



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE MEDICINA  
VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

EVALUACIÓN DEL ANTÍGENO RECOMBINANTE E2 Y  
VIRIONES EN EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DEL VIRUS  
DE DIARREA VIRAL BOVINA MEDIANTE ELISA INDIRECTO.

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A

**DARINKA TORRES PEREZ**

**ASESORES DE TESIS**

Biol. Amanda Gayosso Vázquez

Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2020.





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

A mis padres, mis compañeros entrañables de toda la vida, con quienes he recorrido todo este camino lleno de logros, fracasos, alegrías y amarguras. Cuya esencia ha incitado valentía, confianza, persistencia entrega y cariño incondicional. A ellos, a quienes debo en gran medida lo que soy.

A mis queridos hermanos, de quienes he recibido cariño, comprensión, apoyo y sabiduría. Han reflejado motivación y admiración constante a lo largo de mi vida.

A mi amado esposo quien me ha brindado amor, apoyo, comprensión motivación e inspiración constante durante esta etapa. Quien también plasmó parte de sus “dotes numéricos” enriqueciendo el presente trabajo.

A mi pequeña sobrina que con sus pequeñeces me recuerda la belleza de la inocencia y la bondad.

A mis abuelitos que han sido el pilar de mi amada familia, en cuyo amor y ternura encontramos siempre refugio.

## **AGRADECIMIENTO**

A mi Universidad Nacional Autónoma de México y Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por acogerme y regalarme tanto aprendizaje.

A la Bióloga Amanda Gayosso y Dr. Rogelio Alonso, por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio. Agradezco profundamente por todo el aprendizaje y la capacitación, por el apoyo brindado en cada uno de los aspectos, así como por los detalles que hicieron de mi estancia un ambiente de confianza, amistad y alegría.

A la Dra. Vianey Ramírez, por haberme enseñado mucho de lo que hoy se. Agradezco su amistad, tiempo, esfuerzo, perseverancia e incluso paciencia brindados durante el desarrollo de este trabajo.

A Pablo Pintor, por sus enseñanzas y su amistad.

A todos mis compañeros de laboratorio Silvia, Víctor, Liz, Europa, Jess. De quienes he aprendido. Y quienes hicieron extraordinaria mi estancia en el laboratorio.

Al Dr. Raúl Ulloa por el tiempo y esfuerzo brindados para desarrollar la parte estadística de este trabajo.

## Contenido

1	INTRODUCCIÓN .....	3
1.1	Aspectos generales.....	3
1.2	Agente etiológico.....	4
1.2.1	Taxonomía y estructura.....	4
1.2.2	Genoma viral .....	4
1.3	Genotipos y biotipos .....	10
1.4	Patogénesis.....	10
1.4.1	Infección aguda .....	11
1.4.2	Infección intrauterina.....	11
1.4.3	Infección persistente .....	12
1.4.4	Enfermedad de las mucosas.....	12
1.5	Diagnóstico del virus DVB.....	13
1.5.1	Pruebas diagnósticas directas .....	13
1.5.2	Pruebas diagnósticas indirectas .....	16
1.6	Prevención y control.....	17
1.7	Antígenos recombinantes en el diagnóstico serológico como parte de la prevención y control .	18
2	JUSTIFICACIÓN.....	21
3	HIPÓTESIS .....	22
4	OBJETIVO .....	22
5	OBJETIVOS PARTICULARES .....	22
6	MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
6.1	Propagación del antígeno recombinante E2 expresado en baculovirus .....	23
6.2	Propagación del virus de Diarrea Viral Bovina. ....	24
6.3	Caracterización del virus y del antígeno recombinante por Western blot. ....	25
6.4	Optimización y estandarización de los antígenos y sueros empleados en el sistema ELISA indirecto. ....	26
6.4.1	Titulación de virus .....	26
6.4.2	Titulación del antígeno recombinante .....	27

6.4.3	Titulación de sueros control .....	28
6.5	Ensayos de repetibilidad y determinación de los niveles de sensibilidad y especificidad que presenta el uso del antígeno recombinante y el virus de DVB en el sistema ELISA indirecto. ....	29
6.5.1	Obtención de grupos control positivo y negativo .....	29
6.5.2	Repetibilidad.....	29
6.5.3	Determinación de punto de corte, sensibilidad y especificidad .....	30
7	RESULTADOS.....	32
7.1	Cultivo celular y propagación del antígeno recombinante E2. ....	32
7.2	Cultivo celular y propagación viral de DVB .....	33
7.3	Caracterización inmunogénica del virus de DVB y del antígeno recombinante E2 por Western Blot	34
7.4	Optimización y estandarización de los antígenos y sueros empleados en el sistema ELISA indirecto. ....	37
7.4.1	Titulación del virus de DVB y del antígeno recombinante E2 .....	37
7.4.2	Titulaciones de los sueros de conejo y bovino positivos y negativos.....	40
7.5	Ensayos de repetibilidad y determinación de los niveles de sensibilidad y especificidad que presenta el uso del antígeno recombinante y el virus de DVB en el sistema ELISA indirecto. ....	43
7.5.1	Puntos de corte, sensibilidad y especificidad.....	46
8	DISCUSIÓN .....	52
9	CONCLUSIONES .....	56
10	REFERENCIAS .....	57

## RESUMEN

La enfermedad de diarrea viral bovina (DVB) es causada por el virus de diarrea viral bovina que pertenece al género *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae*. El cual representa un importante impacto económico en la industria ganadera relacionado principalmente con la disminución de la producción láctea, retraso en el crecimiento, aumento de infecciones secundarias y mortalidad en animales jóvenes.

La complejidad de la patogénesis, así como la inexistencia de tratamientos y protocolos exitosos orientados al abordaje de la enfermedad, han hecho que la prevención y el control sean los factores clave para mitigar la enfermedad aunado al uso de herramientas diagnósticas confiables y adaptables a grandes poblaciones. Dentro de las herramientas diagnósticas más empleadas destaca la prueba serológica ELISA indirecto la cual ha mostrado ser una herramienta versátil debido a su practicidad para aplicarse a gran escala, con resultados en poco tiempo y altos niveles de confianza.

En el presente trabajo se evaluó el desempeño del antígeno recombinante E2, como antígeno de detección en el sistema ELISA indirecto, este antígeno está basado en la expresión del gen que codifica para la glicoproteína E2 del virus de DVB, una de las proteínas más inmunodominantes. Esta proteína recombinante fue previamente expresada en un baculovirus que empleó el sistema comercial Bac to Bac.

Tanto el antígeno recombinante E2 como el virus de DVB tipo I y II se propagaron mediante la infección de cultivos celulares Sf9 y MDBK respectivamente, seguido de la caracterización antigénica de ambos por western blot. Con el cual se comprobó, por una parte, la presencia de una banda correspondiente con el peso estimado de la proteína recombinante E2 (43.7 kDa) y por otra, el reconocimiento de diversas bandas correspondientes con los diferentes pesos de las proteínas que componen al virus de DVB.

Lo anterior permitió la ejecución de ensayos de titulación con la finalidad de obtener las diluciones óptimas a emplear en el sistema ELISA indirecto, tanto de antígenos (recombinante E2 y virus), como de los sueros (conejo y bovino). Encontrando que la

dilución apropiada para la fijación del virus y el antígeno recombinante E2 a la placa de microtitulación es de: 1:8000 y 1:5000 respectivamente, mientras que la dilución a emplear de los sueros es de:1:10.

Bajo estas determinaciones se procesaron dos grupos de muestras séricas de bovino, previamente identificadas como positivas y negativa. Los resultados arrojaron una clara distinción entre individuos positivos y negativos evaluados tanto con el virus como con el antígeno recombinante, por lo que se realizaron ensayos de repetibilidad con la finalidad de obtener resultados consistentes tras la ejecución de la misma metodología en distintas repeticiones. Los resultados mostraron un coeficiente de variación menor al 20% indicando que existió una adecuada repetibilidad en la metodología. Así mismo, se obtuvieron coeficientes de correlación aceptables que confirman concordancia entre mediciones.

Mediante la distribución de los valores de las muestras normalizadas (empleando controles internos positivos y negativos), se seleccionaron diferentes puntos de corte, estimando los niveles de sensibilidad y especificidad diagnóstica con cada uno, así como su respectivo valor predictivo positivo y negativo. Se determinó el valor 0.4 como el punto de corte apropiado, ya que con éste se obtienen altos niveles de sensibilidad y especificidad diagnóstica, minimizando y equilibrando la presencia de individuos falsos positivos y negativos. Lo anterior permitió la comparación entre los valores obtenidos con el del virus de DVB y el antígeno recombinante en el mismo el sistema diagnóstico ELISA inidecto.

Encontrando que al punto de corte 0.4, el antígeno recombinante muestra una sensibilidad y especificidad de (98.33% y 97.58%) respectivamente, mientras que la sensibilidad y especificidad obtenidas con el uso del virus de DVB fueron de (80.33% y 95.16%) respectivamente, evidenciando así la capacidad del antígeno recombinante E2 de detectar anticuerpos neutralizantes de individuos expuestos al virus de DVB, así como su potencial como antígeno de diagnóstico en el sistema ELISA indirecto.



# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Aspectos generales

El virus de la Diarrea Viral Bovina (DVB) es uno de los principales agentes infecciosos que afecta al ganado bovino. El cual puede generar trastornos en sistema digestivo, respiratorio o reproductivo, siendo este último el que refleja mayor impacto económico (Sandvik, 1999; Goyal and Ridpath, 2008; OIE., 2013)(Lértora, 2003), ya que los trastornos reproductivos están directamente relacionados con la disminución de la producción láctea, la tasa de fertilidad, aumento en el índice de abortos, malformaciones, retraso en el crecimiento e incluso la muerte de los animales con infecciones agudas (López, 2014).

La diarrea viral bovina es una enfermedad de distribución mundial y tiende a ser endémica en la mayoría de las poblaciones bovinas (Marzocca, 2003). Los índices de prevalencia reportados alrededor del mundo oscilan entre 0.5 al 2% de animales persistentemente infectados (PI) mientras que en los animales seropositivos los índices van del 60 al 80% (Rivera, 1999; Lértora, 2003). Esta enfermedad presenta rápida difusión, alcanzando una morbilidad del 80% con una mortalidad del 20% (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2007).

El diario oficial de la Federación de los Estados Unidos Mexicanos, ha clasificado la enfermedad de diarrea viral bovina en el grupo 3, el cual está conformado por aquellas enfermedades y plagas que están presentes en territorio nacional y son consideradas como endémicas, aunque dichas enfermedades suelen ser de menor riesgo deberán ser de notificación mensual obligatoria (SAGARPA, 2007).

## 1.2 Agente etiológico

### 1.2.1 Taxonomía y estructura

El virus de DVB, pertenece al género *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae* (Donofrio *et al.*, 2006; Marini, 2008).

Presenta una cápside proteica, rodeada por una envoltura fosfolipídica que adquiere de la célula huésped posterior a la infección, tal característica hace que estos virus sean susceptibles a la inactivación por solventes y detergentes. Esta envoltura lipídica consta de glicoproteínas ancladas a ella, que permiten la interacción del virión con la célula hospedera (Lértora, 2003). El virus de diarrea viral bovina presenta simetría icosaédrica y mide de 40 a 60nm de diámetro (Martínez y Santos, 2008).

### 1.2.2 Genoma viral

El virus se compone de una cadena simple de RNA de polaridad positiva de 12.5 kb, posee solo un marco de lectura (ORF) que codifica para una poliproteína de aproximadamente 4000 aminoácidos (450 kDa) (Rivera, 1999).

Cabe destacar que el RNA genómico carece de una estructura equivalente al CAP así como de una secuencia de poliadenosina (PoliA) en su extremo 3'. Por lo que en cada uno de sus extremos presenta regiones sin traducir o UTR (Untranslated region). Siendo la región del extremo 5' la de mayor relevancia puesto que contiene una secuencia de nucleótidos altamente conservada en todos los pestivirus, que funge como sitio de entrada interno al ribosoma (IRES) y media la transducción de la poliproteína viral (Collett *et al.*, 1988; Marzocca, 2003; Marini, 2008; Vargas, *et al.*, 2009; López, 2014).

La poliproteína es co y post-traduccionalmente procesada por endoproteasas virales y celulares dando lugar a entre 11 y 12 proteínas que pueden ser estructurales o no estructurales (Vargas *et al.*, 2009), tal como se muestra en la Figura 1.

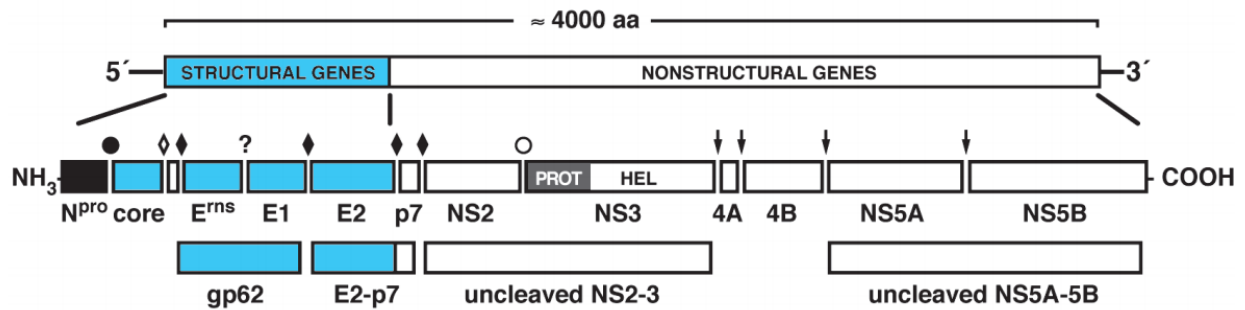


Figura 1. Diagrama del genoma de los pestivirus indicando las regiones 5' UTR y 3' UTR, así como las proteínas estructurales y no estructurales codificadas en cada una de las regiones (Lindenbach *et al.*, 2007).

Como puede observarse, las proteínas estructurales están codificadas en la región amino terminal (N-terminal) o extremo 5' de la poliproteína mientras que las proteínas no estructurales se encuentran codificadas en la región carboxilo (C-terminal), la zona más próxima al extremo 3' posterior a la secuencia de la proteína E2 (Lindenbach *et al.*, 2007).

### Proteínas estructurales

#### Proteína Npro:

Es la primera proteína codificada en la secuencia genómica estructural. Sin embargo, se trata de una autoproteasa, que se auto cataliza postraduccionalmente para liberarse de la proteína de la cápside (proteína C). Se ha sugerido que Npro tiene la propiedad de bloquear específicamente la actividad del factor regulador de interferón (IRF-3), un factor de transcripción esencial para la activación del promotor de interferón (Lindenbach *et al.*, 2007; Marini, 2008; López, 2014).

### Proteína C:

También denominada proteína de la cápside posee un peso de aproximadamente 14 KDa y es una proteína que se encuentra altamente conservada en los pestivirus. Esta proteína es procesada por Npro en su extremo amino terminal antes de su ensamblaje en el virión. Su función es empaquetar el RNA genómico viral y procurar las interacciones necesarias para la formación del virión envuelto, aún se desconocen los dominios involucrados en este proceso (Collett *et al.*, 1988)

Inmunogénicamente no resulta significativa puesto que se ha observado que aquellos animales que han cursado por una infección con el virus de DVB no desarrollan anticuerpos contra esta proteína. ( Elahi *et al.*, 1999; Marzocca, 2003).

### Proteína Erns:

También conocida como E0, es una proteína de envoltura de 48 KDa. Erns es procesada por peptidasas señal de la célula huésped y es secretada por la misma a través de exocitosis. A esta proteína se le ha atribuido la función de ribonucleasa en el espacio extracelular, aunque aún no están claros los mecanismos por los cuales lleva a cabo tal función.

La mayor parte de su producción es retenida en la célula y unida a la envoltura viral, de hecho ésta proteína establece el primer contacto con la célula a través de su extremo carboxilo, puesto que presenta afinidad por glicosaminoglicanos (Lindenbach *et al.*, 2007; Marini, 2008)

Erns ha sido capaz de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes mismos que además de inhibir la actividad ribonucleasa tienden a neutralizar la infectividad del virus (López, 2014).

### Proteína E1:

Es también una glicoproteína de envoltura que presenta dos dominios hidrofóbicos los cuales le sirven de anclaje a la membrana. E1 forma un heterodímero unido por puentes disulfuro con E2, que resultan ser esenciales durante la entrada a la célula hospedera (Yu *et al.*, 1999; López, 2014).

No resulta significativa en cuanto a sus niveles de anticuerpos neutralizantes.

#### Proteína E2:

Es una de las glicoproteínas de envoltura de mayor tamaño. Posee una masa de aproximadamente 41 a 48 kDa y está formada por 370 aminoácidos, presenta un dominio extremo N-terminal y uno C-terminal, en este último dominio se encuentran 30 aminoácidos que funcionan como anclaje transmembranal (Donofrio *et al.*, 2006). E2 forma heterodímeros con E1 que son esenciales para la entrada del virus, misma que depende de los residuos cargados en los segmentos transmembrana de E1 y E2. Así mismo da lugar a homodímeros E2.

