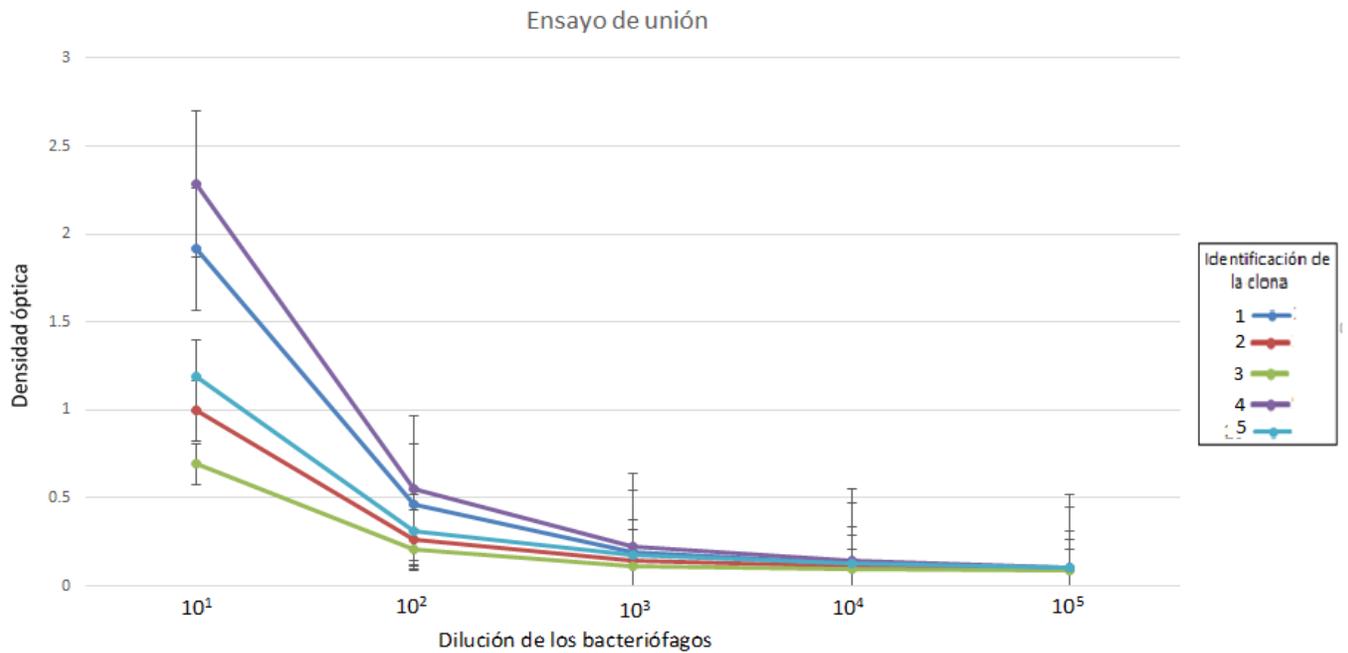


Figura 8. Ensayo de unión. Para verificar que las clonas obtenidas en el despliegue en fagos fueran reactivas a los anticuerpos con los que se seleccionaron, diferentes diluciones del suero fijadas en una placa para ELISA y posteriormente enfrentadas a las clonas obtenidas en el despliegue en fagos. La unión fue revelada con un anticuerpo monoclonal reactivo al bacteriófago M13 conjugado con peroxidasa y su respectivo sustrato.

Una vez verificada la reactividad de las clonas al suero de conejo anti VDEP se procedió a obtener la secuencia de interés flanqueada por secuencias señales y a compararlas con la secuencia completa del VDEP para ver si existía homología con la secuencia de este virus. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 4 donde podemos observar que dos de las secuencias peptídicas obtenidas asemejan a la proteína de la nucleocápside, a la proteína M, a la proteína S y una a la poliproteína del VDEP.

