



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**Construcción de la glicoproteína B recombinante de
rinotraqueitis infecciosa bovina para probarla como antígeno
en un sistema diagnóstico inmunológico Luminex**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

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

PRESENTA

HÉCTOR DANIEL NÁJERA RIVERA

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Alejandro Benítez Guzmán - FMVZ

COMITÉ TUTOR

Dra. Luary Carolina Martínez Chavarría - FMVZ

Dr. Luis Padilla Noriega - FM

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

Septiembre, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mis papás. ¡Por todo, por siempre!

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser mi segunda casa, por haberme formado y dejarme ser parte de esta institución. A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por haberme permitido lograr mis sueños.

A los departamentos de Microbiología e Inmunología, Reproducción y patología por permitirme realizar este proyecto.

A los proyectos PAPIIT IA-205010, PAPIIT IN-215718, CONACyT 247539 y al proyecto semilla de la FMVZ, por el financiamiento otorgado para que este trabajo pudiera llevarse a cabo.

Al Dr. Alejandro Benítez por sus enseñanzas, por la confianza y todo el apoyo brindado.

A mi comité tutor, Dra. Luary Carolina Martínez Chavarría y Dr. Luis Padilla Noriega por todas sus aportaciones para que este trabajo pudiera ser terminado con calidad.

A la Dra. Ana Rodríguez por su enseñanza, apoyo, confianza y paciencia, por ser parte fundamental y guía de mi vida.

Al Dr. Juan Heberth por su apoyo para que este trabajo pudiera llevarse a cabo.

A M. en C. Teresa de Jesús López Pérez y M. en C. Lourdes Marion Galindo Castañeda por haber donado el virus de campo de IBR para utilizarlo como material biológico en este proyecto.

A los miembros del jurado, Dr. Carlos Gutiérrez Aguilar, Dra. Clara Espitia y Dra. Gabriela Bárcenas por sus aportaciones para que este trabajo fuera finalizado con éxito y pueda formar parte del acervo de la Universidad.

A mis hermanos Beto, Gaby y Edgar por siempre apoyarme.

A mis amigos de inmunofisiología: Adriana, Tzayhri, Itzelita, Mons, Clau, Omar, Josue y Yahel por el apoyo incondicional y sus consejos.

A mis amigos por estar conmigo durante todo este trayecto, por verme crecer y ser parte de mi vida.

A Hugo Quetzal por todo. Por ayudarme a crecer y a realizar mis sueños, porque siempre tienes una palabra de apoyo y no dejarme rendir nunca.

A todas las personas que en mayor o menor medida aportaron para impulsarme a seguir adelante y nunca mirar hacia atrás.

RESUMEN

La Rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) es una enfermedad causada por el alfa herpesvirus bovino tipo 1 y presenta una distribución mundial. Afecta al ganado bovino tanto productiva como reproductivamente y genera pérdidas económicas. El virus presenta varias glicoproteínas en su superficie, entre ellas, la glicoproteína B (gB) que es importante para la adhesión y fusión del virus con las células. La gB es considerada como inmunodominante e inmunogénica, por lo que se ha utilizado para profilaxis y diagnóstico. Debido a que en México se tienen regiones con seroprevalencias por arriba del 70%, es necesario tener una prueba diagnóstica certera y con posibilidad de ser escalable a una prueba multiplex, por lo que en este trabajo, produjimos un fragmento recombinante de la gB para probarla como antígeno en un sistema diagnóstico. Para lograrlo un fragmento del dominio 2 de la gB se clonó en el vector pET28-b, se sobre expresó y la proteína se purificó mediante cromatografía de afinidad con una columna de Niquel-Sefarosa. Se verificó su presencia e inmunorreactividad mediante SDS-PAGE y western blot, con anticuerpos antihistidina y sueros de animales positivos a IBR, respectivamente. No se estandarizó la técnica Luminex ya que la proteína recombinante no fue reconocida por los sueros de bovinos infectados naturalmente con IBR.

Palabras clave: Rinotraqueitis infecciosa bovina, IBR, antígeno, glicoproteína B, proteína recombinante.

ABSTRACT

Infectious bovine rhinotracheitis (IBR) is a respiratory and reproductive disease caused by bovine alphaherpesvirus type 1 in cattle. It is considered one of the major cattle diseases present worldwide. The virus has surface glycoproteins on its envelope, among them is glycoprotein B (gB), which is important for the virus attachment and fusion to the cell. The gB is highly immunogenic and immunodominant, thus it is a target for prophylaxis and diagnosis. In several regions of Mexico, IBR seroprevalence is above 70%; hence creating the need to implement an accurate diagnostic test with the possibility to be incorporated in a multiplex test in a platform such as luminex. In this work, we produced a recombinant fragment of gB to use as antigen in a luminex assay. In order to do this, the 2nd domain of gB was cloned into pET-28b vector, then overexpressed and recovered by affinity chromatography. Its presence and antigenicity checked with SDS-PAGE and western blot using antihistidine antibodies and sera from IBR positive cows, respectively. The Luminex test was not standardized because the recombinant protein was not recognized by IBR positive cow sera.

Keywords: Infectious bovine rhinotracheitis, IBR, antigen, glycoprotein B, recombinant protein.

CONTENIDO

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
CONTENIDO	VI
LISTA DE CUADROS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
INTRODUCCIÓN	1
AGENTE ETIOLÓGICO.....	2
CICLO DE REPLICACIÓN VIRAL	4
LATENCIA	9
GLICOPROTEÍNA B.....	10
EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE.....	12
DIAGNÓSTICO.....	13
HIPÓTESIS	15
OBJETIVO GENERAL	15
MATERIAL Y MÉTODOS	16
CULTIVO CELULAR.....	16
INFECCIÓN Y COSECHA VIRAL.....	17
ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....	19
IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS	19
EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO	20
CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS PET28UL27VAC Y PET28UL27VIR	21
SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA.....	23
INDUCCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA	23
PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE AFINIDAD	24
ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE) Y WESTERN BLOT (WB)	24
RESULTADOS	25
DISCUSIÓN	39
REFERENCIAS	47
ANEXO 1	51

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Iniciadores empleados para la amplificación del dominio II de la glicoproteína B de IBR	20
Cuadro 2: Principales glicoproteínas de IBR y su peso molecular .	25
Cuadro 3. Epítomos reportados de la glicoproteína B del herpesvirus bovino tipo 1 y sus características	28
Cuadro 4: Características físico-químicas del dominio II de la glicoproteína B de IBR.....	30

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 Representación esquemática del herpesvirus bovino tipo 1...	3
Fig. 2 Organización del genoma de herpesvirus bovino tipo 1.....	6
Fig. 3 Identificación del virus de IBR.....	24
Fig.4. Infección viral IBR.....	26
Fig. 5 Verificación de presencia e inmunorreactividad del virus de campo replicado en cultivo celular.....	27
Fig. 6 Modelo cristalizado del ectodominio de la glicoproteína B del herpes simplex 1.....	29
Fig. 7. Modelo de la glicoproteína B de IBR.....	29
Fig.8 Representación esquemática de los mapas de los vectores pET-28 y pBAD.....	31
Fig. 9. Purificación de los plásmidos pBAD/Myc-His y pET-28.....	31
Fig. 10. Estandarización de la PCR para fragmento gB de IBR.....	32
Fig. 11. Amplificación por PCR del fragmento gB de IBR.....	32
Fig. 12. Purificación de los productos de PCR y plásmidos.....	33
Fig. 13. Digestión enzimática de los plásmidos.....	33
Fig. 14. PCR de colonia en <i>E. coli</i> Top10 transformadas para el fragmento gB de IBR.....	34
Fig.15. Secuenciación del inserto clonado en el vector que corresponde al fragmento de la gB de IBR.....	35
Fig.16 Inducción de la proteína recombinante del dominio 2 de gB de IBR.....	36
Fig. 17 Cromatograma de la purificación de la proteína recombinante fragmento gB de IBR.....	37
Fig. 19 SDS-PAGE15% y WB de la purificación de la proteína recombinante fragmento gB de IBR.....	37

INTRODUCCIÓN

La Rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) es una enfermedad del complejo respiratorio y complejo abortivo bovino causada por el alfaherpesvirus bovino tipo 1. Esta enfermedad tiene distribución mundial y afecta al ganado bovino en su reproducción y productividad, generando grandes pérdidas económicas (Muylkens *et al.* 2007). En los Estados Unidos de Norte América, las pérdidas por IBR se estiman en 640 millones de dólares anuales (Bowland & Shewen 2000); debidos a restricciones comerciales, disminución de la producción láctea, signos clínicos y el manejo para combatir la infección (Bowland & Shewen 2000; Muylkens *et al.* 2007; Sayers 2016).

La presencia de la enfermedad en una región determinada y en un momento específico se puede estimar a partir de la seroprevalencia, que es la proporción de individuos con anticuerpos en suero y se utiliza como un indicador de que los animales han estado expuestos al agente infeccioso. Debido a la naturaleza de los herpesvirus, una vez que un animal es expuesto al virus queda como portador indefinidamente, por lo que se considera como portador a todo animal que tiene anticuerpos y posible excretor intermitente del virus (OIE 2017). Para IBR, se han reportado seroprevalencias alrededor del mundo entre el 8.8% y 70.4% en países como Argentina, Colombia, España e India (Odeón *et al.* 2001; Eiras *et al.* 2009; González-García *et al.* 2009; Cedeño *et al.* 2011; Saravanajayam *et al.* 2015). En el caso de México, no hay estudios amplios que permitan conocer la seroprevalencia nacional, sin embargo, existen reportes que van desde el 13.66% hasta el 93% en los estados de Michoacán, Yucatán, Tamaulipas, Campeche y Chiapas (Solis-Calderon *et al.* 2003; Córdova-Izquierdo *et al.* 2007; Segura-Correa *et al.* 2016; Espinosa *et al.* 2016).

El herpesvirus bovino tipo 1 (BoHv-1) pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *alfaherpesvirinae* y género *Varicellovirus* (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV). Existen tres genotipos diferentes, BoHv-1.1, BoHv-1.2a y BoHv-1.2b, determinados por diferencias en los patrones de

restricción en el DNA. Cada genotipo se ha asociado con diferencias en la semiología (Metzler & Matile 1985; Wang *et al.* 2006; Muylkens *et al.* 2007).

El virus puede infectar al animal mediante aerosoles en distancias cortas o por contacto directo, mediante monta natural o inseminación artificial; se replica en las células del epitelio respiratorio, en la mucosa vaginal o prepucial; desde donde alcanza los ganglios trigémino o sacros, en los que se mantiene durante toda la vida del animal en estado latente (OIE 2017; Muylkens *et al.* 2007).

Los signos clínicos pueden variar dependiendo de la vía de infección, así como del genotipo presente. Los animales infectados por vía aerógena o por contacto directo, presentan fiebre entre los 4 y 5 días post-infección, tos, descarga mucosa nasal, anorexia y dificultad para respirar; si la infección se da entre los 4 y 8 meses de gestación, puede generar aborto. Por otro lado, cuando la infección es por vía genital, se observa balanopostitis o vulvovaginitis (Muylkens *et al.* 2007). El genotipo 1.1 tiene manifestaciones respiratorias y abortos, el genotipo 1.2a se asocia con vulvovaginitis o balanopostitis y el genotipo 1.2b se ha asociado con ambas manifestaciones, sin embargo, no se ha relacionado con abortos (Fulton *et al.* 2015).