Tanto los homodímeros E2 como los heterodímeros E1-E2 están presentes en la superficie de los viriones maduros (Marzocca, 2003; Li *et al.*, 2013).

E2 permite la unión con el receptor de membrana celular CD46, promoviendo la fusión entre membranas y la internalización del virus a través de la formación de un endosoma (Li *et al.*, 2013).

En comparación con el resto de las proteínas estructurales, E2 resulta ser de mayor relevancia inmunológica, puesto que presenta la mayor capacidad de inducción de anticuerpos neutralizantes en el huésped, posterior a la infección o vacunación (Bolin and Ridpath, 1996).

Esto ha sido demostrado mediante el desafío de las proteínas de envoltura contra sueros, donde se observó mayor reactividad de los anticuerpos frente a algunos dominios (epítomos) de E2 siendo así N-terminal el dominio más inmunogénico de los tres dominios que han sido reportados (Xue *et al.*, 1990; Li *et al.*, 2013).

Actualmente esta proteína es una de las moléculas más empleadas para el estudio de la enfermedad y el desarrollo de nuevas herramientas preventivas y diagnósticas considerando sus propiedades inmunogénicas (Donofrio *et al.*, 2006).

## Proteínas no estructurales

### Proteína p7:

Es una pequeña proteína hidrofóbica con una masa molecular de aproximadamente 6 a 7 kDa, su código genético separa a las secuencias que codifican para las proteínas E2 y NS2-3 (Harada *et al.*, 2000).

Se sabe que el corte entre E2 y p7, se da por proteasas del hospedero y en ocasiones el procesamiento puede llegar a ser irregular dando lugar a un complejo extra (E2-p7). Tal complejo ha resultado ser necesario para la formación de virus infectivo en cultivos de células MDBK (Elbers *et al.*, 1996). Se desconoce con precisión la función de p7, sin embargo, se presume que la presencia de un dominio citoplasmático en la proteína interactúa con la proteína de la cápside para iniciar el proceso de gemación. También se ha propuesto la función de vaporina, con capacidad de permeabilizar la membrana celular y por consiguiente facilitar la liberación de los nuevos viriones ensamblados (Harada *et al.*, 2000; Lindenbach *et al.*, 2007).

### Proteína NS2-3:

Esta proteína se encuentra muy conservada en la familia *Flaviviridae*. Suele además expresarse como dos polipéptidos separados; NS2 y NS3. Sin embargo, el procesamiento de NS2-3 es necesario para la replicación del RNA y su eficiencia está regulada por una chaperona celular que determinará la citopagenicidad viral (Lindenbach *et al.*, 2007).

El procesamiento en el sitio de NS2-3 pone de manifiesto la notable variación entre las especies y cepas de DVB (Lindenbach *et al.*, 2007; López, 2014).

### Proteína NS2:

Es una cisteín proteasa hidrofóbica y de tamaño variable debido a la existencia de elementos genéticos adicionales generados por rearrreglos en la secuencia o por inserción en el genoma de secuencias ajenas al mismo. Esta proteína es responsable del procesamiento del complejo NS2-3, que es esencial para la replicación del RNA de los pestivirus. En cuanto al aspecto inmunogénico, NS2 no resulta significativa (Marzocca, 2003; López, 2014).

#### Proteína NS3:

Esta proteína posee un dominio N-terminal que funciona como serin proteasa, y es responsable del procesamiento de las proteínas NS4B, NS5A y NS5B. Además del dominio N-terminal, posee también un dominio C-terminal que funciona como RNA helicasa (Lindenbach *et al.*, 2007), y como ATPasa, ambas funciones son importantes durante la replicación del RNA viral (Marzocca, 2003; López, 2014).

NS3 es considerada como una de las proteínas no estructurales con mejor capacidad inmunogénica. Cabe señalar que la expresión de NS3 esta correlacionada con la citopatogenicidad de DVB (Kümmerer, *et al.*, 1998).

#### Proteínas NS4A y NS4B:

Ambas proteínas son hidrofóbicas y similares en cuanto a tamaño y composición. Como se mencionó anteriormente, NS4A es un cofactor para la actividad proteolítica de NS3 y se requiere para la escisión en sitios NS4B/NS5A y NS5A/NS5B (Xu *et al.*, 1997; Lindenbach *et al.*, 2007). Por su parte NS4B está involucrada en el proceso de replicación y existen datos preliminares que sugieren su relación con el cambio de patogénesis viral. En cuanto a la inmunogenicidad está descrito que los bovinos infectados con el virus de diarrea viral bovina no desarrollan anticuerpos contra estas proteínas (Marzocca, 2003; López, 2014).

#### Proteínas NS5A y NS5B:

NS5A es una proteína hidrofílica cuya secuencia presenta una variabilidad considerable en los pestivirus (Lindenbach *et al.*, 2007). Se ha sugerido un papel importante en la replicación viral a través de la unión de la proteína con el factor-1 traduccional de elongamiento (Eef1a) (Johnson *et al.*, 2001).

La proteína NS5B ha sido identificada como una polimerasa dependiente de RNA. Se considera que las proteínas no estructurales recién sintetizadas, se ensamblan en complejos funcionales de replicación y llevan a cabo la síntesis de RNA viral (López, 2014).

### 1.3 Genotipos y biotipos

El virus de DVB presenta 2 genotipos; genotipo 1 (DVB-I) y genotipo 2 (DVB-II) que a su vez presentan 11 y 2 subgenotipos respectivamente (Pedrera *et al.*, 2007; Gómez *et al.*, 2017). Esta clasificación está basada en criterios genómicos (Ridpath *et al.*, 1994).

Se ha propuesto un tercer genotipo VDVB-3 o virus “HoBi-like”. Se trata de un patógeno viral bovino que produce una enfermedad similar a las infecciones causadas por DVB-I y DVB-II. Actualmente el virus “HoBi-like” ha sido detectado en Sudamérica, Europa y Asia. Sin embargo, no existen reportes concretos de su presencia en Norteamérica, ni evidencia contundente que demuestre lo contrario (Bauermann *et al.*, 2013; Gómez *et al.*, 2017).

Adicionalmente el virus de DVB puede ser clasificado en dos biotipos: citopático (CP) y no citopático (NCP), tal clasificación es independiente del genotipo y está en función del efecto que el virus produce en ciertos cultivos celulares (Pedrera *et al.*, 2007).

La determinación de la citopatogenicidad viral está dada por la expresión de la proteína NS3.

En el biotipo NCP, el procesamiento en los sitios de corte 2/3 del complejo NS2-3 no se lleva a cabo, por lo que únicamente se expresa NS2-3, mientras que en el biotipo CP, el procesamiento es completo permitiendo la expresión tanto de NS2-3 como de NS3.

Por esta razón la proteína NS3 es empleada como marcador molecular para la identificación de biotipos CP (Kümmerer *et al.*, 1998).

Las duplicaciones, rearrreglos e inserciones en las secuencias celulares, así como las deleciones en el marco de lectura son los fenómenos moleculares más frecuentes que dan lugar a esta condición (Xu *et al.*, 1997; Kümmerer *et al.*, 1998).

### 1.4 Patogénesis

El virus de DVB provoca una infección que genera una enfermedad con presentaciones clínicas variadas, mismas que dependerán de factores como el genotipo y biotipo del virus que produce la infección, así como de la susceptibilidad y características del huésped.



(Pedrera *et al.*, 2007). Para comprender la patogénesis de la infección se han propuesto cuatro presentaciones principales, (Infección aguda, infección intrauterina, infección persistente y enfermedad de las mucosas) (Romero *et al.*, 2012).

#### 1.4.1 Infección aguda

Generalmente ocurre como una infección temporal que puede llegar a ser imperceptible, se presenta en animales susceptibles (inmunocompetentes). Se estima que el 70-90% desarrolla una infección de este tipo. Esta se caracteriza por presentar una ligera depresión, fiebre y leucopenia transitoria que se refleja en inmunosupresión, acompañada de viremia durante la primera semana post infección, en ocasiones se presentan cuadros digestivos y respiratorios leves (Rivera, 1999; Morán *et al.*, 2006; Evermann y Barrington, 2008).

Los individuos adquieren esta infección comúnmente de forma horizontal y la fuente de infección son los animales persistentemente infectados (PI) (Pedrera *et al.*, 2007; Evermann and Barrington, 2008).

#### 1.4.2 Infección intrauterina

Todos los órganos del sistema reproductivo son permisivos al virus de DVB, por lo que existen varias alteraciones reproductivas cuando un animal gestante cursa con una infección con el virus de DVB. Estas alteraciones van desde la disminución de la tasa de fertilidad hasta la muerte embrionaria temprana (Pedrera *et al.*, 2007; Evermann y Barrington, 2008).

El tipo de manifestaciones está sujeta al biotipo y cepa, así como a la etapa de la gestación en la que se encuentre el animal (Pedrera *et al.*, 2007).

#### 1.4.3 Infección persistente

Como se mencionó anteriormente estos individuos son el resultado de una infección con el virus de DVB de genotipo 1 o 2, con biotipo no citopático, durante el primer trimestre y cuatrimestre de la gestación (Lértora, 2003; Rondón, 2006; Liebler-Tenorio, 2008).

Durante esta etapa el individuo desarrollará inmunotolerancia específica a la cepa que originó la infección, esta es la razón por la que estos individuos no presentan anticuerpos neutralizantes (Rondón, 2006).

Aunque los animales PI pueden montar respuesta celular y humoral ordinaria frente a otros patógenos es posible que ésta llegue a ser ineficiente (Liebler-Tenorio, 2008).

Una característica relevante es que estos animales constituyen una fuente importante de infección vertical y horizontal ya que los persistentemente infectados presentan altos títulos virales en la mayoría de los tejidos, por lo que el virus estará presente en todos los fluidos y secreciones del animal como la saliva, orina, semen, leche y calostro (Pedrera *et al.*, 2007; Liebler-Tenorio, 2008).

#### 1.4.4 Enfermedad de las mucosas

Esta enfermedad afecta únicamente a los animales persistentemente infectados que presentan una infección con un biotipo citopático, homólogo antigénicamente al biotipo no citopático que originó la inmunotolerancia, o bien por la recombinación entre cepas no citopáticas en animales persistentemente infectados. La enfermedad tiende a presentarse entre los 6 y 18 meses de edad en una forma esporádica, fatal que suele ser de curso agudo con cuadro clínico caracterizado por diarreas sanguinolentas, pirexia, ulceraciones en cavidad bucal y la muerte a las 2 o 3 semanas de la manifestación de signos. Las lesiones encontradas a la necropsia van desde úlceras en mucosas del esófago, rumen, abomaso, intestino delgado y grueso, depleción de bazo, linfonodos y timo (Pedrera *et al.*, 2007; Liebler-Tenorio, 2008; Vargas *et al.*, 2009).

## 1.5 Diagnóstico del virus DVB

El correcto diagnóstico es el punto clave para los programas enfocados a la prevención. Esta práctica depende de la integración del conocimiento de la enfermedad, su relación con la historia clínica y la elección de las pruebas diagnósticas (Goyal and Ridpath, 2008).

La determinación del uso de una prueba diagnóstica está sujeta a la disponibilidad de esta, el tiempo que toma en arrojar los resultados, su costo, así como sus propiedades (sensibilidad y especificidad).

La sensibilidad epidemiológica o diagnóstica se define como el porcentaje de verdaderos positivos que son identificados como tal por una prueba diagnóstica, siendo así la especificidad epidemiológica o diagnóstica el porcentaje de verdaderos negativos reconocidos como tal en la prueba. No se deben confundir estos términos con la sensibilidad analítica la cual refiere a la cantidad mínima de sustancia o analito que puede ser detectado a través de la prueba, mientras que la especificidad analítica refiere al grado en que dicha prueba es capaz de distinguir entre la sustancia o analito de interés y otros componentes que puedan ser detectados (Sandvik, 1999; OIE, 2017).

Actualmente existen varias herramientas diagnósticas útiles en la detección de la enfermedad, éstas se dividen en 2 grandes grupos; método directo e indirecto. El primero se basa en la detección del antígeno viral, en contraste, el segundo determina la respuesta inmune de tipo humoral del huésped frente al agente (Goyal y Ridpath, 2008).

### 1.5.1 Pruebas diagnósticas directas

Aislamiento viral en cultivos celulares:

Consiste en la replicación e identificación del virus a partir de muestras de individuos que son sospechosos a la enfermedad. Esta prueba ha sido considerada de referencia, por ser 100% específica, aunque se considera relativamente sensible ya que ésta se encuentra directamente relacionada con el volumen del inóculo y el periodo de incubación, además de que el uso de cultivos celulares y medios de enriquecimiento como el suero fetal bovino

(SFB) podrían estar contaminados con virus de DVB y anticuerpos neutralizantes lo que puede afectar los resultados. Por lo que es necesario asegurar que todos los reactivos son libres tanto del antígeno en cuestión como de anticuerpos neutralizantes. El tratamiento del suero fetal bovino con calor a 56°C durante 30-45 min y la irradiación a 25 kiloGrays (2,5 Mrad), son algunas de las metodologías empleadas para inactivar al agente en cuestión, siendo la última la más confiable. (Sandvik, 1999; Goyal y Ridpath, 2008; OIE., 2013).

El uso de esta técnica diagnóstica tiende a implicar un alto costo debido al uso de equipo y material para el mantenimiento de los cultivos celulares, además de requerir varios días o semanas para la obtención de resultados (Sandvik, 1999).

Detección de antígeno viral en muestras de tejidos:

Consiste en la detección de antígenos virales expresados en el citoplasma de la célula, esto se realiza mediante el empleo de anticuerpos monoclonales o policlonales conjugados (Vargas, Jaime and Vera, 2009). La inmunohistoquímica ha resultado ser una excelente herramienta especialmente para el diagnóstico de individuos PI o para aquellos que cursan por cuadros agudos. La obtención de muestras de piel y muescas de oreja resulta ser práctica para evaluar y diagnosticar animales vivos (Goyal y Ridpath, 2008).

La prueba presenta especificidad y sensibilidad de 97% (Sandvik, 1999; Martinez y Santos, 2008).

Sus desventajas radican principalmente en el tiempo y costo por el uso de múltiples reactivos y de anticuerpos altamente específicos contra antígenos virales (Carlier y Santos, 2008).

Análisis inmunoenzimático para la detección de antígeno:

El análisis inmunoenzimático (ELISA) presenta una variante en la que puede ser detectado el antígeno de interés, este método también es conocido como “sándwich” o de “captura”. El ensayo consta de un anticuerpo monoclonal que captura el antígeno viral presente en la muestra, a su vez este complejo antígeno-anticuerpo es detectado por un segundo

anticuerpo unido a una enzima como la peroxidasa, la cual produce una reacción colorimétrica medida por valores de densidad óptica (Goyal y Ridpath, 2008).

El anticuerpo de captura generalmente empleado está dirigido contra el antígeno correspondiente con la proteína no estructural NS2-3 altamente conservada en las cepas de DVB, o bien NS3 (Sandvik, 1999).

Las muestras séricas resultan convenientes para la detección de los PI. Sin embargo, los animales que cursan por cuadros agudos son escasamente identificados puesto que el virus está presente en su sangre solo por un periodo corto (Goyal and Ridpath, 2008).

En general este sistema ha mostrado una alta sensibilidad y especificidad de 97,9% y 99.7% respectivamente (Lértora, 2003).

Detección de material genético:

La presencia de RNA viral se puede detectar por medio de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa (RT-PCR). Este método ofrece una alta sensibilidad, además de que pueden emplearse muestras como suero, plasma o leche de manera individual o bien a partir de un conjunto de muestras como leche en tanque. Por su parte la existencia de anticuerpos en las muestras no afecta los resultados de la prueba.

La amplificación por RT-PCR se lleva a cabo mediante el uso de oligonucleótidos específicos que se unen a secuencias blanco como la UTR 5' región del genoma viral que se encuentra altamente conservada (Vargas *et al.*, 2009; López, 2014; Lértora, 2003). La RT-PCR además de ser empleada como método diagnóstico permite la realización de estudios de genotipificación de cepas para distinguir entre genotipos y subgenotipos. El RNA viral se purifica y se transcribe a DNA complementario, mediante el uso de la enzima transcriptasa reversa para poder ser utilizado como cadena molde en la PCR (López, 2014; Marzocca, 2003).

La aplicación de RT-PCR para propósitos diagnósticos podría verse limitada por la contaminación con RNAsas o proteínas, dando lugar a la presencia de falsos negativos (Vargas, *et al.*, 2009).

### 1.5.2 Pruebas diagnósticas indirectas

#### Seroneutralización:

Consiste en una prueba punto final seroneutralizante que permite identificar la capacidad de los anticuerpos séricos para inhibir o neutralizar el efecto de una cepa determinada. Para ello el suero problema se diluye de forma seriada y se incuba con virus citopático, posteriormente se adicionan células susceptibles de bovino y se incuban nuevamente durante 4 días.

Esta prueba es sensible y específica, aunque presenta la limitante de no detectar bajas tasas de anticuerpos como en el caso de animales virémicos inmunocompetentes. Además de generar costos importantes relacionados con el mantenimiento de cultivos celulares, así como la adquisición de medios de enriquecimiento (Sandvik, 1999; Marini, 2008).