Muestra	Secuencia	Péptido	Mimotopo
1	AGTGAGACGCCGTGGCATCGG	SETPWHR	Proteína N
2	AAGTTTCATCCTAATAAGTCG	KFHPNKS	Proteína N
3	TATCCTTGGTCTCCTGCGTAT	YPWSPAY	Proteína S
4	CTGGGTGATTTGAAGTTTTAT	LGDLKFY	Poliproteína
5	CCTGATCATAAGATGGCTCTG	PDHKMAL	Proteína M

Cuadro 4. Secuencia de los péptidos reactivos. La secuencia obtenida se comparó con la secuencia de aminoácidos del VDEP para obtener los mimótopos.

Para comprobar la afinidad de los bacteriófagos obtenidos en el despliegue en fagos hacia anticuerpos de cerdo se enfrentaron las diferentes clonas obtenidas a sueros de cerdo positivos y negativos al VDEP. No se encontró diferencia entre los sueros positivos y negativos al enfrentarlos a los bacteriófagos ni al comparar los resultados obtenidos al enfrentar los sueros a una cepa de campo del bacteriófago M13 (Figura 9).

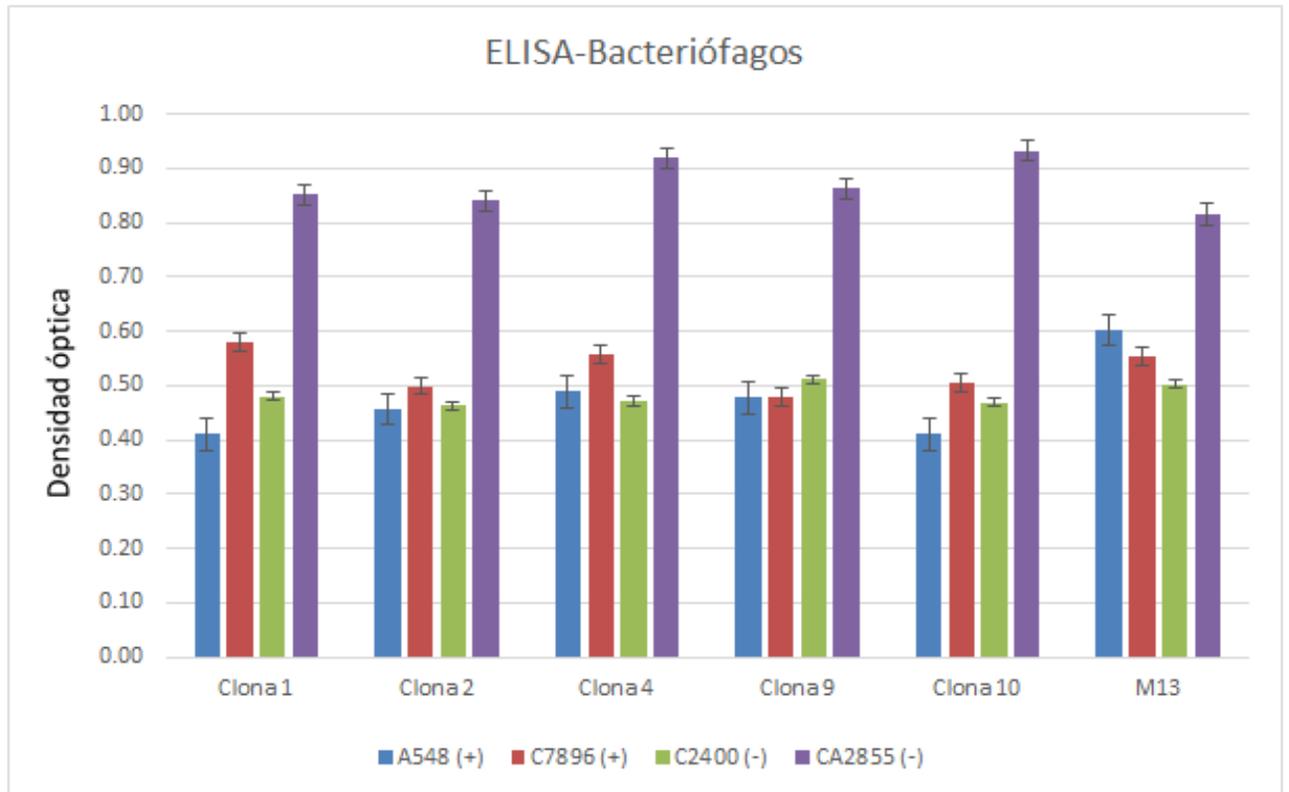


Figura 9. ELISA-Bacteriófagos. Para verificar si las clonas obtenidas en el despliegue de fagos podrían ser utilizadas en un ensayo de ELISA para el diagnóstico del VDEP fueron fijadas en una placa de poliestireno y enfrentadas a sueros de cerdo tanto positivos como negativos al VDEP. No se encontró diferencia en los resultados.

VIII. Discusión

La Diarrea Epidémica Porcina es una enfermedad viral emergente y reemergente que afecta la producción porcina a nivel mundial. Aunque los primeros casos se reportan desde 1971 en el continente Europeo es hasta el 2013 que esta enfermedad se hace presente en México. A la fecha se han desarrollado diversas técnicas para el diagnóstico de esta enfermedad, las más utilizada por su gran sensibilidad y especificidad son las ensayos moleculares. Las pruebas serológicas además de indicarnos si los animales han estado expuestos al agente infeccioso nos pueden ayudar a evaluar las diferentes estrategias de