Agente etiológico

BoHv-1 es un virus esférico de 150 a 200nm de diámetro con DNA lineal de doble cadena, con presencia de cápside icosaédrica, tegumento y envoltura como se muestra en la figura 1 (Fauquet *et al.* 2005). El genoma codifica para diferentes proteínas virales; las principales glicoproteínas estructurales son: glicoproteína B (gB), glicoproteína C (gC) y glicoproteína D (gD). Existen otras glicoproteínas adicionales: gE, gI, gH, gL, gG, gK y gM, además de diferentes enzimas y proteínas reguladoras (Schwyzer & Ackermann 1996). BoHv-1 presenta un ciclo de replicación lítico en las células epiteliales, produce muerte celular y por lo tanto, produce un efecto citopático (Keil *et al.* 1996; Muylkens *et al.* 2007).

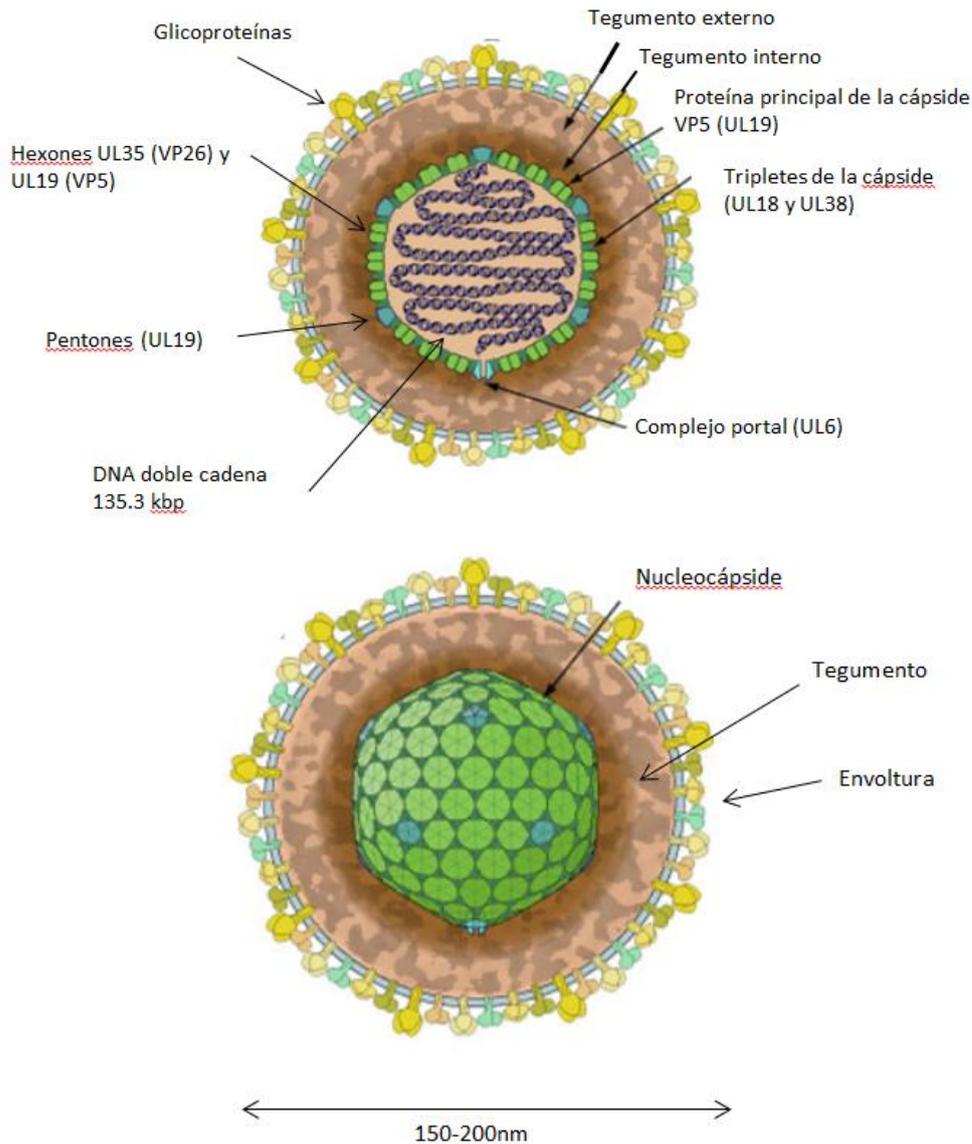


Figura 1 Representación esquemática del herpesvirus bovino tipo 1. Tomado y modificado de https://viralzone.expasy.org/176?outline=all_by_species

La gB, gC y gD se han reportado como proteínas inmunogénicas capaces de producir anticuerpos neutralizantes. Se ha descrito que la gB y gD no presentan diferencias antigénicas en relación al genotipo, por lo que son las proteínas más conservadas entre los herpesvirus (Levings *et al.* 2015). Sin embargo, la glicoproteína C presenta mayor variabilidad, por lo que un cambio en la secuencia de aminoácidos es suficiente para la diferenciación del genotipo (Rijsewijk *et al.* 1999).

Ciclo de replicación viral

Las gC y gB de la envoltura viral, interactúan con el heparán sulfato de los proteoglicanos (HSPG) en las células susceptibles para generar un primer punto de adhesión. Se ha observado que otros glicosaminoglicanos como el dextrán o el dermatán sulfato pueden sustituir al HSPG (Nicola *et al.* 2003). La gC no es esencial para la entrada del virión a la célula y la gB es capaz de realizar la adhesión de manera correcta para su posterior fusión con la membrana celular (Byrne *et al.* 1995; Heldwein & Krummenacher 2008).

Una vez dada la unión de la envoltura viral con la membrana celular es importante la interacción de gD con sus receptores, principalmente Nectina-1; sin embargo, también puede interactuar, independientemente, con el receptor de entrada de los herpesvirus (HVEM) y con el heparán sulfato modificado por la 3-O-sulfotransferasa (3-OS-HS) (Nicola *et al.* 2003; Heldwein & Krummenacher 2008). Se ha descrito que la interacción de gD con su receptor (HVEM) puede inducir la activación de apoptosis en ciertos tipos celulares, aunque el mecanismo no está descrito hasta ahora (Jones & Chowdhury 2007; Muylkens *et al.* 2007).

El complejo glicoproteína H/glicoproteína L (gH/gL) es necesario para la fusión y entrada del virión a la célula interactuando con el receptor de integrina de la membrana celular. La gL carece de la región transmembranal y forma un complejo con la gH, estabilizándola. Se ha propuesto que el complejo gH/gL podría funcionar como péptido de fusión en conjunto con la gB (Heldwein & Krummenacher 2008).

Al interactuar con sus receptores, la gD desencadena una señal de activación hacia la gB, que en conjunto con el complejo gH/gL genera cambios conformacionales, lo que permite el acercamiento del virión con la célula para llevar a cabo la fusión (Heldwein & Krummenacher 2008). Aunque la fusión de la envoltura viral con la membrana celular se ha descrito como la vía canónica de entrada de los herpesvirus, se sabe que estos también son

capaces de infectar células mediante endocitosis y dependiente de pH ácido (Nicola *et al.* 2003).

La envoltura viral queda unida a la membrana celular, por lo que las glicoproteínas permanecen en la superficie y permiten el paso de la nucleocápside con el tegumento al interior (Heldwein & Krümmecher 2008). Algunas proteínas del tegumento son necesarias para el transporte al núcleo mediante su interacción con el sistema de microtúbulos de la célula. Se ha observado que las proteínas del tegumento UL34, UL36, UL37 y VP26 interactúan con la dineína, la cual es responsable del movimiento de la periferia de la célula hacia el centrosoma, cerca del núcleo, a través de los microtúbulos (Leopold & Pfister 2006; Barber *et al.* 2017). Durante el transporte al núcleo, las proteínas del tegumento son liberadas en el citoplasma de la célula infectada.

La proteína del tegumento UL41, también conocida como proteína de apagado del hospedador (vhs), es responsable de la detención de la producción de proteínas en las células infectadas al degradar el mRNA celular (Griffin *et al.* 2010).

Una vez que el virión alcanzó el núcleo, las proteínas VP1/2 (UL36) y UL25 del tegumento interactúan con el complejo del poro nuclear con las nucleoporinas Nup214, Nup 358, hCG1 e importina β (Kobiler *et al.* 2012). La salida del genoma de la cápside se efectúa cuando se realiza un corte proteolítico a la proteína principal del tegumento (VP1/2), que desencadena un cambio conformacional en la cápside, permitiendo la apertura del complejo del poro por otro corte proteolítico en la proteína UL6 (Newcomb & Brown 2007; Kobiler *et al.* 2012).

El genoma del BoHV-1 está formado por una doble cadena de DNA lineal de 135.3 kbp, que comprende dos únicas secuencias, una larga (U_L) y una corta (U_S) flanqueadas por una secuencia de repeticiones interna (IR) y una secuencia de repeticiones terminal (TR) como se muestra en la figura 2. Se han identificado 73 marcos de lectura abiertos (ORF) en donde se encuentran

las secuencias que codifican para las distintas proteínas virales. Sin embargo, se han descrito genes esenciales y no esenciales para la replicación y viabilidad del BoHv-1 *in vitro* (Robinson *et al.* 2008).

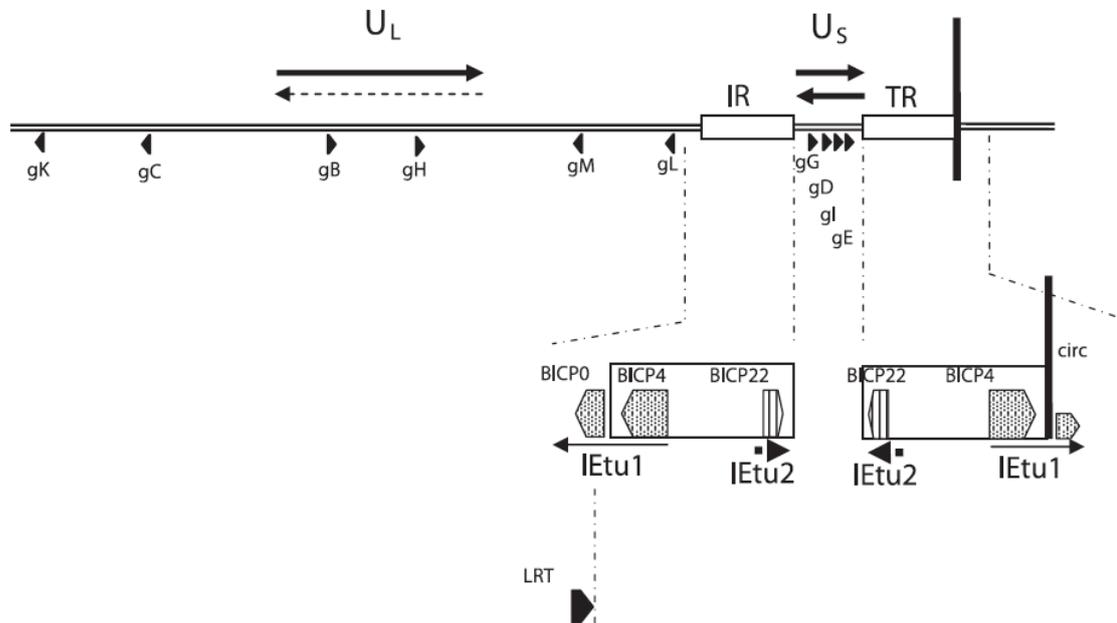


Figura 2 Organización del genoma de herpesvirus bovino tipo 1. Tomado de Muylkens, B. *et al.*, 2007. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Veterinary Research*, 38(2), pp.181–209.

