



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**Identificación de péptidos por medio de despliegue en fagos para el diagnóstico de *Brucella melitensis*.**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS

Presenta:

**Skarlet Joselin Villaseñor Orozco**

Tutora principal:

**Beatriz Arellano Reynoso**

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Miembros del Comité tutor

**José Alberto Cano Buendía**

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM,

**Araceli Contreras Rodríguez**

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN

Ciudad Universitaria, CDMX, octubre, 2022



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 pues sin ellos no lo hubiera logrado, gracias por apoyarme y guiarme en cada una de las decisiones que he tomado, por su esfuerzo y sacrificio para darme el mejor regalo que alguien puede recibir... mi educación.

A cada integrante de mi hermosa familia, por todo el apoyo, amor y alegría que me brindan a diario y por comprender que a veces no podía estar presente en las reuniones y aun así siempre me hacían partícipe en todo.

A Carlos por siempre estar a mi lado; puede que no entendieras nada de lo que te platicaba sobre mi tesis, pero tratabas, y eso siempre tendrá un gran valor para mí; gracias por apoyar cada decisión que he tomado, por tu paciencia y amor.

A la familia Martínez López por siempre recibirme en su hogar como una integrante más, por el apoyo y amor que siempre me brindan, gracias por darme posada para escribir gran parte de mi tesis.

A mis compañeros y colados del laboratorio de brucelosis y tuberculosis, Jacobo, Josué, Nava, Itzel, Laura, Escobar, Alcaraz, Omar, Adolfo, Erik, Yordy y Miguel por los consejos que me dieron cada vez que me acerque a ustedes, pero sobre todo por hacer del laboratorio un lugar tan especial en el que siempre disfruté estar, aun así pasará más de 8 horas al día ahí, especialmente gracias a mi inseparable compañera de mesa de trabajo, Adrianita y a Migue por siempre escucharme y aconsejarme no solo en el ámbito académico, gracias por todo.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Beatriz Arellano por la confianza que depositó en mí para llevar a cabo este proyecto, gracias por todo, principalmente por su infinita paciencia para explicar y enseñar.

Al Dr. Alberto Cano Buendía por recibirme en su laboratorio, gracias por todas sus aportaciones a este proyecto y por instruirme en el mundo de despliegue en fagos.

A la Dra. Araceli Contreras Rodríguez por el tiempo invertido para la revisión de este escrito.

A los MVZ's Yordy Negrete y Miguel Cortes, por ser mis guías en el uso de despliegue en fagos, por la paciencia y tiempo que siempre me brindaron cuando acudía a ustedes.

Al biólogo Omar Cortéz, por su apoyo en la preparación de reactivos y material para llevar a cabo este proyecto. Al M. en C. Erik Hernández por la donación de los sueros e información recabada de cada uno de los animales. Al M. en C. Adolfo Ortiz por la capacitación para trabajar en la unidad de bioseguridad.

Al Dr. Miguel de la Rosa y MVZ. Esp. Ma. Grisel Anaya por la asesoría durante la producción de los antígenos utilizados en la inmunización de las ratas.

Al laboratorio de enfermedades de los pequeños rumiantes del CENID- Microbiología, especialmente a la bióloga Isabel Tuxpan, Dra. Gabriela Palomares y Dr. Efrén Díaz por asesorarme y prestar sus instalaciones para la producción del antígeno de *B. melitensis*.

A la Dra. Marisol Rivera, Dra. Laura Cobos, y los técnicos académicos Lucía Macías y Héctor Nájera de la UNIPREC por su asesoramiento y trabajo en la producción de sueros hiperinmunes.

A los miembros del jurado por el tiempo invertido en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Francisco Suárez Güemes, por la beca de ayudante de investigador que me otorgó para poder finalizar este proyecto.

Trabajo financiado por el proyecto SAGARPA-CONACYT No. 291311 "Desarrollo y transferencia de pruebas diagnósticas para Lentivirus y microorganismos causantes de aborto: *Chlamydia* spp., *Brucella melitensis*, *Leptospira* spp., y *Coxiella burneti*, en Ovinos y Caprinos". Al CONACYT por la beca otorgada, número de becario 815194.

## RESUMEN

La brucelosis es una enfermedad zoonótica, de origen bacteriano y es endémica en la mayor parte del mundo, incluido México. El diagnóstico oportuno es una herramienta importante para el control y erradicación de la enfermedad el cual requiere de antígenos adecuados, sin embargo, las pruebas utilizadas actualmente presentan limitaciones en cuanto a sensibilidad, especificidad, costos y tiempo requerido para la producción de antígenos. Una alternativa para eliminar estos problemas es la identificación de epítomos por medio de la técnica de despliegue en fagos, que permite la selección de péptidos específicos contra un blanco determinado; enfrentando anticuerpos con bibliotecas de bacteriófagos comerciales, este proceso es conocido como bioselección.

Con el objetivo de identificar péptidos específicos de *Brucella melitensis*, que sean de utilidad en el diagnóstico serológico, se llevó a cabo la bioselección utilizando dos bibliotecas comerciales de fagos: Ph.D.-12 y Ph.D.- C7C (New England Biolabs) y sueros positivos a *B. melitensis*; previo al proceso de bioselección el suero utilizado con la biblioteca C7C se adsorbió contra 4 microorganismos: *Escherichia coli*, *Salmonella* Dublin, *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica*.

Ambas bibliotecas se confrontaron a 5 o 4 rondas de bioselección, al término de cada ronda las clonas elegidas se amplificaron y titularon usando *E. coli* TG1 y posteriormente se llevó a cabo la identificación de clonas reactivas por medio de ELISA, usando un suero control positivo y negativo a *B. melitensis*. Se obtuvieron en total 26 clonas reactivas, que mostraron diferencias significativas en comparación a un suero negativo. Todas las clonas se secuenciaron y analizaron, la mayoría muestran homologías con proteínas que intervienen en el metabolismo bacteriano.

Para eliminar posibles reacciones cruzadas con *Salmonella* Dublin y *Yersinia enterocolitica* O:9, se llevaron a cabo ELISAs utilizando las clonas como antígeno de captura y sueros hiperinmunes de ratas; se logró identificar 6 clonas que no

reaccionan con sueros hiperinmunes de *Salmonella* Dublin, las clonas 6, 7 y 19 de la biblioteca Ph.D. -12 y las clonas 13 y 14 de la biblioteca Ph.D.-C7C.

Los resultados obtenidos indican que las clonas identificadas por medio de despliegue en fagos, pueden diferenciar entre animales seropositivos y seronegativos a la enfermedad y, por lo tanto, son de utilidad en el diagnóstico serológico.

**Palabras clave:** despliegue en fagos, *Brucella melitensis*, diagnóstico, ELISA, reacciones cruzadas, brucelosis.

## ABSTRACT

Brucellosis is a zoonotic disease of bacterial origin and is endemic in most of the world, including Mexico. A timely diagnosis is an important tool for the control and eradication of the disease which requires adequate antigens, however, the tests currently used have limitations in terms of sensitivity, specificity, costs, and time required for the production of antigens. An alternative to eliminate these problems is the identification of epitopes employing the phage display technique, which allows the selection of specific peptides against a given target; by pitting antibodies against commercial bacteriophage libraries, this process is known as bioscreening.

To identify specific peptides of *Brucella melitensis* that are useful in serological diagnosis, bioscreening was carried out using two commercial phage libraries: Ph.D.-12 and Ph.D.-C7C (New England Biolabs) and sera positive for *B. melitensis*; Before the bioselection process, the serum used with the C7C library was adsorbed against 4 microorganisms: *Escherichia coli*, *Salmonella Dublin*, *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica*.

Both libraries were confronted with 5 or 4 rounds of bioselection, at the end of each round, the chosen clones were amplified and titrated using *E. coli* TG1, and later the identification of reactive clones was carried out using ELISA, using a positive control serum. and negative for *B. melitensis*. A total of 26 reactive clones were obtained, which showed significant differences compared to a negative serum. All clones were sequenced and analyzed, most show homologies to proteins involved in bacterial metabolism. To eliminate possible cross-reactions with *Salmonella Dublin* and *Yersinia enterocolitica* O:9, ELISAs were carried out using the clones as capture antigen and hyperimmune sera from rats; it was possible to identify 6 clones that do not react with *Salmonella Dublin* hyperimmune sera, clones 6, 7 and 19 of the Ph.D.-12 and clones 13 and 14 of the library Ph.D.-C7C. The results indicate that clones identified using phage display can differentiate between seropositive and

seronegative animals for the disease and, therefore, are useful in serological diagnosis.

**Keywords:** Phage display, *Brucella melitensis*, diagnosis, ELISA, cross-reactions.



## Contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Brucelosis .....	3
1.1.1. Brucelosis en cabras.....	4
1.1.1.1. Etiología .....	4
1.1.1.2. Patogenia .....	5
1.1.1.3. Signos clínicos .....	6
1.1.1.4. Profilaxis .....	7
1.1.1.5. Diagnóstico.....	7
1.1.1.5.1. Prueba de tarjeta .....	9
1.1.1.5.2. Fijación del complemento (CFT) .....	9
1.1.1.5.3. ELISA.....	11
1.2. Bacteriófago M13 .....	12
1.3. Despliegue en fagos .....	14
1.3.1. Aplicaciones de Despliegue en fagos .....	16
1.3.2. Despliegue en fagos y <i>Brucella</i> .....	17
2. JUSTIFICACIÓN .....	18
3. OBJETIVOS .....	20
3.1. General.....	20
3.2. Específicos .....	20
4. HIPÓTESIS .....	20
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
5.1. Sueros .....	21
5.1.1. Selección de sueros .....	21
5.1.2. Adsorción de sueros.....	22
5.2. Producción de sueros hiperinmunes en el modelo de rata.....	23
5.3. Despliegue en fagos .....	25
5.3.1. Bioselección .....	25
5.3.2. Amplificación de fagos .....	26
5.3.3. Titulación de fagos .....	27
5.4. Análisis de clonas.....	27
5.4.1. ELISA de fagos.....	27
5.4.2. Dot Blot con fagos .....	28

5.4.3. Secuenciación y análisis bioinformático .....	29
6. RESULTADOS .....	31
6.1. Selección de suero .....	31
6.2. Adsorción de sueros .....	32
6.3. Bioselección.....	34
6.4. Análisis de clonas .....	35
7. DISCUSIÓN.....	44
8. CONCLUSIONES.....	53
9. PERSPECTIVAS .....	53
10. BIBLIOGRAFÍA .....	54

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Título obtenido en cada ronda de bioselección (Ph.D.-C7C) para <i>Brucella melitensis</i> .....	34
<b>Tabla 2.</b> Título obtenido en cada ronda de bioselección (Ph.D.- 12) para <i>Brucella melitensis</i> . .....	35
<b>Tabla 3.</b> Análisis e identificación de las secuencias de clonas obtenidas con la biblioteca Ph.D.- C7C. ....	36
<b>Tabla 4.</b> Análisis e identificación de las secuencias de clonas obtenidas con la biblioteca Ph. D.-12.....	39

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática del fago M13. ....	13
<b>Figura 2.</b> Esquema del proceso de bioselección en microplacas.....	15
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática de las bibliotecas comerciales mayormente utilizadas en despliegue en fagos .....	16
<b>Figura 4.</b> Esquema de inmunizaciones de ratas Wistar con diferentes antígenos. ....	24
<b>Figura 5.</b> Evaluación de la producción de anticuerpos a través de los días post-infección en cabras desafiadas con <i>Brucella melitensis</i> . ....	31
<b>Figura 6.</b> Evaluación de la reactividad de sueros positivos y negativos a <i>B. melitensis</i> contra diferentes antígenos por medio de ELISA.....	32
<b>Figura 7.</b> Evaluación de la adsorción de sueros positivos y negativos a <i>B. melitensis</i> contra diferentes antígenos.....	33
<b>Figura 8.</b> Reactividad de clonas de fagos biblioteca C7C a sueros positivos y negativos de <i>B. melitensis</i> por medio de ELISA .....	35
<b>Figura 9.</b> Reactividad de clonas de fagos de la biblioteca Ph.D.-12 por medio de ELISA, utilizando sueros positivos y negativos a <i>B. melitensis</i> .....	37
<b>Figura 10.</b> Evaluación de la reactividad de sueros positivos a <i>B. melitensis</i> por medio de DOT-BLOT, utilizando diferentes antígenos de captura.....	40
<b>Figura 11.</b> Evaluación de la producción de anticuerpos de ratas inmunizadas con diferentes antígenos por medio de ELISA.....	41
<b>Figura 12.</b> Evaluación de la reactividad cruzada de clonas de fagos de la biblioteca Ph.D.-12 a diferentes antígenos por medio de ELISA. ....	42
<b>Figura 13.</b> Evaluación de la reactividad cruzada de clonas de fagos de la biblioteca Ph.D.-C7C a diferentes antígenos por medio de ELISA .....	43

## 1. INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa y zoonótica, causada principalmente por 4 especies de *Brucella*. Esta enfermedad es transmitida por diversas especies animales y se transmite a los seres humanos a partir de secreciones y derivados alimenticios de animales infectados, y tiene fuertes repercusiones socioeconómicas (Franyuti, 2020).

La principal causa de la brucelosis caprina se debe a la especie *Brucella melitensis*, esta enfermedad está distribuida a lo largo de todo el mundo y en México se considera endémica (Hernández *et al.*, 2016). En el reporte emitido en febrero del 2022, por el Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), solo dos estados, Baja California Sur y Sonora, se encuentran libres de la enfermedad, el resto del territorio nacional se encuentra en fase de erradicación o control (SENASICA, 2022).

En México existe la Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995: campaña nacional contra la brucelosis en los animales; en este documento se indica que los animales reactivos, es decir, los que han tenido un resultado positivo a una o más pruebas diagnósticas deben ser sacrificados, por lo tanto, no deben recibir tratamiento alguno contra la enfermedad.

El aislamiento de la bacteria se considera el estándar de oro para el diagnóstico, sin embargo, presenta ciertas dificultades; una de ellas es el tiempo requerido para llevar a cabo el proceso, pues suele ser de aproximadamente 10 días.

Además, debido a que *B. melitensis* puede generar aerosoles se considera una bacteria de alto riesgo, por lo que se requiere de un laboratorio de alta seguridad biológica y personal calificado para su manipulación (Saytekin y Ak, 2018).

Debido a que no es posible realizar el aislamiento de manera rutinaria las pruebas serológicas son las más utilizadas en el diagnóstico de brucelosis en humanos y animales. En el caso de animales se usan la prueba de tarjeta y fijación del

complemento; ambas detectan anticuerpos dirigidos contra la cadena O del LPS de *Brucella*, sin embargo esta última molécula comparte epítomos con otras bacterias Gram negativas (por ejemplo, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157 o *Yersinia enterocolitica* O: 9) (Nielsen *et al.*, 2004) (Corbell, 1975) (Bonfini *et al.*, 2018), por consiguiente existe un alto riesgo de detectar reacciones serológicas falsas positivas; lo cual conlleva la pérdida del estado libre de brucelosis y el sacrificio de animales falsos positivos; por lo tanto debido a los inconvenientes que presentan tanto el aislamiento como las pruebas serológicas se requieren otros métodos de diagnóstico más específicos.

Una alternativa para resolver estos problemas es el uso de la técnica despliegue en fagos (PhD), la cual permite seleccionar péptidos específicos de manera fácil y rápida, con el objetivo de utilizarlos en una prueba serológica para el diagnóstico de esta enfermedad; los péptidos obtenidos a través de esta técnica suelen mostrar altos niveles de especificidad (Al-Mrabeih *et al.*, 2009) esto nos brinda la posibilidad de eliminar las reacciones falsas positivas, aunado a que la producción de los péptidos suele realizarse en cortos periodos de tiempo (Arap, 2005) a diferencia de la producción de antígenos para las pruebas tradicionales; además su producción no requiere instalaciones sofisticadas, por lo tanto los péptidos seleccionados por medio de despliegue en fagos son buenos candidatos para su uso en el diagnóstico de la brucelosis.

## 1.1. Brucelosis

Brucelosis es la denominación genérica de las infecciones animales o humanas, causadas por cualquier especie del género *Brucella*, entre las que destacan *Brucella abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2018). El primer informe clínico se le atribuye a Marston en 1860 (Ruiz, 1990). El agente etiológico fue aislado a finales del siglo XIX por Sir David Bruce y Carruana Scicluna, quienes investigaban un padecimiento febril que provocó la muerte de un número considerable de soldados; más tarde, en 1905 Zammit, un médico maltés, demostró que las cabras transmitían la enfermedad (Shakir, 2021). En América Latina la llegada de la enfermedad fue debido a la introducción de animales infectados por los españoles durante el tiempo de la colonia.

Las especies de *Brucella* tienen un hospedero específico, sin embargo, se ha reportado que pueden infectar a otros animales (Vaillard, 2017); actualmente, existen 12 especies de *Brucella*, las cuales se dividen en dos grupos: clásicas y atípicas. Estas últimas exhiben rasgos fenotípicos diferentes y una mayor diversidad genética que las del grupo clásico, es por esto que se han denominado como "atípicas" ya que no tienen relación con las especies previamente reportadas (Keyburn y Buller, 2020).

El grupo de especies clásicas está conformado por: *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis* y *B. papionis*. Las especies de este grupo son inmóviles, desprovistas de plásmidos y sus genomas muestran identidades de nucleótidos superiores al 99% (Scholz *et al.*, 2016).

Las especies consideradas como atípicas son: *B. inopinata*, *B. microti* y *B. vulpis* (Keyburn y Buller, 2020). Recientemente se han identificado algunas cepas que se encuentran en espera de afiliación de especie, aisladas de humanos y animales. Este grupo incluye cepas candidatas como BO2 de un humano, LT605586 de una

mantarraya, NF2653 de un roedor y el último de estos aislamientos ha sido de anfibios (Latheef *et al.*, 2020).

### **1.1.1. Brucelosis en cabras**

La infección por *Brucella* en cabras está causada principalmente por *B. melitensis*, se han observado infecciones esporádicas causadas por *B. abortus* o *B. suis*, pero estos casos son infrecuentes (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2018). Países como Canadá, E.U.A., Japón, el norte y centro de Europa, Australia y Nueva Zelanda han logrado erradicar esta enfermedad (Hernández *et al.*, 2016).

#### **1.1.1.1. Etiología**

El género *Brucella* está constituido por bacilos cortos, Gram negativos, aerobios y algunas especies requieren atmósferas de CO<sub>2</sub> entre el 5% -10% (Muñoz *et al.*, 2020). Son bacterias que no esporulan, no presentan cápsula y son inmóviles (Barreto *et al.*, 2021). Sin embargo, Uzureau y colaboradores (2007) demostraron que *B. melitensis* tiene genes que codifican para un flagelo, y que la expresión de estos genes está relacionada con el proceso regulador denominado detección de quórum (QS). Posteriormente se confirmó que el flagelo se expresa durante la fase exponencial de crecimiento en medios enriquecidos y que los genes involucrados son necesarios para la infección *in vivo* de ratones y cabras (Ferooz *et al.*, 2011).