vacunación. Para el caso del Virus de la Diarrea Epidémica Porcina se han desarrollado vacunas casi desde su aparición sin contar a la fecha con una vacuna efectiva que nos ayude al control y erradicación de este virus. La técnica de ELISA tiene entre sus ventajas ser un ensayo que nos permite la evaluación de una gran cantidad de muestras en un corto periodo de tiempo a bajo costo, para el diagnóstico del VDEP se han desarrollado diferentes variantes de la técnica permitiendo detectar al virus en heces o anticuerpos generados en respuesta a la infección. En este proyecto estandarizamos una ELISA indirecta fijando al VDEP en placas de poliestireno, utilizar al virus completo en la estandarización de esta técnica tiene como desventaja que el virus debe ser aislado en cultivo celular, labor sumamente complicada debido las condiciones requeridas por el agente para su aislamiento existiendo diferentes reportes de tasas de aislamientos exitoso menores o iguales al 10% (Chen et al., 2014, Lee et al., 2015, Oka et al., 2014). Para este trabajo utilizamos la cepa Mx_EdoMexC2A1S_2014 (No. GenBank KM044335.1) aislada por nuestro grupo de trabajo a partir del brote en México de 2014 (Trujillo-Ortega et al., 2016), teniendo como ventaja que al ser un aislado de una cepa circulante en el país, los ensayos serológicos realizados pueden identificar cepas locales, no como ocurre actualmente que los ensayos de ELISA disponibles están diseñados con cepas de referencia o aislados en otros países. Esto cobra relevancia debido a que los coronavirus tienen una alta tasa de mutación y recombinación genética con una consecuente gran variabilidad genética (Huang et al., 2013).

Debido a la complejidad en el aislamiento del VDEP se han estandarizado técnicas de ELISA sustituyendo al virus con proteínas recombinantes, las