La replicación es regulada por una serie de genes que se activan en forma de cascada: genes inmediato-tempranos (α -genes), tempranos (β -genes) y tardíos (γ -genes). Los α -genes codifican para proteínas involucradas principalmente en la regulación del ciclo viral. Los β -genes y γ -genes son expresados posteriormente, los cuales codifican para proteínas implicadas en la replicación del DNA viral y en la morfogénesis del virión, respectivamente (Muylkens *et al.* 2007; Robinson *et al.* 2008).

El inicio de la transcripción está determinado por la proteína del tegumento VP16 o factor de transducción de genes alfa (α -TIF), el cual, en conjunto con proteínas celulares, se une al promotor de las unidades de transcripción inmediatas tempranas 1 y 2 (IETu1 e IETu2), que codifican para las principales proteínas inmediatas tempranas que son bICP0, bICP4 y Circ para el IETu1,

mientras que bICP22 para el IEtu2 (Muylkens *et al.* 2007; Robinson *et al.* 2008; Barber *et al.* 2017).

Las principales proteínas inmediatas tempranas activan los genes tempranos como UL54 y UL42, que codifican para bICP27 y una subunidad de la DNA polimerasa, respectivamente, las cuales intervienen en el metabolismo del RNA, así como en la replicación del DNA viral.

Una vez que se replicó el DNA viral, es necesaria la activación de los genes tardíos como UL27, UL44 y US6, entre otros, para la producción de las proteínas estructurales gB, gC y gD, respectivamente; además, se producen durante la fase tardía las proteínas del tegumento con actividad enzimática o reguladora (Muylkens *et al.* 2007; Robinson *et al.* 2008; Barber *et al.* 2017). Las proteínas de envoltura se traducen en el retículo endoplásmico rugoso para después ser transportadas mediante vesículas al aparato de Golgi donde son glicosiladas (Mettenleiter 2004).

Las proteínas estructurales del virión ingresan al núcleo para la formación y maduración de la cápside, que está formada por 162 capsómeros con una estructura icosaédrica. Estos capsómeros están divididos en hexones y pentones, los cuales están unidos por tripletes formados por las proteínas UL18 y UL38. Los hexones se localizan en las caras y aristas de la cápside formados por las proteínas UL19 (VP5) y UL35 (VP26), mientras que los pentones se encuentran en los vértices; once de los doce pentones están formados por la proteína UL19 y el último está formado por la proteína UL6 el cual forma el complejo portal (Newcomb *et al.* 2003; Barber *et al.* 2017).

El ensamblaje de la cápside se da al interactuar la proteína de anclaje UL26.5 con la proteína UL6, y a partir de esta unión, el resto de las proteínas se acoplan formando diferentes complejos que se unen al final para formar una procápside, la cual tiene en su interior la proteína de anclaje UL26.5 (Newcomb *et al.* 2003; Barber *et al.* 2017). Las proteínas virales VP21 y VP24 actúan como proteasas para la escisión de la proteína de anclaje y permitir el posterior empaquetamiento del DNA viral (Baines 2011).

La salida del virus se lleva a cabo por tres procesos, dos de gemación y uno de exocitosis. La primera gemación se da en la membrana del núcleo. Las proteínas UL34, UL31 y US3 del tegumento interactúan con la cápside madura guiándola hacia la zona de salida en la membrana nuclear. La proteína cinasa (PKC) es importante para obtener la primer envoltura del virus a partir de la membrana interna del núcleo. Una vez en el espacio intermembranal, la US3 actúa como proteína cinasa, permitiendo la fusión de la primer envoltura con la membrana externa del núcleo, generando un desenvolvimiento y liberando la cápside al citoplasma (Mettenleiter 2004).

En el citoplasma, los viriones adquieren las proteínas del tegumento. La cápside interactúa con la proteína UL36 y esta a su vez con la UL37 para formar la primer base del tegumento (tegumento interno); posteriormente, obtiene el resto del tegumento (tegumento externo) al adquirir la segunda envoltura en el siguiente proceso de gemación (Mettenleiter 2004).

Las vesículas liberadas del aparato de Golgi, las cuales tienen en su interior las glicoproteínas del virus, interactúan con las cápsides presentes en el citoplasma. Las vesículas exponen las regiones intracitoplasmáticas de las glicoproteínas, siendo éstas importantes para la interacción con proteínas del tegumento para la envoltura de la cápside. Se ha descrito que la proteína del tegumento UL48 puede interactuar directamente con la gB, gD y el complejo gH/gL; por otro lado, la proteína UL49 interactúa con la gM en complejo con la gN y con la gE/gI, mientras que UL20 interactúa con gK. Estas interacciones son importantes para el segundo envolvimiento de la cápside, lo que permite al virus tener una envoltura con las glicoproteínas (Mettenleiter 2004).

El virus envuelto es entonces mantenido en la vesícula, la cual es transportada hacia la membrana celular, donde ocurre la fusión y el virión maduro sale de la célula mediante exocitosis, permitiendo posteriormente la diseminación de la infección (Mettenleiter 2004).

Una vez que se tienen viriones maduros, se produce viremia, lo que permite su diseminación y llegada a órganos blanco, incluyendo el feto o embrión. Sin embargo, el virus puede ser neutralizado por la presencia de anticuerpos. Otra forma de diseminación es por contacto célula-célula, donde el virus no puede ser reconocido por anticuerpos neutralizantes, lo que le permite infectar células vecinas (Muylkens *et al.* 2007).

La glicoproteína D interactúa con receptores presentes en la superficie lateral de las células en las uniones intercelulares, con lo que se permite la diseminación célula-célula. También se ha descrito que la glicoproteína B y el complejo gH/gL son importantes para este tipo de diseminación (Muylkens *et al.* 2007).

Latencia

El virus puede invadir mediante diseminación célula-célula, a las neuronas sensitivas del ganglio trigémino, o de los ganglios sacros, dependiendo de la vía de entrada y es en estas neuronas sensitivas donde se produce latencia. El virus migra a través del axón de forma retrógrada hasta el núcleo, donde permanece en forma episomal (Jones & Chowdhury 2007; Muylkens *et al.* 2007). En las neuronas infectadas se transcriben los genes relacionados con latencia (LR o LAT), estos genes permiten el establecimiento de la misma y la regulación de los genes de expresión viral como bICP0, por lo que no se expresan los α y β -genes e inhiben la apoptosis de la célula (Jones & Chowdhury 2007). El virus permanece latente en las neuronas infectadas y se reactiva ante algún estímulo estresante para el animal.

El BoHv-1 contiene en su genoma elementos responsivos a receptores de glucocorticoides, por lo que estas hormonas son capaces de inducir la reactivación de la replicación viral (Zhu *et al.* 2017). Se ha observado que no hay expresión de genes inmediatos tempranos o tempranos en la reactivación de la latencia. En esta etapa disminuye la transcripción de los genes LR y LAT y se incrementa la producción de los genes tardíos, lo que

supone un ensamblaje y maduración del virus (Jones & Chowdhury 2007; Zhu *et al.* 2017).

Los virus maduros migran en sentido anterógrado a través de los axones de las neuronas sensitivas y llegan hasta las células epiteliales, permitiendo así la diseminación de la infección. La glicoproteína E (gE) y la proteína de envoltura US9 son importantes para la diseminación anterógrada permitiendo la reactivación de la latencia (Jones & Chowdhury 2007).

Glicoproteína B

La glicoproteína B (gB) es la proteína más conservada de la familia *herpesviridae* y una de las principales glicoproteínas del herpesvirus bovino tipo 1. Esta proteína es codificada por el gen UL27 y traducida como parte del proceso de morfogénesis de los viriones. Se localiza en la envoltura y es importante para la adhesión y fusión del virus con las células durante la infección mediante la unión de este a los proteoglicanos de la superficie celular (Heldwein & Krummenacher 2008).

La gB está compuesta por una larga porción extra viral o ectodominio, una región hidrofóbica proximal a la membrana, una región transmembranal con una estructura única helicoidal y una porción intraviral (Heldwein *et al.* 2006; Cooper & Heldwein 2015).

Con base en la proteína gB cristalizada del herpesvirus simplex 1 (Heldwein *et al.* 2006), el cual pertenece a la misma subfamilia que BoHv-1, se infiere la estructura del ectodominio de la gB. Es un homotrímero que contiene tres protómeros designados A, B y C, cada uno de 101.9 kDa (932 aminoácidos) conformados por 5 dominios, I: base, II: medio, III: núcleo, IV corona y V: brazo. No hay estructura trimérica *per se*; es la interacción entre estos dominios en cada protómero lo que resulta en la estabilidad del trímero y la unión mediante puentes disulfuro, todos intramoleculares. Cada protómero extiende un brazo carboxilo terminal desde un extremo de la molécula al otro,

insertándolo en la unión entre los otros dos protómeros (Heldwein *et al.* 2006; Cooper & Heldwein 2015).

La gB es considerada una proteína de fusión clase III por presentar elementos de las proteínas de fusión clase I y II como el núcleo helicoidal y los bucles de fusión internos e hidrófobos, respectivamente. Estos bucles de fusión se localizan en el dominio II de la proteína. Los dominios I y II que cubren las superficies laterales de la gB están suspendidos por segmentos extendidos de la cadena polipeptídica desde el extremo distal de la membrana de la molécula, lo que sugiere un mecanismo para un cambio conformacional fusogénico y además, se encuentran adyacentes al extremo C-terminal de anclaje con la membrana viral (Cooper & Heldwein 2015).

La gB se encuentra en un estado de pre-fusión estable y es hasta que recibe un estímulo, que realiza un cambio conformacional en el que expone sus segmentos de fusión previamente protegidos. La región amino-terminal de la gB está implicada en la adhesión del virus a la célula, ya que interactúa con su receptor, el heparán sulfato de los proteoglicanos. El cambio conformacional ocurre cuando gD interactúa con alguno de sus receptores celulares, nectina-1, HVEM o 3-OS-HS, lo que libera a gD de su estado dimérico autoinhibido y le permite transmitir de alguna manera una señal al complejo gH/gL, que, a su vez, activa gB. La gB expone los bucles internos hidrófobos extendiéndolos e insertándolos en la membrana de la célula diana (Cooper & Heldwein 2015). Esta conformación alargada es inestable y se pliega rápidamente sobre sí misma de modo que el extremo C-terminal de la proteína, anclado a la membrana viral, se acerca hacia el segmento de fusión de esta, permitiendo que se unan las membranas y obteniendo así su estado de post-fusión (Cooper & Heldwein 2015).

La gB es considerada como inmunodominante e inmunogénica e induce la producción de anticuerpos neutralizantes; además, se ha descrito que no presenta diferencias antigénicas con relación al genotipo (Levings *et al.* 2015). Se han determinado diferentes epítopos a lo largo de toda la glicoproteína (Gao *et al.* 1999), sin embargo, es en la región amino-terminal o

corona y los laterales o dominios I y II, donde se han identificado epítomos que desencadenan la generación de anticuerpos neutralizantes (Heldwein *et al.* 2006, Okazaki *et al.* 2006).