Filogenéticamente, se clasifican en la subdivisión 2- $\alpha$  de las proteobacterias. Tienen un metabolismo oxidativo, basado en la utilización de nitratos como aceptores de electrones (Charbonnier, 2019). Son organismos intracelulares facultativos, parcialmente acidorresistentes y carecen de plásmidos nativos. Aproximadamente miden 0.5 a 0.7  $\mu$  de diámetro y 0.6 a 1.5  $\mu$  de longitud. Son oxidasa, catalasa y ureasa positivos (Pradeepkirana *et al.*, 2021).

Con base en el aspecto de las colonias obtenidas en medio sólido, las diferentes especies de *Brucella* se clasifican habitualmente como lisas S (del inglés smooth),



o rugosas R, (del inglés rough) (Castro *et al.*, 2005). Esta característica está relacionada con la presencia o ausencia del lipopolisacárido (LPS), las especies lisas de *Brucella* presentan un polisacárido O terminal (conocido también como cadena O) en cambio, las cepas rugosas carecen de éste. *B. melitensis* está clasificada dentro del grupo de cepas lisas (Scholz *et al.*, 2016).

#### **1.1.1.2. Patogenia**

El paso inicial de una infección exitosa de *Brucella* es la adhesión y la penetración, estas se dan a través de las superficies mucosas, como las vías respiratorias, la piel erosionada y el tracto gastrointestinal. Algunos autores sugieren que el contacto inicial entre *Brucella* y la célula hospedera se produce entre la membrana plasmática celular y el LPS, específicamente la cadena O (O-LPS) siendo la primera molécula que está involucrada en la entrada intracelular de *Brucella* (Delrue *et al.*, 2004). El O-LPS contribuye junto con el lípido A y el núcleo a la protección de *Brucella* contra las defensas celulares como por ejemplo, los péptidos y la lisis mediada por el complemento (Moriyon y Lopez-Goni, 1998).

Las brucelas muestran un fuerte tropismo tisular y se replican dentro de las vacuolas de los macrófagos, las células dendríticas y los trofoblastos placentarios. Sin embargo, tiene la capacidad de replicarse en una amplia variedad de células de mamíferos, que incluyen células de la microglía, fibroblastos, células epiteliales y células endoteliales (de Figueiredo *et al.*, 2015).

Generalmente esta bacteria ingresa a la célula hospedera mediante un mecanismo de fagocitosis tipo “zipper”, el cual se caracteriza por la inducción de rearrreglos moderados en la membrana y el citoesqueleto de la célula hospedera (De Bolle *et al.*, 2015, Solano, 2015) y pueden utilizar el citoesqueleto, tanto para el movimiento como para la diseminación intracelular (Doherty y Kaufmann, 1994). Finalmente establecen un nicho replicativo dentro del retículo endoplásmico (Oliveira, 2021). La clave de *Brucella* para sobrevivir durante el proceso de infección, reside en su

capacidad de adaptarse al nicho intracelular que contiene pocos nutrientes, poco oxígeno, pH ácido y especies reactivas de oxígeno (Amjadi *et al.*, 2019). Durante los primeros pasos del tránsito intracelular de *Brucella*, la bacteria puede bloquear la progresión de su ciclo celular, permaneciendo en la etapa G1 durante varias horas, antes de alcanzar su nicho de replicación (Oliveira, 2021).

Las bacterias que sobreviven, se transportan a través del sistema linfático hasta alojarse en los ganglios linfáticos regionales, después se multiplican, y viajan a través del conducto torácico hasta llegar a los órganos parenquimatosos y el torrente sanguíneo (Rhyan *et al.*, 1994). González y colaboradores (2021) proponen que *Brucella* aprovecha el ambiente proporcionado por los nichos celulares para generar reservorios en bazo, linfonodos, hígado, médula ósea, epidídimo y placenta, para eventualmente causar enfermedad cardiovascular, hepática, linforreticular, neurológica y osteoarticular.

### **1.1.1.3. Signos clínicos**

La importancia de esta enfermedad radica en que afecta la reproducción del ganado, ya que los signos típicos incluyen aborto, infertilidad, retención placentaria, mortalidad neonatal o debilidad de la progenie; todo ello se traduce en pérdidas económicas considerables para los productores (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2018).

El aborto suele ocurrir en la primera gestación posterior a la infección, generalmente en los dos últimos meses de gestación, antes de que la inmunidad adquirida pueda reducir el riesgo de futuros abortos. Sin embargo, todavía existe la posibilidad de que se presenten abortos en las gestaciones futuras. El agente infeccioso se puede eliminar hasta tres meses después del parto; en los machos los signos son orquitis y problemas articulares (Hull y Schumaker, 2018).

Los animales gestantes expuestos a un pequeño número de bacterias pueden desarrollar una inmunidad autolimitante y estos se convierten en portadores latentes (Coelho *et al.*, 2014), ya que solo se necesitan de 10-100 UFC (unidades formadoras de colonias) para establecer una infección (Hans *et al.*, 2020). La infección puede persistir en las glándulas mamarias y linfonodos supramamarios; por este motivo es común la excreción del microorganismos en las lactancias sucesivas (Coelho *et al.*, 2014).

El período de incubación varía de 15 días a varios meses, esta variabilidad está asociada a la susceptibilidad del hospedero (Memish y Balkhy, 2004) (Querol, 2011).

#### **1.1.1.4. Profilaxis**

Las únicas vacunas comerciales disponibles para la brucelosis son las destinadas a los animales (Goodwin y Pascual, 2016). La vacuna que actualmente se utiliza para la prevención de *B. melitensis* está elaborada a partir de una cepa viva atenuada llamada REV-1; y es administrada a cabras y ovejas (Pascual *et al.*, 2018);

#### **1.1.1.5. Diagnóstico**

El diagnóstico de brucelosis en el ganado caprino se lleva a cabo en los laboratorios aprobados por la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER).

El aislamiento se considera el estándar de oro, éste se puede llevar a cabo a partir de la placenta, líquidos fetales y secreciones vaginales excretadas por las cabras infectadas, ya sea al abortar o al parir. La excreción de *Brucella* también es frecuente en el semen, y puede aislarse de distintos tejidos, como los linfonodos, el bazo y los órganos asociados a la reproducción (útero, epidídimo y testículos), así como de lesiones artríticas (Solano, 2015).

Para el aislamiento a partir de canales de animales infectados se recomiendan órganos del sistema reticuloendotelial, suele aparecer crecimiento pasados 3 a 4 días, pero los cultivos no deben considerarse negativos hasta que hayan pasado 7 a 10 días (Kopenhagen y González, 2019).

Algunas cepas, sobre todo en el primoaislamiento, solo se desarrollan en presencia de suero. Se recomiendan como medios de cultivo base (no selectivos) el agar-dextrosa con suero, el agar-triptosa con suero y el agar-tripticosa-soja, al cual se adiciona suero bovino o equino al 5% (Alton *et al.*, 1988). Los medios selectivos recomendados son el Farrel y Thayer-Martin modificado (Herrera *et al.*, 2009)

Las pruebas serológicas tienen una gran trascendencia en el diagnóstico de esta enfermedad, las brucelas tienen una envoltura celular formada por una membrana interna, un periplasma y una membrana externa. La membrana externa contiene lípidos libres, proteínas y LPS; este último es el principal antígeno de superficie y las pruebas serológicas se basan en la identificación de anticuerpos producidos contra esta molécula (Nielsen *et al.*, 1989, Muñoz *et al.*, 2020).

La infección por *Brucella* induce una respuesta de anticuerpos mediante la producción de anticuerpos IgM e IgG a las 1-2 semanas después de la infección, estos persisten durante 1 año o más (Trotta *et al.*, 2020).

En México la NOM-041-ZOO-1995 indica que para el diagnóstico de *B. melitensis* se utiliza la prueba de tarjeta al 3% y fijación del complemento, ambas indicadas para el diagnóstico en pequeños rumiantes.

La prueba serológica ideal para el diagnóstico certero sería aquella que reuniera las siguientes características: ser altamente sensible, que detecte la infección de manera temprana, que discrimine entre anticuerpos de origen vacunal e infección natural y que no presente reacciones cruzada con otras bacterias Gram negativas.

#### **1.1.1.5.1. Prueba de tarjeta**

La prueba de tarjeta es un ensayo rápido de aglutinación en portaobjetos que se realiza con una suspensión de *B. abortus* teñida con rosa de bengala y suero sin diluir. La sensibilidad general es del 92.9%, es decir rara vez se encuentran resultados falsos negativos. La prueba se basa en la reactividad de anticuerpos contra el O-LPS (Asfaw Geresu y Mamo Kassa, 2015). En 1967 Pietz y Schilf desarrollaron el antígeno utilizado en esta prueba; este consiste en una suspensión de *B. abortus* cepa 1119-3 (Díaz, 2001), inactivado por calor, y ajustado a un pH de 3.6 para la detección de anticuerpos Ig-G de tipo 1 y en menor medida de Ig-M en suero sanguíneo de ganado caprino y ovino de origen vacunal o debidos a infecciones naturales (Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, 2018).

Los resultados de la prueba de tarjeta se interpretan como: positivos y negativos, dependiendo de la presencia o ausencia de aglutinación. La prueba (específicamente en pequeños rumiantes) se realiza en hembras mayores de 14 meses de edad, que recibieron la dosis clásica de la vacuna REV-1 entre los 3 y 4 meses de edad; en el caso de las hembras vacunadas con dosis reducida, únicamente se podrán realizar las pruebas diagnósticas 8 meses después de la fecha de vacunación; en las hembras nunca antes vacunadas y en los machos sin castrar la prueba se realizará a partir de los 4 meses de edad (NOM-041-ZOO-1995, 1995).

#### **1.1.1.5.2. Fijación del complemento (CFT)**

La CFT es ampliamente recomendada como prueba de confirmación para el diagnóstico de brucelosis debido a su especificidad; sin embargo, es menos sensible que la prueba de tarjeta y ELISA (Barbuddhea *et al.*, 2020) es la prueba de referencia recomendada por la OIE para el tránsito internacional de animales (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2018).

Se basa en la activación del complemento por la vía clásica, en donde es necesaria la presencia de una unión antígeno-anticuerpo para iniciar la reacción (fase invisible). Cuando existen anticuerpos contra *Brucella* spp., se da la reacción antígeno anticuerpo y el complemento se une a esta reacción (Ag-Ac-C'), siendo incapaz de unirse al sistema hemolítico, que es un segundo sistema antígeno anticuerpo (fase visible), observándose una sedimentación de los glóbulos rojos con anticuerpos o hemolisina. En ausencia de anticuerpos contra *Brucella* spp. en el primer sistema durante la fase invisible, el complemento queda libre, uniéndose al segundo sistema antígeno-anticuerpo o sistema hemolítico, observándose una hemólisis (Alton *et al.*, 1988). Por lo tanto, si el suero presenta anticuerpos contra *Brucella* spp., el complemento no va a estar disponible y por lo tanto, no se va a producir la lisis de los eritrocitos sedimentándose y, por consiguiente, se formará en el fondo del tubo un botón de eritrocitos, dando la prueba como positiva (Berrueta Wilkins, 2012).

Para la prueba se emplea, el antígeno preparado con la cepa 1119-3 de *B. abortus*, sin teñir, con un pH entre 6.8 a 7.0, y una concentración celular de 4.5%. Los resultados de la prueba se interpretan como positivos y negativos. En caprinos y ovinos los positivos serán aquellos en los que se obtengan títulos mayores de 1/4 (NOM-041-ZOO-1995, 1995).

El antígeno celular e inmunoglobulinas que intervienen en la fijación del complemento son el O-LPS e IgG1, inmunoglobulina que predomina en la infección por *Brucella* (Díaz, 2001), ya que las IgM e IgG2 de rumiantes no activan el complemento de cobayo (Nielsen *et al.*, 2004).

### 1.1.1.5.3. ELISA

En el diagnóstico de brucelosis se ha encontrado que el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas ELISA (por sus siglas en inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) utilizando LPS como antígeno es más sensible y específica que las pruebas de tarjeta y fijación del complemento (Ducrotoy *et al.*, 2016). Esta prueba detecta anticuerpos contra el polisacárido O (O- LPS), porción más expuesta del lipopolisacárido S (LPS-S) (Díaz *et al.*, 2012), también utiliza a la cepa *B. abortus* S99 o 1119-3 como fuente de LPS liso (Barbuddhea *et al.*, 2020). Cuantifica diferentes tipos de inmunoglobulinas anti-*Brucella* (IgM, IgG e IgA), esto nos permite saber si se trata de una infección aguda o crónica (Asfaw Geresu y Mamo Kassa, 2015) (Barbuddhea *et al.*, 2020).

Esta técnica tiene como principales ventajas, la posibilidad de procesar muchas muestras a la vez, y permite la cuantificación de antígenos bacterianos en las muestras analizadas. Tiene una especificidad de 90,5% y sensibilidad de 97,7% y (Nielsen *et al.*, 2004) sin embargo, a veces no es capaz de distinguir entre anticuerpos generados por vacunación, por reacciones cruzadas con otras bacterias Gram negativas y los inducidos por cepas patógenas de *Brucella*. Por consiguiente, la prueba ELISA-I (ELISA-indirecta) debe considerarse como una prueba de análisis más que como una prueba confirmatoria (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2018).

Otra prueba utilizada para el diagnóstico de brucelosis es el ELISA competitivo (c-ELISA), este procedimiento está basado en la detección de anticuerpos séricos contra brucelas lisas incluidas *B. abortus* y *B. melitensis*; es un ensayo multi-especie que permite la detección de anticuerpos de *Brucella* específicos en especies domésticas y salvajes (Suárez, 2015). Su sensibilidad varía del 92 al 100 %, mientras que la especificidad varía del 90 al 99 % (Godfroid *et al.*, 2010).

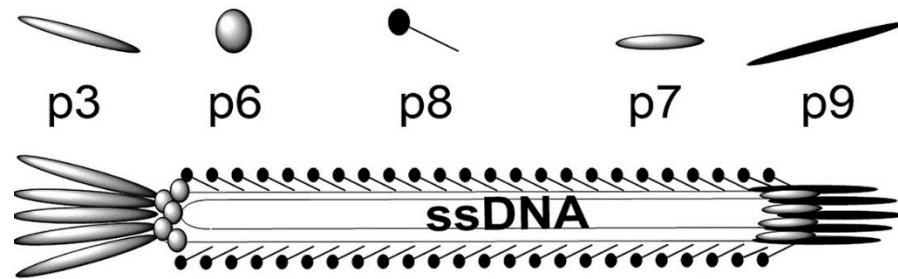
## 1.2. Bacteriófago M13

Los bacteriófagos (también llamados fagos) fueron descubiertos en 1917 por Felix d'Herelle (Wittebole *et al.*, 2014) son los virus que infectan y parasitan únicamente bacterias específicas (hospederos naturales). La estructura de los fagos es determinada por sus proteínas de envoltura (o proteínas estructurales) cuya función principal es la de proteger al material genético (DNA o RNA) (Segundo *et al.*, 2010). Con base en la cápside viral los bacteriófagos se clasifican en 3 tipos: icosaédricos, helicoidales y con forma de cabeza-cola. Entre los helicoidales los fagos filamentosos son el grupo más estudiado, en este grupo se encuentran F1, M13 y fd (Faezeh *et al.*, 2020).

M13 es un fago que infecta a *Escherichia coli* y que porta el episoma F. Clasificado en la familia Inoviridae, género Inovirus y en el grupo II del sistema de Baltimore (Hay y Lithgow, 2019). Tiene un ciclo de replicación viral lisogénico, es decir, se ensamblan en la superficie celular y se exporta de manera coordinada mediante un mecanismo secretor (Faezeh *et al.*, 2020), posteriormente introduce su genoma en el citoplasma de la célula hospedera para después integrarlo en el cromosoma de la célula bacteriana o bien se mantiene como un elemento episomal donde, se replica y se transmite a las células bacterianas hijas sin lissarlas (Kasman y Porter, 2022). Consta de un genoma de DNA monocatenario (ssDNA) de 6407 nucleótidos, capaz de codificar once proteínas, cinco de las cuales son proteínas de la cubierta y las seis restantes son esenciales para su replicación y el ensamblaje (Ping *et al.*, 2021).

La p8 es la proteína principal conformada por aproximadamente 2700, mientras que las proteínas menores (p3, p6 en un extremo y p7 y 9 en el otro) presentan cinco copias de cada una (Smeal *et al.*, 2017) (Figura 1).





**Figura 1.** Representación esquemática del fago M13 (Smeal *et al.*, 2017).

Los fagos infectan mediante una gama de receptores de superficie bioquímicamente diversos, como carbohidratos, lipopolisacáridos y proteínas. El rango de hospederos generalmente está determinado por la forma en la que el fago interactúa específicamente con el receptor; el reconocimiento de esta región única tiene como consecuencia que un fago puede ser capaz de infectar solo una especie o cepa de hospedero (Hyman y Abedon, 2010). En el caso del fago M13 el sitio de infección es el pili presente en *E. coli*, el virus se adhiere a la punta del pili conjugativo, esto provoca que éste se retraiga y pone al fago en contacto con el correceptor TolA de la célula hospedera, lo que lleva a la transferencia del genoma del fago a la célula (Lin *et al.*, 2011).

El proceso está mediado por la proteína de recubrimiento menor (p3), de 406 aminoácidos, compuesta por tres dominios unidos por medios de enlaces ricos en glicina. Inicialmente el dominio N-terminal (N2) se une a la punta del pilus F; seguido por el otro dominio N-terminal (N1) que se une a TolA, una proteína de membrana integral en *E. coli*. El dominio terminal C se ancla a la proteína p3 a la cápside y finalmente permite la liberación del fago (Bennett y Rakonjac, 2006). Esta proteína toma importancia ya que en la mayoría de las aplicaciones de despliegue en fagos es la más utilizada (Zhao *et al.*, 2016).

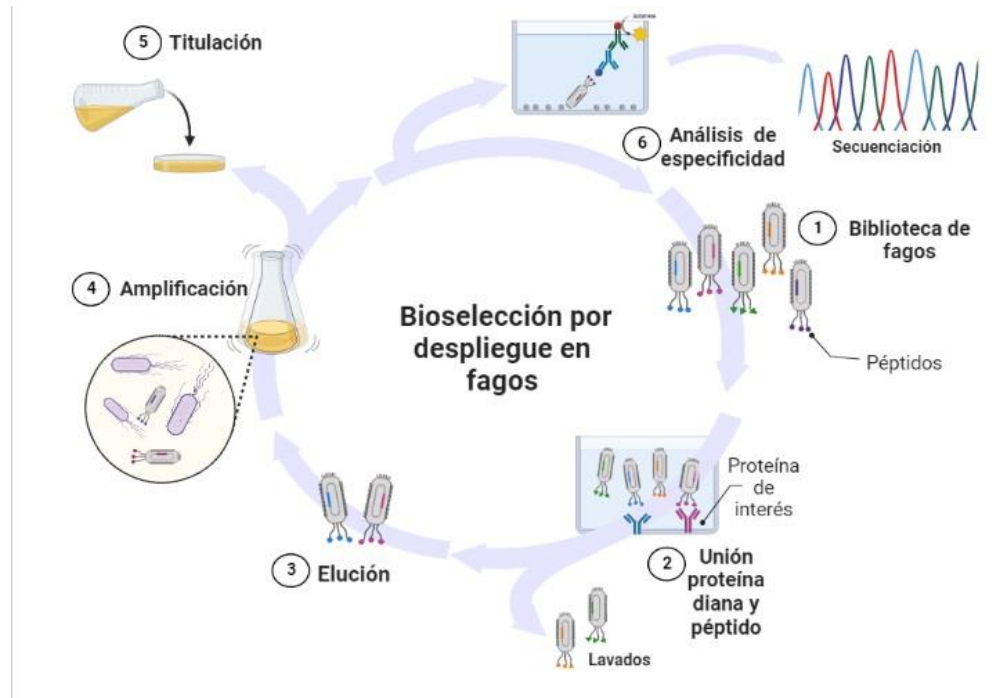
### 1.3. Despliegue en fagos

Unos 25 años después de que se aisló por primera vez el fago filamentoso, se informó que una modificación genética, es decir, la inserción de un fragmento de DNA extraño en el genoma del fago, producía una partícula que mostraba la secuencia insertada como un péptido fusionado a las proteínas de cubierta (Smith, 1985). Además, el péptido expuesto era accesible para el reconocimiento específico por un anticuerpo dirigido hacia esa secuencia (Barderas y Benito-Pena, 2019).