La demora en la obtención de los resultados y la preparación de stocks virales que en general son de bajo título, son otros de los inconvenientes que presenta esta prueba (Marzocca, 2003).

#### Análisis inmunoenzimático indirecto:

También conocido como ELISA indirecto, se basa en la detección de los anticuerpos presentes en muestras séricas a través de la fijación de antígeno a una fase sólida (Crowther, 2001), este capta los anticuerpos específicos presentes en el suero problema, posteriormente se detecta la presencia de estos complejos antígeno-anticuerpo a través de un segundo anticuerpo (anti-Ig) específico de especie, unido a una enzima que al reaccionar con su sustrato que es cromogénico (Sandvik, 1999) desencadena una reacción que emite una coloración, la reacción enzimática es frenada e interpretada por espectrofotómetro.

Esta prueba constituye una de las principales herramientas de diagnóstico por ser un método versátil, simple, sensible y cuantificable (Crowther, 2001). Es independiente de

cultivos celulares, facilita el análisis de grandes poblaciones, los resultados son de confianza y se obtienen en pocas horas, este sistema suele encontrarse de forma comercial, estos son algunos de los sistemas comerciales; IDEXX® BVDV p80 y Bio-X Diagnostics (BIO K 004). Las muestras empleadas pueden ser suero o leche (Sandvik, 1999; Lértora, 2003).

La especificidad de este sistema está dada por la elección del antígeno viral, mismo que puede tratarse de la partícula viral purificada, extractos de cultivos celulares infectados con DVB o proteínas recombinantes. Esta característica ha permitido la búsqueda en la optimización del sistema.

En general el método inmunoenzimático ELISA indirecto presenta una alta especificidad diagnóstica de 99.7% y una sensibilidad diagnóstica de y 97.9% lo que la hace una prueba altamente confiable.

Una de las limitantes de este método consiste en la imposibilidad de diagnosticar animales persistentemente infectados, al igual que el resto de las pruebas que emplean muestras séricas.

## 1.6 Prevención y control

No existen tratamientos específicos y exitosos para el abordaje de la enfermedad, por lo que la alternativa para su mitigación tiende a recaer sobre los programas de prevención y control, especialmente cuando se trata de grandes poblaciones.

La estrategia de control pretende la instauración de programas basados en el control sistemático sin vacunación y el control sistemático con vacunación, el primero consiste en la identificación y eliminación de animales persistentemente infectados, seguido de un monitoreo continuo del hato a través del empleo de pruebas diagnósticas que confirmen el estatus, en estos programas también se implementan medidas de bioseguridad como el control en el desplazamiento de animales entre fincas, la realización de cuarentenas para animales nuevos que ingresan al rancho, uso de semen certificado libre del virus, así

como el control en el ingreso de personal al hato, entre otros (Vargas *et al.*, 2009). Por su parte, el control sistemático con vacunación se basa en la implementación de esquemas de inmunización, este programa se ha desarrollado donde existe alta prevalencia, además de que el control mediante la eliminación de individuo persistentemente infectados y la implementación de medidas de bioseguridad no han sido suficientes (Sandvik, 1999; Vargas *et al.*, 2009). El objetivo del control sistemático con vacunación es proveer protección contra las posibles infecciones que se originen a partir de individuos persistentemente infectados (Lértora 2003).

En México existen vacunas de virus activo e inactivo. La mayoría de estas vacunas contienen virus citopático y no citopático de genotipo I y II. Sin embargo, dado que los laboratorios no especifican las cepas empleadas en la elaboración de las vacunas, existe la posibilidad de recombinación entre cepas vacunales y cepas de campo lo que supone un riesgo continuo de infección en los animales (López, 2014).

## 1.7 Antígenos recombinantes en el diagnóstico serológico como parte de la prevención y control

El uso de procedimientos basados en biotecnología recombinante ha dado lugar a la producción de moléculas con actividad biológica importante, como la insulina, la hormona del crecimiento, el factor de coagulación VIII, o la vacuna contra la hepatitis B, entre otros. A través del tiempo se han desarrollado más y numerosos estudios enfocados a la generación y mejora de herramientas terapéuticas, profilácticas y diagnósticas para diversas enfermedades (Birch and Onakunle, 2005).

Dentro del amplio grupo de moléculas recombinantes, destacan los antígenos recombinantes que son proteínas de interés producidas en células bajo la regulación de construcciones genéticas, que contienen el gen del antígeno obtenido por clonación molecular en un sistema de expresión (plásmidos o virus). Los antígenos recombinantes tienen la capacidad de desplegar una respuesta inmune induciendo la formación de anticuerpos específicos.



El incremento en el uso de antígenos recombinantes a partir de proteínas virales, empleados como inmunógenos o antígenos de diagnóstico, está asociado a las bondades que estas moléculas presentan como: Producción a gran escala con lotes homogéneos y aumento en su vida media, posibilidad de diseñar y mejorar de forma específica sus propiedades para alcanzar un efecto deseado (antigenicidad, afinidad por ligandos, solubilidad). Seguridad, sobre todo cuando se trabaja con material biológico peligroso y de riesgo sanitario. Especificidad ya que se trata de una sola proteína. E incluso, disminución en costos, si se compara con producciones virales, las cuales requieren de cultivos celulares específicos según el tropismo que presente el virus, suplementos o requerimientos adicionales para los cultivos celulares como el suero fetal bovino, el cual podría llegar a ser un riesgo de contaminación para el cultivo mismo. (Birch y Onakunle, 2005).

La tecnología de antígenos recombinantes involucra cierta metodología con diversos protocolos que están en función de la proteína de interés (antígeno). Inicialmente la información genética de la proteína a producir es insertada en un vector de clonación que generalmente suele ser un plásmido, la selección de este vector dependerá de si se desea expresar la proteína recombinante en organismos procariontes o eucariontes entre otras características (Lara, 2011). Estas moléculas de DNA recombinantes son introducidas en células que constituyen un sistema de expresión, (bacterias, células de mamífero o insecto) comercialmente disponibles. La elección de estos organismos hospederos dependerá de su origen biológico y las propiedades de la proteína de interés, las características de crecimiento y propagación del hospedero así como de sus niveles de expresión, entre otros (González y Fillat, 2018).

Dentro de los sistemas de expresión de antígenos recombinantes destacan los baculovirus, que son virus que principalmente infectan a insectos del orden *Lepidoptera* (Gómez Valderrama y Villamizar, 2013).

Los baculovirus pueden llegar a expresar genes heterólogos de antígenos de interés, en cultivos de células o larvas de insecto. Estos vectores de expresión ofrecen ciertas ventajas como son seguridad, ya que, al poseer un restringido grupo de hospederos, no representan riesgo para animales y plantas. La producción puede ser llevada a gran escala empleando cultivos de células de insecto con altos niveles de expresión de antígeno recombinante cuya recuperación suele ser sencilla, tomando en cuenta que en la mayoría de los casos estas proteínas son solubles. Así mismo, presentan similitud al antígeno nativo debido a que las modificaciones postraduccionales de la proteína de interés se llevan a cabo de manera semejante a la del sistema habitual, lo que les confiere mayor especificidad (Gómez Valderrama y Villamizar, 2013; Invitrogen, 2015).

El sistema Bac-to-Bac, es un método que permite la producción eficiente de baculovirus recombinantes, mediante el uso del vector pFastBac en el que es insertado el gen de interés, con este vector se transforman células competentes (DH10Bac, *E. coli*), que producen un bacmido con el cual se transfectan células de insecto, mismas que dan lugar al antígeno recombinante (Invitrogen, 2015).

Adicionalmente, es posible purificar el antígeno recombinante obtenido y con ello proporcionar mayor especificidad, sobre todo para su uso profiláctico o diagnóstico.

La inexistencia de tratamientos y protocolos efectivos para la enfermedad de DVB, ha impulsado el refinamiento de herramientas diagnósticas y profilácticas mediante el desarrollo y empleo de antígenos recombinantes como inmunógenos o bien como parte de sistemas diagnósticos (ensayos inmunoenzimáticos). Uno de los genes más empleados es el que codifica para la glicoproteína viral E2, ya que es uno de los antígenos con mayor capacidad de inducción de anticuerpos neutralizantes y presenta reactividad cruzada a diferentes cepas del virus de DVB (Chimeno Zoth y Taboga, 2006).

El abordaje de diversos procedimientos y metodologías en torno a este antígeno ha hecho posible el planteamiento de nuevas y prometedoras perspectivas, con el objetivo de mitigar la enfermedad de diarrea viral bovina en las producciones pecuarias.

## 2 JUSTIFICACIÓN

El diagnóstico serológico por ELISA indirecto tiende a ser una herramienta práctica en programas de control puesto que permite ser aplicada a gran escala, con resultados en pocas horas, es de ejecución simple e incluso refleja menor costo. A diferencia de otras pruebas diagnósticas que requieren mayor tiempo (días) para la obtención de resultados, personal y equipo especializado, reflejando mayor costo.

Los sistemas de diagnóstico comerciales tipo ELISA pueden emplear como antígeno de reconocimiento el virus completo, implicando procedimientos de crecimiento y purificación viral que requieren del mantenimiento de cultivos celulares, medios de crecimiento y enriquecimiento especial, así como de equipo e infraestructura.

Otros sistemas comerciales están basados en la detección de anticuerpos contra algunas proteínas de tipo no estructural como NS2 o NS2-3. Sin embargo, la capacidad inmunogénica de estas proteínas no es equiparable con la que presentan las proteínas de tipo estructural, dentro de las cuales destaca la proteína E2 una de las proteínas más inmunodominantes. Por lo que el desarrollo de un sistema basado en el reconocimiento de un antígeno con esta propiedad podría presentar mejor desempeño.

El empleo del antígeno E2 obtenido de forma recombinante constituye una alternativa para el sistema ELISA indirecto enfocado al diagnóstico de individuos expuestos al virus de DVB. Este sistema podría superar los niveles de sensibilidad y especificidad que presentan otros sistemas, debido al reconocimiento de la proteína más inmunogénica.

Este sistema puede contribuir con el monitoreo y la vigilancia epidemiológica de campañas zoonositarias enfocadas al control de la enfermedad.

### 3 HIPÓTESIS

El antígeno recombinante de la proteína E2 del virus de la Diarrea Viral Bovina, presentará mejor desempeño como antígeno diagnóstico que el uso de los viriones, en el sistema serológico ELISA indirecto.

### 4 OBJETIVO

Producir y evaluar el antígeno recombinante E2 del virus de la Diarrea Viral Bovina, en relación a su capacidad antigénica y potencial como antígeno de diagnóstico, en comparación al uso de los viriones en un sistema ELISA indirecto.

### 5 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Propagar y caracterizar inmunológicamente el antígeno recombinante E2 del virus de DVB expresado en baculovirus.
2. Propagar y caracterizar inmunológicamente el virus de Diarrea Viral Bovina.
3. Optimizar y estandarizar los componentes del sistema ELISA indirecto.
4. Determinar los niveles de sensibilidad y especificidad diagnóstica que presenta el uso del antígeno recombinante y el virus de DVB en el sistema.

### 6 MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Genética y Bioestadística perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM).

Materiales biológicos

- Baculovirus recombinante que expresa el antígeno recombinante E2 del virus de DVB. Previamente producido en el laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Genética y Bioestadística (FMVZ-UNAM).
- Células de insecto Sf9 (ATCC® CRL1711™)
- Virus semilla de DVB biotipo I y II, procedente del laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Genética y Bioestadística (FMVZ-UNAM).
- Células Madin Darby Bovine Kidney (MDBK catálogo CCL-22 de ATCC)
- Suero hiperinmune de conejo positivo a DVB (procedente de conejos inmunizados con DVB I y II).
- Suero de conejo negativo a DVB procedente de conejos del día cero de inmunización
- Muestras de sueros de bovino positivo a DVB procedente de hatos ganaderos (Ciudad Victoria, Tamaulipas)

## 6.1 Propagación del antígeno recombinante E2 expresado en baculovirus

Para propagar el baculovirus recombinante se sembraron  $1 \times 10^6$  células Sf9 /ml en 50 ml en medio SF-900 (Invitrogen) adicionando antibiótico (Penicilina 10,000 ul/ml, Estreptomina 10,000 µg/ml, Anfotericina B 25 µg/ml) en matraces de 250 ml, los cuales se mantuvieron en incubación a 26°C a una velocidad de 80 rpm. Las células fueron infectadas con baculovirus recombinante a una MOI de 0.1 virus/célula. La cosecha se realizó a las 96 horas post infección.

Los cultivos previamente infectados se centrifugaron a 1,280 g/10 min, con la finalidad de eliminar los restos celulares y recuperar el sobrenadante.

Los baculovirus recombinantes presentes en el sobrenadante obtenido de la cosecha se concentraron por centrifugación a 17,000 g durante 1 hora. La pastilla fue resuspendida en 500 µl de PBS 1x.

## 6.2 Propagación del virus de Diarrea Viral Bovina.

La propagación viral se llevó a cabo en botellas T75 en las cuales se infectaron células MDBK con confluencia celular mínima del 80% con 1 ml virus semilla de DVB I y DVB II con título de  $(3.23 \times 10^9)$  y  $(2.54 \times 10^{10})$  respectivamente. Se adicionaron 10 ml de medio Dulbecco's Minimal Esencial Medium (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%. Se incubó a 37°C y se monitoreó diariamente el cultivo hasta las 72 horas post infección y observado el efecto citopático se cosechó el virus.

La cosecha se obtuvo a través de la lisis de las células mediante tres ciclos de congelamiento (-70°C) y descongelamiento a temperatura ambiente. El lisado viral se centrifugó a 1,280 g/10 min, y se recuperó el sobrenadante.

Concentración de antígenos obtenidos.

Los sobrenadantes de los cultivos celulares infectados obtenidos (virus de DVB I y II), fueron precipitados con PEG 10% (Polietilenglicol 8000, Sigma P 2139), se incubaron en agitación a 4°C por 12 horas, posteriormente se centrifugaron a 10,600 g durante 30 minutos, las pastillas se resuspendieron en 1 ml de PBS 1x. Se adicionaron 500 µl de una solución de PEG 20% y NaCl 2.5 M, y se incubaron a 4°C por 12 horas, se centrifugaron a 12,600 g durante 15 min, resuspendiendo las pastillas en 1.5 ml de PBS 1x.

A partir de la obtención de virus y antígeno recombinante, se realizó la estimación de la concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) de proteínas total por espectrofotometría a una absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro Epoch, BioTek®, con la finalidad de determinar la cantidad de material a cargar en gel para electroforesis.

### 6.3 Caracterización del virus y del antígeno recombinante por Western blot.

Se empleó la técnica de western blot empleando dos diferentes anticuerpos, para detectar la presencia de los antígenos. Utilizando geles SDS-PAGE al 12% con 10 pozos cada uno.

La distribución de las muestras estuvo dada de la siguiente manera:

Gel A. se cargaron 3  $\mu$ l de marcador de peso PageRuler™ de 10-180 KD, 60.09 $\mu$ g del concentrado viral, 31 $\mu$ g de antígeno recombinante E2 concentrado por centrifugación.

Por otro lado, se cargó un gel (B); se cargaron 3  $\mu$ l del marcador de peso PageRuler™ de 10-180 KD y 31 $\mu$ g del concentrado viral.

Los geles fueron sometidos a electroforesis a 72 volts durante 4 horas.

Posteriormente se transfirió cada gel (A y B) en una membrana (A y B) de Nitrocelulosa (BIO-RAD Nitrocellulose Membrane Transfer, 0.45 $\mu$ m, Cat. #162-011). La transferencia se realizó en una cámara semihúmeda (BIO-RAD) durante 90 minutos 80 Volts.

Las membranas se incubaron con buffer de bloqueo (leche descremada al 5% en Buffer de lavado) y se incubó a 4°C durante 1 hora. Posteriormente se realizó un ciclo de lavado a cada una, el cual consistió en 3 lavados con 5 ml de buffer de lavado (cloruro de sodio 125mM, tris-HCl 25mM, Tween-20 0.1%, pH 7.9,) cada uno con un periodo de 5 minutos en agitación.

Para la adición del primer anticuerpo en la membrana A, se empleó un anticuerpo anti-his, 6-His Antibody, no. Catalogo. A19-214A (anticuerpo policlonal de conejo contra histidinas). En consideración a las características de la construcción del antígeno recombinante el cual presenta 6 histidinas en el extremo carboxiterminal. Dicho anticuerpo fue empleado en una dilución 1:5000 en buffer de bloqueo.

Para la membrana B, se empleó suero hiperinmune de conejo positivo a DVB, en una dilución 1:1000, en buffer de bloqueo.

Ambas membranas se incubaron a 37°C durante 1 hora, transcurrido el tiempo, se realizó un ciclo de lavado. Posteriormente se les añadió un segundo anticuerpo (anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa) a una dilución 1:800, en buffer de bloqueo y se incubó por 1 hora a 37°C, pasado el periodo de incubación se realizó nuevamente un ciclo de lavado. Finalmente, las membranas fueron reveladas con DAB (diaminobencidina) al 1%.