Evasión de la respuesta inmune

Después de la infección primaria, el sistema inmune es capaz de activar mecanismos para evitar la proliferación y diseminación de la infección al detectar, mediante receptores reconocedores de patrones (PRR's), ligandos como proteínas o ácidos nucleicos específicos del virus (Muylkens *et al.* 2007; Griffin *et al.* 2010). La detección de estos ligandos desencadena vías de señalización que llevan a la producción de interferón (IFN) tipo I y otras citocinas y quimiocinas para el reclutamiento de diferentes células como macrófagos, polimorfonucleares, linfocitos y células *natural killer* (NK), con el objetivo de eliminar al virus. El herpesvirus bovino tipo 1 tiene la capacidad de evadir esta respuesta inmune y permanecer latente durante toda la vida del animal.

La proteína inmediata temprana bICP0 inhibe la transcripción de los genes que codifican para IFN-I debido a la degradación del factor regulador de IFN 3 (IRF3). De igual manera, se ha descrito que la disminución de la traducción de las proteínas de la célula, podría verse relacionada con la inhibición de la respuesta por interferón tipo I (IFN-I). Además, se ha descrito que la glicoproteína G se une a las quimiocinas secretadas, por lo que evita que cumplan su función (Muylkens *et al.* 2007; Griffin *et al.* 2010).

La respuesta inmune celular es la principal para eliminar a los virus, se activa al procesar y presentar antígenos mediante el complejo principal de histocompatibilidad de clase I (por sus sigla en inglés, MHC-I), el cual interactúa con el receptor de células T (TCR) de los linfocitos T CD8+ o citotóxicos que desencadenan la muerte de la célula infectada. Sin embargo, el BoHv-1 codifica para la proteína UL41 o vhs (por sus siglas en inglés, "*virion host shutoff protein*"), la cual posee actividad de RNAsa, permitiendo la degradación del mRNA de la célula, por lo que se ve disminuida la expresión

de MHC-I y por lo tanto la susceptibilidad a ser destruida por los linfocitos T citotóxicos. Además, la proteína viral UL49.5 induce la degradación de la proteína TAP del complejo de carga del péptido, por lo que no pueden ser presentados los antígenos (Muylkens *et al.* 2007; Griffin *et al.* 2010).

Diagnóstico

La IBR es diagnosticada mediante diferentes técnicas, entre las que se encuentran el aislamiento viral, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), virus-neutralización (VN) o el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Estas técnicas tienen diferentes propósitos como son: demostrar la ausencia de infección en la población o en animales individuales (principalmente antes de su desplazamiento), confirmar casos clínicos, contribuir con las políticas de erradicación y determinar la prevalencia o el estado inmunitario de animales vacunados (OIE 2017).

Debido a que la infección viral se puede encontrar de forma latente, los métodos diagnósticos para la identificación del agente como el aislamiento viral o la PCR, se pueden ver limitados a realizarse en etapas agudas de la enfermedad o cuando se presentan los signos clínicos. Por otra parte, las pruebas serológicas se pueden realizar a partir de muestras de suero, plasma o leche y resultan ser un indicador útil para conocer el estatus de los animales con respecto a la infección, donde todo animal positivo a anticuerpos se considera portador y posible excretor intermitente del virus (OIE 2017).

Estas pruebas serológicas se consideran sensibles y específicas para el diagnóstico de IBR, sin embargo, al realizarse un monitoreo de hato y utilizarse la leche de tanque como muestra, la sensibilidad de estas técnicas disminuye, por lo que no se podría determinar un hato negativo al herpesvirus bovino tipo 1 y sería necesario realizar la técnica individualmente a todos los animales (OIE 2017).

Las pruebas serodiagnósticas de ELISA que se ofertan en México son importadas, por lo que dependemos de tecnología extranjera, lo que conlleva a un mayor gasto para el diagnóstico de esta enfermedad, además que este tipo de técnicas monoplex, únicamente determinan un solo analito por ensayo. Además, las cepas del virus utilizadas como antígeno para la prueba podrían no estar circulando en el país y por lo tanto tener baja especificidad.

Por otro lado, existen metodologías multiplex como el sistema Luminex que ha demostrado ser una prueba confiable, reproducible, sensible y específica, con altos índices de exactitud y precisión. Además de ser muy eficiente al determinar varios analitos simultáneamente, con lo que se reducen los tiempos de trabajo y los volúmenes de muestra requeridos para su estudio (Ray *et al.* 2005; Elshal & McCoy 2006; Anderson *et al.* 2011).

El Luminex es un sistema multiplex para la detección de varios analitos simultáneamente, que utiliza microesferas de poliestireno con un método de identificación interna mediante la emisión de fluorescencia resultante de la combinación de dos fluoróforos (rojo e infrarrojo). Estas combinaciones pueden dar hasta 100 poblaciones diferentes de esferas, denominadas regiones. A cada región o población de esferas, se le puede acoplar un analito diferente, es por esto que con esferas marcadas en diferentes regiones se pueden determinar diferentes analitos al mismo tiempo, en un mismo ensayo y con bajos volúmenes de muestra. La tecnología Luminex funciona básicamente como un citómetro de flujo de 2 láseres, un diodo laser de 635 nm que excita la combinación de fluoróforos en el interior de la esfera y que emite una longitud de onda entre 678 a 689 nm lo que permite su identificación, y por lo tanto distingue las diferentes regiones de estas y el segundo láser con una longitud de onda de 532 nm, el cual excita la molécula reportera de ficoeritrina, y esta a su vez emite una señal de longitud de onda de 575 nm que se detectará como la intensidad de fluorescencia presente en la superficie de la esfera (Ray *et al.* 2005; Elshal & McCoy 2006; Lash *et al.* 2006; Anderson *et al.* 2011; LUMINEX 2017).

HIPÓTESIS

La proteína recombinante gB de rinotraqueitis infecciosa bovina será reconocida por sueros de bovinos no vacunados y positivos a IBR y funcionará como antígeno en un sistema diagnóstico inmunológico Luminex.

OBJETIVO GENERAL

Generar la proteína recombinante gB de rinotraqueitis infecciosa bovina para utilizarla como antígeno en el sistema diagnóstico inmunológico Luminex.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Seleccionar la región inmunogénica de la gB y clonar dicho fragmento en un vector de expresión.
- Inducir la sobreexpresión de la proteína recombinante.
- Purificar la proteína recombinante mediante columnas de afinidad.
- Determinar la presencia de la proteína recombinante mediante SDS-PAGE y WB con anticuerpos antihistidina.
- Verificar la inmunorreactividad de la proteína recombinante mediante SDS-PAGE y WB con sueros de animales positivos a IBR.
- Estandarizar el sistema luminex con la proteína recombinante purificada.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo Celular

Se realizó el cultivo de la línea celular Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) (ATCC®CCL-22) en condiciones de esterilidad. Para esto, se utilizó medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco, 11995-073) suplementado con HEPES 25mM (Sigma, H3375) y 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco, 26140-079).

Un vial almacenado a -80°C con una concentración de 4×10^6 células/ml se descongeló a temperatura ambiente y se sembró en una botella de cultivo celular de 25 cm^2 (Nest, 707001). Las células fueron centrifugadas a 2500 rpm durante cinco min, se retiró el sobrenadante, se resuspendió y homogeneizó la pastilla con 1 ml de medio DMEM suplementado, se depositó en la botella y se completó con 2 ml más de medio. Se dejó en incubación a 37°C y 5% CO_2 durante 24 h.

Posteriormente, se desechó el medio y se lavó la botella con 1 ml de solución de fosfatos salinos (PBS). Se descartó el PBS y se agregaron 3 ml de medio suplementado. Se dejó en incubación a 37°C y 5% de CO_2 hasta alcanzar una confluencia del 90%.

Para realizar la propagación de las células, se retiró el medio y se lavó con 1 ml de PBS, se retiró el PBS, se agregaron 500 μl de tripsina al 0.25% EDTA (Gibco, 25200-056) y se incubó 10 min a 37°C . Posteriormente, las células fueron depositadas en un tubo de 1.5 ml y se les agregaron 500 μl de medio DMEM suplementado. Se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min. Se retiró el sobrenadante y se agregó 1 ml de medio, se homogeneizaron las células y se depositaron en dos botellas de cultivo celular, 500 μl a cada una. Se completó con 2.5 ml de medio a cada una. Se dejó en incubación a 37°C y 5% CO_2 hasta alcanzar una confluencia del 90% para realizar el mismo procedimiento.

Infección y cosecha viral

La infección viral se realizó con una cepa de campo del virus de rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) donada por Marion Lourdes Galindo Castañeda y Teresa de Jesús López Pérez del laboratorio de virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la UNAM. Se utilizó la línea celular MDBK como sustrato, y como medio de infección se empleó DMEM suplementado con HEPES 25 mM y 2% de SFB.

Dos botellas de 225 cm² (Nest, 721001) fueron sembradas con células MDBK, se utilizó medio DMEM suplementado, se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ hasta alcanzar una confluencia del 80% en la monocapa. Una vez alcanzada la confluencia, una alícuota con el virus de IBR se descongeló en hielo y se agregaron 500 µl del virus a cada botella, se dejó en agitación a temperatura ambiente cubierta de la luz durante 1 h. Posteriormente se completó con 22 ml de medio de infección y se dejó en incubación a 37°C y 5% de CO₂ durante 96 h. Las células se revisaron cada 24 h para observar el efecto citopático (ECP) característico del virus: agrupaciones celulares, lisis y formación de placas.

Una vez pasadas las 96 h se cosechó el virus. Para esto, se realizaron 3 ciclos de congelación-descongelación para lisar las células. Se obtuvo todo el contenido de ambas botellas y se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min a 4°C. Se alicuotó el sobrenadante en crioviales de 1 ml y la pastilla celular se diluyó con 1 ml del sobrenadante y se almacenó en 2 crioviales de 500 µl. Todo el procedimiento se realizó en cadena fría. Los viales obtenidos se almacenaron a -80°C.

El virus cosechado fue titulado mediante la prueba de Reed and Muench. Para esto, en una placa de 96 pozos de cultivo celular se sembraron 10 000 células MDBK por pozo con medio suplementado. Las células fueron mantenidas en incubación a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas.

Se realizaron diluciones décuples seriadas del virus cosechado para la infección de las células en 50 µl de medio de infección. El virus sin diluir fue utilizado como testigo positivo y medio de infección como testigo negativo.

Pasado el tiempo de incubación, se retiró el medio suplementado y se agregó a cada columna de la placa, 8 pozos, una dilución diferente del virus cosechado, el testigo positivo y negativo. Se incubó a 37°C durante 72 h. La placa fue revisada cada 24 h para observar la presencia de efecto citopático. Se identificó el número de pozos donde hubo presencia de ECP por nivel de dilución.

Se realizó el análisis matemático para la obtención del título viral en dosis infectantes en cultivo celular al 50% (DICC₅₀). Primero, se generó el número de pozos acumulados por nivel de dilución sumando consecutivamente, desde la mayor dilución hasta la menor, todos los pozos positivos y sumando desde la dilución menor a la mayor, los pozos negativos. Se dividió el número de pozos acumulados por nivel de dilución entre su total de pozos (suma de positivos con negativos por nivel de dilución) para obtener el porcentaje de pozos positivos a ECP.

Para obtener la distancia proporcional que existe entre las diluciones que estuvieron más cercanas al 50% del ECP se divide la diferencia del valor en porcentaje de la dilución que estuvo por arriba del 50% de ECP menos 50 entre la diferencia de los porcentajes superior e inferior inmediatos al 50%.

Posteriormente, se obtuvo el punto final 50% al sumar el factor de dilución a la multiplicación del logaritmo de la base de la dilución por la distancia proporcional, todo esto expresado en el volumen en el que se realizó la dilución. Se realiza el ajuste para expresar DICC₅₀ por mililitro.