Esta técnica recibió el nombre de despliegue en fagos (del inglés phage display) y se introdujo por primera vez en 1985 por George Smith (Smith, 1985). Los vectores mayormente utilizados son los fagos filamentosos y el sistema de fagémidos (Sioud, 2019).

Esta tecnología se basa en el hecho de que el fenotipo y el genotipo del fago están ligados físicamente. De hecho, el gen que codifica la molécula expuesta está empaquetado dentro del mismo virión (Kaplan y Gershoni, 2012). Esto se logra mediante un proceso cíclico conocido como bioselección (biopanning, en inglés), que tiene como objetivo enriquecer una población de fagos que contengan un solo péptido y que, a su vez, tenga afinidad por un ligando de interés (Hammers y Stanley, 2014). En términos simples, la bioselección se realiza incubando una biblioteca de péptidos expuestos en fagos con la molécula diana, posteriormente se realizan lavados con el objetivo de eliminar los fagos no unidos y se eluyen los fagos específicamente unidos; estos últimos son amplificados mediante la infección de la bacteria *E. coli*, es decir, la bacteria se convierte en una planta de producción para su replicación. Finalmente, las bacterias infectadas generarán una nueva población de fagos que se someterán a otro ciclo de bioselección, hasta llevar a cabo de 3-5 rondas, al terminar se debe determinar la especificidad entre el péptido y la molécula diana, regularmente se determina por medio de un ELISA. El nivel de absorbancia es proporcional al número de fagos unidos, lo que indica que el péptido tiene especificidad hacia la molécula blanco (Ping *et al.*, 2021). Finalmente se lleva a cabo la secuenciación del ADN del fago (Bozovicar *et al.*, 2021), con el objetivo de

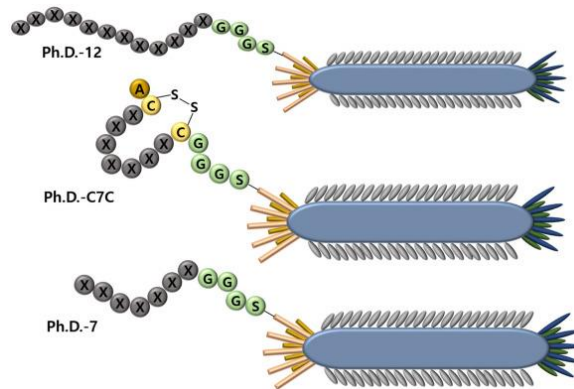
comparar el resultado con las secuencias proteicas que ya han sido reportadas esto con el propósito de inferir su función (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema del proceso de bioselección en microplacas

El proceso de selección *in vitro* por medio de despliegue en fagos generalmente utiliza microplacas, perlas o columnas para fijar el objetivo; también se ha implementado el biopanning *in vivo*, que consiste en inyectar la biblioteca de fagos en un cuerpo humano o animal vivo durante un período predeterminado y luego recuperarlo de los tumores u órganos diana, para posteriormente identificarlos y utilizarlos como biomarcadores (Ping *et al.*, 2021).

Actualmente existen laboratorios dedicados a la producción de bibliotecas comerciales, en función de la longitud y el tipo, hay tres tipos: biblioteca de heptapéptidos restringidos por cisteínas (en bucle) (Ph.D.-C7C), biblioteca de heptapéptidos lineales (Ph.D.-7) y biblioteca de dodecapéptidos lineales (Ph. D.-12) (Rami *et al.*, 2017) (Figura 3).



**Figura 3.** Representación esquemática de las bibliotecas comerciales mayormente utilizadas en despliegue en fagos (Ping *et al.*, 2021).

### 1.3.1. Aplicaciones de Despliegue en fagos

Ha tenido una gran influencia en el trabajo y los descubrimientos realizados en los campos de inmunología (Alizadeh *et al.*, 2021) biología celular (Villamil Giraldo *et al.*, 2015) (Ch'ng *et al.*, 2021) y la industria farmacéutica (Bazan *et al.*, 2012); quizá este último es el campo en donde ha tomado mayor relevancia, ya que entre 2016 y 2019 los péptidos representaron aproximadamente el 6.3% de los medicamentos aprobados; la tecnología de presentación de fagos ha ayudado a la industria farmacéutica a identificar ligandos terapéuticos de péptidos que se encuentran actualmente en el mercado o en ensayos clínicos (Al Shaer *et al.*, 2020).

Los péptidos obtenidos de esta técnica también funcionan como biomarcadores, dado que muchas proteínas son biomarcadores de enfermedades; la última década

ha sido testigo de numerosos estudios sobre la detección de péptidos de unión para varios biomarcadores tumorales (Ping *et al.*, 2021). También se han implementado como biosensores, estos están compuestos por elementos biológicos (por ejemplo, péptidos) que se utilizan para detectar la presencia de un ligando objetivo y generar una señal (Khemthongcharoen *et al.*, 2015). Además, se ha demostrado que puede ser un excelente vehículo de administración de péptidos antigénicos (Delhalle *et al.*, 2012).

El despliegue en fagos también ha tomado relevancia en el diagnóstico de diversas enfermedades, ya que los péptidos obtenidos a través de esta técnica pueden ser utilizados en inmunoensayos para sustituir algún antígeno (Zhao *et al.*, 2021).

### **1.3.2. Despliegue en fagos y *Brucella***

Existen trabajos en donde se evaluaron péptidos obtenidos por medio de técnica despliegue en fagos para el diagnóstico de *Brucella* spp. El primero de ellos fue reportado por Lichtfouse y colaboradores en 1995. En ese estudio se utilizó un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína de membrana externa OMP89, para la bioselección de péptidos específicos que posteriormente podrían ser buenos candidatos para el diagnóstico, los péptidos se expresaron en la proteína 8 del fago filamentoso f88-4.

Otro trabajo fue publicado en 1999, en donde a diferencia del anterior identificaron péptidos dirigidos contra los epítomos A y M, de la cadena O del LPS de *Brucella* spp. y posteriormente utilizaron estos péptidos en un protocolo de inmunización en ratones con el objetivo de crear una respuesta inmunitaria hacia estas moléculas (De-Bolle *et al.*, 1999).

En otros estudios, se identificaron interacciones entre diferentes moléculas del sistema de secreción tipo IV (VirB5) (Deng *et al.*, 2019) y VirB5-VirB6 (Villamil *et al.*, 2012).

## 2. JUSTIFICACIÓN

Un aspecto importante que hay que considerar para el control y erradicación de la brucelosis es el diagnóstico oportuno. Actualmente se cuenta con pruebas serológicas, las cuales detectan anticuerpos contra el lipopolisacárido (LPS) (Hernández, 2006). Esta molécula toma importancia en el diagnóstico, ya que a lo largo de los años se ha reportado que otras bacterias Gram negativas tienen epítomos comunes a la cadena O de *Brucella*, por ejemplo *Yersinia enterocolitica* O:9 (Chenais *et al.*, 2012) (O'Grady *et al.*, 2016) y *Salmonella* spp. (Nielsen *et al.*, 2007). Estos inconvenientes se traducen en pérdidas económicas para los productores ya que la NOM-041-ZOO-1995-044 indica que todo animal que resulte positivo a las pruebas diagnósticas deberá sacrificarse.

Una alternativa para resolver estos problemas es el uso de la técnica de despliegue en fagos (PhD), para identificar y seleccionar péptidos específicos; que posteriormente puedan ser utilizados en una técnica diagnóstica como antígeno de captura (Zhao *et al.*, 2021). La identificación de estos péptidos (a través del proceso de bioselección *in vitro*) suele ser rápida representando una gran ventaja (Rami *et al.*, 2017). Con esta técnica también es posible identificar péptidos novedosos, que no han sido estudiados o reportados anteriormente, lo cual aumenta la posibilidad de la seleccionar antígenos específicos (Williams, 2018).

Las pruebas serológicas disponibles para el diagnóstico de la brucelosis utilizan como antígenos de captura suspensiones de *Brucella* en fase lisa (S) (Castro *et al.*, 2005). Sin embargo la producción de estos antígenos suele ser costosa ya que el género *Brucella* se encuentra dentro de los agentes del grupo de riesgo III, por lo que para su manipulación se requiere un nivel de contención 3 (BLS3) (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2018). Lo anterior supone altos costos de producción, pues el funcionamiento y mantenimiento de un laboratorio BSL3 es costoso, ya que requiere personal altamente capacitado y la adquisición de

reactivos y consumibles que a largo plazo pueden socavar su viabilidad (Bridges *et al.*, 2014).

Este hecho es contrastado con la producción de péptidos exhibidos en fagos, pues el proceso de producción suele ser económico (Ch'ng *et al.*, 2021) ya que los bacteriófagos no representan un riesgo biológico y no requieren instalaciones especializadas; aunado a que el manejo y amplificación de estos virus es sencillo y rápido, en comparación con la producción de antígenos convencionales de *Brucella*, el cual se lleva a cabo en 6 días, pudiendo aumentar a 16 ya que la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2018) recomienda una incubación de 10 días posterior a la inactivación con fenol para verificar que el proceso haya finalizado de manera correcta; esto de nuevo contrasta con el tiempo requerido para la amplificación de bacteriófagos ya que el proceso puede completarse en tan solo 3 días.

Actualmente esta técnica se ha utilizado para aumentar la especificidad en el diagnóstico de otras enfermedades infecciosas. Por ejemplo, en la tuberculosis en donde los péptidos presentaron un 100% de especificidad al analizarlos por medio de ELISA (Serena *et al.*, 2022). Otro estudio se enfocó en el diagnóstico de la dirofilariasis; en ese trabajo se obtuvo un péptido con gran potencial de diagnosticar la enfermedad en un inmunoensayo eliminando las reacciones cruzadas con *Toxascaris leonina*, *Uncinaria stenocephala* y *Toxocara canis* (Pekacz *et al.*, 2022).

El presente proyecto propone la técnica de PhD para identificar y seleccionar péptidos específicos que interactúen con sueros de caprinos positivos a *Brucella melitensis*; y su evaluación para desarrollar un diagnóstico serológico.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. General**

Identificar péptidos específicos de *Brucella melitensis* por medio de la técnica de despliegue en fagos, que sean de utilidad en el diagnóstico serológico de animales infectados.

#### **3.2. Específicos**

- Seleccionar un suero positivo a *Brucella melitensis* con altos títulos de anticuerpos, que funcionen como proteína diana en la técnica de despliegue en fagos.
- Llevar a cabo la bioselección de epítomos/mimotopos de *Brucella melitensis* mediante el uso de despliegue en fagos.
- Evaluar las clonas reactivas a sueros positivos de *Brucella melitensis* mediante inmunoensayos y herramientas bioinformáticas.
- Identificar a las clonas que no reaccionen a sueros hiperinmunes de ratas infectadas con *Yersinia enterocolitica* 0:9 ni a *Salmonella* Dublin mediante ELISA.

### **4. HIPÓTESIS**

Los péptidos de las clonas identificadas por medio del proceso de bioselección utilizando anticuerpos contra *Brucella melitensis* serán específicos y de utilidad en el diagnóstico serológico de la brucelosis.



## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1. Sueros**

#### **5.1.1. Selección de sueros**

Los sueros se obtuvieron de cabras desafiadas con *B. melitensis* 16M, con aislamiento y prueba de tarjeta al 3% positiva, fueron amablemente donados por el Dr. José Francisco Morales Álvarez y el M. en C. Erik Hernández Badillo.

Comprobamos la reactividad de estos sueros por medio de ELISA indirecta; de acuerdo a la metodología propuesta por Rodríguez (2003) con algunas modificaciones: se sensibilizó una placa de poliestireno, fondo plano de 96 pozos maxysorp (Thermo Fisher Scientific®, No. de Cat. 439454, Massachusetts/Estados Unidos) con 0.468 ng (nanogramos) de antígeno crudo de la cepa *B. melitensis* 16M. Se agregaron 50 microlitros (µl) en cada pozo y se homogenizó en agitación orbital a 100 revoluciones por minuto (rpm) por 5 minutos (min) e incubó por 17 horas (h) a 4°C (grado Celsius).

A continuación, se decantó el contenido de los pozos y se lavó 3 veces con 100 µl de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) - tween 20 (Sigma-Aldrich®, No. de Cat. P9416, Misuri/Estados Unidos) al 0.05%; los lavados se llevaron a cabo al término de cada procedimiento. Posteriormente los sueros se diluyeron con PBS-albumina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich®, No. de Cat. 9048-46) al 0.1% a una dilución de 1:200, se colocaron 50 µl de la dilución en el pozo correspondiente, y se incubó por 2 h a 37°C.

Posteriormente, se realizó una dilución 1:5000 de la IgG anti-cabra marcada con peroxidasa de rábano (MB Biomedicals, No. de Cat. 55358, California/Estados Unidos) agregando 50 µl a cada pozo. Se incubó 2 h a 37°C. Para el revelado se agregaron 50 µl de 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) (ABTS) (Sigma-Aldrich®, No. de Cat. A3219) y se incubó durante 25 min en agitación orbital a 100 rpm. Finalmente se llevó a cabo la lectura a 405 nanómetros (nm) utilizando un lector de microplacas (BioTek, Vermont/Estados Unidos, modelo ELx808).

### 5.1.2. Adsorción de sueros.

Con la finalidad de remover anticuerpos inespecíficos del suero de cabra seleccionado, se adsorbió contra 4 microorganismos: *Escherichia coli*, *Salmonella* Dublin, *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica*. La producción de antígenos y adsorción de sueros se llevó a cabo de acuerdo con la metodología propuesta por Gruber y Zingales (1995) con algunas modificaciones. Para la producción de los antígenos se sembró una colonia de la cepa respectiva en 400 mililitros (ml) de caldo infusión cerebro-corazón (Becton Dickinson® No. de Cat. 211200, Nueva Jersey/Estados Unidos) y se incubó a 37° C durante toda la noche en agitación orbital a 250 rpm. Al día siguiente se separó el cultivo en dos partes de 200 ml cada una. Una parte se esterilizó usando los siguientes parámetros 121° C, 15 libras/pulgadas<sup>2</sup> (psi) durante 1 h, al finalizar este tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente, a la otra mitad se le agregó formaldehído (Merck®, No. de Cat. 104003, Darmstadt/Alemania) a una concentración final de 0.5% y se incubó a 37° C durante 2 h a 250 rpm. Posteriormente ambas suspensiones bacterianas se juntaron y centrifugaron a 5000 fuerza centrífuga relativa (*g*) durante 10 min. La pastilla se lavó con PBS. Después se midió la densidad óptica (D.O.) de cada uno de los antígenos y se igualaron al antígeno que obtuvo el menor valor en comparación con el resto. Para poder igualar los antígenos se llevaron a cabo diluciones con PBS, después a cada uno de los antígenos se les agregó inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich®, No. de Cat. P2714) y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Finalmente, para la técnica de adsorción se sensibilizó una placa de poliestireno de fondo plano de 96 pozos maxysorp (Thermo Fisher Scientific®, No. de Cat. 439454), con 200 µl de cada uno de los antígenos, en pozos independientes (uno por cada antígeno), y se incubó a 4 °C durante 16 h. Posteriormente se decantó el contenido de los pozos y se lavó 3 veces con 200 µl de PBS-tween 20 (Sigma-Aldrich®, No. de Cat. P9416) al 0.05%. Se agregó el suero de cabra diluido 1:50 en PBS-BSA (Sigma-Aldrich®, No. de Cat. 9048-46) al 1% en un volumen final de 200 µl, para

exponerlo al primer antígeno. Posteriormente se incubó por 2 h a 4°C, y el suero fue colocado en el siguiente pozo para exponerlo al segundo antígeno a adsorber, es decir esto se llevó a cabo por 4 ocasiones de manera secuencial.

El contenido de los pozos se recolectó y se almacenó a -20 °C hasta su uso. Finalmente se llevó a cabo el análisis de los sueros adsorbidos por medio de un ELISA indirecta utilizando la misma metodología para la selección de sueros, descrita anteriormente. Esta técnica se llevó a cabo con sueros positivos y negativos adsorbidos y sin adsorber.

## **5.2. Producción de sueros hiperinmunes en el modelo de rata**

Con el objetivo de identificar las clonas de fagos que no tuvieran reacción cruzada con otros microorganismos Gram negativos, se llevó a cabo la producción de sueros hiperinmunes en el modelo de rata.

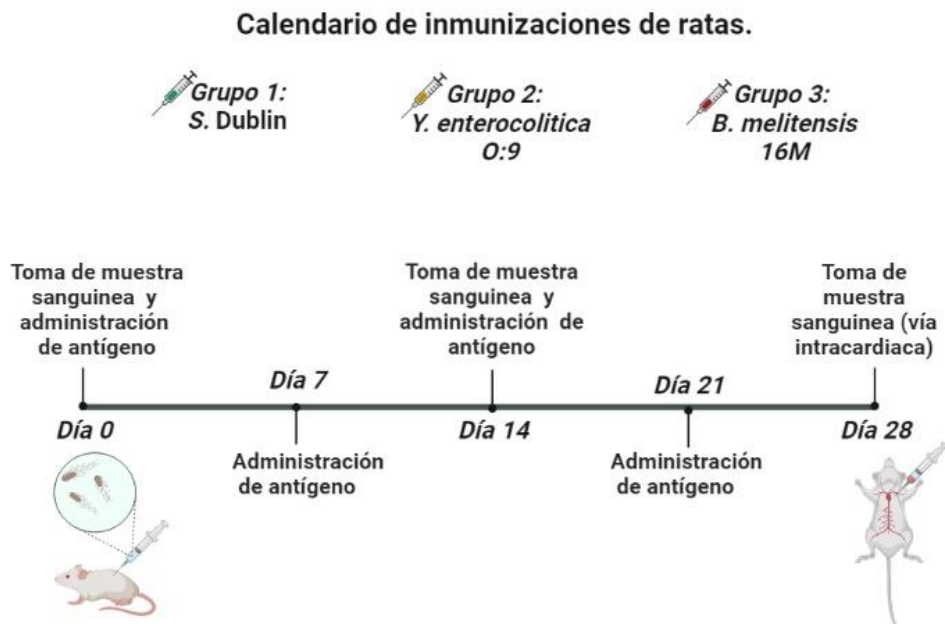
Se emplearon 6 ratas (*Rattus norvegicus*) hembras, libres de patógenos específicos (SPF), estirpe Wistar de 85-90 días de edad, con un peso aproximado de 350 g (gramos). Los animales se mantuvieron bajo la guía de condiciones establecidas en la NOM-062-ZOO-1999 y bajo las pautas de experimentación que establece el Subcomité institucional para el cuidado y uso de animales experimentales (SICUAE) con el número de protocolo aprobado SICUAE MC-2020/4-7.