proteínas que se han utilizado principalmente son la proteína S, la M y la N (Li et al., 2015, Ren et al., 2011, Hou et al., 2007). La proteína S es la proteína genéticamente más variable dentro de las proteínas estructurales del virus ya que su secuencia genética contiene múltiples sitios de mutación que son utilizados para diferenciar los dos genotipos que existen del virus además estas mutaciones podrían conllevar a cambios en la antigenicidad de la proteína, razón que explica la ineffectividad de las vacunas existentes por lo que utilizar esta proteína en la estandarización de una prueba serológica podría causar falsos negativos en la prueba (Sun et al., 2014, Wang et al., 2016). La proteína M y la proteína N son de las proteínas genéticamente más conservadas en las diferentes cepas del VDEP aunque el proceso de producción de proteínas recombinantes es muy costoso y en algunos casos las proteínas deben modificarse para su utilización además de que las bacterias, los mohos y las células de insectos utilizadas en la síntesis de estas proteínas no son capaces de producir glicosilaciones como los mamíferos (Demain and Vaishnav, 2009). En la actualidad, los bacteriófagos son una alternativa para el desarrollo de métodos de diagnóstico debido a su uso en el sistema de despliegue en fago (Ph.D.). La técnica de despliegue en fago descrita en 1990 por Scott y Smith (Scott and Smith, 1990), permite la expresión de péptidos de interés en las proteínas presentes en la superficie de los bacteriófagos siendo los más utilizados los bacteriófagos filamentosos (M13). Además, los fagos tienen un genoma de ADN de cadena sencilla el cual es 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 filamentosos es una metodología para la selección de péptidos (mimótopos) por su capacidad de unión a anticuerpos (Tikunova and Morozova, 2009) que se caracteriza por su sencillez y su bajo costo. Para la estandarización de la técnica de ELISA se decidió utilizar mimótopos del VDEP obtenidos mediante despliegue de fagos como lo han reportado Cruz y Kim en 2006 y Cao y Ge en 2015 (Cruz et al., 2006, Cao et al., 2015), en donde lograron identificar péptidos que mimetizan epítomos de la proteína S del VDEP, utilizando anticuerpos monoclonales. En este proyecto se utilizaron anticuerpos policlonales producidos en conejo inmunizados con el VDEP cepa Mx_EdoMexC2A1S_2014, logrando identificar péptidos expresados en la proteína pIII de los fagos de la biblioteca comercial que mimetizan las proteínas N,

M y S del VDEP. Al utilizar anticuerpos policlonales logramos obtener variabilidad en los mimótopos seleccionados y aunque para las bioselecciones se utilizan principalmente anticuerpos monoclonales utilizar anticuerpos policlonales tiene como ventaja que son producidos con más facilidad y reflejan el estado actual de los epítomos inmunogénicos (Gazarian et al., 2011). Suo y Wang logran identificar clonas mediante despliegue en fagos capaces de unirse a la proteína S del virus de la gastroenteritis transmisible del cerdo seleccionándolas con una proteína recombinante del virus. Estos autores estandarizan una técnica de ELISA indirecta a partir de las clonas identificadas con alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico del virus (Suo et al., 2015). A pesar de que se logró identificar diferentes mimótopos del VDEP, al utilizarlos en la estandarización de la técnica de ELISA fijando las clonas obtenidas en las placas de poliestireno y al enfrentarlas a sueros de cerdo no se encontró diferencia entre las uniones obtenidas entre los sueros de cerdo positivos y negativos al VDEP. Algunas de las densidades ópticas obtenidas fueron superiores a 1.0 pero quizá se deba a que los sueros están reconociendo alguna de las otras proteínas estructurales que conforman al bacteriófago M13 pues este es un agente ubicuo. Shi y Wang en sus respectivos proyectos utilizan péptidos diseñados a partir de la secuencia de las clonas obtenidas mediante la técnica del despliegue de fagos para estandarizar pruebas de ELISA para el diagnóstico serológico de distintas enfermedades. El utilizar péptidos sintéticos podría ayudarnos a eliminar la inespecificidad generada por la presencia de otras proteínas presentes en los bacteriófagos. (Wang et al., 2018, Shi et al., 2018). El despliegue de fagos es una técnica con gran variedad de aplicaciones como la identificación de epítomos antigénicos utilizados para el desarrollo de agentes diagnósticos y terapéuticos así como para el desarrollo de vacunas. El haber identificados mimótopos del VDEP nos es de gran utilidad ya que pueden ser utilizados para otros proyectos, Oleksiewicz utiliza las secuencia obtenidas del despliegue en fagos para mapear e identificar epítomos del virus del síndrome respiratorio y reproductivo del cerdo, en este proyecto podemos utilizar las secuencias obtenidas para identificar epítomos de la cepa Mx_EdoMexC2A1S_2014 la cual fue utilizada para producir los antisueros utilizados en el despliegue en fagos (Oleksiewicz et al., 2001). Cao 2015 y Meng 2014 demuestran las propiedades de los péptidos identificados mediante

despliegue en fagos de evitar la adsorción del VDEP a la superficie celular reduciendo así la expresión de proteínas virales lo que indica la posible utilización de estos péptidos como agentes antivirales del VDEP (Cao et al., 2015, Meng et al., 2014).