Análisis bioinformático

Se obtuvo la secuencia completa del gen UL27 que codifica para la glicoproteína B de IBR con número de acceso en el GenBank: JN787952.1 y la traducción a proteína a partir de esta secuencia con código de acceso en NCBI: AFB76670.1. Además, se realizó una recopilación de todos los epítomos reportados para la gB de IBR, para lo cual se utilizó la base de datos *The Immune Epitope Database* (www.IEDB.org). Fue utilizado el código 10320 referente a Bovine alphaherpesvirus 1 y posteriormente el antígeno *envelope glycoprotein B*.

Con base en un modelo de la glicoproteína B cristalizada del herpesvirus simplex, el cual pertenece a la misma subfamilia que el herpesvirus bovino tipo 1 o IBR, con código de acceso del banco de datos de proteínas 2GUM, se realizó el modelo de la proteína gB de IBR en el programa Chimera 1.11.2. Se determinaron los dominios de la proteína y se identificaron los epítomos reportados para esta.

Una vez seleccionada la región a clonar, se utilizó el programa ProtParam para determinar las características fisicoquímicas teóricas de la proteína recombinante como el número de aminoácidos, el peso molecular, el punto isoeléctrico, el coeficiente de extinción molar, el índice de inestabilidad, la vida media, el índice alifático y el índice hidropático.

Identificación del virus

La identificación del virus se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la que se amplificó un fragmento del gen que codifica para la glicoproteína E (gE) de IBR con condiciones previamente estandarizadas por el laboratorio de virología de la FMVZ-UNAM. Para esto, se realizó la extracción de DNA con el kit comercial QIAamp MiniElute Virus Vacuum™ (Qiagen, 57714) a partir del sobrenadante y la pastilla de células infectadas y no infectadas y empleando el kit comercial Zymo Quick DNA miniprep™ para la vacuna bovi-shield gold fp5 de Zoetis™. Se eluyó con 40

µl de agua libre de nucleasas. El procedimiento se realizó siguiendo las instrucciones de los fabricantes. El DNA obtenido fue cuantificado en un NanoDrop™.

La PCR se realizó utilizando un master mix Toptaq® (Qiagen, 200403) y los iniciadores: Forward 5'-GCC GTA CCA CTC CCA CGT AT-3' y Reverse 5'-CAC GTC TCG TAT ATG CGG ATG A-3'. El producto esperado fue de 150 pares de bases (pb). Las condiciones empleadas fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C 15 min y 35 ciclos de desnaturalización 95°C 30 s, alineamiento 56°C 30 s y extensión 72°C 1 min, seguidos de una extensión final a 72°C 5 min.

Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con SYBR® safe DNA gel stain (Invitrogen, S33102). Se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler 100bp DNA ladder (Thermo scientific, SM0241).

Extracción de plásmido

Las bacterias *E. coli* que contenían el vector pET-28b o pBAD-Myc/His fueron crecidas en medio Luria-Bertani (LB) (Dibico, 1236-E) adicionado con kanamicina 30 µg/ml (Amresco, 0408-10g). Se dejaron en incubación a 37°C y 150 rpm durante 24 h.

Una vez pasado este tiempo, se centrifugaron a 14000 rpm durante 2 min. Se descartó el sobrenadante y se trabajó con las pastillas obtenidas para realizar la purificación de los plásmidos, empleando el kit comercial Zyppy Plasmid miniprep™ (Zymo research, D4019) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Los plásmidos fueron cuantificados con un NanoDrop™ y visualizados en gel de agarosa al 1.8%.

Construcción de los plásmidos pET28UL27vac y pET28UL27vir

Se diseñaron los iniciadores para el fragmento del gen UL27 que codifica para el dominio II de la glicoproteína B (gB), con los sitios de restricción, *Bam*HI (Thermo scientific, FD0054) y *Bg*II (Invitrogen, IVGN019-6) para el forward y *Hind*III (Invitrogen, 15207-012) para el reverse (Cuadro 1). La amplificación se realizó utilizando un master mix Toptaq®. El DNA molde provenía tanto del virus de campo como de la vacuna. El producto esperado fue de 991 pb. Las condiciones empleadas fueron: desnaturalización inicial a 94°C 5 min y 35 ciclos de desnaturalización 94°C 1 min, alineamiento 63°C 1 min y extensión 72°C 1.5 min, seguidos de una extensión final a 72°C 10 min.

Cuadro 1. Iniciadores empleados para la amplificación del dominio II de la glicoproteína B de IBR

Iniciador	Secuencia*	Producto esperado	Vector en el que se clonó
fraggB- F <i>Bam</i> HI	5'-GTGGGATCCCTCGCGCCCGCGCG-3'	991pb	pET-28 (b)
fraggB-F <i>Bg</i> II	5'-GTGAGATCTCTCGCGCCCGCGCG-3'	991pb	pBAD/Myc-His (a)
fraggB- R <i>Hind</i> III	5'-CGGAAGCTTGGCCACGACAAAGCC-3'	991pb	Ambos

*La región subrayada corresponde a los sitios de restricción

Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5% y se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler 1Kb plus DNA ladder (Thermo scientific, SM1331). Se realizó su purificación a partir del gel de agarosa con el kit QIAquick gel extraction™ (Qiagen, 28706).

Posteriormente, se realizó la digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI, *Bg*II y *Hind*III para los productos de PCR y los plásmidos purificados. Se utilizaron los buffers correspondientes a cada enzima. Se realizó la mezcla de reacción para *Bam*HI o *Bg*II y se dejó incubando a 37°C durante 3 h. Posteriormente se purificaron las digestiones y se realizó nuevamente la mezcla de reacción para *Hind*III, se dejó incubando en las mismas

condiciones y se purificó. Se corrió un gel de agarosa al 1.5% con las digestiones purificadas a 100V durante 45 min.

La ligación se realizó mezclando 1 µg del plásmido digerido con 5 µg de los productos de PCR y 1 µl (5 U/µl) de la enzima T4 DNA ligasa (Thermo scientific, EL0011); esta mezcla se dejó incubando a 4°C durante 24 h.

La digestión enzimática tanto de los productos de PCR como de los plásmidos y las ligaciones, se purificaron mediante el kit QIAquick PCR purification™ (Qiagen, 28106) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se realizó la transformación de 50 µl de bacterias electrocompetentes One shot™TOP10 electrocom™ *E. coli*. (Invitrogen, C404052) con 50 ng de la ligación purificada empleando el equipo gene pulser Xcell de Bio-Rad™ a 2.5Kv.

Las bacterias transformadas se incubaron en 1 ml de medio SOC a 37°C durante dos horas, posteriormente fueron sembradas en agar LB suplementado con kanamicina 30 µg/ml. Se dejaron en incubación a 37°C durante 24 h.

Se realizó PCR de colonia con las condiciones e iniciadores para el fragmento de la gB. Para esto, se tomó con una punta estéril, una colonia y se resuspendió en 10 µl de agua libre de nucleasas. Se incubó a 90°C durante 15 min para la lisis de las bacterias y la liberación de los plásmidos. Se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min y se utilizaron 3 µl del sobrenadante como templado para la PCR. Se utilizó como testigo positivo el DNA de la vacuna y como testigo negativo, agua. Se mandó a secuenciar el inserto que contenían los plásmidos para verificar su correspondencia con el fragmento del gen UL27 de IBR.

Sobreexpresión de la proteína

Se transformó la cepa *E. coli* Rosetta (DE3) con el plásmido pET28UL27vir. Para esto, se crecieron las bacterias en 5 ml de medio LB durante 16 h a 37°C en agitación a 200 rpm. Después, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min a 4°C para obtener la pastilla de bacterias. Se resuspendió en 10 ml de solución de cloruros y se volvió a centrifugar con las mismas condiciones. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 5 ml de CaCl₂ 0.1M. Una vez obtenidas las bacterias quimio-competentes, se tomaron 300 µl y se agregaron 50 ng del plásmido pET28UL27vir y se incubaron durante 30 min en hielo, posteriormente se pasaron a baño maría a 42°C durante 30s y se colocaron de nuevo en hielo inmediatamente. Una vez transformadas se siguió el mismo procedimiento que las *E. coli* Top10™ hasta su almacenamiento.

Inducción de la producción de la proteína

Las bacterias transformantes se crecieron en medio LB-Km (30µg/ml) a 37°C en agitación a 200 rpm durante 16 h, posteriormente se realizó una dilución 1/50 en medio LB-Km (30µg/ml) y se dejaron en incubación a 37°C en agitación a 200 rpm. Se monitoreó su absorbancia con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a 0.6. En ese momento se indujo con Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) a concentración de 1 mM durante 4 h. Una vez concluido el tiempo de crecimiento, se obtuvo la pastilla bacteriana mediante centrifugación a 8500 rpm durante 15 min a 4°C. Se resuspendieron las bacterias en 1 ml de buffer de lisis del kit QIAexpress® Ni-NTA Fast Start (Qiagen, 30600) con 5 µl de una mezcla inhibidora de proteasas (Sigma, S8820) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma, 10837091001) a 1 mM. Se congelaron durante 30 min y se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 min a 4°C, se obtuvo el sobrenadante y se congeló hasta su uso.

Purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad

Para la purificación de la proteína inducida, se diluyó el sobrenadante en 4 ml de buffer de unión que contiene 20 mM de fosfato de sodio monobásico, 0.5 M de NaCl y 20 mM de imidazol, y se procesó mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) con una columna de afinidad Níquel-Sefarosa His Trap FF crude™ (GE Healthcare, 11000458). Se eluyó con buffer de elución con 500 mM de imidazol con un flujo de 1 ml por minuto y se recolectaron los eluatos en un volumen de 1 ml y se mantuvieron en congelación hasta su uso.

Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y Western blot (WB)

Las proteínas contenidas en los extractos crudos y eluatos fueron resueltas en geles de poliacrilamida al 8% y 12%, para la separación de las proteínas virales y de la proteína purificada, respectivamente. Se utilizó el marcador de peso molecular *precisión plus protein*™ dual color (Bio-Rad, 1610374). La electroforesis se realizó a 15 mA por gel durante 90 min, después las proteínas resueltas en gel fueron transferidas a una membrana de PVDF, en cámara húmeda durante 110 min a una corriente de 100 Volts. Posteriormente, se realizó el WB donde se utilizó como anticuerpo primario, un pool de sueros de bovinos identificados previamente como positivos a IBR mediante una ELISA comercial o un anticuerpo monoclonal anti-histidina-HRP (Santa Cruz Biotechnology, SC8036HRP) a una dilución 1/500 y 1/1000, respectivamente. Para el pool de sueros de bovinos se utilizó como anticuerpo secundario, anti IgG bovino-HRP a una dilución 1/150 000. Se reveló por quimioluminiscencia utilizando como sustrato Luminata™ Crescendo Western HRP (Merck Millipore, WBLUR0100) y SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo scientific, 34095).

RESULTADOS

Identificación del virus

Con el fin de obtener un testigo positivo para verificar la presencia del genoma de IBR y utilizarlo como control en todos los ensayos, se realizó la PCR a la vacuna bovi-shield gold fp5 de Zoetis™. El producto que se obtuvo fue un amplicón de 150 pares de bases (pb) correspondiente a un fragmento de la glicoproteína E (gE) de IBR (figura 3A). Además, para confirmar la inmunorreactividad de esta vacuna, se realizó un western blot utilizando como anticuerpo primario un grupo de sueros de campo determinados como positivos a IBR por una ELISA comercial. En la figura 3B, se observan bandas de proteínas reconocidas por los anticuerpos en los sueros de animales naturalmente infectados. Las proteínas presentes en la vacuna fueron de 100 kDa sugerente a la gB, otra entre 50 y 75 kDa y otra por debajo de los 50 kDa sugerentes a gC y gD, respectivamente. En el cuadro 2 se enlistan las principales glicoproteínas de IBR y su peso molecular (Barber *et al.* 2017).