Las ratas fueron divididas en tres grupos con dos animales cada uno: el grupo 1 fue inoculado con *Salmonella enterica* Dublin, el grupo 2 con *Yersinia enterocolitica* O:9 y el grupo 3 con *B. melitensis* 16M.

Cada una de las cepas bacterianas se sembraron en medio de cultivo líquido infusión cerebro corazón (Becton Dickinson) durante 16 h a 150 rpm. Posteriormente se verificó la pureza del cultivo en medio sólido y por tinción de Gram, después se llevó a cabo la inactivación por calor (80 °C/20 min) se dejó enfriar a temperatura ambiente y finalmente se agregó 0.5% de formol (concentración final) y se almacenó a 4°C toda la noche.

Culminado este tiempo se sembraron en medio sólido y líquido para verificar la correcta inactivación. Por otro lado, a su llegada, los animales permanecieron en cuarentena una semana, terminando este tiempo se llevó a cabo una toma de sangre de 2-3 ml por el plexo venoso ocular (tiempo 0). Previo a cada toma de muestra los animales fueron sedados con isoflurano 3-4% administrado mediante una máquina de anestesia inhalatoria. Los animales fueron inmunizados al día 0, 7, 14, 21 y 28 (figura 4) por vía subcutánea (SC), a una concentración de  $1 \times 10^9$  UFC/ml.

Con el objetivo de monitorear la producción de anticuerpos se obtuvo una muestra de sangre del plexo venoso ocular 14 días posteriores a la primera inoculación, y se llevó a cabo un ELISA utilizando la metodología de ELISA de selección de sueros. Una semana después de la última inoculación (día 28) se obtuvo la última muestra sanguínea por vía intracardiaca para obtener el mayor volumen posible. Finalmente se obtuvo el suero y se almacenó a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso.



**Figura 4.** Esquema de inmunizaciones de ratas Wistar con diferentes antígenos.

### **5.3. Despliegue en fagos**

#### **5.3.1. Bioselección**

Se llevó a cabo la bioselección utilizando 2 bibliotecas, la primera fue Ph.D.-12 (New England Biolabs<sup>®</sup>, No. de Cat. E8110S, Massachusetts, Estados Unidos), esta biblioteca expresa 12 aminoácidos en la proteína menor de cápside (p3) el procedimiento se llevó a cabo con un suero de cabra sin adsorber.

La siguiente biblioteca fue Ph.D.<sup>™</sup>-C7C (New England Biolabs<sup>®</sup>, No. de Cat. E8120S), la cual expresa un péptido de 7 aminoácidos flanqueados por cisteínas, para la bioselección se utilizó un suero de cabra adsorbido.

Para ambas bibliotecas la metodología que se siguió fue la propuesta por Cano y colaboradores (2004) con algunas modificaciones, el procedimiento fue el siguiente: se sensibilizó una placa de 96 pozos maxysorp (Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup>, No. de Cat. 439454) con 0.5 microgramos (ug) del anticuerpo anti-porción Fc de IgG (Novus Biologicals<sup>®</sup>, No. de Cat. NBP172769, Colorado, Estados Unidos) diluido en buffer de carbonatos y se incubó durante 16 h a 4 °C.

Posteriormente se retiró el contenido de los pozos y se realizaron 3 lavados con 200 µl de PBS cada uno; los lavados se llevaron a cabo al término de cada procedimiento. Posteriormente se bloqueó con 200 µl de PBS-BSA (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, No. de Cat. 9048-46) al 2% durante 1.5 h a 37 °C, al terminar se agregó el suero a una dilución 1:50 diluido en PBS-BSA (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, No. de Cat. 9048-46) al 0.1% e incubó durante 4.5 h a 4°C.

Después se agregó la biblioteca de bacteriófagos diluida en PBS-BSA 0.1% a un volumen final de 100 µl por pozo y se incubó durante 4.5 h a 4°C. Posteriormente se llevó a cabo la elución con glicina-HCl 0.2 M (Bio-Rad Laboratories<sup>®</sup> No. de Cat. 1610718, California, Estados Unidos) (Sigma<sup>®</sup>, No. de Cat. 320331) se agregaron 100 µl por pozo e incubó 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó por 10 min a 37°C. El contenido de los pozos se depositó en un tubo que contenía

25 µl de tris-HCl 1 M (Bio-Rad Laboratories®, No. de Cat. 1610716) con la finalidad de neutralizar el fago. Por último, los tubos se mantuvieron a 4°C hasta su uso.

### **5.3.2. Amplificación de fagos**

La amplificación y selección de fagos se realizó siguiendo las indicaciones del laboratorio (Biblioteca comercial Ph. D 12 y C7C New England Biolabs®). La cepa de *E. coli* TG1 K-12 *supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5, (r<sub>K</sub>m<sub>K</sub>)* se incubó durante 16 h a 250 rpm, para la amplificación se agregaron 500 µl de esta cepa a 50 ml de caldo Luria-Bertani (Dibico®, 1236-E, Edo. Mex, México) y 320 µl del fago eluído obtenido de cada ronda de bioselección, se incubó durante 4.5 h a 250 rpm. Al finalizar, se recolectó el medio en un tubo cónico, se centrifugó por 15 min a 16639 *g*. A 40 ml del sobrenadante se le agregaron 8 ml de polietilenglicol (PEG) 8000 20% / 2.5 M de NaCl (Sigma-Aldrich®, No. de Cat. 89510) (Sigma-Aldrich®, No. de Cat. S9888) se mezcló y se mantuvo a 4 °C toda la noche.

Terminando este tiempo, se llevó a cabo el proceso de precipitación el cual consistió en centrifugar a 16639 *g* durante 15 min a 4°C, después se descartó el sobrenadante, y el pellet se resuspendió en 1 ml de tris buffer salino (TBS). Se agregaron 200 µl de PEG 8000 20% / 2.5 M de NaCl y se incubó durante 1 h a 4°C. Se volvió a centrifugar a los mismos parámetros antes mencionados, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 200 µl de TBS. Para finalizar se volvió a centrifugar con el objetivo de eliminar por completo restos celulares, y se obtuvo el sobrenadante para después almacenarlo a 4 °C hasta su uso. Al terminar el proceso de amplificación se llevó a cabo otra ronda de bioselección, utilizando el amplificado de la ronda anterior y así sucesivamente hasta completar 5 o 4 rondas según se indique.

### **5.3.3. Titulación de fagos**

Con el objetivo de calcular el número de fagos se llevó a cabo el proceso de titulación; de cada tubo con fagos eluidos y/o amplificados se tomaron 2 µl, y se llevaron a cabo diluciones seriadas (1:500) en medio LB. Después del tubo que correspondiera se tomaron 10 µl y se depositaron en un tubo que contenía 200 µl de *E. coli* TG1 (previamente crecido durante 16 h) y se incubó por 5 min. Posteriormente se agregó a un tubo que contenía 4 ml de top agar y se sembró en cajas petri con agar LB que contenía X-gal (Thermo Fisher Scientific®, No. de Cat. R0404) e IPTG (Thermo Fisher Scientific®, No. de Cat. 15529019) y se incubó durante toda la noche a 37°C. Finalmente se cuantificó el número de unidades formadoras de placa (UFP).

Las clonas individuales para experimentos posteriores, se seleccionaron al azar de cajas petri que correspondían a rondas de elución y amplificación de la ronda 3 en adelante. Con ayuda de la base de una punta de 200 µl se extrajo una clona y se depositó en un matraz que contenía 50 ml de caldo LB, posteriormente se continuó con el proceso de amplificación y titulación, como se describió anteriormente.

## **5.4. Análisis de clonas**

### **5.4.1. ELISA de fagos**

Con el objetivo de iniciar la selección de las clonas reactivas a *B. melitensis* se llevó a cabo una ELISA de fagos de acuerdo a la metodología de Lehmann y colaboradores (2004), con modificaciones, se sensibilizó una placa de 96 pozos maxysorp (Thermo Fisher Scientific®) con  $1 \times 10^{12}$  UFP, obtenidas de las rondas de bioselección, después se incubó durante toda la noche a 4 °C; terminando este tiempo se decantó el contenido de la placa y se lavó con PBS-Tween 20 (Sigma-Aldrich®) al 0.05%, los lavados se llevaron a cabo al término de cada procedimiento.

Posteriormente se bloqueó con 100 µl de caseína-PBS al 5% y se incubó 1 h a 37°C; enseguida los sueros se diluyeron 1:250 con PBS, se colocaron 100 µl de la dilución en el pozo correspondiente y se incubó por 1 h a 37°C. Por último, se realizó una dilución 1:5000 de la IgG anti-cabra marcada con peroxidasa (Thermo Fisher Scientific®) agregando 100 µl a cada pozo, se dejó incubar 1 h a 37°C. Para el revelado se agregaron 100 µl de ABTS (Sigma-Aldrich®) en cada pozo, finalmente se cubrió la placa con papel aluminio y se incubó durante 25 min a 37 C. Terminando este tiempo se realizó la lectura en un lector de ELISA a 405 nm.

Para discriminar clonas positivas y negativas se determinó el punto de corte; éste se definió como el promedio de las lecturas del control negativo, +/- tres desviaciones estándar. Como un control negativo se utilizó un fago M13 silvestre, no expresa ni despliega ningún péptido en su superficie.

Este procedimiento también se llevó a cabo con los sueros hiperinmunes de ratas inmunizadas con *Yersinia enterocolitica* O:9 y *Salmonella* Dublin con el objetivo de eliminar las clonas que tengan reacción cruzada con estos sueros.

#### **5.4.2. Dot Blot con fagos**

Utilizando como antígeno de captura las clonas de fagos obtenidas del proceso de bioselección con la biblioteca Ph. D. 12 se llevó a cabo un dot blot; como control se utilizó antígeno crudo de *Brucella melitensis* 16M y *Brucella abortus* S19 que previamente se inactivaron por calor hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de 0.6 y bacteriófago M13 silvestre.

Se sensibilizó una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories®, No. de Cat. 1620115) con 5 µl de cada una de las clonas de fagos o M13 a una concentración  $1 \times 10^{12}$  UFP o bien del antígeno de *Brucella*, posteriormente se incubó durante 1 h a temperatura ambiente (la temperatura fue la misma durante todos los procesos de incubación).



Posteriormente se llevó a cabo el equilibrio de la membrana depositándola en un recipiente que contenía buffer de transferencia durante 5 min, finalizando este tiempo se depositó en un recipiente que contenía caseína-PBS al 5%, y se incubó durante 1 h; terminando este tiempo se llevaron a cabo 3 lavados con PBS 1X+ tween 20 al 0.05% cada uno con una duración de 5 min en agitación orbital, (este proceso se realizó al término de cada incubación) después la membrana se colocó en un recipiente que contenía PBS 1X + suero positivo o negativo a *B. melitensis* a una concentración 1:1 y se incubó durante 1 hora, al terminar se agregó el anticuerpo secundario anti-IgG de cabra marcado con peroxidasa de rábano (Thermo Fisher Scientific®) a una dilución 1:2500 y se incubó durante 1 h. Después se llevó a cabo el revelado con 4-cloro-1-naftol (Sigma-Aldrich®, No. de Cat. C8890) se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente se detuvo la reacción con lavados de agua destilada estéril.

#### **5.4.3. Secuenciación y análisis bioinformático**

De las clonas de fagos reactivas a sueros positivos de *B. melitensis* se llevó a cabo la extracción de DNA siguiendo las indicaciones del fabricante de las bibliotecas comerciales (New England Biolabs®). Brevemente, se tomaron 500 µl de la solución de fagos y se añadieron a un tubo que contenía 200 µl de una solución de 20% PEG/ 2.5 M de NaCl. Posteriormente, se mezcló y dejó reposar de 10-20 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 18037 *g* por 10 min a 4°C y se decantó el sobrenadante, después se le añadió 100 µl de buffer de yoduro (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 4 M Ioduro de sodio) (Sigma-Aldrich®, No. de Cat. 324503) (Sigma-Aldrich®, 383112) con el objetivo de lisar al bacteriófago y obtener el DNA. Después el tubo se agitó vigorosamente y se añadieron 250 µl de etanol absoluto y se incubó de 10-20 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 18037 *g* 10 min. a 4°C, se decantó el sobrenadante y se lavó con 500 µl de etanol al 70% (almacenado a -20°C), se volvió a centrifugar y decantar el sobrenadante, y se dejó secar. Se resuspendió en 30 µl de agua grado biología molecular (Thermo

Fisher Scientific®, No. de Cat. 10977035) y se cuantificó el DNA usando un espectrofotómetro.

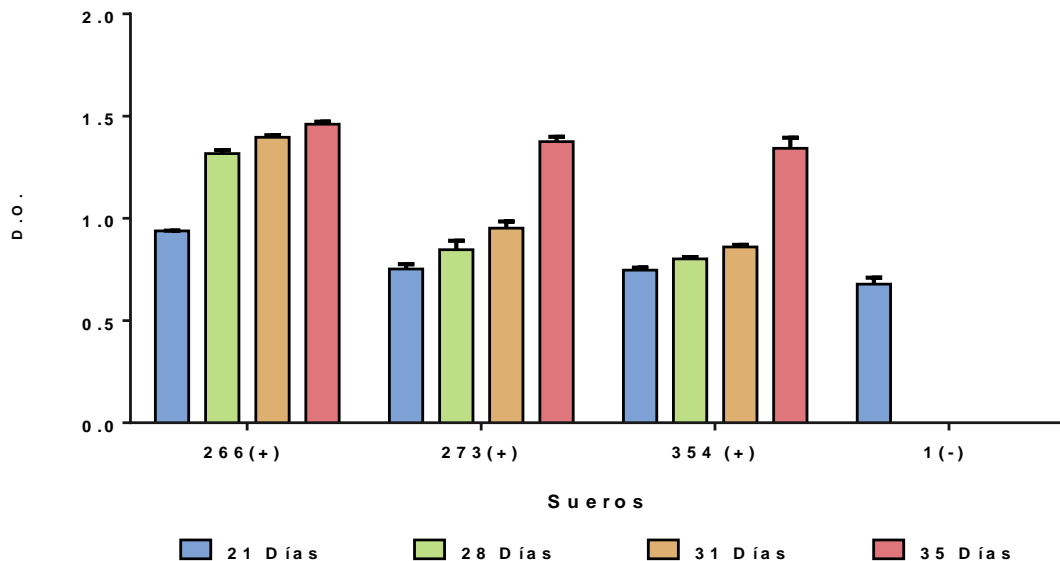
La secuenciación se llevó a cabo en el Instituto de Biotecnología (IBt) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por el método de Sanger utilizando el primer -96 gIII (New England Biolabs, No. de Cat. E8110S, USA).

El análisis de las secuencias se realizó con el programa Sequencher versión 5.4.6 (DNA Sequence Analysis Software, GeneCodes Corporation, USA), finalmente cuando la secuencia era conocida se analizó con la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del NCBI, con el objetivo de conocer con que proteína de *Brucella melitensis* tenían homología para poder inferir su función.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Selección de suero

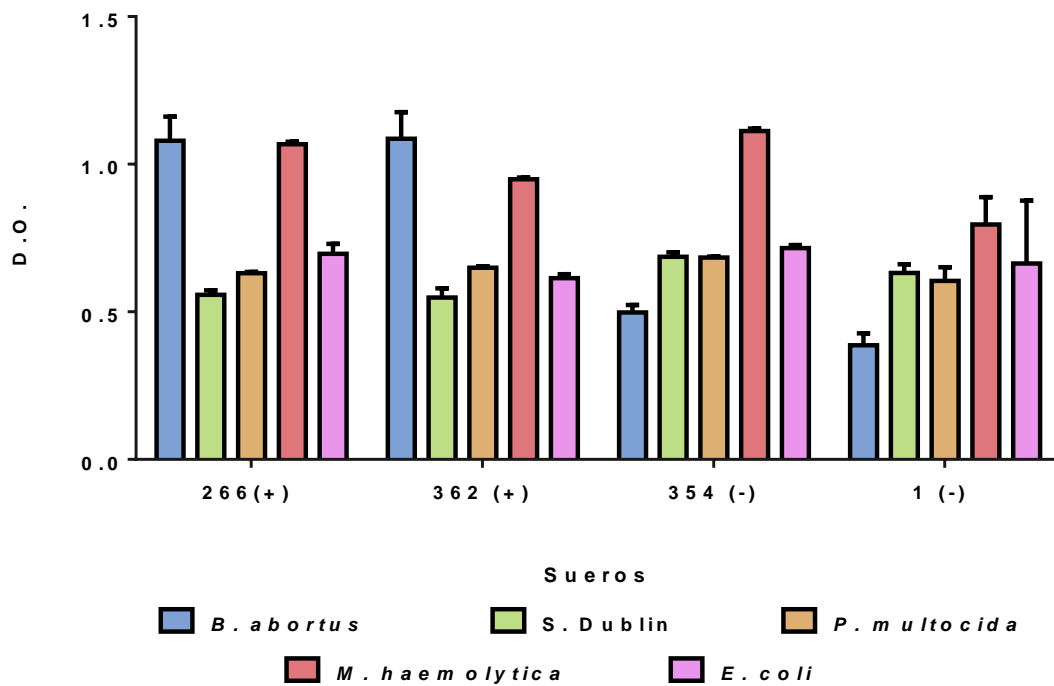
Con el propósito de seleccionar el suero con el que se llevarían a cabo los experimentos futuros, se realizó un ELISA con sueros de diferentes cabras desafiadas con *B. melitensis* 16M a través de varios días (Figura 5). Se puede observar que en el día 35 se obtuvo el valor más alto de absorbancia lo cual sugiere una mayor reactividad del suero con el antígeno de *Brucella*. Los resultados son homogéneos, es decir, los 3 animales tuvieron el resultado más alto en este día. Por lo tanto, se decidió llevar a cabo los demás experimentos, con los sueros del día 35.



**Figura 5. Evaluación de la producción de anticuerpos a través de los días post-infección (21,28,31 y 35) en cabras desafiadas con *Brucella melitensis*.** Como control (-) se utilizó el suero de un animal no infectado. Los resultados se expresan en D.O. como las medias  $\pm$  DE (n=3).