IX. Conclusión y perspectivas

La DEP se ha convertido en una enfermedad viral que ha causado grandes pérdidas económicas alrededor del mundo y es considerada una de las enfermedades más importantes en los países con producción porcina intensiva. La mejor forma de obtener un diagnóstico del VDEP durante los brotes de DEP es mediante ensayos que detecten al virus o su genoma. Los ensayos que identifican anticuerpos generados en respuesta a la infección del VDEP nos dan información acerca de exposiciones previas al virus así como el estado inmune de un animal o una granja además nos permite evaluar la eficacia de las estrategias de vacunación. La técnica de ELISA nos permite trabajar un gran número de muestras en un corto periodo de tiempo a bajo costo, en este proyecto estandarizamos un ensayo de ELISA para el diagnóstico de la DEP y aunque el número de muestras utilizadas es bajo los resultados obtenidos nos muestran que esta prueba es funcional y que puede ser evaluada con un número mayor de muestras así como llevar a cabo el proceso de validación para que en un futuro podamos contar con este ensayo. Aunque la estandarización del ensayo de ELISA con mimótopos obtenidos del despliegue en fagos no mostro los resultados esperados, se logró identificar mimótopos que pueden ser utilizados en otros ensayos virológicos como los propuestos por Cao y Ge, 2015 y Cruz y Kim, 2006 al utilizar los mimótopos identificados en su estudio para inhibir la entra del virus a la célula abriendo la posibilidad de utilizar estos péptidos como terapia antiviral además aún nos falta verificar si al utilizar los péptidos diseñados a partir de las secuencias obtenidas en el despliegue en fagos pueden ser utilizados en la estandarización del ensayo de ELISA ya sea de manera individual o combinando más de un péptido lo que sería de gran utilidad para el diagnóstico de esta enfermedad.