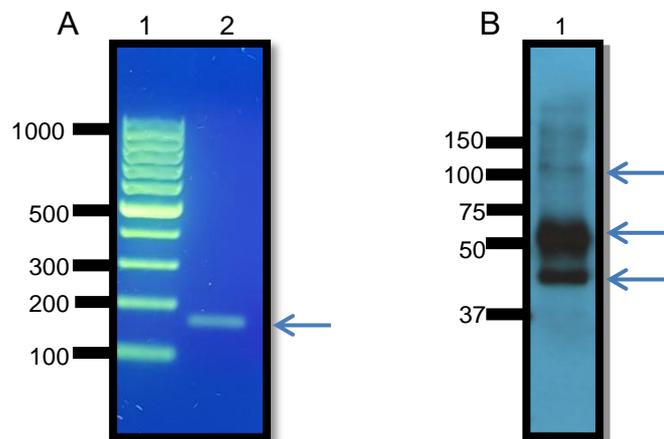


Figura. 3 Identificación del virus de IBR a partir de la vacuna comercial bovi-shield gold fp5 de Zoetis™. A) PCR que amplificó el fragmento de 150 pb del gen que codifica para la gE (flecha). Carril 1: Marcador de peso molecular 100pb, 2: DNA del virus vacunal. B) Western blot de la vacuna comercial para IBR enfrentada a un pool de sueros positivos a IBR. Carril 1: Vacuna comercial para IBR. Las flechas indican las tres proteínas detectadas.

Cuadro 2. Principales glicoproteínas de IBR y su peso molecular

Proteína	Peso molecular (kDa)
gB	101.9
gD	44.9
gC	55.4
gH	88.3
gG	46.6
gE	61.2
gI	39.6

Replicación del virus

Una vez obtenido el testigo positivo, se expandió el virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) en la línea celular Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) para utilizarlo como material biológico y obtener el DNA viral a partir de este. Las células fueron infectadas y revisadas cada 24 h para observar el efecto citopático característico del virus: agrupaciones celulares, lisis y formación de placas (figura 4).

Una vez pasadas las 96 h se cosechó y almacenó el virus a -80°C , posteriormente se realizó la técnica de Reed and Muench y se obtuvo el título viral de $1 \cdot 10^{5.92}$ DIC50% (Dosis infectante en cultivo celular al 50%).

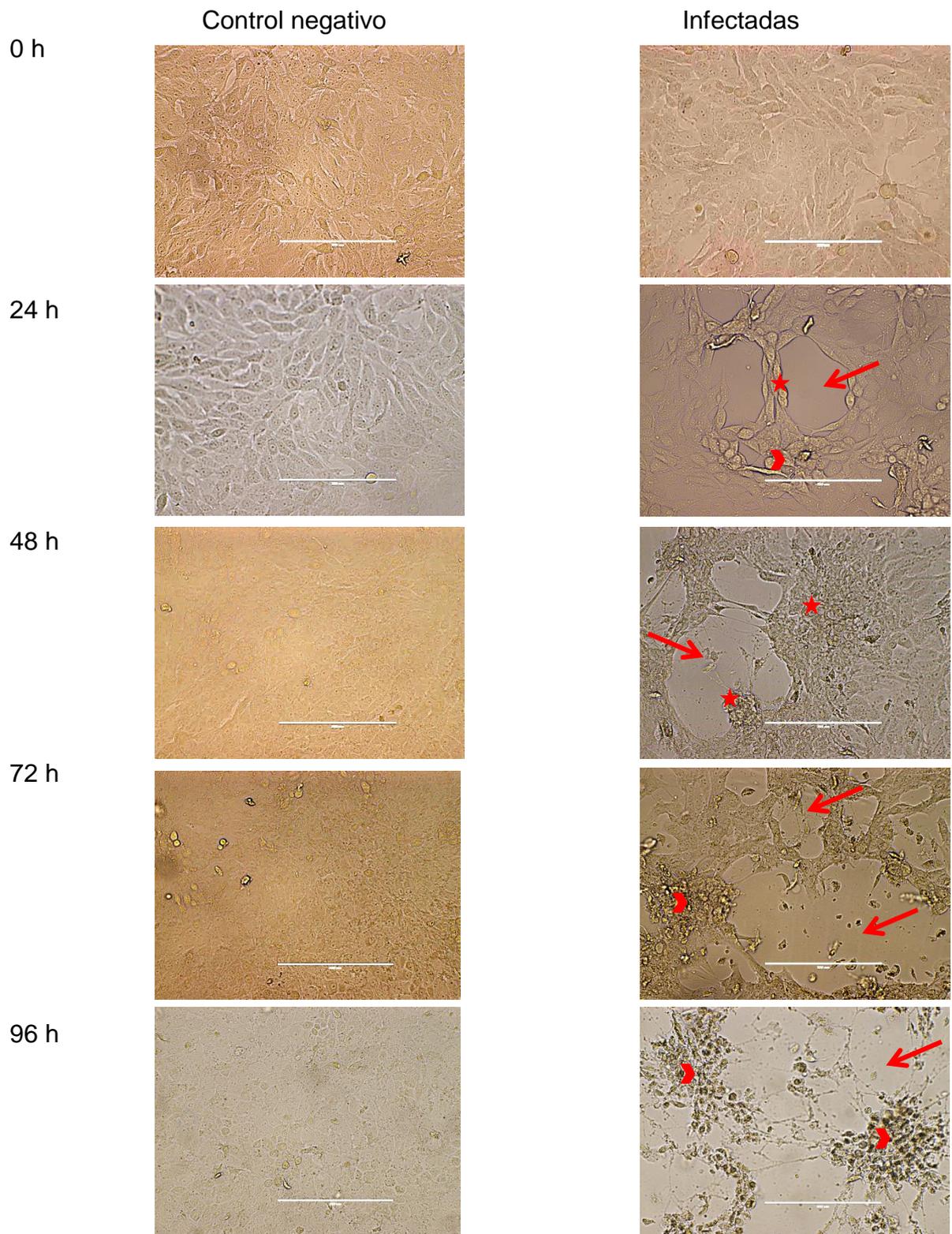


Figura 4. Infección de células MDBK con el virus IBR de campo. Columna izquierda: Células MDBK sin infectar. Columna derecha: Células infectadas con el virus IBR de campo. Se muestran a las 0, 24, 48, 72 y 96 h post-infección los efectos citopáticos: lisis y formación de placa (flechas), redondeamiento (estrellas) y agrupación celular (puntas de flecha).

Para confirmar la presencia del virus en el cultivo celular se realizaron las técnicas de PCR, SDS-PAGE y WB. En el caso de la PCR se obtuvo un fragmento de aproximadamente 150 pb para todas las muestras que demuestra la presencia de DNA del virus de campo de IBR. En contraste, los testigos negativos no dieron amplificación (figura 5A).

Para verificar la inmunorreactividad del virus se utilizó un grupo de sueros positivos a IBR y se realizó un WB al virus cosechado. Se utilizó la vacuna como testigo positivo (BoviShield gold fp5 de Zoetis™) y células MDBK como testigo negativo. En las figuras 5B y 5C se observa el gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie y el WB, respectivamente, en donde se aprecian diferentes bandas que sugieren la presencia de diferentes proteínas de IBR; para la vacuna, se observan bandas cerca de los 100 y 60 kDa sugerentes de la gB y gC, respectivamente; para el virus de campo se observan bandas cercanas a los 70 y 50 kDa sugerentes de la gE y gC, respectivamente. A pesar de la diferencia en el patrón de bandeado entre la vacuna y la cepa de campo, hay reconocimiento antigénico para ambas muestras por los sueros de animales infectados naturalmente.

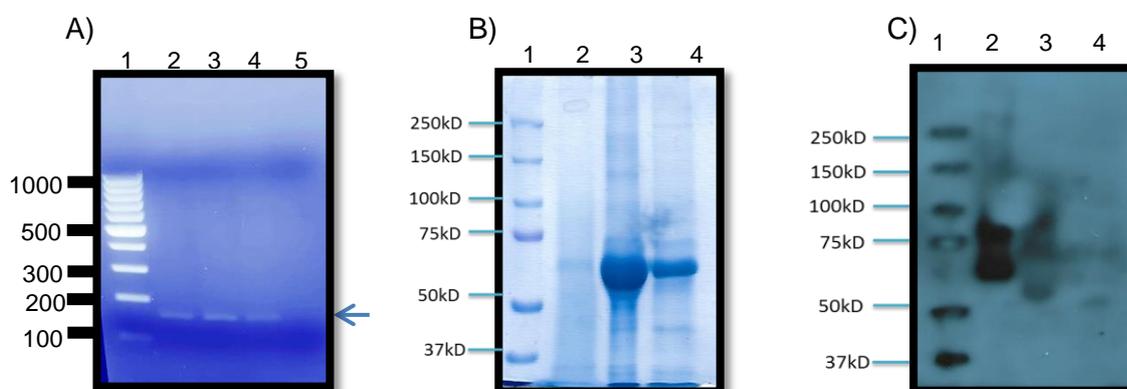


Figura 5 Verificación de presencia e inmunorreactividad del virus de campo replicado en cultivo celular. A) Amplificación del producto de 150 pb correspondiente al gen que codifica para la gE. Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb, 2: C+ DNA del virus vacunal, 3: Sobrenadante de las células MDBK infectadas con el virus de campo, 4: Pastilla de células MDBK infectadas con el virus de campo, 5: C-agua destilada. B) SDS-PAGE 8% teñido con azul de Coomassie Carril 1: Marcador de peso molecular 2: Vacuna comercial, 3: Sobrenadante de células MDBK infectadas con el virus de campo, 4: Células MDBK sin infectar C) Western blot de IBR de campo enfrentado a un pool de sueros positivos a IBR. Carril 1: Marcador de peso molecular 2: Vacuna comercial, 3: Sobrenadante de células MDBK infectadas con el virus de campo, 4: Células MDBK sin infectar.

Posteriormente, para seleccionar la región a clonar de la glicoproteína B, se realizó la recopilación bibliográfica para los epítomos de la gB de IBR como se

muestra en el cuadro 3. Asimismo, con base en la proteína gB cristalizada del herpesvirus simplex (figura 6), con código de acceso del banco de datos de proteínas 2GUM, que pertenecen a la misma subfamilia que BoHv-1, se realizó el modelo de la proteína gB de IBR en el programa Chimera 1.11.2 (figura 7).

En este modelo, se localizaron los epítomos del cuadro 3 así como los dominios que conforman la proteína. Con base en el número de epítomos y que algunos de ellos se localizaban sobre la superficie como 1F10 (figura 7A) y antígeno 8 (figura 7B) en el dominio II, que es una región extra viral, y que se encuentra alejada de la región transmembranal, se decidió que fuera ésta la región a clonar; para prever un mejor plegamiento de la proteína recombinante, se decidió clonar todo el dominio II como se muestra en la figura 7C.