## 6.2. Adsorción de sueros

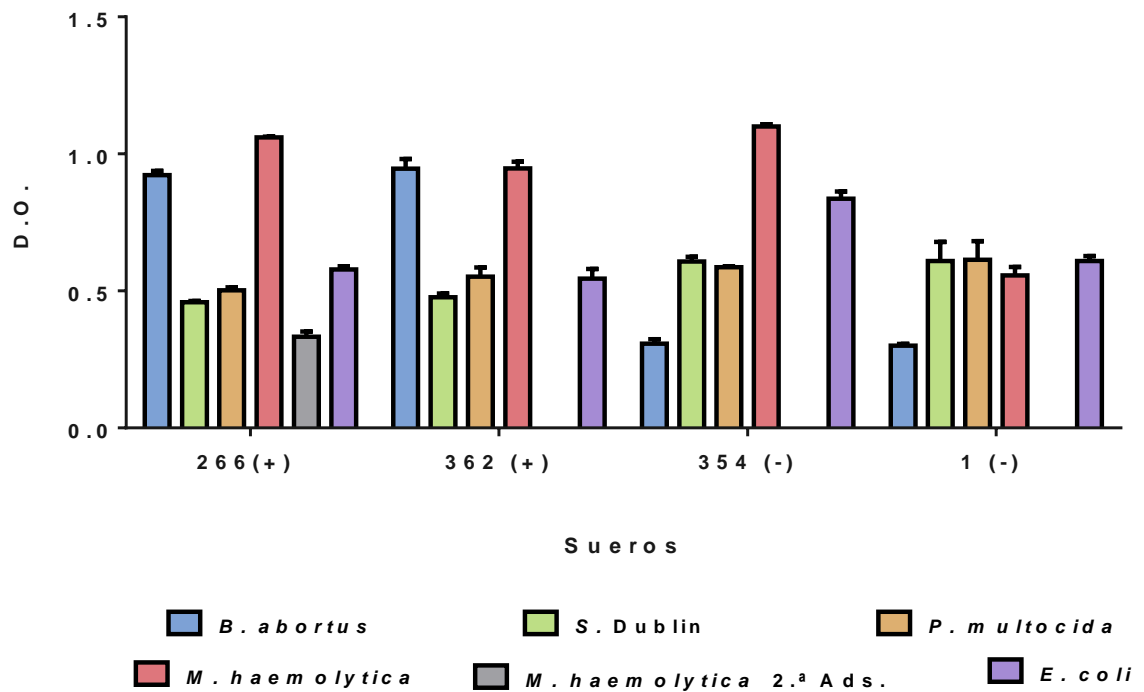
La cantidad presente de anticuerpos dirigidos a los microorganismos *B. abortus* S19, *E. coli*, *S. Dublin*, *P. multocida* y *M. haemolytica* en sueros sin adsorber se midió por medio de la técnica de ELISA. En la Figura 6 se observa que todos los animales tienen anticuerpos contra los microorganismos evaluados; sin embargo, el título más alto es contra *M. haemolytica*, esto puede suponer interferencia en el proceso de bioselección, por este motivo se procedió a la adsorción de los sueros.



**Figura 6. Evaluación de la reactividad de sueros positivos y negativos a *B. melitensis* contra diferentes antígenos por medio de ELISA. Los resultados se expresan en D.O. como las medias  $\pm$  DE (n=3).**

Con esta metodología se logró eliminar algunos de los anticuerpos presentes en el suero dirigidos contra otras bacterias Gram negativas. Sin embargo, se observó que después de hacer la adsorción contra *M. haemolytica* el suero siguió reaccionando con esta bacteria, siendo los títulos incluso más altos que los dirigidos a *Brucella*. Por lo tanto, se decidió llevar a cabo una segunda adsorción solo contra este antígeno; esto solo se llevó cabo con el suero 266 (que tenía un mayor volumen).

Los resultados se muestran en la Figura 7 (barra gris). Los niveles de anticuerpos disminuyeron a más de la mitad, con esto eliminamos anticuerpos que pudiesen intervenir en el proceso de bioselección con despliegue en fagos y en algún momento causar una reacción cruzada.



**Figura 7. Evaluación de la adsorción de sueros positivos y negativos a *B. melitensis* contra diferentes antígenos.** Los resultados se expresan en D.O. como las medias  $\pm$  DE (n=3).

Con toda esta información recabada se llevó a cabo el biopanning con la biblioteca Ph. D.-C7C, utilizando un suero adsorbido.

### 6.3. Bioselección

Se llevaron a cabo 4 rondas de bioselección con la biblioteca Ph. D.-C7C; la cantidad total de fagos obtenidos se determinó en cada ronda (Tabla 1).

Podemos observar que en cada ronda de bioselección aumentó el porcentaje de fagos unidos a los anticuerpos contenidos en el suero, esto muestra el enriquecimiento de la población de fagos.

**Tabla 1. Título obtenido en cada ronda de bioselección (Ph.D.-C7C) para *Brucella melitensis***

Ronda de bioselección	Fago de entrada (UFP/ml)	Fago de recuperación (UFP/ml)
1	$5.6 \times 10^{13}$	$8.0 \times 10^5$
2	$3.1 \times 10^{13}$	$1.2 \times 10^7$
3	$3.2 \times 10^{13}$	$3.0 \times 10^7$
4	$7.5 \times 10^{13}$	$1.6 \times 10^8$

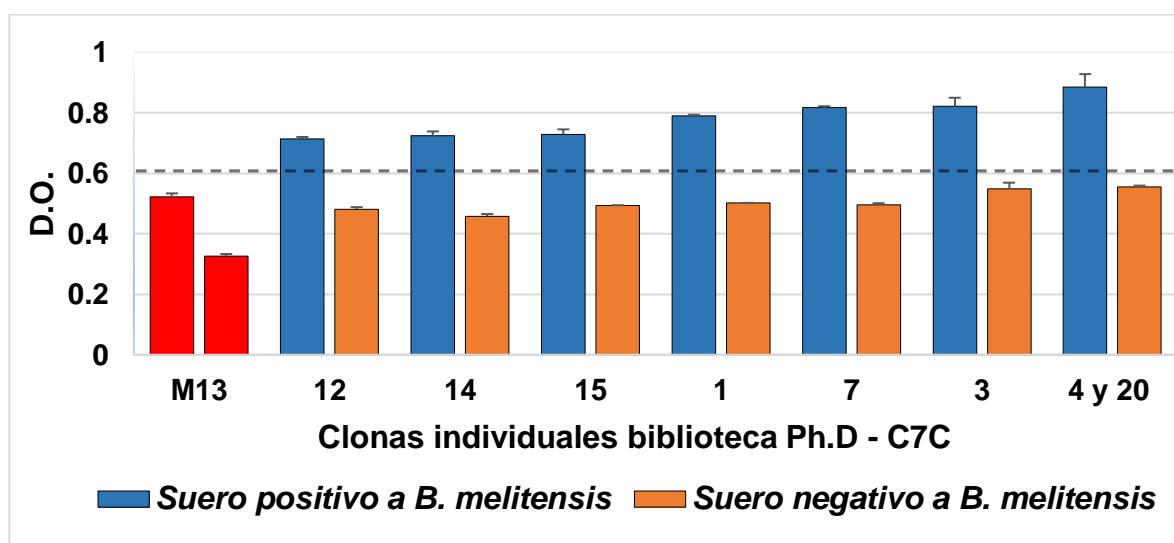
También se llevaron a cabo cinco rondas de bioselección con la biblioteca Ph.D.-12, utilizando el suero 169 sin adsorber, y de acuerdo con este procedimiento podemos observar (Tabla 2) que el número de fagos obtenidos aumentó a medida que el proceso de bioselección avanzaba esto al igual que en la biblioteca anterior nos indica el enriquecimiento de la población de fagos.

**Tabla 2. Título obtenido en cada ronda de bioselección (Ph.D.- 12) para *Brucella melitensis*.**

Ronda de bioselección	Fago de entrada (UFP/ml)	Fago de recuperación (UFP/ml)
1	$1.8 \times 10^{13}$	$2.6 \times 10^4$
2	$1.4 \times 10^{14}$	$6.0 \times 10^7$
3	$4.8 \times 10^{13}$	$4.0 \times 10^7$
4	$3.0 \times 10^{12}$	$4.0 \times 10^7$
5	$1.2 \times 10^{13}$	$1.2 \times 10^9$

#### 6.4. Análisis de clonas

Para la biblioteca C7C se eligieron 20 clonas al azar a partir de la ronda tres; se evaluaron mediante ELISA de fagos, se calculó el punto de corte, obteniendo un valor de 0.655 de absorbancia, de acuerdo a esto todas las clonas son reactivas a sueros positivos a *Brucella melitensis* (Figura 8).



**Figura 8. Reactividad de clonas de fagos biblioteca C7C a sueros positivos y negativos de *B. melitensis* por medio de ELISA. Los resultados se expresan en D.O. como las medias  $\pm$  DE (n=3). La línea punteada representa el punto de corte, las barras color rojo corresponden al fago M13 como control.**

Finalmente, estas clonas se purificaron y titularon para llevar a cabo la extracción de material genético; posteriormente se llevó a cabo la secuenciación y análisis con el programa bioinformático secuencher y la herramienta de alineamiento local Blast.

De acuerdo con los resultados del análisis bioinformático las secuencias de las clonas se identificaron como proteínas de *B. melitensis*, las cuales intervienen en procesos metabólicos (Tabla 3); cabe destacar que dos de las clonas (4 y 20) contienen la misma secuencia.

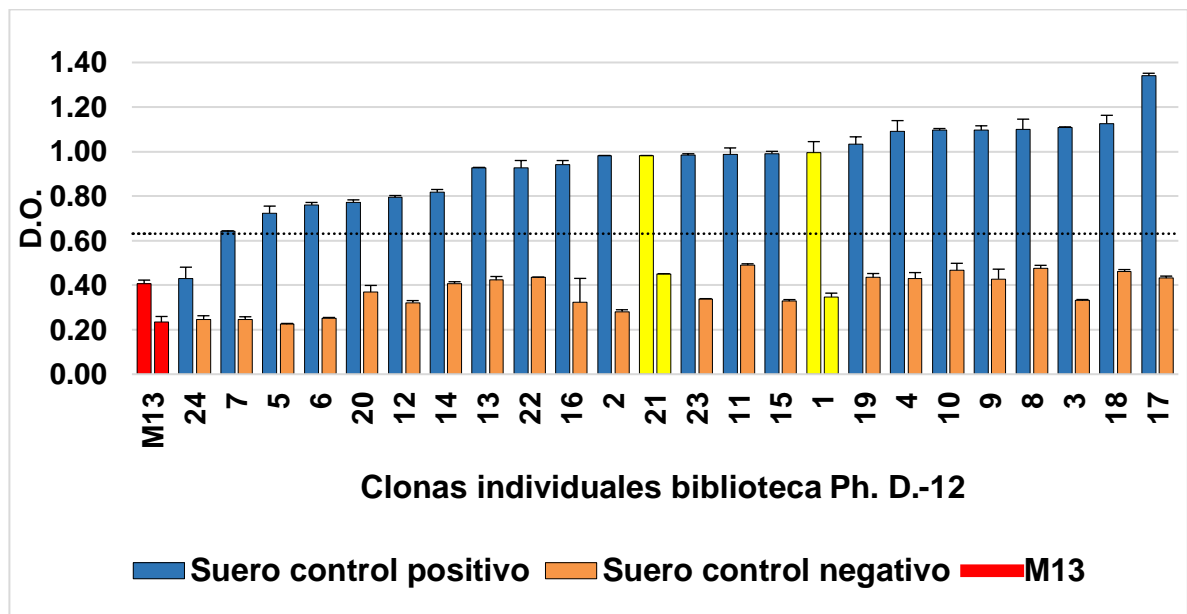
**Tabla 3. Análisis e identificación de las secuencias de clonas obtenidas con la biblioteca Ph.D.- C7C.**

<b>Análisis de secuencias clonas biblioteca P. h D. -C7C</b>				
<b>Clona</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Descripción</b>	<b>E valor</b>	<b>% de identidad</b>
<b>1</b>	CHHDNVAMC	Factor de elongación termo inestable ( <i>EF-Tu</i> )	9.4	100.00%
<b>3</b>	CPHTLLAVC	Proteína cobg	2.3	100.00%
<b>4 Y 20</b>	CGYDETATC	Exopolifosfatasa	13	100.00%
<b>7</b>	CASLRNDSC	Sulfato adeniltransferasa	6.6	85.71%
<b>12</b>	CTTHTYFGC	Proteína Hipotética	14	83.33%
<b>14</b>	CPELSARGC	Proteína hipotética	0.59	85.71%
<b>15</b>	CETRYFSAC	Proteína hipotética	0.59	85.71%



Para la biblioteca Ph. D.- 12 se seleccionaron aleatoriamente 24 clonas a partir de la ronda 3 de bioselección y posteriormente se evaluó su reactividad en un ELISA-I utilizando sueros positivos y negativos a *B. melitensis*, utilizando las clonas como antígeno de captura.

Con el objetivo de discriminar clonas reactivas y no reactivas a los sueros se determinó el punto de corte obteniendo un valor de 0.631 de absorbancia. Con base en lo anterior se reconocieron 21 clonas reactivas a sueros positivos, el valor de absorbancia es menor en el fago M13 y en los sueros negativos, esto indica que la reactividad y especificidad solo ocurre entre el suero positivo y los fagos que expresan péptidos en su superficie (Figura 9).



**Figura 9. Reactividad de clonas de fagos de la biblioteca Ph.D.-12 por medio de ELISA, utilizando sueros positivos y negativos a *B. melitensis*.** Las clonas marcadas en color amarillo obtuvieron la misma secuencia, las barras color rojo corresponden al fago M13 como control. Los resultados se expresan en D.O. como las medias  $\pm$  DE ( $n=3$ ).

Las clonas que obtuvieron una D.O. arriba del punto de corte fueron secuenciadas y posteriormente se analizaron con la herramienta bioinformática de alineamiento local BLAST, con el objetivo de alinear la secuencia de las clonas con esta base de datos, y de esta manera predecir la función que ejercen en el metabolismo de *Brucella*.

Como resultado todas las clonas a excepción de 4 (clona 3,10,13 y 17) intervienen en diferentes procesos metabólicos, las cuatro restantes están catalogadas como proteínas hipotéticas, los resultados se muestran en la Tabla 4.

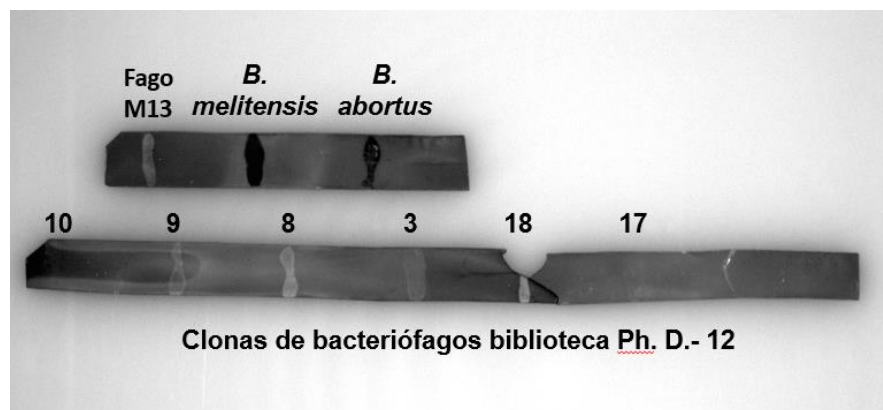
**Tabla 4.** Análisis e identificación de las secuencias de clonas obtenidas con la biblioteca Ph. D.-12.

<b>Clona</b>	<b>Descripción</b>	<b>E valor</b>	<b>% de identidad</b>
<b>2</b>	Treonina-fosfato descarboxilasa	1.4	85.71%
<b>3</b>	Proteína hipotética	5.5	83.33%
<b>4</b>	Hidrolasa UxaA	16	100.00%
<b>5</b>	Exportador de sulfito de la familia de proteínas Tau / SafE.	6.6	85.71%
<b>9</b>	Peptidil prolil isomerasa	11	83.33%
<b>10</b>	Proteína hipotética	45	100.00%
<b>11</b>	MscS canal de iones mecanosensibles	7.9	100.00%
<b>12</b>	Helicasa	16	87.50%
<b>13</b>	Proteína hipotética	5.5	83.33%
<b>14</b>	Proteínas Anti-freeze	11	100.00%
<b>15</b>	Proteína hipotética de membrana	2.7	85.71%
<b>16</b>	Enzima Propionil-CoA carboxilasa	46	83.33%
<b>17</b>	Proteína hipotética	1.4	70.00%
<b>18</b>	Quelataza de cobalto subunit CobS	16	83.33%
<b>19</b>	3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa	0.16	88.89%
<b>20</b>	Familia SDR oxidorreductasa	23	87.50%
<b>22</b>	Biotin carboxylase	23	100.00%
<b>23</b>	Proteína de reparación de desajuste	33	100.00%
<b>1 y 21</b>	RNA polimerasa factor sigma RpoD	5.9	77%

Con el objetivo de explorar otro método diagnóstico en el cual se utilicen las clonas de fagos como antígeno de captura se llevó a cabo un dot blot de fagos; utilizando las 6 clonas que obtuvieron mayor reactividad en el ELISA de fagos (clona 10, 9, 8, 3, 18 y 17). Para poder comparar la eficacia de este método se utilizó como control antígeno crudo de *B. melitensis* y *B. abortus*, el resultado se muestra en la Figura 10.

Como podemos observar la sensibilidad de este método es menor, ya que la intensidad de la mancha es muy similar al compararla con el resultado del M13, es decir, un fago que no expresa ningún péptido en su superficie. Al utilizar el antígeno crudo de *Brucella* la mancha se intensifica, lo cual sigue una sensibilidad mayor como antígeno de captura al compararla con las clonas de fagos.

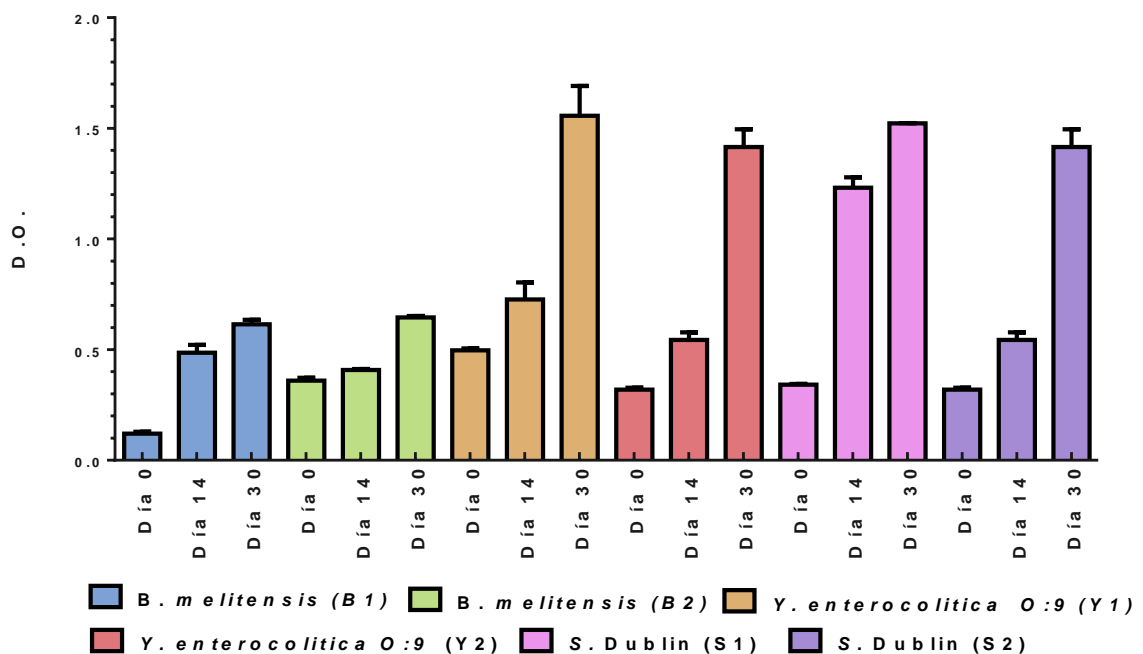
Por lo tanto, concluimos que este método utilizando como antígeno de captura las clonas de fagos no es el mejor, ya que podemos inferir que su nivel de sensibilidad es bajo, pues no detectó los sueros de cabras desafiadas con *B. melitensis* como positivos.