#### 6.4 Optimización y estandarización de los antígenos y sueros empleados en el sistema ELISA indirecto.

Con el objetivo de determinar las diluciones óptimas de los componentes del sistema se titularon tanto los antígenos (virus y antígeno recombinante) como los sueros control (sueros positivos y negativos de conejo y bovino) Mediante diluciones dobles seriadas.

##### 6.4.1 Titulación de virus

Se tituló la cosecha viral de DVB I y II. Para ello se emplearon dos placas de microtitulación de 96 pozos. En la primera (placa A), se fijó el virus a una dilución inicial de 1:100 y llevándolo a diluciones dobles seriadas en un volumen final de 50 µl/pozo en buffer de carbonatos (carbonato de sodio 0.1 M, bicarbonato de sodio 0.1 M, pH 9.6). En la segunda placa (placa B), se fijó el virus a una dilución inicial 1:500 y de igual forma se continuó con diluciones dobles seriadas en un volumen final de 50 µl/pozo en buffer de carbonatos. Las placas se incubaron a 4°C durante 12 horas. Transcurrido el periodo se eliminó el contenido por inversión vigorosa de ambas placas, realizando en cada una un ciclo de lavado (tres lavados, de 5 minutos cada uno en agitación, con 150 µl/pozo de solución de lavado (cloruro de sodio 125mM, 25mM, tris-HCl pH 7.9, Tween-20 0.1%) 1x, decantando por inversión vigorosa en cada uno); posteriormente se les adicionaron 50 µl/pozo de buffer de bloqueo (leche descremada al 5% en buffer de lavado) dejando incubar a 4°C durante 1 hora, nuevamente se realizó un ciclo de lavado y se adicionó el primer anticuerpo para la placa A (suero hiperinmune de conejo positivo a DVB y suero de conejo negativo a DVB), para la placa B (suero de bovino positivo a DVB y suero de bovino negativo a DVB), todos los sueros fueron probados en dos diluciones constantes; 1:10 y 1:100 en 50



µl/pozo de buffer de bloqueo y cada dilución por duplicado. Se incubaron las placas a 37°C durante 1 hora, transcurrido el tiempo se eliminó el contenido de la placa por inversión vigorosa y se realizó un ciclo de lavado. Posteriormente se adicionó el segundo anticuerpo anti-IgG (Inmunoglobulina de conejo y bovino acopladas a peroxidasa) en las placas A y B respectivamente, ambos conjugados fueron adicionados en una dilución 1:800 en 50 µl/pozo de buffer de bloqueo, el conjugado fue previamente valorado por la prueba de máxima densidad óptica. Las placas se incubaron a 37°C durante 1 hora, se eliminó el contenido de esta con inversión vigorosa y se realizó un ciclo de lavado. La reacción fue revelada con 100 µl/pozo de una solución de ácido cítrico 100mM pH 4.5, citrato de sodio 100mM pH 4.5, TMB y peróxido de hidrógeno al 30 %, incubando a temperatura ambiente por 10 minutos y protegido de la luz, la reacción fue frenada con 100 µl/pozo de ácido sulfúrico 2N, finalmente se llevó a cabo la lectura de la placa por absorbancia a 450 nm en espectrofotómetro epoch BioTek®

#### 6.4.2 Titulación del antígeno recombinante

Para titular el antígeno se emplearon dos placas de microtitulación de 96 en la primera (placa C), se fijó el antígeno recombinante a una dilución inicial de 1:1000 y llevándolo a diluciones dobles seriadas en un volumen final de 50 µl/pozo en buffer de carbonatos (carbonato de sodio 0.1 M, bicarbonato de sodio 0.1 M, pH 9.6). En la segunda placa (placa D), se fijó el antígeno recombinante en una dilución inicial 1:500 y de igual forma se llevó a diluciones dobles seriadas en un volumen final de 50 µl/pozo en buffer de carbonatos. Las placas se incubaron a 4°C durante 12 horas, continuando con la metodología de bloqueo descrita en la sección “Titulación de virus”. Se empleó como primer anticuerpo (suero de bovino positivo a DVB y suero de bovino negativo a DVB), en dos diluciones constantes; 1:10 y 1:100. Como segundo anticuerpo (Inmunoglobulina de conejo y bovino acopladas a peroxidasa) en una dilución 1:800. La adición de los anticuerpos estuvo dada bajo las mismas condiciones empleadas en la sección “Titulación de virus”.

La reacción fue revelada con 100 µl/pozo de una solución de ácido cítrico 100mM pH 4.5, citrato de sodio 100mM pH 4.5, TMB y peróxido de hidrógeno al 30 %, incubando a temperatura ambiente por 10 minutos (protegida de la luz), la reacción fue frenada con

100 µl/pozo de ácido sulfúrico 2N, finalmente se llevó a cabo la lectura de la placa a 450 nm en espectrofotómetro Epoch, BioTek®

Nota 1. Cada una de las diluciones de los antígenos fue evaluada por duplicado.

Nota 2. En cada ensayo de ELISA se efectúa una reacción control llamada “máxima densidad óptica” que permite la evaluación de la funcionalidad de los reactivos empleados en el revelado y la concentración adecuada del segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa. Para ello se realiza una dilución 1:2 del conjugado diluido en buffer de bloqueo con solución de revelado, en un volumen de 100 µl/pozo de solución de revelado, efectuando diluciones dobles seriadas.

#### 6.4.3 Titulación de sueros control

Todos los sueros control fueron titulados con la finalidad de determinar la dilución óptima a emplear, para ello se sensibilizó media placa de microtitulación de 96 pozos con antígeno viral a una dilución constante; 1:8000. La segunda mitad fue sensibilizada con antígeno recombinante a dilución constante 1:5000. Ambas diluciones en un volumen final de 50 µl/pozo en buffer de carbonatos. Se continuó con el protocolo antes descrito, sin embargo, el primer anticuerpo (suero hiperinmune de conejo positivo a DVB, suero de conejo negativo a DVB, suero de bovino positivo a DVB y suero de bovino negativo a DVB) fueron adicionados a una dilución inicial 1:10 y llevándolos a diluciones dobles seriadas en un volumen final de 50µl/pozo en buffer de bloqueo, retomando el protocolo descrito en la sección “Titulación de virus”, finalmente se llevó a cabo la lectura de la placa por espectrofotometría a 450 nm.

Nota 1. La elección de las diluciones empleadas para la fijación de los antígenos a la placa está basada en los resultados obtenidos del ensayo de titulación de estos.

Nota 2. Cada una de las diluciones de los sueros fue evaluada por duplicado.

## 6.5 Ensayos de repetibilidad y determinación de los niveles de sensibilidad y especificidad que presenta el uso del antígeno recombinante y el virus de DVB en el sistema ELISA indirecto.

### 6.5.1 Obtención de grupos control positivo y negativo

Con base en los resultados procedentes de las titulaciones se determinó que las diluciones de los antígenos requeridas para sensibilizar las placas de ELISA son: virus a una dilución constante 1:8000 y antígeno recombinante a una dilución constante 1:5000. Mientras que para los sueros se determinó emplear una dilución 1:10.

Con estas condiciones se evaluó un grupo de 63 muestras séricas de bovino (35 muestras positivas a DVB y 28 muestras negativas a DVB), procedentes de hato, mismas que habían sido previamente evaluadas en el laboratorio con un paquete de diagnóstico comercial.

Así mismo se incluyó un control positivo y negativo (muestras empleadas en los ensayos de titulación) cada muestra sérica fue evaluada por duplicado.

Las diluciones empleadas para la fijación de los antígenos y la incubación de los sueros fueron adicionadas en un volumen final de 50  $\mu$ l/pozo en buffer de carbonatos y buffer de bloqueo respectivamente. Siguiendo con la metodología referida en la sección “optimización y estandarización de los antígenos empleados en el sistema ELISA indirecto”

La lectura de las placas se realizó a 450 nm en el espectrofotómetro Epoch, BioTek®.

### 6.5.2 Repetibilidad

Empleando el mismo grupo de 63 ejemplares (35 muestras positivas y 28 negativas), se realizaron ensayos de repetibilidad, con la finalidad de obtener resultados concordantes de cada muestra entre las réplicas dentro de cada ensayo (intra ensayo) y entre las réplicas de cada uno de los ensayos (inter ensayo). En cada corrida se incluyó un suero control positivo y un suero control negativo. Todas las muestras fueron adicionadas a dilución constante 1:10 y evaluadas con virus 1:8000 y antígeno recombinante 1:5000. Se

realizaron tres ensayos en diferentes días y bajo el mismo protocolo descrito. Cada muestra fue evaluada por cuadruplicado, en cada ensayo, incluyendo los controles positivos y negativos.

La repetibilidad fue estimada mediante de la determinación del coeficiente de variación:  $CV = \frac{s}{\bar{x}}$  donde  $s$ = desviación estándar y  $\bar{x}$ = promedio, del conjunto de réplicas intra e inter ensayo de todas las muestras.

Esta prueba pretende determinar el porcentaje de variabilidad entre réplicas. Así mismo, se estimó el coeficiente correlación intraclase (ICC) dentro de cada ensayo (intra ensayo) y entre ensayos (inter ensayos), para evaluar la concordancia existente. Ambos análisis fueron realizados empleando los valores brutos (D.O).

### 6.5.3 Determinación de punto de corte, sensibilidad y especificidad

Las densidades ópticas son valores absolutos que están sujetas a variaciones dadas por el ruido de fondo (uniones inespecíficas o variables durante el procesamiento). Por lo que los valores obtenidos en la lectura del ensayo se deben normalizar y ajustar tomando en cuenta el valor de un control interno positivo y negativo.

Para lograr tal ajuste se hizo uso de los valores normalización (valor SP) el cual consiste en la proporción de la reactividad normalizada de un suero problema con relación a un suero control positivo y negativo. Los valores (SP) del suero problema y de los sueros control se obtuvieron de la siguiente manera:

$$Valor\ SP = \frac{Densidad\ Optica\ de\ la\ muestra - Densidad\ Optica\ del\ control\ negativo}{Densidad\ Optica\ del\ control\ Positivo - Densidad\ Optica\ del\ control\ negativo}$$

El valor SP fue aplicado a todas las muestras procesadas.

La determinación del punto de corte (PC) se dio a partir de la inspección visual de la distribución de frecuencias de los valores normalizados correspondientes con las muestras

evaluadas con el antígeno viral y el antígeno recombinante, en donde se identifica la intersección de las distribuciones positivas y negativas (Jacobson, 1998).

Determinación de los niveles de sensibilidad y especificidad

Con los resultados obtenidos en los ensayos de repetibilidad, fue calculada la sensibilidad y especificidad relativa de cada uno de los sistemas empleando diferentes puntos de corte (0.3, 0.35, 0.4, 0.5).

La sensibilidad de los métodos se calculó como el porcentaje de sueros detectados positivos por ELISA indirecto empleando antígeno recombinante E2 y antígeno viral, con respecto al total de sueros conocidos como positivos (aquellos sueros que fueron previamente evaluados en el laboratorio por un paquete de diagnóstico comercial).

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP+FN}$$

Donde  $VP$ = verdaderos positivos,  $FN$ = falsos negativos

La especificidad se calculó como el porcentaje de sueros detectados negativos por ELISA indirecto empleando antígeno recombinante E2/antígeno viral, con respecto al total de sueros conocidos como negativos (aquellos sueros que fueron previamente evaluados en el laboratorio por un paquete de diagnóstico comercial).

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN+FP}$$

Donde  $VN$ = verdaderos negativos,  $FP$ = falsos positivos

La estimación del valor predictivo positivo y negativo para cada antígeno con sus diferentes puntos de corte se calculó de la siguiente manera:

$$\text{valor predictivo positivo (VPP)} = \frac{VP}{VP+FP}$$

$$\text{Valor predictivo negativo (VPN)} = \frac{VN}{VN+FN}$$

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Cultivo celular y propagación del antígeno recombinante E2.

El siguiente gráfico corresponde con los porcentajes de viabilidad celular (Sf9), obtenidos de la siguiente manera:  $(\text{número de células vivas}/\text{número de células totales}) \times 100$ , a las 0hrs, 24 hrs, 48 hrs, 72 hrs y 96hrs post infección con baculovirus recombinante, de esta manera se muestra la efectividad de la infección, la cual se refleja con una disminución de la viabilidad celular conforme transcurre el tiempo a consecuencia de la mortalidad celular.

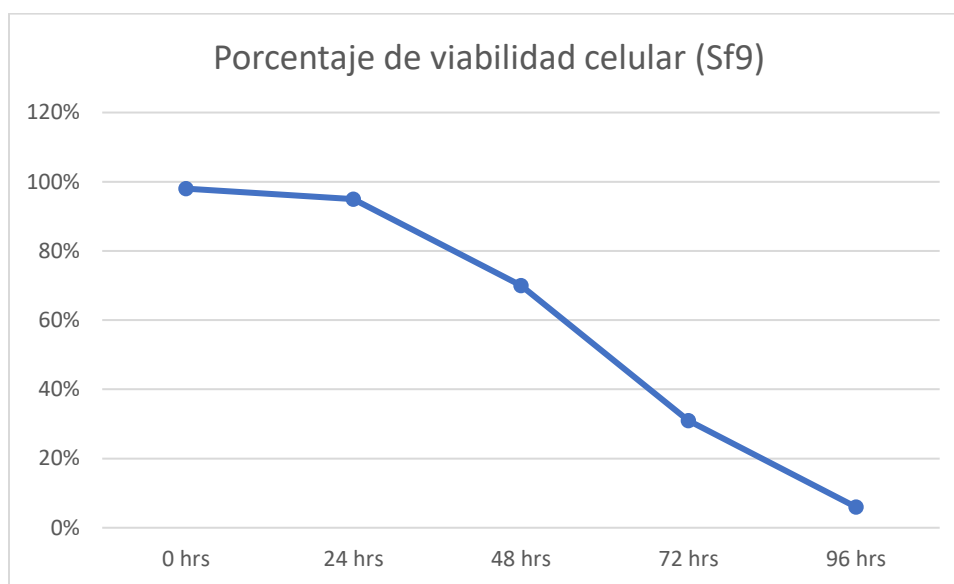


Figura 2. Grafico que muestra la disminución progresiva de los porcentajes de viabilidad estimados a las 0 hrs, 24 hrs. 48 hrs, 72, hrs y 96 hrs.

Las siguientes imágenes corresponden a microfotografías de cultivo celular SF-9 sin infección (A) en el cual las células se observan delimitadas y de tamaños homogéneos, e incluso algunas en fases de mitosis. En contraste las imágenes (B Y B´) muestran el mismo cultivo celular a las 96 hrs post infección, en las cuales el efecto citopático comienza a ser visible a partir de las 24 hrs, mismo que se refleja con aumento de la mortalidad celular, evidenciada con el azul de tripán el cual tiñe a las células que presenta daño en la membrana (células muertas), además es posible observar irregularidad de las células.

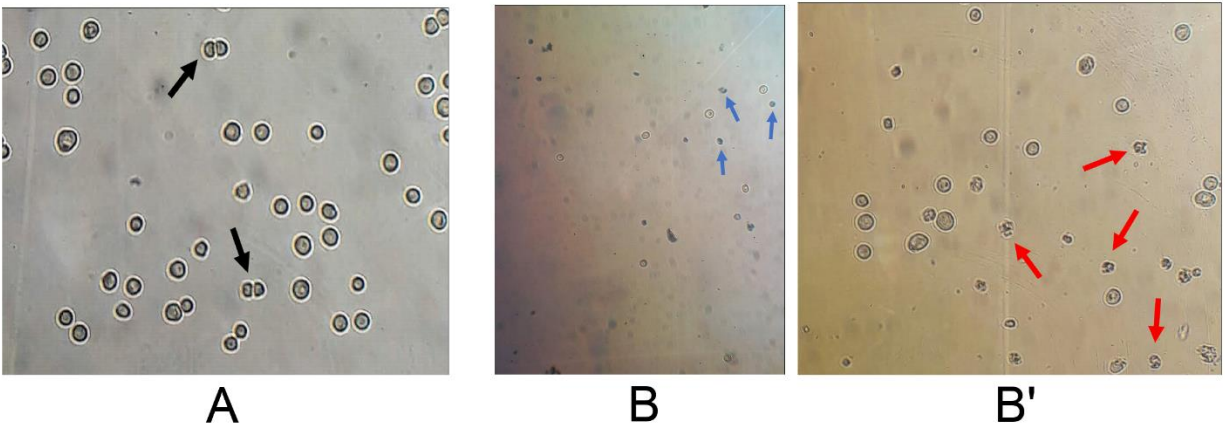


Figura 3. Micrografía 40 x y 10x (B) de cultivo celular SF9 a las 0 hrs de infección (A), se aprecia redondeamiento de las células uniformidad en el tamaño de las mismas, las flechas negras señalan algunas células en fase de mitosis. En contraste las micrografías de células SF9 a las 96 horas post-infección con baculovirus de DVB (B y B'), en ellas es posible apreciar disminución de la densidad celular y algunas células muertas, las flechas azules señalan las células teñidas con azul tripán en la imagen (B), las flechas rojas en la imagen (B') señalan irregularidad en las células.