Cuadro 3: Epítomos reportados de la glicoproteína B del herpesvirus bovino tipo 1 y sus características

Epítomo	Región	Secuencia	Posición	Núm. Aminoácidos	Referencia
H233	Ala315-Arg328		315-328	14	Heldwein, E.E. <i>et al.</i> , 2006.
H126	Tyr 303		303	1	
H1375	Arg304		304	1	
B4	Glu305		305	1	
H1435	His308		308	1	
B2 y B5	Gly594		594	1	
H1838	Ala390-Gly410		390-410	21	
H1781	Pro454-Ser473		454-473	20	
SS106 y SS144	Ser697-Ala725		697-725	29	
ITC48 e ITC52	Pro593-Val602		593-602	10	
ITC63B e ITC63C	Ala629-Thr642		629-642	14	
7-17	Glu631-Val648		631-648	18	
	Y265-T268	YGTT	265-268	4	
	Q332-V352	QQIEGYKRD MATGRRLKEPV	332-352	21	
	Y338-D341	YKRD	338-341	4	
1F10		KWREADEMLRDESRGNFRFT ARLSATFVSDSHTFALQNVPL SDCVIEEAEAAVERVYRER	380-440	61	Levings, R.L. <i>et al.</i> , 2015.
8		QQIEGYKRD MATGRRLKEPV	331-352	22	Gao, Y., Wang, C. & Splitter, G.A., 1999.
20		YLQELARSNGTLEGLFAAAAAP	475-496	22	
21		EGLFAAAAAPKPGRRARRAAP	487-508	22	

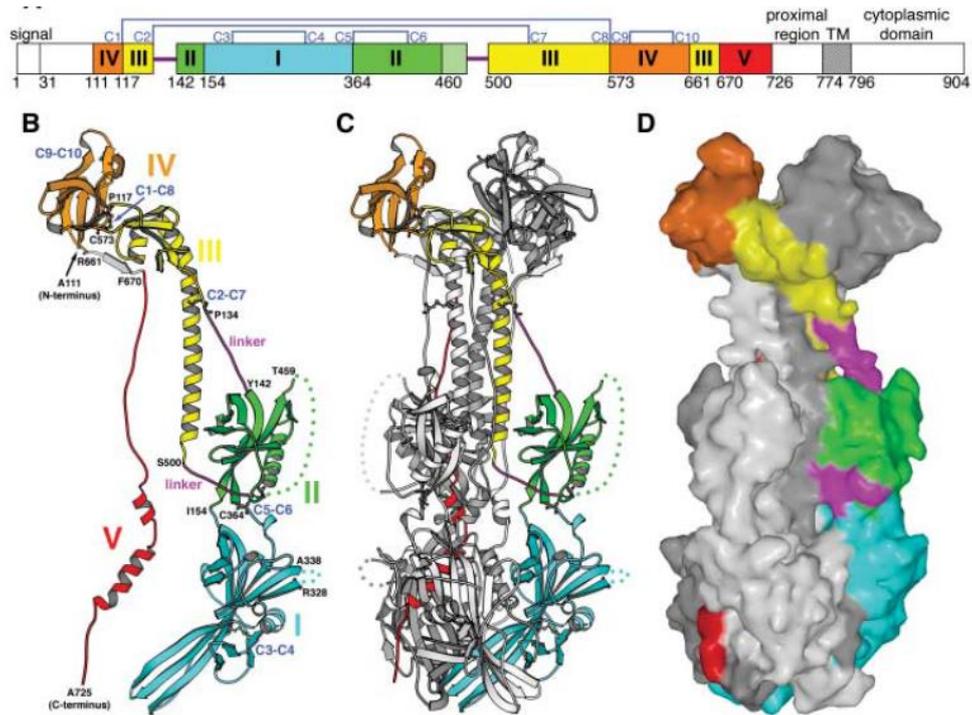


Figura 6 Modelo cristalizado del ectodominio de la glicoproteína B del herpes simplex 1. Tomado de Heldwein, E.E. *et al.*, 2006. Crystal Structure of Glycoprotein B from Herpes Simplex Virus 1. *Science*, 313(5784), pp.217–220. Código de acceso del protein data bank (PDB) 2GUM.

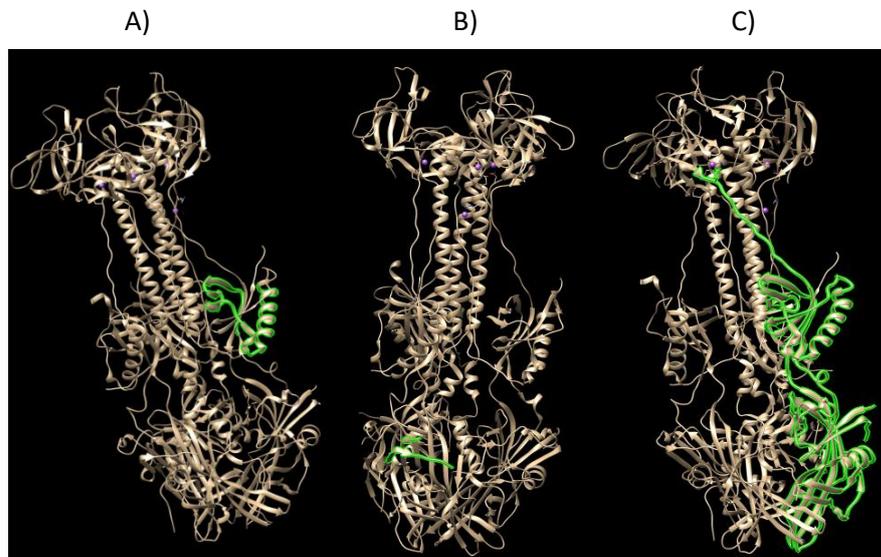


Figura 7. Modelo de la glicoproteína B de IBR con el programa Chimera 1.11.2. Código de acceso de NCBI: AFB76670 con base en la glicoproteína B de herpesvirus simplex Código de acceso PDB: 2GUM. A) Epítipo 1F10 marcado en verde. B) Epítipo 8 marcado en verde. C) Dominio II con los epítipos seleccionados marcado en verde.

Una vez seleccionada la región a clonar, que va del residuo Leu142 al residuo Phe460, se determinaron sus características fisicoquímicas teóricas mediante el programa ProtParam las cuales se muestran en el cuadro 4.

Cuadro 4: Características físico-químicas del dominio II de la glicoproteína B de IBR

Característica	Fragmento gB de IBR
Número de aminoácidos	322
Residuos cargados negativamente	39 (Asp+Glu)
Residuos cargados positivamente	42(Arg+Lys)
Peso molecular	36.55 kDa
Punto isoeléctrico (PI)	8.47
Vida media	5.5 h <i>in vitro</i>
Índice de inestabilidad	40.56
Índice alifático	70.59
Hidrofobicidad (GRAVY)	-0.496

Una vez teniendo las características de la proteína a clonar y que confirmamos la presencia de proteínas inmunodominantes a partir del virus de campo aislado, se clonó el fragmento del gen UL27 que codifica para el dominio II de la glicoproteína B de IBR. Para ello se usaron los plásmidos pET-28b y pBAD/Myc-His, cuyo mapa se observa en la figura 8. Se purificaron los plásmidos a partir de *E. coli* y se corrió un gel de agarosa para evidenciar su pureza. En la figura 9, se observan tres bandas sugerentes a plásmidos circulares debido a sus distintas conformaciones.

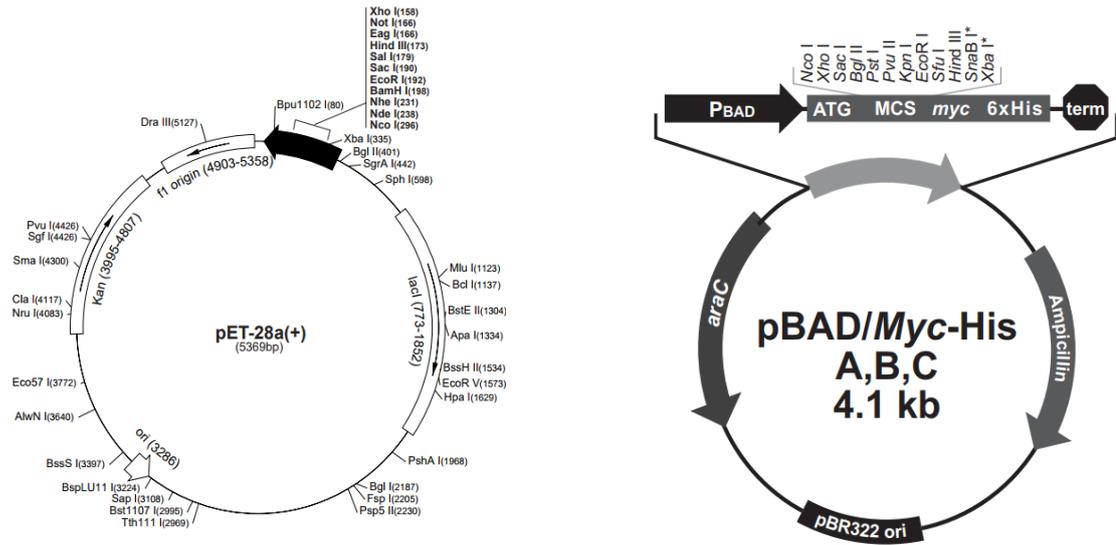


Figura 8 Representación esquemática de los mapas de los vectores pET-28 y pBAD

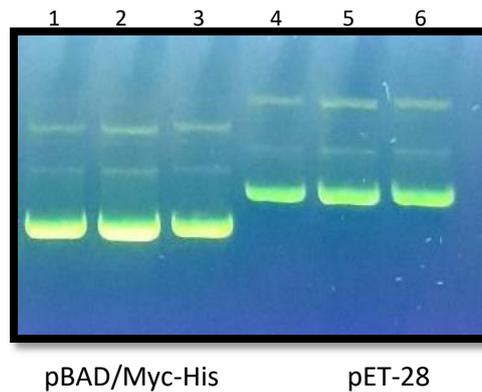


Figura 9. Purificación de los plásmidos pBAD/Myc-His y pET-28. Carriles 1-3: pBAD/Myc-His, 4-6: pET-28

Como se indicó en la sección de metodología, para la PCR se utilizaron oligonucleótidos que agregan los sitios de restricción necesarios para la clonación en el vector pET-28b y en el vector pBAD/Myc-His (Cuadro 1). Como templado se utilizó el DNA vacunal y se realizó un gradiente de temperatura para establecer las condiciones óptimas. En la figura 10 se observan bandas en un gel de agarosa de aproximadamente 991 pb. Una vez que definimos que la temperatura ideal para ambos pares de iniciadores fue de 63°C, se realizó la extracción de DNA del virus aislado de campo para realizar el mismo procedimiento. En la figura 11 se muestra una banda de aproximadamente 991pb tanto para el DNA obtenido de la vacuna como del virus cosechado para ambos pares de iniciadores.