**Figura 10. Evaluación de la reactividad de sueros positivos a *B. melitensis* por medio de DOT-BLOT, utilizando diferentes antígenos de captura. Se utilizaron 6 clonas de fagos de la biblioteca Ph D. 12, como control se utilizó el fago M13 y antígeno crudo de *Brucella*.**

Con el objetivo de evaluar la reactividad cruzada de las clonas de fagos se llevó a cabo la producción de sueros hiperinmunes en el modelo de rata, con el propósito de generar muestra de referencia para su uso en experimentos posteriores. Esto se llevó a cabo en ratas Wistar utilizando antígenos de *B. melitensis*, *Y. enterocolitica* O:9 y *Salmonella* Dublin previamente inactivados.

Para monitorear la producción de anticuerpos se obtuvo una muestra sanguínea 14 días posteriores a la primera inoculación, y se llevó a cabo un ELISA utilizando como antígeno de captura el antígeno administrado a cada animal. Los resultados se muestran en la figura 11, se observa que las inmunizaciones obtuvieron una respuesta positiva, ya que en el día 14 se encontró un mayor nivel de anticuerpos contra los microorganismos inoculados, esto con respecto al día 0. De acuerdo con estos resultados las ratas respondieron al estímulo y la producción de anticuerpos aumentó a lo largo del estudio.

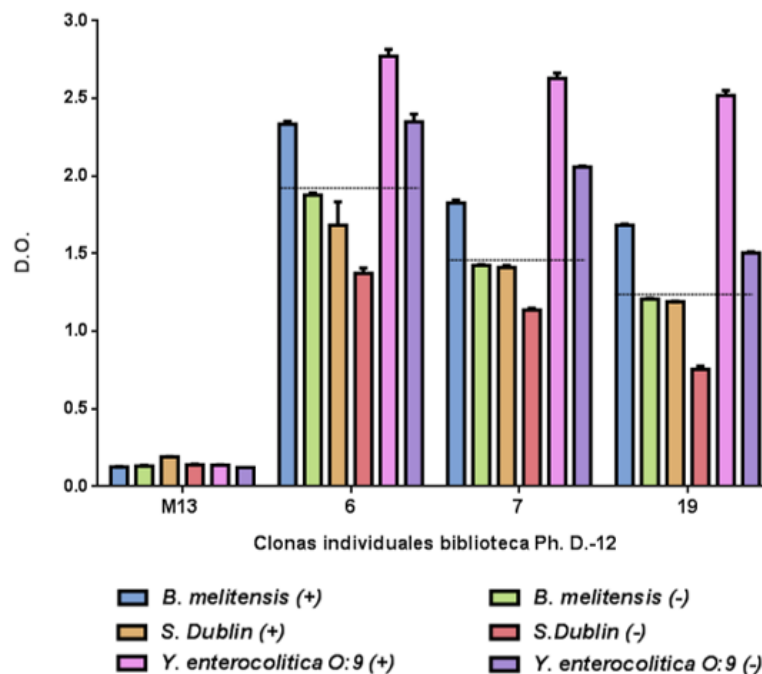


**Figura 11. Evaluación de la producción de anticuerpos de ratas inmunizadas con diferentes antígenos por medio de ELISA.** Los resultados se expresan en D.O. como las medias  $\pm$  DE (n=3).

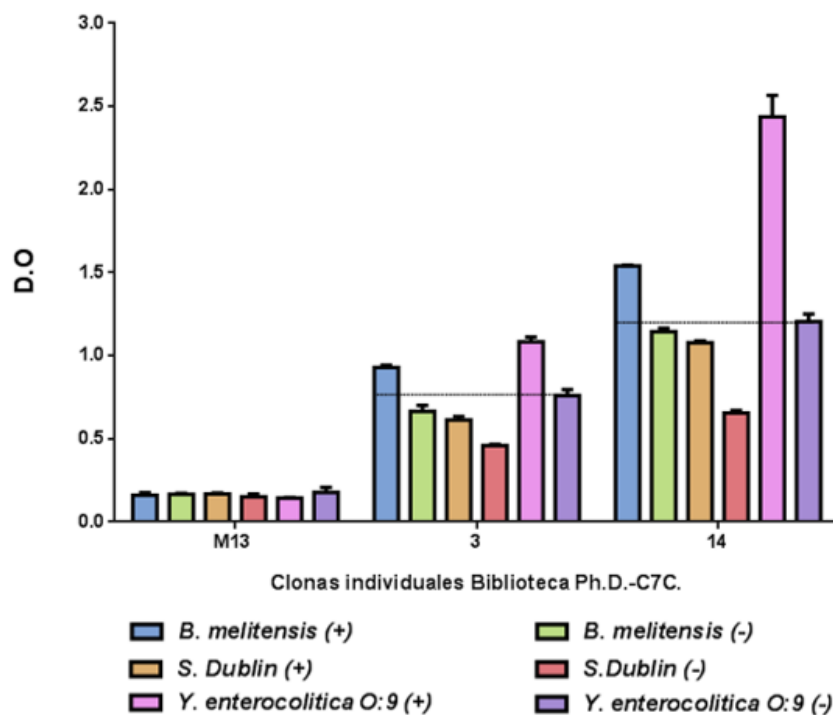
Finalmente se llevaron a cabo ELISAS con el objetivo de identificar las clonas que no tuvieran reacción a los sueros hiperinmunes de ratas inmunizadas con antígeno de *Y. enterocolitica* O:9 y *Salmonella* Dublin; estas clonas previamente fueron identificadas como reactivas a sueros de cabras positivas a *B. melitensis*.

Se calculó el punto de corte por clona, éste se definió como el promedio de las lecturas de los sueros negativos a *B. melitensis* de ratas al día 0, a este promedio se le sumaron tres desviaciones estándar.

Los resultados se muestran en densidad óptica, para las clonas de la biblioteca Ph.D. -12 fueron 1.9194 para la clona seis, 1.4434 para la clona siete y 1.2264 para la clona 19 (figura 12); para las clonas de la biblioteca Ph.D. – C7C fueron 0.7725 para la clona tres y 1.2076 para la clona 14 (figura 13).



**Figura 12. Evaluación de la reactividad cruzada de clonas de fagos de la biblioteca Ph.D.-12 a diferentes antígenos por medio de ELISA.** Los resultados se expresan en D.O. como las medias  $\pm$  DE (n=3). La línea punteada representa el punto de corte.



**Figura 13. Evaluación de la reactividad cruzada de clones de fagos de la biblioteca Ph.D.-C7C a diferentes antígenos por medio de ELISA.** Los resultados se expresan en D.O. como las medias  $\pm$  DE (n=3). La línea punteada representa el punto de corte.

Los resultados indican que, 5 clones no presentaron reacción cruzada con sueros de ratas inmunizadas con *Salmonella* Dublin: las clones 6, 7 y 19 de la biblioteca Ph.D. -12 y las clones 13 y 14 de la biblioteca Ph.D.-C7C; sin embargo, todas las clones analizadas cruzan con los sueros de *Y. enterocolitica* O:9.

## 7. DISCUSIÓN

La brucelosis es una enfermedad que aún representa un desafío en todo el mundo debido a la capacidad de estos microorganismos de tener múltiples especies de hospederos animales, la epidemiología compleja y las limitaciones en el diagnóstico (Franc *et al.*, 2018).

El diagnóstico de laboratorio se basa en tres enfoques diferentes: (i) diagnóstico directo por aislamiento, (ii) diagnóstico indirecto por pruebas serológicas y (iii) diagnóstico por biología molecular. A pesar de la experiencia establecida con las pruebas serológicas y las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos, el cultivo todavía se considera el “estándar de oro” debido a su relevancia clínica y epidemiológica (Buenaventura *et al.*, 2021). Sin embargo, esta metodología conlleva varias desventajas, las más importantes, el aspecto de bioseguridad y la necesidad de contar con personal calificado.

Por este motivo se han desarrollado pruebas serológicas que resuelven este problema; sin embargo estas técnicas presentan ciertas desventajas (Al Dahouk y Nockler, 2011), una de las más importantes son las reacciones cruzadas con otras bacterias Gram negativas, entre otras; por lo tanto, no se puede suponer que los animales estén libres de brucelosis o estén infectados basándose únicamente en las pruebas serológicas disponibles.

La aplicación y desarrollo de antígenos proteicos específicos parece ser una posible estrategia para minimizar estos inconvenientes, dicho lo anterior en este trabajo se identificaron péptidos que pueden ser utilizados en el diagnóstico de la brucelosis en animales, éstos se identificaron por medio de la técnica conocida como despliegue en fagos.



A lo largo del tiempo se han llevado a cabo algunas investigaciones en donde se integra la técnica de despliegue en fagos y *Brucella* spp. ya sea con el objetivo de dilucidar la interacción entre algunas moléculas como lo es el sistema de secreción tipo IV y sus componente VirB5-VirB6 (Villamil *et al.*, 2012), VirB10 dentro de VirB6 (Villamil *et al.*, 2012) VirB8 y VirB10 (Sharifahmadian *et al.*, 2017) y VirB5 (Deng *et al.*, 2019). También se han identificado proteínas que intervienen en la adherencia de *Brucella* (Posadas *et al.*, 2012) así como las que intervienen en la invasión (Li *et al.*, 2014).

Otra aplicación de esta metodología es la identificación de péptidos para su uso en el diagnóstico.

Quizá el primer trabajo reportado es el de Lichtfouse y colaboradores (1995) en donde se expresó una proteína de membrana externa (OMP 89) de *B. abortus*, con el objetivo de crear un método de diagnóstico más específico, por medio de un inmunoensayo. En este estudio se utilizó un anticuerpo monoclonal específico dirigido a OMP 89 para el proceso de bioselección, y llevaron a cabo 3 rondas, este número de rondas es común ya que los expertos recomiendan entre 3 a 5 rondas para obtener un grupo de fagos enriquecidos con unión específica (Fernandez *et al.*, 2008); en nuestro estudio se llevaron a cabo 4 y 5 rondas.

Con su inmunoensayo Lichtfouse y colaboradores lograron detectar 68% de los sueros positivos, este bajo porcentaje quizá se deba a una mala elección del anticuerpo monoclonal para la bioselección y no a la técnica utilizada; ya que otros autores han logrado obtener resultados prometedores con esta técnica; un ejemplo son Abbady y colaboradores (2011) quienes lograron reconocer péptidos específicos de *B. abortus* y *B. melitensis*, utilizando anticuerpos policlonales de cadena pesada, obtenidos de un camello inmunizado con *Brucella*.

Lo anterior se asemeja a la metodología de nuestro estudio en donde utilizamos sueros de cabras inmunizadas con *B. melitensis*, es decir un suero policlonal para el proceso de bioselección, ya que la sangre de un animal infectado contiene una buena fuente de anticuerpos específicos de unión a antígenos (Abbady *et al.*, 2011) a diferencia de los anticuerpos monoclonales (AcM). Los AcM tienden a seleccionar un solo sitio de unión, un péptido seleccionado con un AcM durante el proceso de bioselección puede tener una adaptabilidad excelente para un parátipo en particular, pero esta capacidad de imitar al antígeno original depende completamente de la forma y las propiedades moleculares del sitio de unión del anticuerpo. Es posible que estos anticuerpos no sean los mejores para inducir el repertorio de receptores de células B (Vispo y Puchades, 2001).

Aunado a que los anticuerpos monoclonales son más laboriosos y costosos de producir, en comparación con los anticuerpos policlonales, estos se dirigen a múltiples epítomos y, por lo tanto, contienen especificidades que cubren la gama completa de epítomos en un antígeno que se presenta al sistema inmune y suelen tener mayor avidéz por el antígeno en cuestión; esto es a pesar de que la mayoría de los anticuerpos presentes en una muestra policlonal están dirigidos contra epítomos conformacionales (Read *et al.*, 2009).

Lo anterior queda demostrado en los resultados obtenidos en nuestro estudio en donde logramos identificar 5 péptidos capaces de diferenciar entre sueros hiperinmunes de *Salmonella* Dublin y *Brucella melitensis*, y los alcanzados por Abbady y colaboradores (2013) en donde por medio de una selección negativa pudieron identificar 2 péptidos capaces de eliminar la reacción cruzada entre *Yersinia* spp. y *Brucella* spp.

Beninati y colaboradores (2009) utilizaron esta técnica para identificar péptidos específicos anti-LPS del epitomo A y C, utilizando un anticuerpo monoclonal, en esta investigación utilizaron 3 bibliotecas de péptidos expresados en fagos de 9, 12 y 15 aminoácidos fusionados en la proteína pVIII del fago M13; el uso de diferentes

tipos de bibliotecas de bacteriófagos también es recomendable, en nuestro estudio se utilizaron 2 bibliotecas la Ph.D.-C7C y Ph.D.-12 expresados en la pIII del fago M13. Las funciones biológicas de los bacteriófagos no se ven afectadas con las fusiones a su extremo amino. Por el contrario, con la inserción de péptidos de más de 10 aminoácidos en todas las copias de la proteína pVIII no se obtienen los mejores resultados, debido a que no permite el ensamblaje de la cápside (Iannolo *et al.*, 1997) ya que pueden afectar la infección de los fagos a través del pili de *E. coli* (Ping *et al.*, 2021).

pVIII se usa comúnmente para mostrar péptidos cortos (6 a 8 aa) debido a su abundancia en la cápside del fago (Fernandez *et al.*, 2008). pIII tolera inserciones más grandes (Fernandez *et al.*, 2008) por ejemplo de 12 aa como fue el caso de este estudio. Para los péptidos cortos, se han introducido modificaciones como es el añadir cisteínas en los extremos, esto con el propósito de que se forme un asa (loop) que permita mimetizar epítopos estructurales (Berrocal, 2013). La gran diferencia entre ambos tipos de bibliotecas es que en las lineales (Ph.D.-12) el péptido se encuentra libre y puede asumir múltiples conformaciones, es por eso que suelen ser más versátiles en el sentido que para epítopos lineales generalmente se encuentran más clones positivos que cuando se utilizan las bibliotecas restringidas (Ph.D.-C7C) (Vispo y Puchades, 2001). Tomando en consideración esta información, en este estudio logramos identificar más péptidos específicos utilizando la biblioteca Ph.D.-12, 19 contra 7 de la biblioteca Ph.D.-C7C.

También es recomendable llevar a cabo una selección negativa de las clonas de fagos, Hayhurst y colaboradores (2003) utilizaron anticuerpos anti-LPS de *Brucella*, con el objetivo de eliminar los péptidos dirigidos a esta molécula y aumentar la especificidad; finalmente 2 de los 94 péptidos evaluados fueron los seleccionados. Algunos expertos difieren con el hecho de que esta selección negativa debe realizarse al inicio del proceso (Lim *et al.*, 2019) incluso, han propuesto diversas

técnicas con resultados prometedores, esto para evitar la unión no específica de fagos y obtener resultados de detección más efectivos (Yun *et al.*, 2019).

Esta metodología se asemeja a la que se llevó a cabo en este estudio, la cual se realizó solo con el suero utilizado en la bioselección con la biblioteca Ph.D.-C7C, los resultados sugieren un aumento en la especificidad, ya que 2 de los 7 péptidos identificados lograron diferenciar entre sueros hiperinmunes de *S. Dublin* y *B. melitensis* a diferencia de la biblioteca Ph.D.-12 en donde de 19 péptidos identificados solo 3 lo lograron; sugerimos que esto se investigue y se aplique en estudios futuros, para ampliar el panorama respecto a las reacciones cruzadas.

Las pruebas serológicas disponibles para el diagnóstico de brucelosis en cabras son la prueba de tarjeta al 3% y fijación del complemento; la primera es una técnica bastante útil, rápida y tiene la ventaja de que puede realizarse con el suero sin diluir, además el porcentaje de sensibilidad suele ser alto entre 94.33% y 98.04%. A pesar de ello presenta un porcentaje de especificidad bajo, este se sitúa entre el 76,92 % y 85,71%, esto da como resultado una cantidad reducida de falsos negativos pero una cantidad significativa de falsos positivos (Hosein *et al.*, 2017).

Por lo tanto, se requiere una prueba con mayor índice de especificidad; generalmente esta característica la encontramos en los péptidos obtenidos a partir de despliegue en fagos. En veterinaria se ha utilizado para aumentar los índices de especificidad en el diagnóstico de algunas enfermedades (Alizadeh *et al.*, 2021) por ejemplo, leishmaniosis canina (Machado *et al.*, 2019), rabia (Yang *et al.*, 2013) entre otras; en este trabajo se logró identificar 27 péptidos capaces de diferenciar entre el suero de un animal sano y posteriormente, identificaron este mismo suero como positivo, esto después de desafiar al animal con *B. melitensis*.

Con respecto a la técnica de fijación del complemento Hosein y colaboradores (2017) reportan una sensibilidad y especificidad de 93.46% y 88.23%

respectivamente; sin embargo, es una técnica que no suele utilizarse debido a su complejidad técnica, ya que es difícil de ejecutar, requiere buenas instalaciones y una formación específica del personal para titular y conservar los reactivos adecuadamente (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2018).

Este inconveniente también es eliminado al utilizar los péptidos de despliegue en fagos, ya que la producción de los péptidos suele ser rápida, simple y rentable porque no es indispensable contar con aparatos ni personal especializado (Alizadeh *et al.*, 2021). Esto se debe a los principales atributos de los bacteriófagos, que incluyen estabilidad respecto a los cambios de temperatura y pH, un bajo costo de producción y una operación fácil (Ping *et al.*, 2021).

En este estudio se utilizaron 2 métodos ELISA y dot blot para determinar la especificidad entre el péptido y los anticuerpos, sin embargo, de acuerdo a los resultados, la técnica de dot blot mostro poca efectividad, pues la reacción entre los fagos y el suero fue poco visible si se compara con el antígeno crudo de *Brucella*. Aunado a que el fago M13 silvestre mostro el mismo patrón de mancha que en los fagos que expresan péptidos, esto no indica que los péptidos identificados no sean reactivos a sueros positivos de *Brucella*, si no que este sistema no es el idóneo para el uso de estos péptidos, ya que con la técnica de ELISA la mayoría de las clonas evaluadas fueron altamente reactivas.

Estos resultados son consistentes a los obtenidos por Geok y Wen (2014) en donde compararon estos dos métodos, concluyendo que la técnica de ELISA era el mejor método para evaluar sueros positivos, ya que al comparar los resultados con Dot blot la sensibilidad se redujo a más de la mitad; esto lo adjudican a que los pocillos de las microplacas suelen ser más sensibles, ya que están fabricados específicamente para detectar sustancias en muestras biológica.