X. Referencias

- BELOUZARD, S., MILLET, J. K., LICITRA, B. N. & WHITTAKER, G. R. 2012. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses*, 4, 1011-33.
- BOSCH, B. J., VAN DER ZEE, R., DE HAAN, C. A. & ROTTIER, P. J. 2003. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *Journal of virology*, 77, 8801-8811.
- CAO, L., GE, X., GAO, Y., ZARLENGA, D. S., WANG, K., LI, X., QIN, Z., YIN, X., LIU, J., REN, X. & LI, G. 2015. Putative phage-display epitopes of the porcine epidemic diarrhea virus S1 protein and their anti-viral activity. *Virus Genes*, 51, 217-24.
- CASTEL, G., CHTEOUI, M., HEYD, B. & TORDO, N. 2011. Phage display of combinatorial peptide libraries: application to antiviral research. *Molecules*, 16, 3499-518.
- CRUZ, D. J., KIM, C. J. & SHIN, H. J. 2006. Phage-displayed peptides having antigenic similarities with porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) neutralizing epitopes. *Virology*, 354, 28-34.
- CHANG, Y. C., KAO, C. F., CHANG, C. Y., JENG, C. R., TSAI, P. S., PANG, V. F., CHIOU, H. Y., PENG, J. Y., CHENG, I. C. & CHANG, H. W. 2017. Evaluation and Comparison of the Pathogenicity and Host Immune Responses Induced by a G2b Taiwan Porcine Epidemic Diarrhea Virus (Strain Pintung 52) and Its Highly Cell-Culture Passaged Strain in Conventional 5-Week-Old Pigs. *Viruses*, 9.
- CHEN, Q., LI, G., STASKO, J., THOMAS, J. T., STENSLAND, W. R., PILLATZKI, A. E., GAUGER, P. C., SCHWARTZ, K. J., MADSON, D., YOON, K. J., STEVENSON, G. W., BURROUGH, E. R., HARMON, K. M., MAIN, R. G. & ZHANG, J. 2014. Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea viruses associated with the 2013 disease outbreak among swine in the United States. *J Clin Microbiol*, 52, 234-43.
- CHEN, Q., THOMAS, J. T., GIMÉNEZ-LIROLA, L. G., HARDHAM, J. M., GAO, Q., GERBER, P. F., OPRIESSNIG, T., ZHENG, Y., LI, G., GAUGER, P. C., MADSON, D. M., MAGSTADT, D. R. & ZHANG, J. 2016. Evaluation of serological cross-reactivity and cross-neutralization between the United States porcine epidemic diarrhea virus prototype and S-INDEL-variant strains. *BMC Vet Res*, 12, 70.
- DAVIES, P. R. 2015. The dilemma of rare events: Porcine epidemic diarrhea virus in North America. *Prev Vet Med*.
- DEMAIN, A. L. & VAISHNAV, P. 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv*, 27, 297-306.
- DIEL, D. G., LAWSON, S., OKDA, F., SINGREY, A., CLEMENT, T., FERNANDES, M. H. V., CHRISTOPHER-HENNINGS, J. & NELSON, E. A. 2016. Porcine epidemic diarrhea virus: An overview of current virological and serological diagnostic methods. *Virus Research*, 226, 60-70.
- FIELDS, B. 2001. *Virology*.
- 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.
- GUSCETTI, F., BERNASCONI, C., TOBLER, K., VAN REETH, K., POSPISCHIL, A. & ACKERMANN, M. 1998. Immunohistochemical detection of porcine epidemic diarrhea virus compared to other methods. *Clin Diagn Lab Immunol*, 5, 412-4.
- HOU, X. L., YU, L. Y. & LIU, J. 2007. Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant nucleocapsid protein for detection of porcine epidemic diarrhea (PEDV) antibodies. *Vet Microbiol*, 123, 86-92.
- HUAN, C. C., WANG, Y., NI, B., WANG, R., HUANG, L., REN, X. F., TONG, G. Z., DING, C., FAN, H. J. & MAO, X. 2015. Porcine epidemic diarrhea virus uses cell-surface heparan sulfate as an attachment factor. *Arch Virol*, 160, 1621-8.