La cosecha de células SF9 (50 ml) se precipito el antígeno recombinante por centrifugación y se estimó la concentración de proteína total por espectrofotometría, donde se obtuvieron 783.5  $\mu\text{g}$  totales en un volumen de 500  $\mu\text{l}$  (1.567  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )

## 7.2 Cultivo celular y propagación viral de DVB

Las siguientes imágenes corresponden con microfotografías del cultivo celular MDBK sin infección (A), en ellas se observan las células a una confluencia de más del 80%, es decir, una distribución homogénea de las células sobre toda el área de contacto, debido a la alta población. Por otro parte se aprecia el mismo cultivo celular a las 72 horas post-infección con DVB I y II (B). En células infectadas con biotipo citopático es frecuente encontrar el efecto citopático, mismo que puede apreciarse por desprendimiento celular asociado a la muerte de estas, así como irregularidad celular.

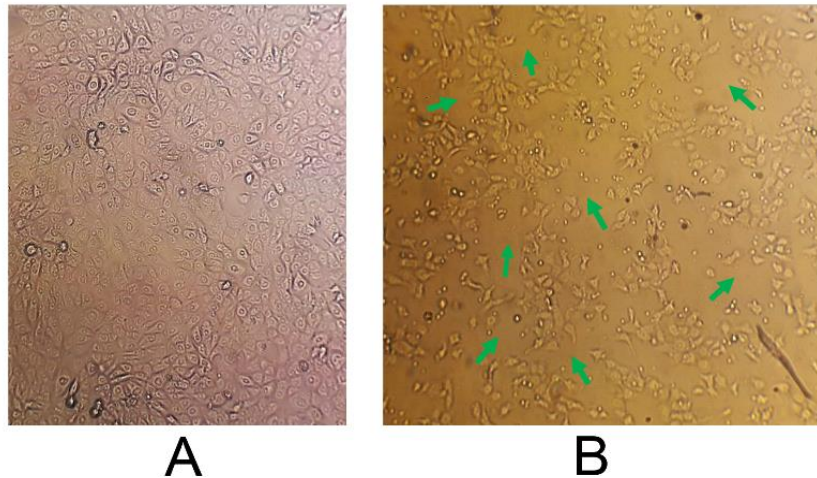


Figura 4. Micrografía 40 x de cultivos celulares MDBK sin infección (A) donde se muestran las células en confluencia de más del 80%. En contraste a la micrografía (B) de células MDBK a las 72 horas post-infección con virus semilla DVB I y II. Las flechas verdes señalan las zonas de desprendimiento celular por la muerte de las mismas. También es posible apreciar irregularidad celular.

En cuanto a la cuantificación por espectrofotometría del virus de DVB I y II precipitado con PEG se obtuvieron: 9.135  $\mu\text{g}$  totales en un volumen de 1.5  $\mu\text{l}$  (6.09  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), a partir de un volumen de 50 ml.

### 7.3 Caracterización inmunogénica del virus de DVB y del antígeno recombinante E2 por Western Blot

En las Figuras 5 y 6, se muestran los resultados de las pruebas de western blot así como su respectiva tinción con azul de coomassie. En la Figura 4. La imagen "Gel A", muestra la tinción con azul de coomassie de diferentes bandas pesos moleculares que corresponden con las distintas proteínas que constituyen al virus, así como las proteínas que conforman el vector de expresión (baculovirus) en donde es posible visualizar una banda ligeramente mayor a los 40KDa asociada al peso estimado para el antígeno recombinante E2 (43.7 KDa). La imagen "Membrana A", muestra una banda única que



corresponde con el reconocimiento del antígeno recombinante E2, mediante el uso de un anti-his (anticuerpo contra histidinas), en un peso cercano al estimado (43.7 KDa).

La imagen “Gel B” de la figura 5. Muestra la tinción con azul de coomassie de diferentes bandas pesos moleculares que corresponden con las distintas proteínas que constituyen al virus. La imagen “Membrana B” corresponde con el western blot, en el que es posible apreciar la reactividad del suero a diferentes proteínas virales. Sin embargo, la Figura 6. Muestra la similitud de peso entre la banda del antígeno recombinante (43 KDa) reconocido por el anti-his y una banda reconocida por el suero de conejo correspondiente con el virus y cuyo peso se encuentra entre los 41 y 55 KDa, misma que podría corresponder con el peso estimado de la glicoproteína viral E2 (41 y 45 KDa).

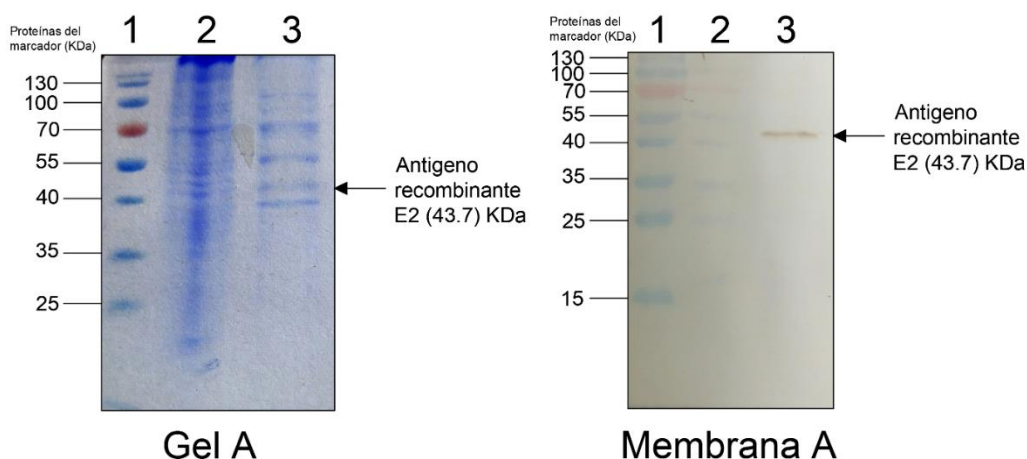


Figura 5. Gel A: Tinción con azul de Coomassie 1x, donde se muestra la separación de las diferentes proteínas que conforman al virus y al vector de expresión (baculovirus recombinante) y la presencia del antígeno de interés en su peso estimado (43.7 KDa). Membrana A: Western Blot de que muestra la presencia del antígeno recombinante mediante un anti-his a una dilución 1:5000, que reconoce la secuencia final de histidinas que presenta el mismo. La disposición de las muestras tanto en el gel teñido como en la membrana está dada de la siguiente manera: Carril 1. Marcador de peso (KDa), carril 2. Virus DVB I y II precipitado con PEG, carril 3. Baculovirus recombinante E2 concentrado.

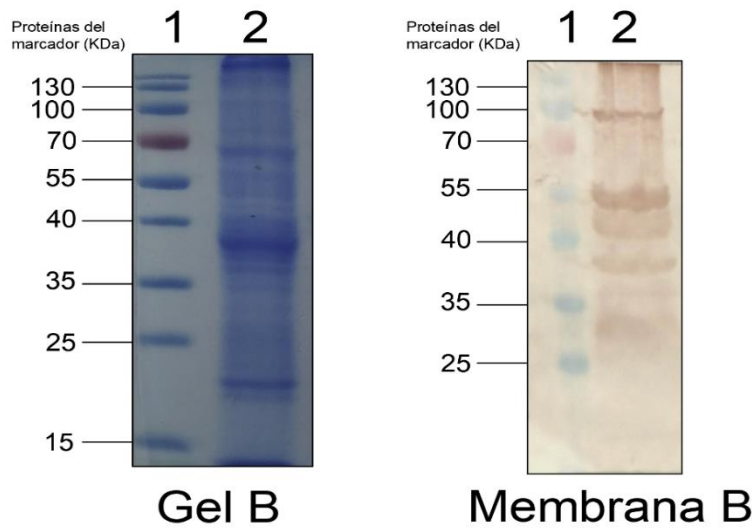


Figura 6. Gel B: Tinción con azul de Coomassie 1x, donde se muestran las diferentes proteínas que conforman al virus. Membrana B: Western Blot que muestra la reactividad del antígeno recombinante frente a suero hiperinmune de conejo positivo a DVB en una dilución 1:1000. La disposición tanto en el gel teñido como en la membrana y está dada de la siguiente manera: Carril 1. Marcador de peso (KD), carril 2. Virus DVB I y II precipitado con PEG.

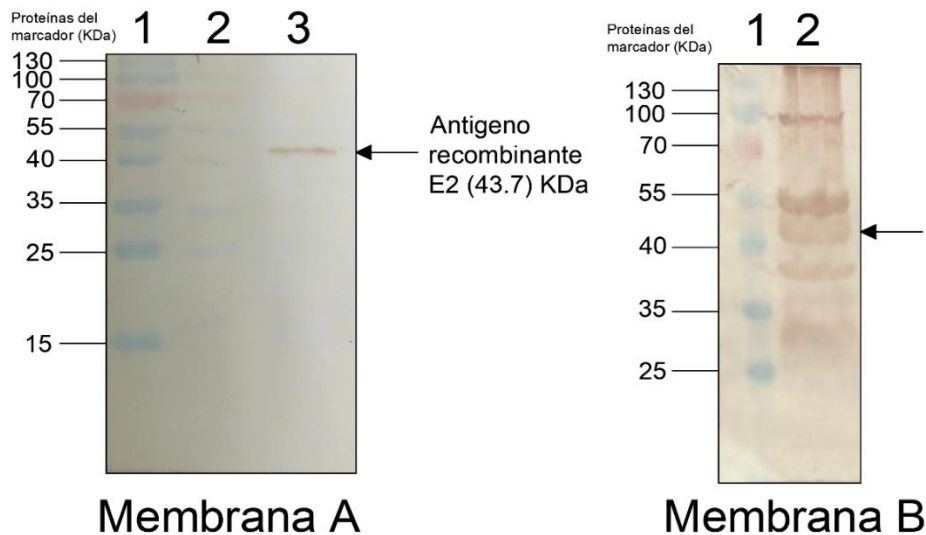


Figura 7. Comparación entre membrana A y B revela la presencia de una banda presente en el virus (flecha negra en membrana B) cercana al peso estimado a la glicoproteína E2 de virus de DVB (41-45 KDa), semejante al peso del antígeno de interés membrana con peso de 43.7 KDa.

#### 7.4 Optimización y estandarización de los antígenos y sueros empleados en el sistema ELISA indirecto.

##### 7.4.1 Titulación del virus de DVB y del antígeno recombinante E2

La escala de lectura de D.O en espectrofotómetro, va de 0 a 4 D.O, donde 0 es la ausencia de detección de reacción y 4 es la detección de la saturación de la reacción dentro del sistema.

Se tituló el antígeno recombinante E2 y el virus de DVB mediante diluciones dobles seriadas con el objetivo de determinar la cantidad mínima necesaria tanto de los antígenos como de los sueros a emplear. Para lograr la obtención de una relación antígeno-anticuerpo óptima, cuya lectura en espectrofotómetro presente valores cercanos a 2 D.O para positivos, y cercanos 0.4 D.O para negativos, tomando como referencia los valores de las muestras positivas y negativas evaluadas anteriormente. Y con ello evitar tanto la saturación del sistema de antígeno y/o anticuerpo, como la escasez de antígeno y/o anticuerpo.

Los resultados de las titulaciones están expresados en valores de D.O y representan el promedio de cada una de las muestras por duplicado. Estos valores están en función de la dilución de los antígenos.

En las Figuras 8 y 9, se muestran las diluciones dobles seriadas del virus probado con suero positivo y negativo a dilución constante (1/10 y 1/100) de conejo (Fig. 8) y con suero positivo y negativo de bovino a dilución constante (1/10 y 1/100) (Fig. 9).

Los gráficos muestran el trazo de una curva que parte de una alta concentración de antígeno donde la lectura es cercana a 4 D.O, a una menor donde es muy pobre la distinción entre positivos y negativos. El área bajo la curva refleja el margen de separación entre muestras positivas y negativas.

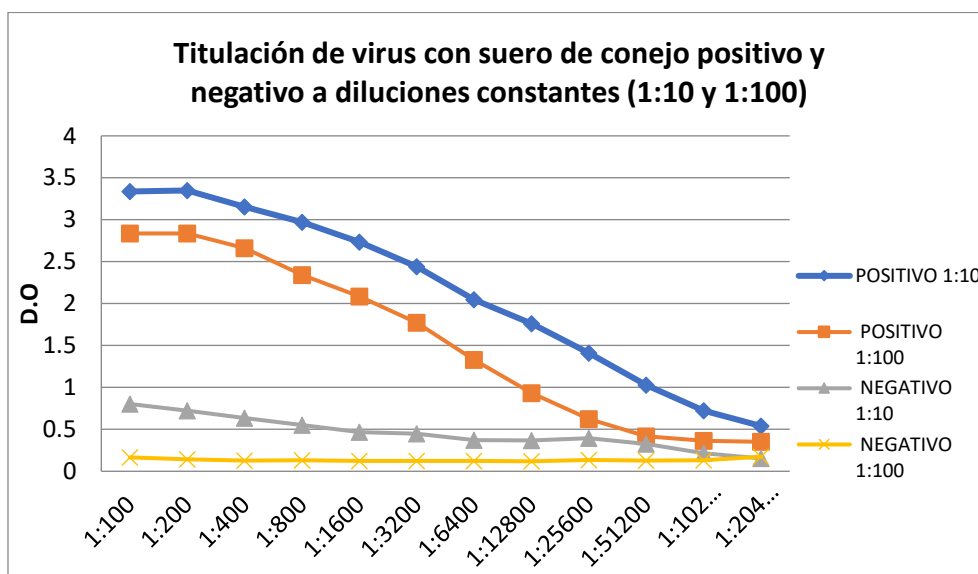


Figura 8. Suero de conejo positivo y negativo a dos diluciones constantes (1:10 y 1:100) enfrentados al virus de DVB a una dilución inicial 1:100 y llevado a diluciones dobles seriadas.

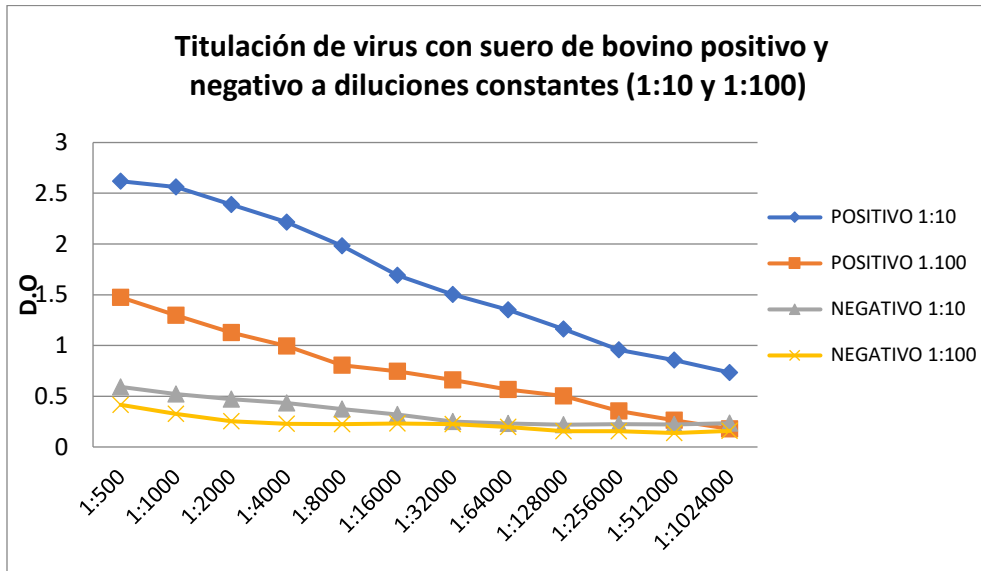


Figura 9. Suero de bovino positivo y negativo a dos diluciones constantes (1:10 y 1:100) enfrentados al virus de DVB I y II a dilución inicial 1:500 y llevado a diluciones dobles seriadas.

En las Figuras 10 y 11 se muestran la titulación del antígeno recombinante empleando sueros positivos y negativos de conejo (Fig. 10) y bovino (Fig. 11) diluidos 1/10 y 1/100.

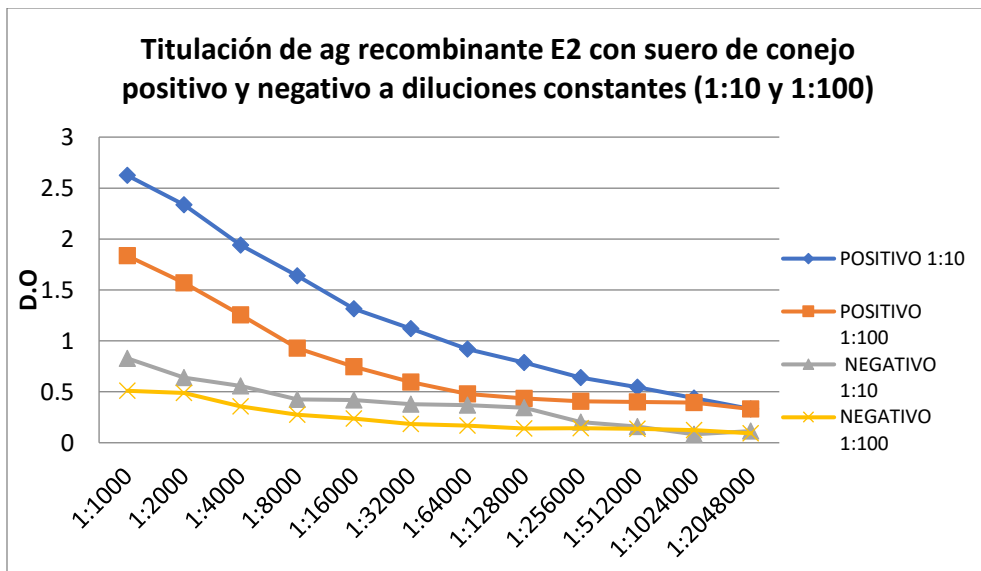


Figura 10: Suero de conejo positivo y negativo a dos diluciones constantes (1:10 y 1:100) enfrentados al antígeno recombinante E2 a dilución inicial 1:1000 y llevado a diluciones dobles seriadas.