A lo largo del tiempo se han implementado otras técnicas serológicas en el intento de superar las limitaciones de las pruebas convencionales, como lo son el ELISA competitivo (c-ELISA) del laboratorio ID Vet o ELISA indirecto (ELISA-I) de los laboratorios Svanova, Idexx y Bionote. La ventajas que representan estas técnicas

es que amplían el panorama en cuanto al tipo de muestra requerida, pues para todas puedes utilizar suero, leche o plasma (Suárez, 2015). Sin embargo, la principal desventaja es que todas se basan en la detección de anticuerpos, en particular de la clase IgG1 contra el LPS, el cual se usa como antígeno de captura, en el caso del ELISA competitivo utiliza un anticuerpo monoclonal específico para una porción de la cadena "O" del LPS de *Brucella*.

La cadena O contiene cuatro tipos de epítomos: A, M, C y C/Y, los epítomos de la cadena O difieren en el número de unidades del homopolímero N-formil-perosamina (perosamina) y en el tipo de enlaces entre estas moléculas. El epítomo A cuenta con más de 5 unidades de perosamina, unidas por enlaces  $\alpha$  1-2. El epítomo M incluiría al menos un enlace  $\alpha$  1-3 y el epítomo C incluiría menos de 5 unidades de perosamina en enlaces  $\alpha$  1-2, por último, el epítomo C/Y está compuesto por dos unidades de perosamina en enlace  $\alpha$  1-2 (García, 2011).

Este tipo de enlaces se encuentran en todas las cepas de *Brucella* lisas, pero también es común en otros microorganismos como *Yersinia enterocolitica* serotipo O:9 ya que su cadena O también está compuesto por perosamina en enlaces exclusivamente  $\alpha$  1 – 2 (Ducrotoy *et al.*, 2016) además de determinantes comunes al epítomo A pero no al M (Corbell, 1975). Esta similitud es elevada aproximadamente del 98% (Alia *et al.*, 2010) y sería la responsable de las reacciones cruzadas.

Otra bacteria que puede causar reacciones falsas positivas es *Salmonella* ya que su cadena O contiene determinantes antigénicos que se asemejan a estructuras comunes a los epítomos A y M; pero solo forman una parte menor de la estructura (Corbell, 1975) por lo tanto muestra una reactividad cruzada menos intensa (Ducrotoy *et al.*, 2016). Lo anterior respalda los resultados obtenidos en los experimentos encaminados a eliminar las reacciones cruzadas, ya que solo fue posible eliminar la reacción contra *Salmonella* Dublin, no así con *Yersinia enterocolitica* O:9; esto por las marcadas diferencias estructurales en la cadena O

entre *Brucella* y *Salmonella*, y la alta homología reportada entre *Brucella* y *Yersinia*; dificultando alcanzar nuestro objetivo.

Es difícil rastrear el origen de las reacciones cruzadas por lo que es un campo que siempre permanece relativamente abierto a la investigación (Ducrotoy *et al.*, 2016), si bien en nuestro estudio las clonas reaccionan con sueros de *Yersinia*, eliminar la reacción cruzada con al menos una de las bacterias más reportadas es benéfico para el diagnóstico.

*Y. enterocolitica* O:9 puede causar infecciones leves en el ganado (Ducrotoy *et al.*, 2016) en cuanto a *Salmonella* la infección se presenta en rebaños mixtos y también suele estar presente de manera habitual en el tracto digestivo (Pérez, 2019) causando la producción de anticuerpos contra estos agentes, sin embargo a diferencia de *Yersinia enterocolitica* O:9 el serotipo de *Salmonella* causante de las reacciones cruzadas no está plenamente identificado, en este estudio se eligió *Salmonella* Dublin ya que es la responsable de causar enfermedades digestivas en los pequeños rumiantes (Méndez *et al.*, 1999).

Los resultados falsos positivos dificultan el diagnóstico serológico de la brucelosis, se han realizado muchas modificaciones de diversas pruebas serológicas para superar el problema, obteniendo un éxito limitado (Padilla *et al.*, 2010). Este es el caso de las proteínas de membrana externa (Omps) y BP26. Bai y colaboradores (2021) compararon y analizaron estas proteínas para su uso en el diagnóstico, sin embargo la capacidad para detectar sueros positivos utilizando una sola proteína fue ligeramente pobre; esto se debe a que las Omps se encuentran expuestas en la superficie de la membrana externa, sin embargo, son menos accesibles en las cepas lisas que en las rugosas, debido al impedimento estérico que causan las largas y abundantes cadenas O del LPS en las cepas lisas (López, 2002) haciendo necesario el uso de varias proteínas para aumentar la especificidad, sin embargo esto también aumenta el riesgo de tener falsos positivos con *Vibrio*

*parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, *Legionella pneumophila*, *Salmonella* y *Vibrio parahaemolyticus* (Bai *et al.*, 2021).

En otro estudio (Trotta *et al.*, 2020) estandarizaron un ELISA utilizando antígeno crudo de *B. melitensis* B115 (rugosa). Si bien no llevaron a cabo estudios de reacciones cruzadas, prácticamente todas las pruebas serológicas contra *Brucella* sp. que usen LPS, parte de LPS o células completas como antígeno presentarían reacciones falsas positivas (Padilla *et al.*, 2010) pues si bien se tiene plenamente identificado al LPS como responsable de estas reacciones, también se han reportado otras moléculas involucradas como una chaperona de 57,5 kDa o OMP 25 quienes mostraron reactividad contra sueros positivos de *Y. enterocolitica* (Ko *et al.*, 2012). Por lo tanto, el hecho de apostar por reemplazar cepas lisas por rugosas para eliminar estas reacciones no supone tener buenos resultados.

En el mismo estudio (Ko *et al.*, 2012) identificaron proteínas citoplasmáticas y citosólicas con potencial diagnóstico o vacunal; concluyeron que estas eran las más aptas para este propósito comparándolas con OMPS, ya que solo reaccionaban a sueros positivos de *Brucella* y no a otro tipo de sueros. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en este estudio ya que todos los péptidos identificados tienen una alta homología con proteínas de este tipo, y aproximadamente el 61% de los péptidos identificados mostraron alta reactividad con sueros positivos y una marcada baja reactividad a sueros negativos.

Lo anterior puede representar una ventaja, ya que al tratarse de antígenos de tipo intracelular solamente una exposición prolongada de *Brucella* al sistema inmune produciría anticuerpos contra esta; como sucede en una infección de campo, fenómeno parecido al que presenta el hapteno nativo de *Brucella* (González *et al.*, 2006), molécula que requiere la combinación de altos títulos de anticuerpos y avidéz los cuales resultan de una infección activa por *Brucella* (Nielsen *et al.*, 2006).



El uso de una biblioteca de fagos para detectar un patógeno intracelular como *Brucella* es atractivo porque puede permitir la identificación de epítomos antigénicos que no se han identificado previamente a través de otros métodos (Williams, 2018) como los identificados en este estudio. Esta investigación servirá como base para futuros estudios pues creemos que la combinación de las técnicas adsorción de sueros y selección negativa mejora considerablemente la especificidad.

## **8. CONCLUSIONES**

- Este estudio logró la estandarización de un ELISA utilizando como antígeno de captura los péptidos expresados en fagos filamentosos, obtenidos a partir de la técnica de despliegue en fagos; con esta ELISA podemos diferenciar entre animales seropositivos y seronegativos a la enfermedad.
- Los fagos seleccionados eliminan las reacciones cruzadas con *Salmonella* Dublin en ensayos de ELISA.
- Los péptidos que se identificaron y analizaron tienen homología con proteínas internas de *Brucella*.
- La técnica de despliegue en fagos es una alternativa rápida y específica para la búsqueda de péptidos que sean de utilidad en el diagnóstico serológico de brucelosis y posiblemente de cualquier enfermedad.

## **9. PERSPECTIVAS**

- Llevar a cabo la validación de la técnica de ELISA, para el diagnóstico de la brucelosis.
- Evaluar la síntesis y uso de péptidos sintéticos a partir de las secuencias reconocidas, para ensayos de ELISA.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- ABBADY, A., AL-MARIRI, A. & ZARKAWI, M. 2013. Expression and Purification of *Brucella*-Specific Nanobodies. *Iran J Biotech*, 11, 80-88.
- ABBADY, A. Q., AL-MARIRI, A., ZARKAWI, M., AL-ASSAD, A. & MUYLDERMANS, S. 2011. Evaluation of a nanobody phage display library constructed from a *Brucella*-immunised camel. *Vet Immunol Immunopathol*, 142, 49-56.
- AL-MRABEH, A., ZIEGLER, A., COWAN, G. & TORRANCE, L. 2009. A fully recombinant ELISA using in vivo biotinylated antibody fragments for the detection of potato leafroll virus. *J Virol Methods*, 159, 200-5.
- AL DAHOUK, S. & NOCKLER, K. 2011. Implications of laboratory diagnosis on brucellosis therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 9, 833–845.
- AL SHAER, D., AL MUSAIMI, O., ALBERICIO, F. & DE LA TORRE, B. G. 2020. 2019 FDA TIDES (Peptides and Oligonucleotides) Harvest. *Pharmaceuticals (Basel)*, 13, 1-15.
- ALIA, N., KHDRAWI, A., MOURAD, A.-M. & ABBADY, A. 2010. Applying nanobody phage display technology to distinguish between *Brucella* and *Yersinia* lipopolysaccharides. *J. of Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 1, 177 – 184.
- ALIZADEH, A. A., MORRIS, M. B., CHURCH, W. B., YAQOUBI, S. & DASTMALCHI, S. 2021. A mechanistic perspective, clinical applications, and phage-display-assisted discovery of TNFalpha inhibitors. *Drug Discov Today*, 27, 503-518.
- ALTON, G. G., JONES, L. M., ANGUS, R. D. & VERGER, J. M. 1988. *Techniques for the Brucellosis Laboratory*, INFRA.
- AMJADI, O., RAFIEI, A., MARDANI, M., ZAFARI, P. & ZARIFIAN, A. 2019. A review of the immunopathogenesis of Brucellosis. *Infect Dis (Lond)*, 51, 321-333.
- ARAP, M. A. 2005. Phage display technology Applications and innovations. *Genetics and Molecular Biology*, 28, 1-9.
- ASFAW GERESU, M. & MAMO KASSA, G. 2015. A Review on Diagnostic Methods of Brucellosis. *Journal of Veterinary Science & Technology*, 07.
- BAI, Q., LI, H., WU, X., SHAO, J., SUN, M. & YIN, D. 2021. Comparative analysis of the main outer membrane proteins of *Brucella* in the diagnosis of brucellosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 560, 126-131.
- BARBUDDHEA, S. B., VERGISB, J. & RAWOOL, D. B. 2020. Immunodetection of bacteria causing brucellosis. In: LTD, E. (ed.) *Methods in Microbiology*.
- BARDERAS, R. & BENITO-PENA, E. 2019. The 2018 Nobel Prize in Chemistry: phage display of peptides and antibodies. *Anal Bioanal Chem*, 411, 2475-2479.
- BARRETO, G., RODRIGUEZ, H. & BARRETO, H. 2021. Brucellosis, aspects limiting its accurate valuation. *Revista de Salud Animal* 43, 1-7.
- BAZAN, J., CALKOSINSKI, I. & GAMIAN, A. 2012. Phage display--a powerful technique for immunotherapy: Introduction and potential of therapeutic applications. *Hum Vaccin Immunother*, 8, 1817–1828.
- BENINATI, C., GARIBALDI, M., LO PASSO, C., MANCUSO, G., PAPASERGI, S., GARUFI, G., PERNICE, I., TETI, G. & FELICI, F. 2009. Immunogenic mimics of *Brucella* lipopolysaccharide epitopes. *Peptides*, 30, 1936–1939.
- BENNETT, N. J. & RAKONJAC, J. 2006. Unlocking of the filamentous bacteriophage virion during infection is mediated by the C domain of pIII. *J Mol Biol*, 356, 266-273.

- BERROCAL, P. A. 2013. *Identificación por el método de phage display de mimótopos de epítopes inmunodominantes en la proteína sat.* bachelor's, Universidad Nacional Autónoma de México.
- BERRUETA WILKINS, Y. 2012. *Brucelosis bovina: actualización sobre la enfermedad y la campaña sanitaria en el Uruguay.* Doctor, Universidad de la republica.
- BONFINI, B., CHIARENZA, G., PACI, V., SACCHINI, F., SALINI, R., VESCO, G., VILLARI, S., ZILLI, K. & TITTARELLI, M. 2018. Cross-reactivity in serological tests for brucellosis: a comparison of immune response of *Escherichia coli* O157:H7 and *Yersinia enterocolitica* O:9 vs *Brucella* spp. *Vet Ital*, 54, 107-114.
- BOZOVICAR, K., JENKO-BIZJAN, B., MEDEN, A., KOVAC, J. & BRATKOVIC, T. 2021. Focused peptide library screening as a route to a superior affinity ligand for antibody purification. *Sci Rep*, 11, 1-12.
- BRIDGES, D. J., COLBORN, J., CHAN, A. S., WINTERS, A. M., DENGALA, D., FORNADEL, C. M. & KOSLOFF, B. 2014. Modular laboratories--cost-effective and sustainable infrastructure for resource-limited settings. *Am J Trop Med Hyg*, 91, 1074-8.
- BUENAVENTURA, G. D., ANGELETTI, O. S., IANNI, A., PETITTI, T. & GHERARDI, G. 2021. Microbiological Laboratory Diagnosis of Human Brucellosis: An Overview. *Pathogens*, 12, 1-14.
- CANO, A., VIVEROS, M., ACERO, G., GOVEZENSKY, T., MUNGUIA, M. E., GONZALEZ, E., SOTO, L., GEVORKIAN, G. & MANOUTCHARIAN, K. 2004. Antigenic properties of phage displayed peptides comprising disulfide-bonded loop of the immunodominant region of HIV-1 gp41. *Immunol Lett*, 95, 207-12.
- CASTRO, H., GONZÁLEZ, S. & PRAT, M. 2005. Brucelosis: una revisión práctica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 2, 203-216.
- COELHO, A., GARCÍA, D. J. & COELHO, A. C. 2014. Brucelosis en pequeños rumiantes: etiología, epidemiología, sintomatología, diagnóstico, prevención y control. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 15, 1-31.
- CORBELL, M. J. 1975. The serological relationship between *Brucella* spp., *Yersinia enterocolitica* serotype IX and *Salmonella* serotypes of Kauffmann-White group N. *J Hyg (Lond)*, 75, 151-171.
- CH'NG, A. C. W., LAM, P., ALASSIRI, M. & LIM, T. S. 2021. Application of phage display for T-cell receptor discovery. *Biotechnol Adv*, 54, 1-14.
- CHARBONNIER, P. 2019. *Brucelosis bovina: evaluación de los sistemas de vigilancia epidemiológica aplicados en Uruguay.* Master, Universidad de la República de Paraguay
- CHENAIS, E., BAGGE, E., LAMBERTZ, S. T. & ARTURSSON, K. 2012. *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 cultured from Swedish sheep showing serologically false-positive reactions for *Brucella melitensis*. *Infect Ecol Epidemiol*, 2, 1-7.
- DE-BOLLE, X., LAURENT, T., TIBOR, A., GODFROID, F., JACQUES, V. & MERTENS, P. 1999. Antigenic Properties of Peptidic Mimics for Epitopes of the Lipopolysaccharide from *Brucella*. *J. Mol. Biol.*, 294, 181±191.
- DE BOLLE, X., CROSSON, S., MATROULE, J. Y. & LETESSON, J. J. 2015. *Brucella abortus* Cell Cycle and Infection Are Coordinated. *Trends Microbiol*, 23, 812-821.
- DE FIGUEIREDO, P., FICHT, T. A., RICE-FICHT, A., ROSSETTI, C. A. & ADAMS, L. G. 2015. Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of *Brucella*-host interactions. *Am J Pathol*, 185, 1505–1517.

- DELHALLE, S., SCHMIT, J. C. & CHEVIGNE, A. 2012. Phages and HIV-1: from display to interplay. *Int J Mol Sci*, 13, 4727–4794.
- DELRUE, R. M., LESTRATE, P., TIBOR, A., LETESSON, J. J. & DE BOLLE, X. 2004. Brucella pathogenesis, genes identified from random large-scale screens. *FEMS Microbiol Lett*, 231, 1-12.
- DENG, H., ZHOUB, J., GONGC, B., XIAOA, M., ZHANGA, M., PANGA, Q., ZHANGA, X., ZHAOA, B. & ZHOUD, X. 2019. Screening and identification of a human domain antibody against *Brucella abortus* VirB5. *Acta Tropica*, 197, 1-6.
- DÍAZ, A. G., SOTO, P. & ESTEIN, S. M. 2012. Estudio de la interferencia serológica en el diagnóstico de la brucelosis bovina en el modelo murino. *InVet*, 14, 69-77.
- DÍAZ, E., HERNÁNDEZ, L., VALERO, G., ARELLANO, B. 2001. Bruselosis.
- DOHERTY, P. C. & KAUFMANN, S. H. 1994. Novel insights and new models in a time of rapid technological change. *Curr Opin Immunol*, 6, 515–517.
- DUCROTOY, M. J., CONDE ALVAREZ, R., BLASCO, J. M. & MORIYON, I. 2016. A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis. *Vet Immunol Immunopathol*, 171, 81-102.
- FAEZEH, F., PEYMAN, B., MOZAFAR, M., RAZIEH, A. & FARID, A. J. 2020. A Review of the Methods for Concentrating M13 Phage. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 1, 7-15.
- FERNANDEZ, L. E., GOMEZ, I., PACHECO, S., ARENAS, I., GILLA, S. S., BRAVO, A. & SOBERON, M. 2008. Employing phage display to study the mode of action of Bacillus thuringiensis Cry toxins. *Peptides*, 29, 324–329.
- FEROOZ, J., LEMAIRE, J. & LETESSON, J. J. 2011. Role of FliB in flagellin production in *Brucella melitensis*. *Microbiology (Reading)*, 157, 1253-1262.
- FRANC, K. A., KRECEK, R. C., HASLER, B. N. & ARENAS-GAMBOA, A. M. 2018. Brucellosis remains a neglected disease in the developing world: a call for interdisciplinary action. *BMC Public Health*, 18, 125.
- FRANYUTI, G. A. 2020. Enfoque actual de la Brucelosis en México y el mundo. *Qeios* [Online]. Available: <https://doi.org/10.32388/CUJW20> [Accessed 23/03/2021].
- GARCÍA, F. D. 2011. *Contribución al estudio epidemiológico de la brucelosis bovina en la Comunidad Autónoma de Galicia: Investigación y aplicabilidad de nuevas técnicas diagnósticas*. Ph. D, Universidade de Santiago de Compostela.
- GEOK, H. T. & WEN, S. T. 2014. Comparison between Phage-ELISA and Phage Dot-Blot Assay Methods for the Detection of Hepatitis B Surface Antigen and its Antibodies in Human Serum. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 3, 128-135.
- GODFROID, J., NIELSEN, K. & SAEGERMAN, C. 2010. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croat Med J*, 51, 296-305.
- GONZALEZ, E. G., ARCE, G. V., MEMET, S. & GORVEL, J. P. 2021. *Brucella*: Reservoirs and Niches in Animals and Humans. *Pathogens*, 10.
- GONZÁLEZ, M. E., HERNÁNDEZ, A. L. & DÍAZ, A. E. 2006. Prueba de inmunodifusión radial con hapteno nativo para diferenciar bovinos con revacunaciones repetidas con la cepa S19 de *Brucella abortus*. *Téc Pecú Méx*, 44, 269-276.
- GOODWIN, Z. I. & PASCUAL, D. W. 2016. Brucellosis vaccines for livestock. *Vet Immunol Immunopathol*, 181, 51-58.
- GRUBER, A. & ZINGALES, B. 1995. Alternative method to remove antibacterial antibodies from antisera used for screening of expression libraries. *Biotechniques*, 19, 28-30.