- HUANG, Y. W., DICKERMAN, A. W., PINEYRO, P., LI, L., FANG, L., KIEHNE, R., OPRIESSNIG, T. & MENG, X. J. 2013. Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States. *MBio*, 4, 1-13.
- JARVIS, M. C., LAM, H. C., ZHANG, Y., WANG, L., HESSE, R. A., HAUSE, B. M., VLASOVA, A., WANG, Q., ZHANG, J., NELSON, M. I., MURTAUGH, M. P. & MARTHALER, D. 2016. Genomic and evolutionary inferences between American and global strains of porcine epidemic diarrhea virus. *Prev Vet Med*, 123, 175-84.
- JUNG, K. & SAIF, L. J. 2015. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *Vet J*, 204, 134-43.
- KUSANAGI, K., KUWAHARA, H., KATOH, T., NUNOYA, T., ISHIKAWA, Y., SAMEJIMA, T. & TAJIMA, M. 1992. Isolation and serial propagation of porcine epidemic diarrhea virus in cell cultures and partial characterization of the isolate. *J Vet Med Sci*, 54, 313-8.
- KWEON, C. H., KWON, B. J., LEE, J. G., KWON, G. O. & KANG, Y. B. 1999. Derivation of attenuated porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) as vaccine candidate. *Vaccine*, 17, 2546-53.
- KWEON, C. H., LEE, J. G., HAN, M. G. & KANG, Y. B. 1997. Rapid diagnosis of porcine epidemic diarrhea virus infection by polymerase chain reaction. *J Vet Med Sci*, 59, 231-2.
- LEE, C. 2015. Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Virology*, 12, 193.
- LEE, S., KIM, Y. & LEE, C. 2015. Isolation and characterization of a Korean porcine epidemic diarrhea virus strain KNU-141112. *Virus Res*, 208, 215-24.
- LI, B. X., GE, J. W. & LI, Y. J. 2007. Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus. *Virology*, 365, 166-72.
- LI, Y., ZHENG, F., FAN, B., MUHAMMAD, H. M., ZOU, Y. & JIANG, P. 2015. Development of an indirect ELISA based on a truncated S protein of the porcine epidemic diarrhea virus. *Can J Microbiol*, 61, 811-7.
- LIN, C.-M., SAIF, L. J., MARTHALER, D. & WANG, Q. 2016. Evolution, antigenicity and pathogenicity of global porcine epidemic diarrhea virus strains. *Virus Research*, 226, 20-39.
- MENG, F., SUO, S., ZARLENGA, D. S., CONG, Y., MA, X., ZHAO, Q. & REN, X. 2014. A phage-displayed peptide recognizing porcine aminopeptidase N is a potent small molecule inhibitor of PEDV entry. *Virology*, 456-457, 20-7.
- OKA, T., SAIF, L. J., MARTHALER, D., ESSEILI, M. A., MEULIA, T., LIN, C. M., VLASOVA, A. N., JUNG, K., ZHANG, Y. & WANG, Q. 2014. Cell culture isolation and sequence analysis of genetically diverse US porcine epidemic diarrhea virus strains including a novel strain with a large deletion in the spike gene. *Vet Microbiol*, 173, 258-69.
- OLEKSIWICZ, M. B., BOTNER, A., TOFT, P., NORMANN, P. & STORGAARD, T. 2001. Epitope mapping porcine reproductive and respiratory syndrome virus by phage display: the nsp2 fragment of the replicase polyprotein contains a cluster of B-cell epitopes. *J Virol*, 75, 3277-90.
- PARK, J. E., CRUZ, D. J. & SHIN, H. J. 2014. Clathrin- and serine proteases-dependent uptake of porcine epidemic diarrhea virus into Vero cells. *Virus Res*, 191, 21-9.
- REN, X., SUO, S. & JANG, Y. S. 2011. Development of a porcine epidemic diarrhea virus M protein-based ELISA for virus detection. *Biotechnol Lett*, 33, 215-20.
- SCOTT, J. K. & SMITH, G. P. 1990. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*, 249, 386-90.
- SHI, W., ZHAO, L., LI, S., XU, G. & ZENG, Y. 2018. Serological diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection by using the mimic epitopes. *World J Microbiol Biotechnol*, 34, 82.
- SHIRATO, K., MATSUYAMA, S., UJIKE, M. & TAGUCHI, F. 2011. Role of proteases in the release of porcine epidemic diarrhea virus from infected cells. *J Virol*, 85, 7872-80.
- SONG, D. & PARK, B. 2012. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes*, 44, 167-75.