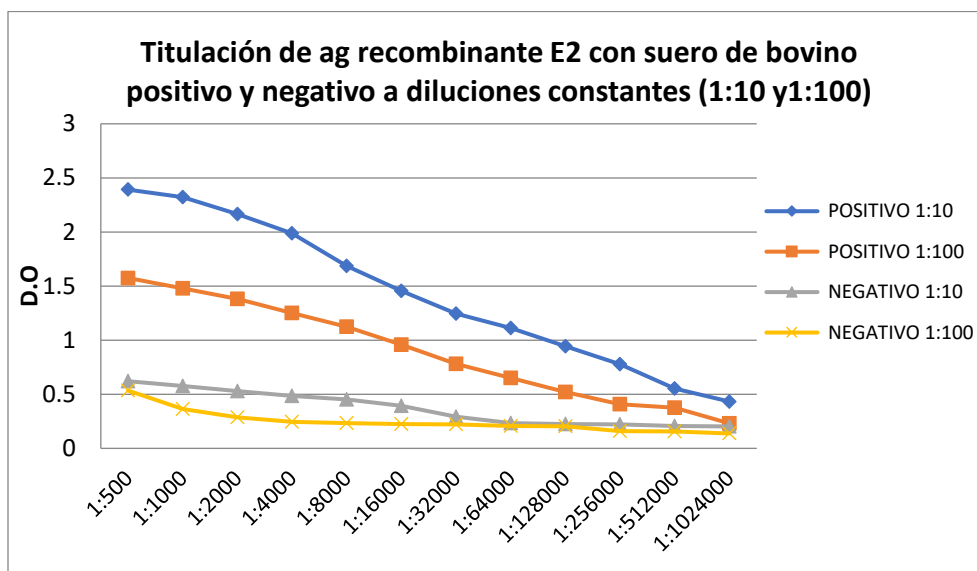


Figura 11: Suero de bovino positivo y negativo a dos diluciones constantes (1:10 y 1:100) enfrentados al antígeno recombinante E2 a dilución inicial 1:500 y llevado a diluciones dobles seriadas.

Estos ensayos nos proporcionan información referente a la dilución óptima, tanto del antígeno viral como del antígeno recombinante E2, para ser fijadas a las placas de microtitulación del sistema ELISA indirecto. A partir de estos resultados se seleccionó la dilución del antígeno que en relación a los sueros control, permitiera la distinción entre positivo y negativo con un amplio margen, es decir, dilución en la cual el control positivo presentara un valor de 2 D.O y el control negativo presentara un valor menor o igual a 0.4 D.O. Estas diluciones fueron: 1:8000 para el virus y 1:5000 para el antígeno recombinante ambas con el empleo de los sueros a dilución 1:10.

#### 7.4.2 Titulaciones de los sueros de conejo y bovino positivos y negativos.

Se titularon los sueros positivos y negativos manteniendo una cantidad constante de antígeno (1:8000 para virus y 1:5000 para antígeno recombinante), con una dinámica de diluciones dobles seriadas de los sueros positivos y negativos de conejo y bovino. Con la finalidad de confirmar que la dilución 1:10 es óptima para la ejecución del sistema. Estos gráficos plasman la curva de titulación misma que refleja la disminución progresiva de la

reactividad dada en D.O. se aprecia que la dilución 1:10 confirma los valores esperados para los sueros positivos y los sueros negativo.

En las Figuras 12 y 13 se muestran los resultados de la reactividad (D.O) de las diluciones dobles seriadas de los sueros controles positivos y negativos de conejos y bovino ante cantidades constantes del antígeno viral (1:5000).

Así mismo, se muestra la reactividad de las diluciones dobles seriadas de los sueros controles positivos y negativos de conejo y bovino ante cantidad constante del antígeno recombinante E2. (Fig. 14 y 15).

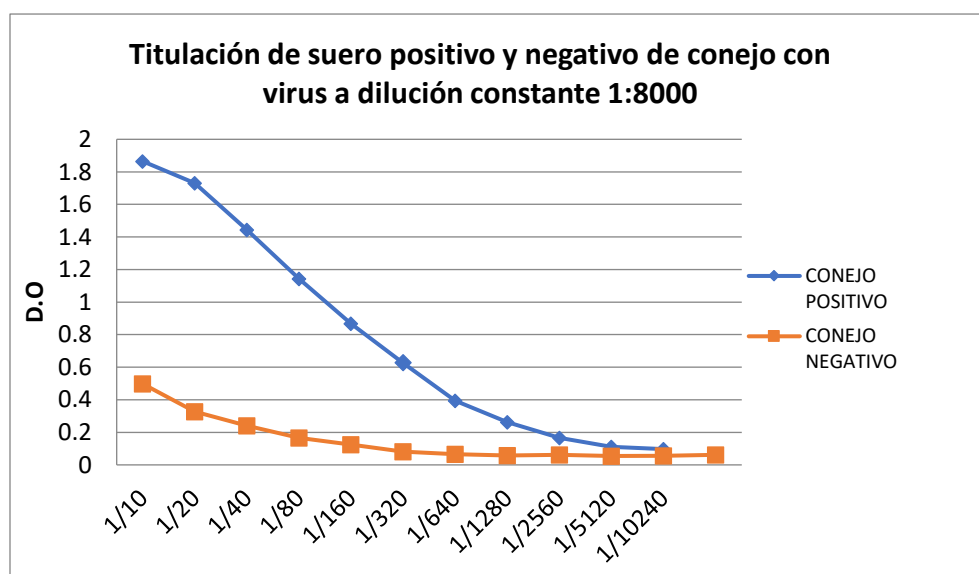


Figura 12: Gráfico que muestra las densidades ópticas de los sueros de conejo positivo y negativo a una dilución inicial 1:10 y diluciones dobles seriadas enfrentados al virus de DVB I y II a una dilución constante 1:8000.

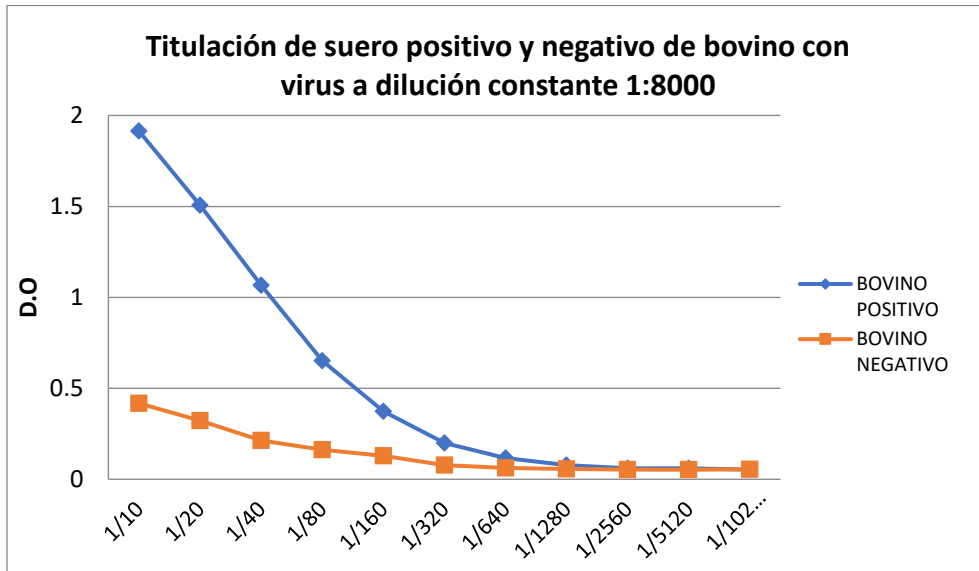


Figura 13. Gráfico que muestra las densidades ópticas de los sueros de bovino positivo y negativo a dilución inicial 1:10 y dobles seriadas enfrentados al virus de DVB I y II a dilución inicial constante 1:8000.

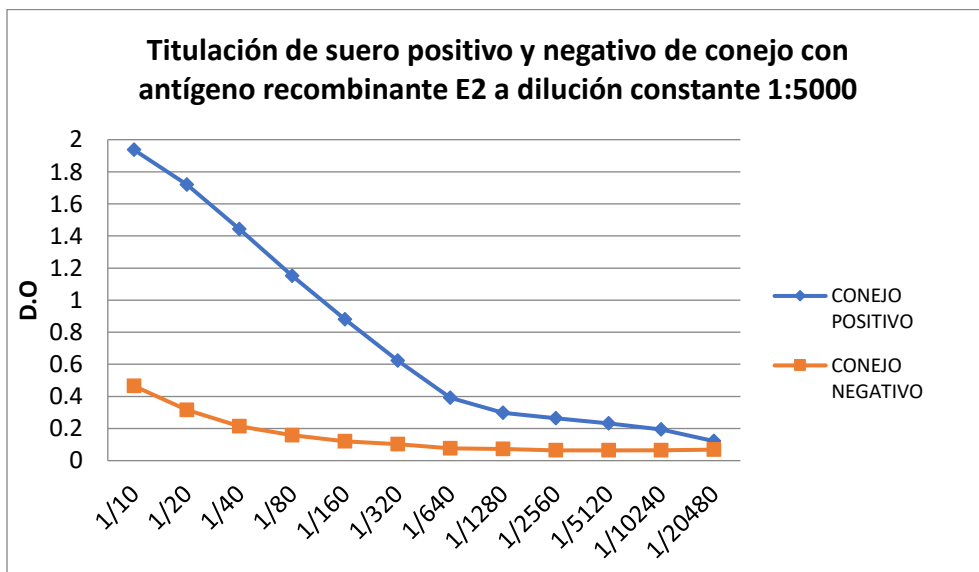


Figura 14. Gráfico que muestra las densidades ópticas de los sueros de conejo positivo y negativo a dilución inicial 1:10 y dobles seriadas enfrentados al antígeno recombinante E2 a dilución constante 1:5000.



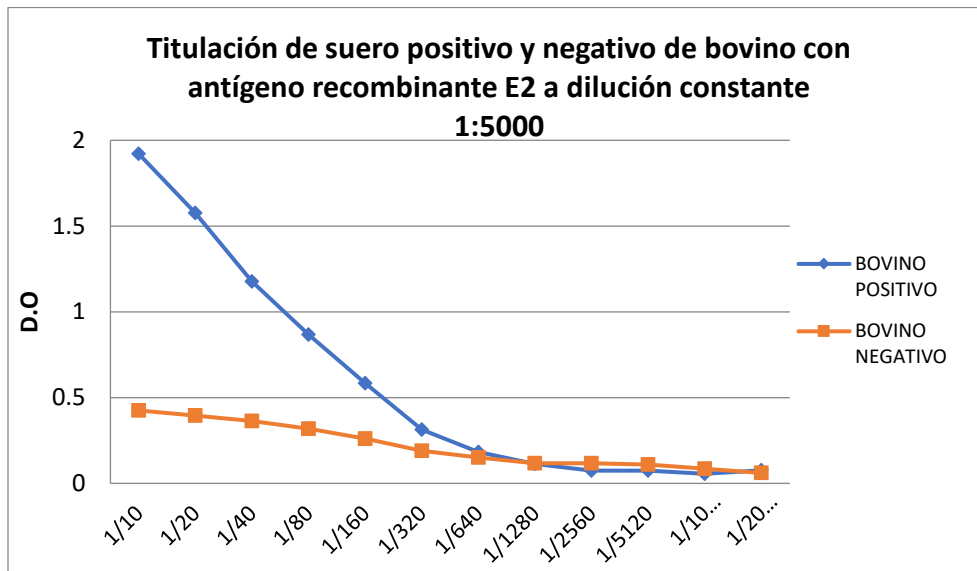


Figura 15: Gráfico que muestra las densidades ópticas de los sueros de bovino positivo y negativo a dilución inicial 1:10 y dobles seriadas enfrentados al antígeno recombinante E2 a dilución constante 1:5000

Los ensayos de titulación del suero confirmaron la dilución 1:10 como óptima para el empleo de los sueros a evaluar en el sistema ELISA, debido a que a dicha dilución existe un amplio margen de discriminación entre el suero positivo y negativo a una cantidad constante de antígeno fijado a la placa.

### 7.5 Ensayos de repetibilidad y determinación de los niveles de sensibilidad y especificidad que presenta el uso del antígeno recombinante y el virus de DVB en el sistema ELISA indirecto.

Con las condiciones establecidas en los ensayos de ELISA, es decir, acoplando una cantidad definida de antígeno viral (1:8000) y antígeno recombinante (1:5000) se evaluó la reactividad de 35 sueros positivos y 28 muestras negativas, estos diluidos 1:10.

En las Figuras 16 y 17 se muestran los promedios de las D.O de los ensayos 1,2 y 3, con la respectiva desviación estándar (D.S), de cada una de las muestras procesadas con el

antígeno viral (Fig. 16) y el antígeno recombinante (Fig. 17). En donde claramente se aprecian diferentes grados de reactividad o valores de D.O, manteniendo diferencia entre positivos y negativos. Además, es posible visualizar que hay similitud entre niveles de reactividad entre antígenos.

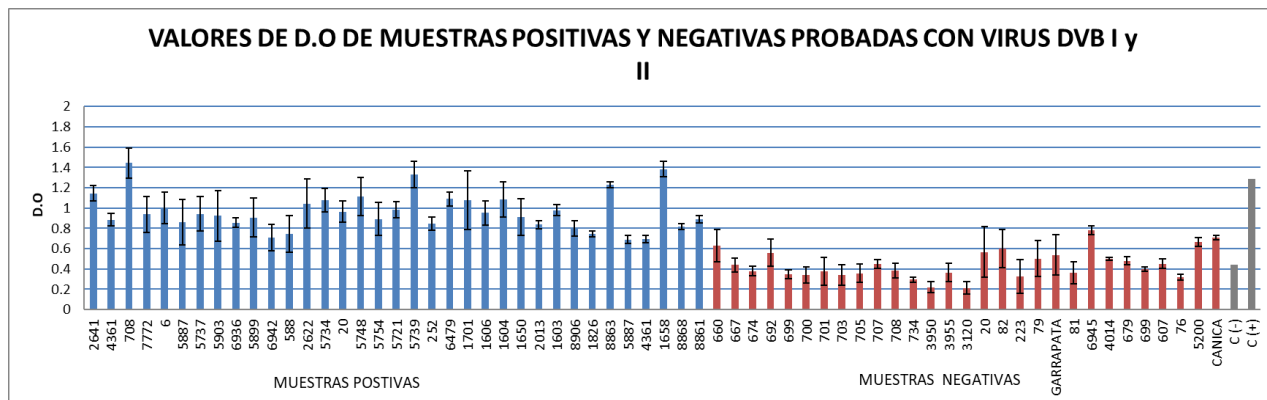


Figura 16. Gráfico con los promedios de D.O de los ensayos 1, 2 y 3 obtenida para los 35 y 28 ejemplares positivos negativos respectivamente, con su D.S. Expuestos al virus DVB I y II. Se incluyen muestras controles positivas y negativas.

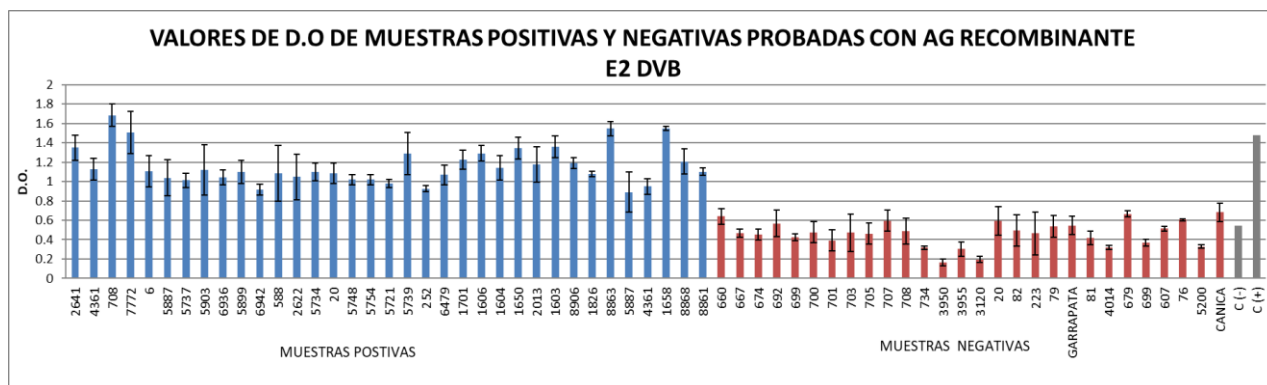


Figura 17. Gráfico con los promedios de D.O de los ensayos 1, 2 y 3 obtenida para los 35 y 28 ejemplares positivos negativos respectivamente, con su D.S. Expuestos al antígeno recombinante E2. Se incluyen los promedios de los sueros control positivos y negativos.