- HAMMERS, C. M. & STANLEY, J. R. 2014. Antibody phage display: technique and applications. *J Invest Dermatol*, 134, 1-5.
- HANS, R., YADAV, P.K., SHARMA, P.K. 2020. Development and validation of immunoassay for whole cell detection of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Sci Rep* 10.
- HAY, I. D. & LITHGOW, T. 2019. Filamentous phages: masters of a microbial sharing economy. *EMBO Rep*, 20, 1-24.
- HAYHURST, A., HAPPE, S., MABRY, R., KOCH, Z., IVERSON, B. L. & GEORGIU, G. 2003. Isolation and expression of recombinant antibody fragments to the biological warfare pathogen *Brucella melitensis*. *J Immunol Methods*, 276, 185-96.
- HERNÁNDEZ, G., L., RODRÍGUEZ, C. A., CALDERÓN, Á. E. D. & GARCÍA, M. R. 2016. Brucellosis: zoonosis de importancia en México. *Revista chilena de infectología*, 33, 656-662.
- HERNÁNDEZ, M. G. 2006. *Desarrollo y validación química y serológica de un ensayo inmunoenzimático ELISA para el diagnóstico de la brucelosis en odontocetos*. Bachelor, Universidad Nacional de Costa Rica.
- HERRERA, M. D., ABELEDO, M. A., GUTIÉRREZ, A. L., CARDEÑA, A. P., ROBLEDO, S. M. L., PULIDO, C. E., ROSAS, S. T. J. & FLORES, C. R. 2009. Evaluación de métodos de cultivo para el aislamiento primario de *Brucella melitensis* a partir de leche de cabra. *Revista de Salud Animal*, 31, 1-4.
- HOSEIN, H. I., ROUBY, S. R., MENSRAWY, A. & ABDAL-GHANY, A. E. 2017. Sensitivity and Specificity of the commonly used Diagnostic Procedures of Bovine Brucellosis. *Veterinary Sciences: Research and Reviews*, 3, 45-52.
- HYMAN, P. & ABEDON, S. T. 2010. Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Adv Appl Microbiol*, 70, 217-248.
- IANNOLO, G., MIENKOVA, O., GONFLONI, S., CASTAGNOLI, L. & CESARENI, G. 1997. Construction, exploitation and evolution of a new peptide library displayed at high density by fusion to the major coat protein of filamentous phage. *Biol Chem*, 378, 517-521.
- KAPLAN, G. & GERSHONI, J. M. 2012. A general insert label for peptide display on chimeric filamentous bacteriophages. *Anal Biochem*, 420, 68-72.
- KASMAN, L. M. & PORTER, L. D. 2022. Bacteriophages. *StatPearls*. Treasure Island (FL).
- KEYBURN, A. & BULLER, N. 2020. *Brucella*: not your 'typical' intracellular pathogen. *Microbiology Australia*, 41, 38-41.
- KHEMTHONGCHAROEN, N., RUANGPRACHA, A., SARAPUKDEE, P., RATTANAVARIN, S., JOLIVOT, R., JARUJAREET, U., PLAIMAS, K., BHATTARAKOSOL, P., PATUMRAJ, S. & PIYAWATTANAMETHA, W. 2015. Novel p16 binding peptide development for p16-overexpressing cancer cell detection using phage display. *J Pept Sci*, 21, 265-273.
- KO, K. Y., KIM, J. W., HER, M., KANG, S. I., JUNG, S. C., CHO, D. H. & KIM, J. Y. 2012. Immunogenic proteins of *Brucella abortus* to minimize cross reactions in brucellosis diagnosis. *Vet Microbiol*, 156, 374-380.
- KOPPENHAGEN, T. V. & GONZÁLEZ, S. 2019. *Revisión bibliográfica - Brucellosis* [Online]. Republica de Paraguay Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Available: <http://www.vet.una.py/brucella/pdf/REVISION%20BRUCELOSIS%20PINV15-377.pdf> [Accessed 14/01/2021 2021].
- LATHEEF, S., KEYBURN, A., BROZ, I., BAGNARA, A., BAYLEY, C., FRITH, S. & DOBSON, E. C. 2020. Atypical *Brucella sp* in captive Australian green tree frogs (*Litoria caerulea*): clinical features, pathology, culture and molecular characterization. *Aust Vet J*, 98, 216-221.

- LEHMANN, D., SODOYER, R. & LETERME, S. 2004. Characterization of BoHV-1 gE envelope glycoprotein mimotopes obtained by phage display. *Vet Microbiol*, 104, 1-17.
- LI, Y., WANG, Y. & CHEN, C. 2014. Screening of receptor that interacted with outer membrane protein 25 during macrophage infection by *Brucella abortus*. *Chinese Journal of Endemiology* 33, 596-600.
- LICHTFOUSE, B., MERTENS, P., CLAVAREAU, C., GODFROID, F., WEYNANTS, V., DENOEL, P., TIBOR, A. & LETESSON, J.-J. 1995. Identification of Brucella cell wall antigenic determinants by immunoscreening of a random peptide library expressed at the surface of filamentous phage. *Letters in Peptide Science*, 2, 261-264.
- LIM, C. C., WOO, P. C. Y. & LIM, T. S. 2019. Development of a Phage Display Panning Strategy Utilizing Crude Antigens: Isolation of MERS-CoV Nucleoprotein human antibodies. *Sci Rep*, 9, 60-88.
- LIN, A., JIMENEZ, J., DERR, J., VERA, P., MANAPAT, M. L., ESVELT, K. M., VILLANUEVA, L., LIU, D. R. & CHEN, I. A. 2011. Inhibition of bacterial conjugation by phage M13 and its protein g3p: quantitative analysis and model. *PLoS One*, 6, 1-11.
- LÓPEZ, M. A. 2002. *Brucella*. In: MARTÍNEZ ROMERO, E. & MARTÍNEZ ROMERO, J. (eds.) *Microbios en línea*. México.
- MACHADO, J. M., COSTA, L. E., DIAS, D. S., RIBEIRO, P. A. F., MARTINS, V. T., LAGE, D. P., CARVALHO, G. B., FRANKLIN, M. L., TAVARES, G. S. V., OLIVEIRA-DA-SILVA, J. A., MACHADO, A. S., RAMOS, L. S., NOGUEIRA, L. M., MARIANO, R. M. S., MOURA, H. B., SILVA, E. S., TEIXEIRA-NETO, R. G., CAMPOS-DA-PAZ, M., GALDINO, A. S. & COELHO, E. A. F. 2019. Diagnostic markers selected by immunoproteomics and phage display applied for the serodiagnosis of canine leishmaniosis. *Res Vet Sci*, 126, 4-8.
- MEMISH, Z. A. & BALKHY, H. H. 2004. Brucellosis and international travel. *J Travel Med*, 11, 49-55.
- MÉNDEZ, A., MALDONADO, A., ERIUZ-VILLAMOR, E., LUQUE, I., BAUTISTA, M., HUERTA, B., SIERRA, E. & BORGE, C. 1999. *Patología de los pequeños rumiantes en imágenes (I)*. *Enfermedades neonatales*. [Online]. México. Available: <https://www.uno.org.mx/empezar/neonatales.html> [Accessed 12/01/2022 2022].
- MORIYON, I. & LOPEZ-GONI, I. 1998. Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Int Microbiol*, 1, 19-26.
- MUÑOZ, P. M., BLASCOA, J. M. & BASTUJI, B. G. 2020. *Brucella spp.* *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 4, 401-418.
- NIELSEN, K., CHERWONOGRODZKY, J. W., DUNCAN, J. R. & BUNDLE, D. R. 1989. Enzyme-linked immunosorbent assay for differentiation of the antibody response of cattle naturally infected with *Brucella abortus* or vaccinated with strain 19. *Am J Vet Res*, 50, 5-9.
- NIELSEN, K., SMITH, P., WIDDISON, J., GALL, D., KELLY, L., KELLY, W. & NICOLETTI, P. 2004. Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7. *Vet Microbiol*, 100, 25-30.
- NIELSEN, K., SMITH, P., YU, W., NICOLETTI, P., JUNGENSEN, G., STACK, J. & GODFROID, J. 2006. Serological discrimination by indirect enzyme immunoassay between the antibody response to *Brucella sp.* and *Yersinia enterocolitica* O:9 in cattle and pigs. *Vet Immunol Immunopathol*, 109, 69-78.
- NIELSEN, K., SMITH, P., YU, W. L. & HALBERT, G. 2007. *Salmonella enterica* Serotype Urbana Interference with Brucellosis Serology. *J Immunoassay Immunochem*, 28, 289-296.
- NOM-041-ZOO-1995 1995. Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales. In: SECRETARÍA DE AGRICULTURA GANADERÍA Y DESARROLLO RURAL (ed.). México.

- O'GRADY, D., KENNY, K., POWER, S., EGAN, J. & RYAN, F. 2016. Detection of *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 in the faeces of cattle with false positive reactions in serological tests for brucellosis in Ireland. *Vet J*, 216, 133-5.
- OLIVEIRA, S. C. 2021. Host Immune Responses and Pathogenesis to *Brucella spp.* *Infection*. *Pathogens*, 10, 1-3.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL, O. I. E. 2018. Brucellosis bovina. *In: COMISIÓN DE ESTÁNDARES BIOLÓGICOS, O. I. E. (ed.) Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (mamíferos, aves y abejas)*
- PADILLA, F., NIELSEN, K., SAMARTINO, L. & YU, W. L. 2010. Diagnosis of Brucellosis. *The Open Veterinary Science Journal*, 4, 46-60.
- PASCUAL, D. W., YANG, X., WANG, H., GOODWIN, Z., HOFFMAN, C. & CLAPP, B. 2018. Alternative strategies for vaccination to brucellosis. *Microbes Infect*, 20, 599-605.
- PEKACZ, M., BASALAJ, K., KALINOWSKA, A., KLOCKIEWICZ, M., STOPKA, D., BASKA, P., DLUGOSZ, E., KARABOWICZ, J., MLOCICKI, D., WISNIEWSKI, M. & ZAWISTOWSKA-DENIZIAK, A. 2022. Selection of new diagnostic markers for *Dirofilaria repens* infections with the use of phage display technology. *Sci Rep*, 12, 2288.
- PÉREZ, E. L. 2019. *Diarreas neonatales en pequeños rumiantes: Prevalencia de Escherichia coli, Salmonella spp. Clostridium spp. y Cryptosporidium parvum en la Comunidad Valenciana*. Bachelor, Universidad católica de Valencia.
- PING, X., SUBHADEEP, G., ANAM RANA, G., JIGNA, B., JONG PIL, P. & TAE JUNG, P. 2021. Screening of specific binding peptides using phage-display techniques and their biosensing applications. *Trends in Analytical Chemistry*, 137, 1-18.
- POSADAS, D. M., RUIZ-RANWEZ, V., BONOMI, H. R., MARTIN, F. A. & ZORREGUIETA, A. 2012. BmaC, a novel autotransporter of *Brucella suis*, is involved in bacterial adhesion to host cells. *Cell Microbiol*, 14, 965-982.
- PRADEEPKIRANA, J. A., BHASKARB, M., SHRIKANYAC, K. V., GOPI KRISHNAD, P., HANUMA REDDYE, M., VENKATRAYULUE, C. & SAINATH, S. B. 2021. Identification and Characterization of Potential Drug Targets. *In: PRADEEPKIRANA, J. A. & SAINATH, S. B. (eds.) 1 ed. USA: AP.*
- PRODUCTORA NACIONAL DE BIOLÓGICOS VETERINARIOS. 2018. *Antígeno para el diagnóstico de la brucellosis en caprinos y ovinos*. [Online]. México. Available: <https://www.gob.mx/pronabive/documentos/aba-test-tarjeta-al-3?state=published> [Accessed 23/03/2022 2022].
- QUEROL, S. J. 2011. *Cuestiones clínicas, epidemiológicas y diagnósticas de la brucellosis bovina, ovina y caprina* [Online]. Argentina. Available: [https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/enfermedades\\_reproduccion/117-Cuestiones\\_clinicas.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/117-Cuestiones_clinicas.pdf) [Accessed 24-05.2022 2022].
- RAMI, A., BEHDANI, M., YARDEHNAVI, N., HABIBI, M. & KAZEMI-LOMEDASHT, F. 2017. An overview on application of phage display technique in immunological studies. *Asian Pac. J. Trop. Biomed*, 7, 599-602.
- READ, A. J., GAUCI, C. G. & LIGHTOWLERS, M. W. 2009. Purification of polyclonal anti-conformational antibodies for use in affinity selection from random peptide phage display libraries: a study using the hydatid vaccine EG95. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 877, 1516-22.

- RHYAN, J. C., QUINN, W. J., STACKHOUSE, L. S., HENDERSON, J. J., EWALT, D. R., PAYEUR, J. B., JOHNSON, M. & MEAGHER, M. 1994. Abortion caused by *Brucella abortus* biovar 1 in a free-ranging bison (*Bison bison*) from Yellowstone National Park. *J Wildl Dis*, 30, 445-6.
- RODRÍGUEZ, A. D. 2003. *Efecto de la leptina en la esteroidogénesis y multiplicación de células de la teca in vitro*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- RUIZ, C. M. 1990. Brucelosis. *La Prensa Médica Mexicana*, 7, 2-13.
- SAYTEKIN, A. M. & AK, S. 2018. Direct diagnosis of *Brucella* species through multiplex PCR formed by a new method. *J Microbiol Methods*, 154, 86-94.
- SCHOLZ, H. C., MUHLDOERFER, K., SHILTON, C., BENEDICT, S., WHATMORE, A. M., BLOM, J. & EISENBERG, T. 2016. The Change of a Medically Important Genus: Worldwide Occurrence of Genetically Diverse Novel *Brucella* Species in Exotic Frogs. *PLoS One*, 11, 1-11.
- SEGUNDO, N., HERNÁNDEZ, E., LÓPEZ, O. & TORRES, O. 2010. Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41, 17-26.
- SENASICA. 2022. *Situación actual del control de la brucelosis en México* [Online]. México: 23 de junio de 2021. [Accessed 15/02/2022].
- SERENA, N. N., BOSCHERO, R. A., HOSPINAL-SANTIANI, M., PACCE, V. D., COSTA, J., MAGALHAES, F. B., WIEDMAR, C., ALBAN, S. M., SOCCOL, C. R. & THOMAZ-SOCCOL, V. 2022. High-performance immune diagnosis of tuberculosis: Use of phage display and synthetic peptide in an optimized experimental design. *J Immunol Methods*, 503, 113242.
- SHAKIR, R. 2021. Brucellosis. *J Neurol Sci*, 420, 1-5.
- SHARIFAHMADIAN, M., NLEND, I. U., LECOQ, L., OMICHINSKI, J. G. & BARON, C. 2017. The type IV secretion system core component VirB8 interacts via the beta1-strand with VirB10. *FEBS Lett*, 591, 2491-2500.
- SIOUD, M. 2019. Phage Display Libraries: From Binders to Targeted Drug Delivery and Human Therapeutics. *Mol Biotechnol*, 61, 286-303.
- SMEAL, S. W., SCHMITT, M. A., PEREIRA, R. R., PRASAD, A. & FISK, J. D. 2017. Simulation of the M13 life cycle II: Investigation of the control mechanisms of M13 infection and establishment of the carrier state. *Virology*, 500, 275-284.
- SMITH, G. P. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 228, 1315-1317.
- SOLANO, O. R. 2015. *Brucella abortus*: patogénesis y regulación génica de la virulencia *Tecnología en Marcha*, 28, 61-73.
- SUÁREZ, A. E. 2015. *Determinación de la presencia de brucelosis en el Hato Caprino Costarricense*. College, Universidad Nacional.
- TROTTA, A., MARINARO, M., CIRILLI, M., SPOSATO, A., ADONE, R., BEVERELLI, M., BUONAVOGLIA, D. & CORRENTE, M. 2020. *Brucella melitensis* B115-based ELISA to unravel false positive serologic reactions in bovine brucellosis: a field study. *BMC Vet Res*, 16, 1-7.
- UZUREAU, S., GODEFROID, M., DESCHAMPS, C., LEMAIRE, J., DE BOLLE, X. & LETESSON, J. J. 2007. Mutations of the quorum sensing-dependent regulator VjbR lead to drastic surface modifications in *Brucella melitensis*. *J Bacteriol*, 189, 35-47.
- VAILLARD, C. J. 2017. *Diversidad y cofilogenia del género Brucella y sus hospederos mamíferos*. bachelor's, Universidad Nacional Autónoma de México.
- VILLAMIL, A., SIVANESAN, D., CARLE, A., PASCHOS, A., SMITH, M. A., PLESA, M., COULTON, J. & BARON, C. 2012. Type IV Secretion System Core Component VirB8 from *Brucella* Binds to



- the Globular Domain of VirB5 and to a Periplasmic Domain of VirB6. *Biochemistry*, 51, 3881–3890.
- VILLAMIL GIRALDO, A. M., MARY, C., SIVANESAN, D. & BARON, C. 2015. VirB6 and VirB10 from the Brucella type IV secretion system interact via the N-terminal periplasmic domain of VirB6. *FEBS Lett*, 589, 1883-9.
- VISPO, N. S. & PUCHADES, Y. 2001. Bacteriófagos: de la terapia con fagos a la biología combinatoria. *Biotecnología Aplicada*, 11, 135-147.
- WILLIAMS, J. 2018. *Development of a phage display library for discovery of antigenic Brucella peptides*. Master, Iowa State University.
- WITTEBOLE, X., DE ROOCK, S. & OPAL, S. M. 2014. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence*, 5, 26-35.
- YANG, L., CEN, J., XUE, Q., LI, J., BI, Y., SUN, L. & LIU, W. 2013. Identification of rabies virus mimotopes screened from a phage display peptide library with purified dog anti-rabies virus serum IgG. *Virus Res*, 174, 47-51.
- YUN, S., LEE, S., PARK, J. P., CHOO, J. & LEE, E. K. 2019. Modification of phage display technique for improved screening of high-affinity binding peptides. *J Biotechnol*, 289, 88-92.
- ZHAO, F., SHI, R., LIU, R., TIAN, Y. & YANG, Z. 2021. Application of phage-display developed antibody and antigen substitutes in immunoassays for small molecule contaminants analysis: A mini-review. *Food Chem*, 339, 1-9.
- ZHAO, N., SCHMITT, M. A. & FISK, J. D. 2016. Phage display selection of tight specific binding variants from a hyperthermostable Sso7d scaffold protein library. *FEBS J*, 283, 51-67.