- SPAAN, W., CAVANAGH, D. & HORZINEK, M. 1988. Coronaviruses: structure and genome expression. *Journal of General Virology*, 69, 2939-2952.
- STEVENSON, G. W., HOANG, H., SCHWARTZ, K. J., BURROUGH, E. R., SUN, D., MADSON, D., COOPER, V. L., PILLATZKI, A., GAUGER, P., SCHMITT, B. J., KOSTER, L. G., KILLIAN, M. L. & YOON, K. J. 2013. Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *J Vet Diagn Invest*, 25, 649-54.
- STURMAN, L. S., RICARD, C. & HOLMES, K. 1985. Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus: activation of cell-fusing activity of virions by trypsin and separation of two different 90K cleavage fragments. *Journal of virology*, 56, 904-911.
- SUN, M., MA, J., WANG, Y., WANG, M., SONG, W., ZHANG, W., LU, C. & YAO, H. 2015. Genomic and epidemiological characteristics provide new insights into the phylogeographical and spatiotemporal spread of porcine epidemic diarrhea virus in Asia. *J Clin Microbiol*, 53, 1484-92.
- SUN, R., LENG, Z., ZHAI, S. L., CHEN, D. & SONG, C. 2014. Genetic variability and phylogeny of current Chinese porcine epidemic diarrhea virus strains based on spike, ORF3, and membrane genes. *ScientificWorldJournal*, 2014, 208439.
- SUO, S., WANG, X., ZARLENGA, D., BU, R.-E., REN, Y. & REN, X. 2015. Phage display for identifying peptides that bind the spike protein of transmissible gastroenteritis virus and possess diagnostic potential. *Virus Genes*, 51, 51-56.
- TIKUNOVA, N. V. & MOROZOVA, V. V. 2009. Phage display on the base of filamentous bacteriophages: application for recombinant antibodies selection. *Acta Naturae*, 1, 20-8.
- TRUJILLO-ORTEGA, M. E., BELTRÁN-FIGUEROA, R., GARCÍA-HERNÁNDEZ, M. E., JUÁREZ-RAMÍREZ, M., SOTOMAYOR-GONZÁLEZ, A., HERNÁNDEZ-VILLEGAS, E. N., BECERRA-HERNÁNDEZ, J. F. & SARMIENTO-SILVA, R. E. 2016. Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea virus associated with the 2014 disease outbreak in Mexico: case report. *BMC Veterinary Research*, 12, 132.
- WANG, J., SONG, J., ZHOU, S., FU, Y., BAILEY, J. A. & SHEN, C. 2018. Screening and identification of RhD antigen mimic epitopes from a phage display random peptide library for the serodiagnosis of haemolytic disease of the foetus and newborn. *Blood Transfus*, 1-7.
- WANG, X., CHEN, J., SHI, D., SHI, H., ZHANG, X., YUAN, J., JIANG, S. & FENG, L. 2016. Immunogenicity and antigenic relationships among spike proteins of porcine epidemic diarrhea virus subtypes G1 and G2. *Arch Virol*, 161, 537-47.
- ZHU, X., LIU, Q., DU, L., LU, L. & JIANG, S. 2013. Receptor-binding domain as a target for developing SARS vaccines. *J Thorac Dis*, 5 Suppl 2, 1-8.

Anexo 1. Soluciones y reactivos.

Utilizadas en el ensayo de ELISA con el virus completo.

Solución amortiguadora de carbonatos 0.05M pH 9.6.

- Na_2CO_3 0.795g.
- NaHCO_3 1.46 g.
- NaN_3 0.1 g.
- Cuanto baste para agua destilada 500 ml.

Solución amortiguadora de fosfatos salinos (PBS) 0.1M pH 7.

- NaH_2PO_4 0.2M 5.421 g.
- Na_2HPO_4 0.2M 8.662 g.
- NaCl 4.35 g.
- Cuanto baste para agua destilada 500 ml.

PBST

- PBS.
- Tween 20 al 0.2%.
- Cuanto baste para agua destilada 500 ml.

PBLT

- PBS,
- Leche descremada al 2%.
- Triton X-100 al 0.02%.
- Cuanto baste para agua destilada 500 ml.

Utilizadas en el despliegue en fagos.

Solución salina tamponada con Tris (TBS).

- Tris-HCl 50mM.
- NaCl 150mM.
- Agua destilada.
- Ajustar pH a 7.5.

TBST

- TBS
- Tween 20 al 0.1%%
- Agua destilada.

Medio YT2X

- Bacto triptona 16g.
- Extracto de levadura 10g.
- NaCl 5g.
- Agua destilada cuanto baste para 1L.

Top agar

- Peptona de caseína 1g.
- Extracto de levadura 0.5g.
- NaCl 0.5g.
- Agar 0.75g.
- Agua destilada cuanto baste para 100 ml.

Solución de ioduro

- Tris-HCl 10 mM.
- EDTA 1 mM.
- NaI 4 M.
- Agua destilada.

Solución de precipitación

- PEG al 20%.
- NaCl al 2.5 M.

Solución de bloqueo

- NaHCO_3 0.1M.
- NaN_3 0.02%.
- 5 mg/ml de albumina sérica bovina.