## Estimaciones de repetibilidad

Los cuadros 1. y 2. muestran las correlaciones y los promedios de los coeficientes de variación, mismos que fueron estimados con las réplicas intra ensayo para cada muestras que conforma el grupo positivo y negativo, evaluados con virus y antígeno recombinante.

Cuadro 1. Promedio de los coeficientes de variación y correlaciones obtenidas a partir de las muestras positivas para cada antígeno y dentro de cada ensayo (intra ensayo).

MUESTRAS POSITIVAS			
ENSAYO	ANTÍGENO	PROMEDIO DE COEFICIENTE DE VARIACION	CORRELACION
1	RECOMBINANTE	6.51	0.90
	VIRUS	8.75	0.82
2	RECOMBINANTE	4.55	0.92
	VIRUS	7.02	0.87
3	RECOMBINANTE	6.48	0.88
	VIRUS	3.93	0.98

Cuadro 2. Promedio de coeficientes de variación y correlaciones obtenidas a partir de las muestras negativas para cada antígeno y dentro de cada ensayo (intra ensayo).

MUESTRAS NEGATIVAS			
ENSAYO	ANTÍGENO	PROMEDIO DE COEFICIENTE DE VARIACION	CORRELACION
1	RECOMBINANTE	10.94	0.87
	VIRUS	7.25	0.93
2	RECOMBINANTE	10.19	0.87
	VIRUS	10.10	0.79
3	RECOMBINANTE	5.68	0.94
	VIRUS	7.40	0.88

El cuadro 3. Muestra los promedios de los coeficientes de variación, mismos que fueron obtenidos a partir del total de réplicas de los tres ensayos (inter ensayo) de las muestras positivas y negativas evaluadas con virus y antígeno recombinante.

Cuadro 3.. Promedio de coeficientes de variación de las muestras positivas y negativas evaluadas con cada antígeno.

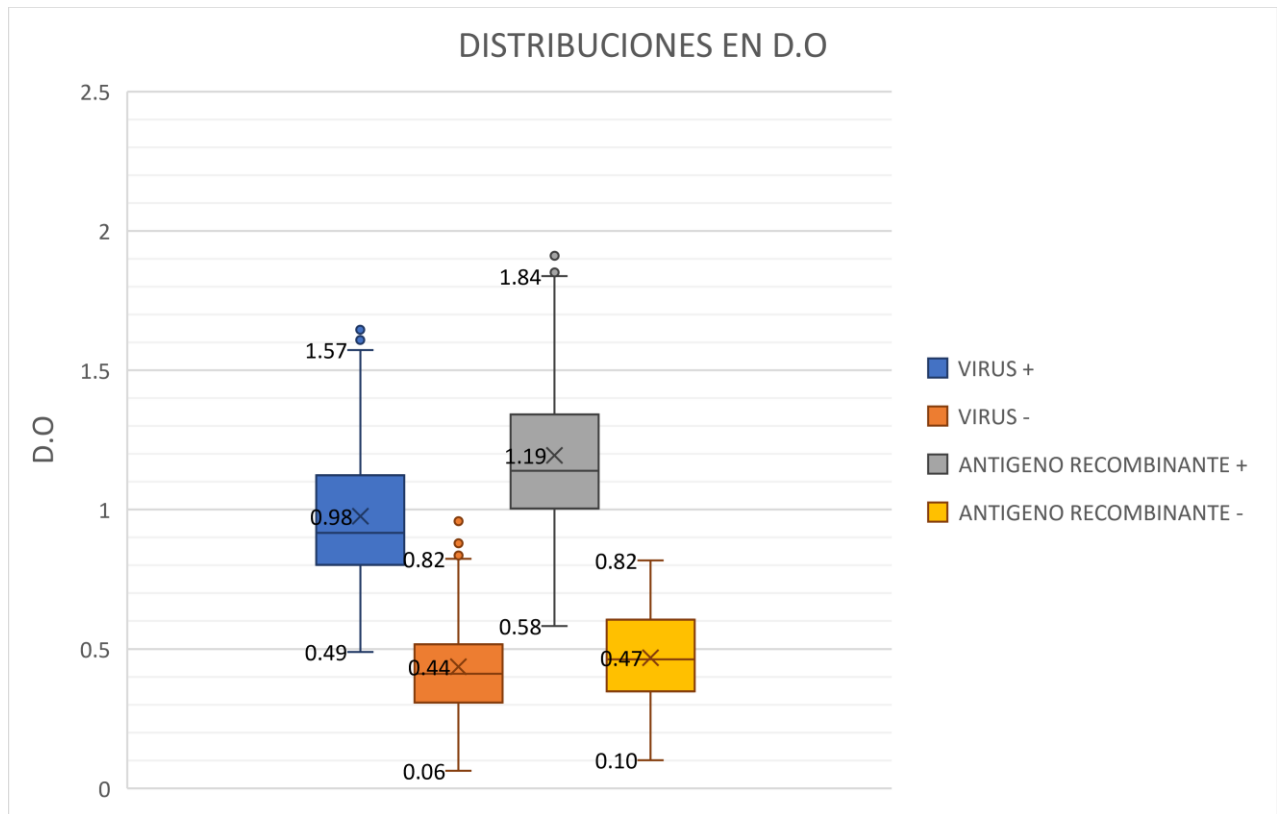
<b>COEFICIENTE DE VARIACION PROMEDIO INTER ENSAYO</b>		
	VIRUS	ANTÍGENO RECOMBINANTE
MUESTRAS +	15.20	13.74
MUESTRAS -	19.58	19.55

Cuadro 4. Coeficiente de correlación intraclase de las muestras positivas y negativas evaluadas con virus y antígeno recombinante inter ensayo.

<b>COEFICIENTE DE CORRELACION INTRACLASE INTER ENSAYO</b>		
	VIRUS	ANTÍGENO RECOMBINANTE
MUESTRAS +	0.74	0.74
MUESTRAS -	0.61	0.69

### 7.5.1 Puntos de corte, sensibilidad y especificidad

Para determinar diferentes puntos de corte y sus respectivos niveles de sensibilidad y especificidad diagnóstica se consideraron los valores normalizados (valores SP) de las réplicas de las muestras, debido a que los valores brutos (D.O) tienden a reflejar ruido de fondo. La figura 18. Muestra las distribuciones en D.O de las muestras positivas y negativas evaluadas con antígeno recombinante y virus. Este gráfico refleja valores mayores de máximos, mínimos y media en cada distribución, a diferencia de los valores observados en las distribuciones de la figura 19, mismos que corresponden con las distribuciones en valores SP.



La figura 18. Distribuciones en D.O de muestras positivas y negativas evaluadas con antígeno recombinante y virus cada una con sus respectivos valores máximos, mínimos y la media.

El análisis visual de la distribución de frecuencias de los valores SP de los grupos positivos y negativos procesados con virus y antígeno recombinante muestra el área de intersección entre las distribuciones positivas y negativas. Esta área corresponde con la zona donde se ubican los individuos falsos positivos y falsos negativos.

La determinación de diferentes puntos de corte dentro de esta zona surgió a partir de la consideración de que un desplazamiento de los mismo hacia abajo minimiza la presencia de individuos falsos negativos obteniendo mayor sensibilidad. Por el contrario, el desplazamiento de los puntos de corte hacia arriba minimiza la presencia de falsos positivos obteniendo así mayor especificidad.

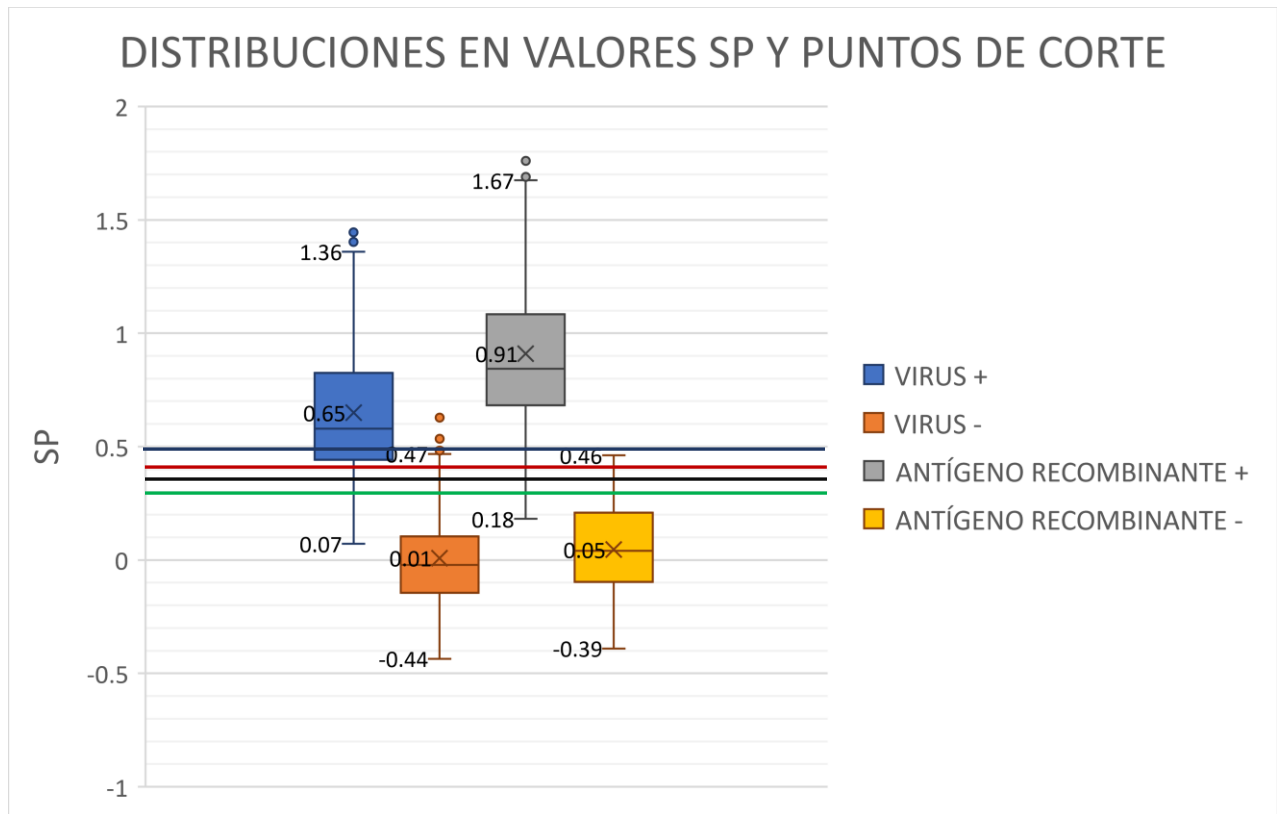


Figura 19. Muestra las distribuciones de los valores SP con sus respectivos valores máximos, mínimos y media, de las muestras positivas y negativas evaluadas con antígeno recombinante y virus, con sus respectivas medias, valores máximos y mínimos. Así como los diferentes puntos de corte: 0.5 (línea transversal azul), 0.4 (línea transversal roja), 0.35 (línea transversal negra), 0.3 (línea transversal verde).

La elección de cuatro puntos de corte dentro del área mencionada permitió determinar y comparar el número de individuos diagnosticados como verdaderos positivos/negativos y falsos positivos/negativos, así como los niveles de sensibilidad y especificidad diagnóstica obtenidos con cada uno.

Para ello se compararon con los valores SP de todas las réplicas de cada una de las muestras conocidas positivas y negativas, donde:

Valor  $SP \geq P.C =$  POSITIVO

Valor  $SP < P.C =$  NEGATIVO

De esta manera aquellas muestras inicialmente conocidas como positivas cuyo diagnóstico en los ensayos fue positivo, se clasificaron como verdaderos positivos (VP), no obstante, las muestras conocidas como positivas cuyo diagnóstico fue negativo al ensayo, se clasificaron como falsas negativas (FN).

Por su parte las muestras conocidas inicialmente como negativas cuyo diagnóstico en los ensayos fue negativo, se clasificaron como verdaderos negativos (VN) y las muestras conocidas como negativas cuyo diagnóstico en los ensayos fue positivo, se clasificaron como falsas positivas (FP).

Con el diagnóstico obtenido se estimaron los niveles de sensibilidad y especificidad que presenta el virus y el antígeno recombinante en el sistema ELISA indirecto de la siguiente manera:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP+FN}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN+FP}$$

Adicionalmente se determinó el valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN), con la finalidad de estimar la probabilidad de que los resultados que arroja la prueba coincidan con el estatus real de los individuos.

La tabla 3 y 4 muestra los resultados obtenidos a partir de cada punto de corte, para cada uno de los antígenos con su respectivo cálculo de sensibilidad y especificidad diagnóstica. Así mismo se muestra el cálculo del valor predictivo y negativo.

Cuadro 5. Diagnóstico obtenido para el conjunto de réplicas evaluadas con virus y comparadas con los diferentes puntos de corte, así como sus respectivos cálculos de especificidad y sensibilidad y valor predictivo positivo y negativo. P.C (Punto de corte), VP (Verdaderos positivos), FN (Falsos negativos), VN (Verdaderos negativos), FP (Falsos positivos), VPP (Valor predictivo positivo), VPN (Valor predictivo negativo).

VIRUS								
P.C	VP	FN	VN	FP	SENSIBILIDAD %	ESPECIFICIDAD %	VPP	VPN
0.3	227	17	214	34	93.03	86.29	86.97	92.64
0.35	216	28	222	26	88.52	89.52	89.26	88.80
0.4	196	48	236	12	80.33	95.16	94.23	83.10
0.5	162	82	245	3	66.39	98.79	98.18	74.92

Cuadro 6. Diagnóstico obtenido para el conjunto de réplicas evaluadas con antígeno recombinante y comparadas con los diferentes puntos de corte, así como sus respectivos cálculos de especificidad y sensibilidad y valor predictivo positivo y negativo. P.C (Punto de corte), VP (Verdaderos positivos), FN (Falsos negativos), VN (Verdaderos negativos), FP (Falsos positivos), VPP (Valor predictivo positivo), VPN (Valor predictivo negativo).

ANTIGENO RECOMBINANTE								
P.C	VP	FN	VN	FP	SENSIBILIDAD %	ESPECIFICIDAD %	VPP	VPN
0.3	243	1	226	22	99.59	91.13	91.70	99.56
0.35	242	2	237	15	99.18	94.05	94.16	99.16
0.4	236	4	242	6	98.33	97.58	97.52	98.37
0.5	232	12	248	0	95.08	100.00	100.00	95.38

Como puede observarse en los cuadros 5 y 6, existen diferentes niveles de sensibilidad y especificidad, mismos que está en función de cada punto de corte. Sin embargo, los porcentajes de sensibilidad y especificidad obtenidos para el antígeno recombinante muestran ser superiores a los obtenidos para el virus. Demostrando que el antígeno recombinante presenta mejor capacidad para distinguir entre positivos y negativos con amplio margen y minimizando la presencia de falsos positivos y falsos negativos. Además de que los valores predictivos positivo y negativo tienden ser mayores, debido a que están en función de los niveles de la misma sensibilidad y especificidad.

Por otra parte, puede observarse que el P.C= 0.4 para el antígeno recombinante brinda altos niveles de sensibilidad y especificidad 98.33 % y 97.58 % respectivamente, manteniendo una relación de equilibrio entre ambos parámetros, evitando incremento sustancial de falsos positivos o bien de falsos negativos, en comparación con los puntos de corte mayores y menores (0.5, 0.3, 0.35) en donde la diferencia existente entre la



sensibilidad y especificidad de cada uno de ellos es proporcional al aumento de individuos diagnosticados como falsos positivos o falsos negativos .

Esto tiende a cobrar relevancia principalmente en las características de la enfermedad y el impacto que genera la presencia de estos individuos, así como la disposición la de los mismos.

## 8 DISCUSIÓN

La glicoproteína E2 es uno de los antígenos con mayor capacidad para inducir la producción de anticuerpos neutralizantes en individuos que han sido expuestos al virus de DVB (Bolin and Ridpath, 1996). Esta característica ha sido abordada en diversos trabajos en los que a partir de la secuencia del gen que codifica para la glicoproteína E2 del virus de DVB, y bajo distintas metodologías, se ha logrado la expresión de antígenos recombinantes como; el antígeno secE2 de secreción soluble expresado en una línea celular de mamífero, que mostró capacidad de seroneutralización, por lo que podría tener potencial como antígeno inmunizante, así como de diagnóstico (Donofrio *et al.*, 2006). El antígeno tE2 expresado en hojas de *Nicotina tabacum*, mostró propiedades inmunogénicas en la prueba de ELISA y de neutralización viral (Nelson *et al.*, 2012).

La expresión de los antígenos antes mencionados tienden a presentar variaciones, que pueden influir en sus propiedades inmunogénicas (Vargas *et al.*, 2009). Mismas que pueden estar relacionadas con las modificaciones estructurales dadas por su sistema de expresión. En este sentido debe reconocerse que la glicoproteína estructural E2 requiere de procesos de glicosilación que están asociados a la generación de epítomos con capacidad neutralizante, (Bolin y Ridpath (1996). Por lo que el sistema baculovirus se ha convertido en una estrategia para la expresión de proteínas que requieren este tipo de procesos, manteniendo las modificaciones postraduccionales de manera semejante a la de células de animales.

La expresión del antígeno recombinante E2 abordado en el presente trabajo está basado en el sistema baculovirus, al igual que los trabajos desarrollados por Bolin y Ridpath (1996) y Chimeno Zoth y Taboga (2006).

Cabe destacar que la construcción del antígeno recombinante E2 del presente trabajo, incluye una secuencia de histidinas a modo de marcaje, una característica que le confiere ventajas sobre otras construcciones pues facilita su caracterización, así como su purificación y recuperación.

La metodología de propagación del baculovirus que expresa el antígeno recombinante E2 del presente trabajo es semejante a la de los reportes anteriores. Sin embargo a diferencia de Chimeno Zoth y Taboga (2006), el cultivo celular Sf9 empleado en este trabajo no fue enriquecido con suero fetal bovino, lo que permitió disminuir costos con buenos alcances.

Para la propagación del virus se empleó cultivo celular MDBK suplementadas con suero fetal bovino con una metodología semejante a la desarrollada por Marzocca (2003) y Xue, Blecha y Minocha (1990) en sus respectivos trabajos.

Los resultados obtenidos a partir de la caracterización por western blot del antígeno recombinante E2 con el uso de un anti-his, mostraron por una parte la presencia de una banda en un peso cercano a los 43.7 KDa (estimado estimado). Esta característica es de relevancia puesto que demuestra la expresión del antígeno de interés.

Tanto Chimeno Zoth y Taboga (2006), como Bolin y Ridpath (1996), encontraron de igual forma el reconocimiento de su antígeno de interés mediante el uso de anticuerpos monoclonales, ambas en un peso cercano a los 50 KDa. Lo anterior como resultados de las diferencias en el diseño en las construcciones.

La caracterización viral evaluada mediante western blot, mostró la identificación de distintas bandas que corresponden con proteínas propias del virus como lo señala (Horzinek, 1990).

La comparación entre el western blot de antígeno recombinante con el de virus de DVB, mostraron una similitud entre la identificación del antígeno recombinante en peso de 43.7 KDa y una banda presente en el virus con un peso, indicando que existe semejanza entre una de las proteínas del virus y el antígeno de interés.

En la titulación de los antígenos en el ELISA indirecto, se encontró que las diluciones óptimas son: 1:5000 para antígeno recombinante y 1:8000 para virus, con suero 1:10, con estas determinaciones se evaluó un grupo de muestras positivas y un grupo de muestras negativas, que fueron previamente valoradas por un paquete de diagnóstico comercial.

Los resultados de estos ensayos permitieron ejecutar pruebas de repetibilidad, tanto para el antígeno recombinante como para el virus. Obteniendo coeficientes de variación menores al 20% tanto para las replicar intra ensayo como para las inter ensayo, lo que indica que existió una repetibilidad adecuada tal como lo señala Jacobson (1998). Cabe señalar que Chimeno Zoth y Taboga (2006) empleó el mismo método para determinar la variabilidad entre repeticiones encontrando valores menores al 20%.

Se estimaron los valores de correlación intra clase, para las muestras evaluadas dentro de cada ensayo (intra ensayo), obteniendo correlaciones entre 0.8 y 0.9 indicando que hubo una excelente correlación. Sin embargo, la correlación estimada para las repeticiones entre ensayos (inter ensayo), mostraron valores entre 0.69 y 0.7 indicando que la correlación es aceptable de acuerdo a Mandeville y Fleiss, (2005)

Los valores de las muestras obtenidos en D.O fueron normalizados con la finalidad de eliminar los posibles ruidos de fondo generados por uniones inespecíficas, mediante el valor SP. Esta metodología es empleada tanto por Chimeno Zoth y Taboga (2006) como por (Marzocca, 2003). A partir de la inspección de las distribuciones de los valores SP determinadas en este trabajo, se seleccionaron cuatro puntos de corte, tal determinación está basada en uno de los criterios planteados por Jacobson (1998). Por su parte, Chimeno Zoth y Taboga (2006), seleccionó su punto de corte a través de otro de los criterios propuestos por Jacobson (1998). Este último toma en cuenta únicamente los resultados de los individuos negativos obtenidos en la prueba.

Con los cuatro puntos de corte establecidos se estimaron sus respectivos niveles de sensibilidad y especificidad diagnóstica. Así como sus valores predictivos positivo y negativo, con la metodología que señala Jacobson (1998).

Con lo anterior se determinó que 0.4 es el valor óptimo a partir del cual una muestra deberá ser considerada positiva o negativa después de ser normalizada, ya que bajo este criterio la prueba cumple con el objetivo planteado de obtener mayores niveles de especificidad y sensibilidad. Obteniendo los siguientes valores; sensibilidad de 98.33% y especificidad de

97.58%, cuya consecuencia radica en la disminución de falsos positivos y falsos negativos, así como de una proporción equilibrada entre estos individuos.

Por su parte Chimeno Zoth y Taboga (2006) obtuvieron una sensibilidad de 88.3% y una especificidad de 98.6%.

En cuanto a uso de virus y antígeno recombinante en el sistema ELISA indirecto, se aprecia que la capacidad del antígeno recombinante para discriminar entre muestras positivas y negativas tiende a ser mayor, puesto que lo hace a través de un amplio margen, disminuyendo considerablemente la presencia de falsos positivos y falsos negativos, confiriendo al sistema diagnóstico importantes niveles de sensibilidad y especificidad. No obstante, el margen de discriminación que presenta el virus es menor, lo que da lugar a una mayor probabilidad de generar individuos falsos positivos y/o negativos.

A partir de los resultados obtenidos se deduce que el antígeno recombinante E2 de DVB presenta mejor desempeño como antígeno diagnóstico que el uso del virus de DVB en la prueba serológica ELISA indirecto y que por lo tanto el antígeno recombinante de la proteína viral E2 presenta potencial para el desarrollo de un paquete de diagnóstico comercial.

## 9 CONCLUSIONES

Tanto los trabajos referidos como el presente involucraron sistemas de clonación y expresión genética distintas que están directamente relacionados con las características del antígeno expresado, lo que repercute en la finalidad o expectativa de uso de este. Por lo que las determinaciones para el montaje del sistema ELISA indirecto presentan variaciones que están sujetas al criterio y planeación de cada laboratorio, además de las condiciones presentes en cada uno

Los resultados presentados confirman la presencia de un antígeno recombinante que conserva propiedades semejantes a la proteína nativa, mostrando excelente capacidad para detectar sueros de animales naturalmente infectados con el virus de DVB, en el ensayo inmunoenzimático (ELISA indirecto), mostrando un nivel de sensibilidad y especificidad excelente y superior en comparación al uso del virus de DVB.

Los estudios abordados en este trabajo sustentan el planteamiento de un antígeno de diagnóstico orientado al desarrollo de un paquete diagnóstico comercial para la detección de anticuerpos específicos a partir de muestras séricas de animales sospechosos a la enfermedad de DVB. Esta herramienta podría representar beneficios relacionados con la disminución de costos, disponibilidad inmediata, practicidad para procesamiento de gran número de muestras, con resultados confiables, contribuyendo de forma importante con el monitoreo y vigilancia epidemiológica de las campañas zoonosanitarias enfocadas al control la enfermedad.

## 10 REFERENCIAS

- Bauermann, F. V. *et al.* (2013) 'HoBi-like viruses: An emerging group of pestiviruses', *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. doi: 10.1177/1040638712473103.
- Birch, J. R. and Onakunle, Y. (2005) 'Biopharmaceutical Proteins', in *Therapeutic proteins: Methods and Protocols*. doi: 10.1007/978-1-62703-239-1\_1.
- Bolin, S. R. and Ridpath, J. F. (1996) 'Glycoprotein E2 of bovine viral diarrhea virus expressed in insect cells provides calves limited protection from systemic infection and disease', *Archives of Virology*. doi: 10.1007/BF01718248.
- Chimeno Zoth, S. and Taboga, O. (2006) 'Multiple recombinant ELISA for the detection of bovine viral diarrhoea virus antibodies in cattle sera', *Journal of Virological Methods*. doi: 10.1016/j.jviromet.2006.07.025.
- Collett, M. S. *et al.* (1988) 'Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: The genomic organization of a pestivirus', *Virology*, 165(1), pp. 200–208. doi: 10.1016/0042-6822(88)90673-3.
- Córdova-Izquierdo, A. *et al.* (2007) 'Seroprevalencia de enfermedades causantes de aborto bovino en el trópico húmedo mexicano', *Revista Veterinaria*.
- Crowther, J. R. (2001) *The ELISA guidebook, Biochemistry (Moscow)*. doi: 10.1134/S000629790909017X.
- Donofrio, G. *et al.* (2006) 'Expression of bovine viral diarrhea virus glycoprotein E2 as a soluble secreted form in a mammalian cell line', *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(6), pp. 698–701. doi: 10.1128/CVI.00071-06.
- Elahi, S. M. *et al.* (1999) 'Induction of humoral and cellular immune responses against the nucleocapsid of bovine viral diarrhea virus by an adenovirus vector with an inducible promoter', *Virology*. doi: 10.1006/viro.1999.9828.
- Elbers, K. *et al.* (1996) 'Processing in the Pestivirus E2-NS2 Region: Identification of Proteins p7 and E2p7', *JOURNAL OF VIROLOGY*, 70(6), pp. 4131–4135. Available at: <http://jvi.asm.org/>.
- Evermann, J. F. and Barrington, G. M. (2008) 'Clinical Features', in *Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management, and Control*. doi: 10.1002/9780470344453.ch6.
- Gómez-Romero, N. *et al.* (2017) 'Genetic diversity of bovine viral diarrhea virus in cattle from Mexico', *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. doi: 10.1177/1040638717690187.
- Gómez Valderrama, J. and Villamizar, L. (2013) 'Baculovirus: Hospederos y especificidad', *Revista Colombiana de Biotecnología*. doi:

10.15446/rev.colomb.biote.v15n2.41273.

González, A. and Fillat, M. F. (2018) 'Aspectos Metodológicos de la Expresión de Proteínas Recombinantes en Escherichia coli', *Revista de Educación Bioquímica*.

Goyal, S. M. and Ridpath, J. F. (2008) *Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management, and Control*, *Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management, and Control*. doi: 10.1002/9780470344453.

Harada, T., Tautz, N. and Thiel, H. J. (2000) 'E2-p7 region of the bovine viral diarrhea virus polyprotein: Processing and functional studies.', *Journal of virology*, 74(20), pp. 9498–9506. doi: 10.1128/JVI.74.20.9498-9506.2000.

Horzinek, M. C. (1990) 'Bovine virus diarrhoea virus: an introduction.', *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 9(1), pp. 13–23. doi: 10.1197/j.aem.2006.06.029.

Invitrogen (2015) 'Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System', *User Guide*. doi: 10.1007/SpringerReference\_28001.

Jacobson, R. H. (1998) 'Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases', *OIE Revue Scientifique et Technique*. doi: 10.20506/rst.17.2.1119.

Johnson, C. M., Merrick, W. C. and Donis, R. O. (2001) 'The NS5A protein of bovine viral diarrhoea virus interacts with the', (2001), pp. 2935–2943.

Kümmerer, B. M., Stoll, D. and Meyers, G. (1998) 'Bovine Viral Diarrhea Virus Strain Oregon: a Novel Mechanism for Processing of NS2-3 Based on Point Mutations', *Journal of Virology*, 72(5), pp. 4127–4138. Available at: <http://jvi.asm.org.ubproxy.ub.uni-heidelberg.de/content/72/5/4127.full.pdf>.

Lara, A. R. (2011) 'Producción de proteínas recombinantes en escherichia coli', *Revista Mexicana de Ingeniera Qumica*. doi: 10.1007/s11263-007-0071-y.

Lértora, W. J. (2003) 'Diarrea viral bovina : actualización', *Revista Veterinaria*. doi: 10.1136/ememed-2014-204211.

Li, Y. *et al.* (2013) 'Crystal structure of glycoprotein E2 from bovine viral diarrhea virus', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, pp. 1–6. doi: 10.1073/pnas.1300524110.

Liebler-Tenorio, E. M. (2008) 'Pathogenesis', in *Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management, and Control*. doi: 10.1002/9780470344453.ch7.

Lindenbach, B. D. and Rice, C. M. (2007) 'Flaviviridae : The'.

Lindenbach, B. D., Thiel, H. J. and Rice, C. M. (2007) 'Flaviviridae: The Viruses and Their Replication', in *Fields Virology*. doi: 10.1016/0038-092X(88)90131-4.



López, Pérez, T. de J. (2014) *Genotipificación de virus de diarrea viral bovina presentes en hatos lecheros*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Mandeville, P. B. and Fleiss, J. L. (2005) 'Tips Bioestadísticos', *Ciencia Uanl*.

Marini, M. del R. (2008) *Identificación del virus de la diarrea viral bovina mediante Inmunohistoquímica en abortos bovinos de la cuenca lechera santafesina y comparación con los resultados obtenidos con el aislamiento viral y la inmunofluorescencia directa*. Universidad Nacional Del Litoral.

Martinez Carlier, P. J. and Santos Riveira, I. M. (2008) *Antecedentes, generalidades y actualización en aspectos de diagnóstico y control de la Diarrea Viral Bovina (DVB) t Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR)*. Pontificia Universidad Jvariana.

Marzocca, M. P. (2003) *Caracterización de antígenos recombinantes de la glicoproteína E2 del virus de la diarrea viral bovina y su utilización como vacunas y reactivos de diagnóstico* Director de Tesis. Universidad de Buenos Aires.

Morán, P., Di Santo, M. and Gorgoza, L. (2006) 'Transmisión del virus de la diarrea viral bovina. Factores de riesgo en el ingreso y diseminación en los rodeos', *Rev vet*, 17(1), pp. 50–56.

Nelson, G. *et al.* (2012) 'Immunocompetent truncated E2 glycoprotein of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) expressed in *Nicotiana tabacum* plants: A candidate antigen for new generation of veterinary vaccines', *Vaccine*. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.04.068.

OIE. (2013) 'Diarrea viral bovina', *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres*.

OIE (2017) 'Principios y métodos de validación de la pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas', in *Manual de las Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos* -.

Pedraza, M. *et al.* (2007) 'Diarrea Vírica Bovina : Etiología , Formas Clínicas , Distribución Del Virus Y Patogenia', *Anales Real Academia Ciencias Veterinarias*, 20(1), pp. 135–158.

Ridpath, J. F., Bolin, S. R. and Dubovi, E. J. (1994) 'Segregation of Bovine Viral Diarrhoea Virus into Genotypes', *Virology*. doi: 10.1006/viro.1994.1620.

Rivera, H. (1999) 'Evolucion Del Conocimiento Sobre La Enfermedad De La Diarrea Viral Bovina Y Su Agente Etiologico', *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 19(2), pp. 93–112. Available at: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172008000200001&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172008000200001&script=sci_arttext).

Romero, R. R. *et al.* (2012) 'Presencia del virus de la diarrea viral bovina y su asociación con otros cuadros patológicos en ganado en corral de engorda', *Veterinaria Mexico*, 43(3), pp. 225–234.

Rondón, I. (2006) 'Diarrea viral bovina: patogénesis e inmunopatología', *Revista MVZ Córdoba*, 11(1), pp. 694–704. Available at:  
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69311103>.

SAGARPA (2007) 'Acuerdo mediante el cual se enlistan las plagas y enfermedades exóticas y enzoóticas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos', *Diario Oficial de la Federación*.

Sandvik, T. (1999) 'Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle', in *Veterinary Microbiology*. doi: 10.1016/S0378-1135(98)00264-8.

Vargas, D. S., Jaime, J. and Vera, V. J. (2009) 'Perspectivas para el control del virus de la diarrea viral bovina (BVDV)', *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*.

Xu, J. *et al.* (1997) 'Bovine viral diarrhoea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication.', *Journal of Virology*, 71(7), pp. 5312–5322. Available at:  
<http://jvi.asm.org/content/71/7/5312>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9188600>.

Xue, W., Blecha, F. and Minocha, H. C. (1990) 'Antigenic variations in bovine viral diarrhoea viruses detected by monoclonal antibodies', *Journal of Clinical Microbiology*, 28(8), pp. 1688–1693.

Yu, H., Grassmann, C. W. and Behrens, S.-E. (1999) 'Sequence and structural elements at the 3' terminus of bovine viral diarrhoea virus genomic RNA: functional role during RNA replication', *Journal of virology*, 73(5), pp. 3638–48. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=104139&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.