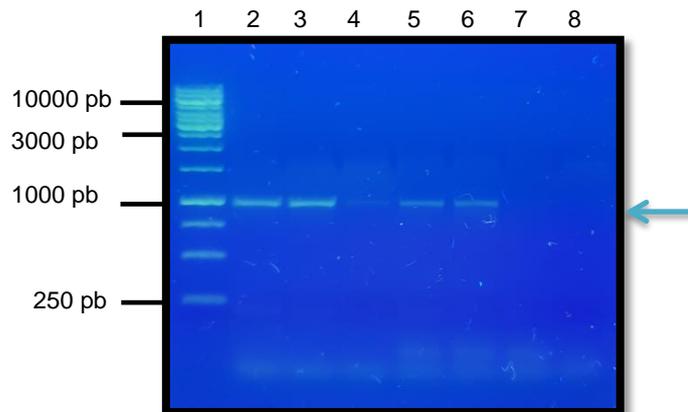


Figura 10. Estandarización de la PCR para la amplificación del fragmento del gen que codifica para gB de IBR correspondiente al dominio II. Producto esperado de 991pb. Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb; carriles 2, 3 y 4: DNA vacunal utilizado con los iniciadores que contienen los sitios de restricción para *Bam*HI (Fw) y *Hind*III (Rv); carriles 5, 6 y 7: DNA vacunal utilizado con los iniciadores que contienen los sitios de restricción para *Bgl*II (Fw) y *Hind*III (Rv); carril 8: C- Agua destilada. Gradiente de temperatura: carriles 2 y 5: 61°C; carriles 3 y 6: 63°C; carriles 4 y 7: 65°C; carril 8: 63°C.

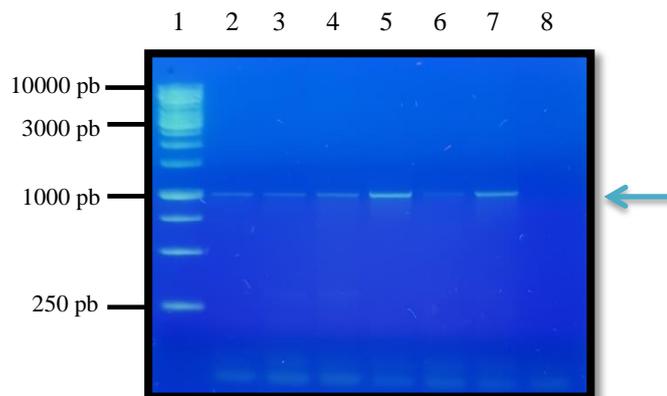


Figura 11. Amplificación por PCR del fragmento del gen que codifica para gB de IBR correspondiente al dominio II. Producto esperado de 991 pb. Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb; carril 2: DNA vacunal utilizado con los iniciadores que contienen los sitios de restricción para *Bam*HI (Fw) y *Hind*III (Rv); carriles 3 y 4: DNA del virus de campo utilizado con los iniciadores que contienen los sitios de restricción para *Bam*HI (Fw) y *Hind*III (Rv); carril 5: DNA vacunal utilizado con los iniciadores que contienen los sitios de restricción para *Bgl*II (Fw) y *Hind*III (Rv), carriles 6 y 7: DNA del virus de campo utilizado con los iniciadores que contienen los sitios de restricción para *Bgl*II (Fw) y *Hind*III (Rv), carril 8: C- Agua destilada.

Los fragmentos amplificados fueron purificados (figura 12) y digeridos junto con los vectores, con las enzimas de restricción según correspondía: *Bam*HI/*Hind*III o *Bgl*II/*Hind*III. Se corrió un gel únicamente con los plásmidos digeridos para observar la linealización de estos (pET-28: 5.3Kb y pBAD: 4.1Kb) (figura 13).

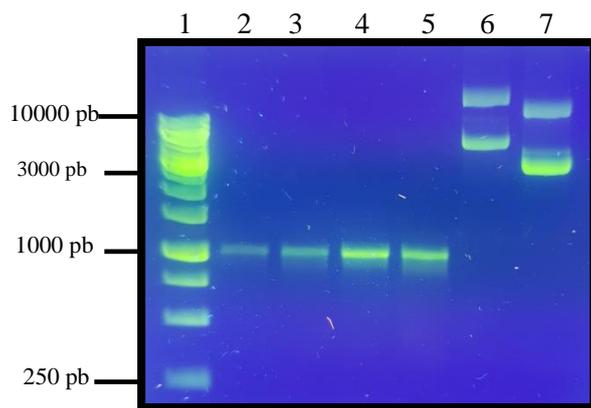


Figura 12. Purificación de los productos de PCR y plásmidos. Gel de agarosa 1.5%. Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb, carril 2: : DNA vacunal utilizado con los iniciadores que contienen los sitios de restricción para *Bam*HI (Fw) y *Hind*III (Rv); carril 3: DNA del virus de campo utilizado con los iniciadores que contienen los sitios de restricción para *Bam*HI (Fw) y *Hind*III (Rv); carril 4: DNA vacunal utilizado con los iniciadores que contienen los sitios de restricción para *Bgl*II (Fw) y *Hind*III (Rv), carril 5: DNA del virus de campo utilizado con los iniciadores que contienen los sitios de restricción para *Bgl*II (Fw) y *Hind*III (Rv), carril 6: pET-28, carril 7: pBAD/Myc-His.

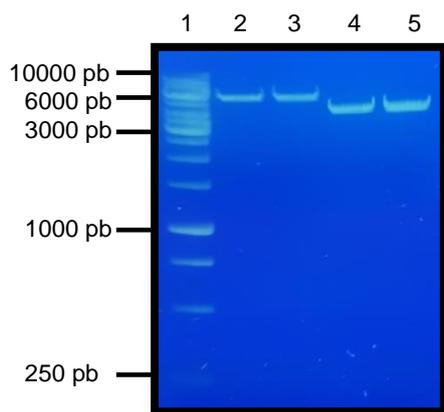


Figura 13. Digestión enzimática de los plásmidos. Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb, carriles 2 y 3: pET-28, carriles 4 y 5: pBAD/Myc-His.

Se realizó la ligación de los plásmidos con su respectivo producto de PCR digerido, y las ligaciones ya purificadas se transformaron en bacterias electrocompetentes *E. coli* TOP10™. Solo se obtuvieron colonias transformantes con el plásmido pET-28. Para comprobar que los plásmidos contenían el fragmento de la gB de IBR, se realizó PCR a todas las colonias bacterianas presentes en el agar. Se utilizó el DNA vacunal como testigo positivo y agua destilada como testigo negativo. En la figura 14 se observa que 6 de 7 clonas transformadas con plásmido clonado con el fragmento del gen que codifica para el dominio II de gB del virus de campo y 14 de 24

clonas transformadas con plásmido clonado con el DNA vacunal tienen el fragmento de la gB.

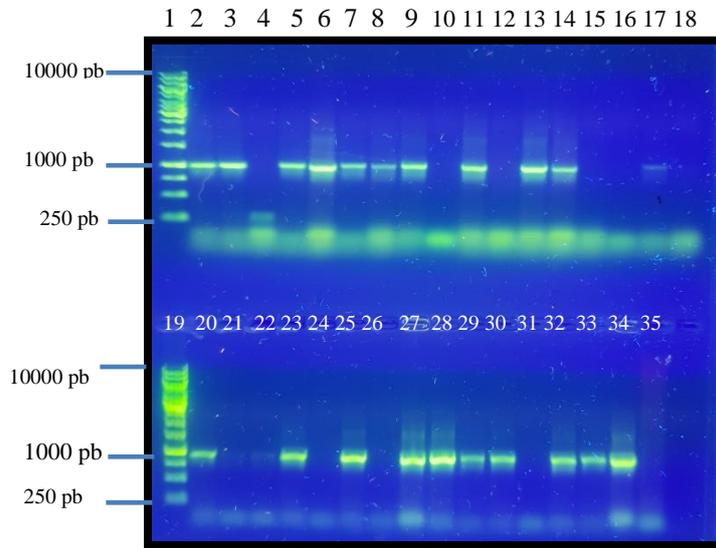
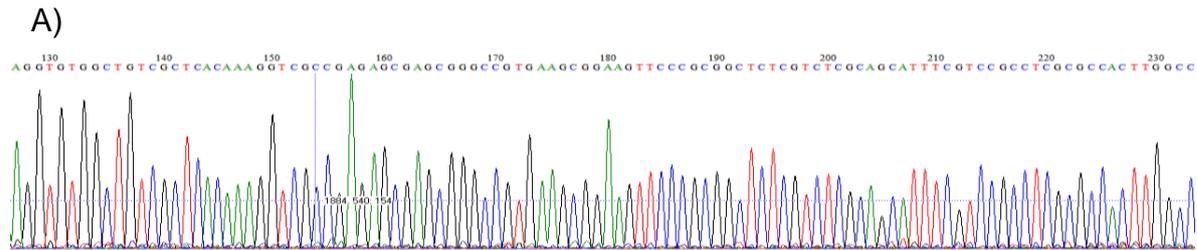


Figura 14. PCR de colonia de *E. coli* Top10 transformadas con el plásmido que contiene el fragmento del gen de gB de IBR. Producto esperado 991 pb. Carriles 1 y 19: Marcador de peso molecular 1Kb; carriles 2-8: Transformantes pET-28UL27Vir; carriles 9-33: pET-28UL27Vac; carril 34: C+ DNA vacunal; carril 35: C- Agua destilada.

Para constatar que los fragmentos se hubieran clonado bien en el vector y correspondieran al gen UL27 o gB de IBR, los plásmidos se purificaron y fueron enviados a secuenciación, empleando los mismos iniciadores con los que se amplificaron el inserto. En la figura 15, se observa un fragmento del electroferograma en donde se muestra la secuencia de los insertos. Las secuencias fueron sometidas a un análisis de “blast n” en la base de datos del NCBI y los porcentajes de identidad que mostraron fueron del 99 y 100% con diferentes cepas de herpesvirus bovino tipo 1, así como con el gen que codifica para la gB. De igual manera, se identificó que no había diferencia entre la secuencia a partir de la vacuna con la secuencia a partir del virus de campo.



B)

	Descript	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
	Bovine herpesvirus type 1.1 complete genome	1829	1829	100%	0.0	100%	AJ004801.1
	Bovine herpesvirus type 1 UL22-35 genes	1829	1829	100%	0.0	100%	Z78205.1
	Bovine herpesvirus type 1 glycoprotein 1 gene, complete cds	1829	1829	100%	0.0	100%	M21474.1
	Bovine alphaherpesvirus 1 isolate 216 II, complete genome	1823	1823	100%	0.0	99%	KY215944.1
	Bovine alphaherpesvirus 1 culture ATCC:VR-188 strain Los Angeles, complete genome	1814	1814	100%	0.0	99%	MF421714.1

Figura 15. Secuenciación del inserto clonado en el vector correspondiente al fragmento de la gB de IBR. A) Electroferograma. B) Secuencias de la gB de IBR con 100% de similitud con la proteína gB clonada en este estudio.

Una vez confirmada la presencia del plásmido con el inserto en la cepa *E. coli* Top10™, se realizó la transformación de la cepa *E. coli* Rosetta™ (DE3) con el plásmido para la sobreexpresión de la proteína.

Para el crecimiento de las bacterias y la inducción de la proteína se utilizaron únicamente las clonas que contenían el DNA del virus de campo. Se realizó su crecimiento y se realizó la inducción con 1 mM de IPTG. En la figura 16A se observa el gel teñido con azul de Coomassie donde se identifica una banda de mayor intensidad para el sobrenadante del cultivo de las bacterias inducidas que para el sobrenadante de las bacterias control. En la figura 16B se observa reconocimiento de la proteína con el anticuerpo antihistidina HRP en una banda cercana a los 37 kDa y una banda de menor intensidad por debajo de 20 kDa en el sobrenadante de las bacterias inducidas. Por otro lado, en la figura 16C, no se observa reconocimiento por parte del pool de sueros de campo positivos a IBR a alguna proteína de 37 kDa. Por lo anterior, al inducir las bacterias con IPTG hay una sobreexpresión de la proteína recombinante que es reconocida por anticuerpos antihistidina.

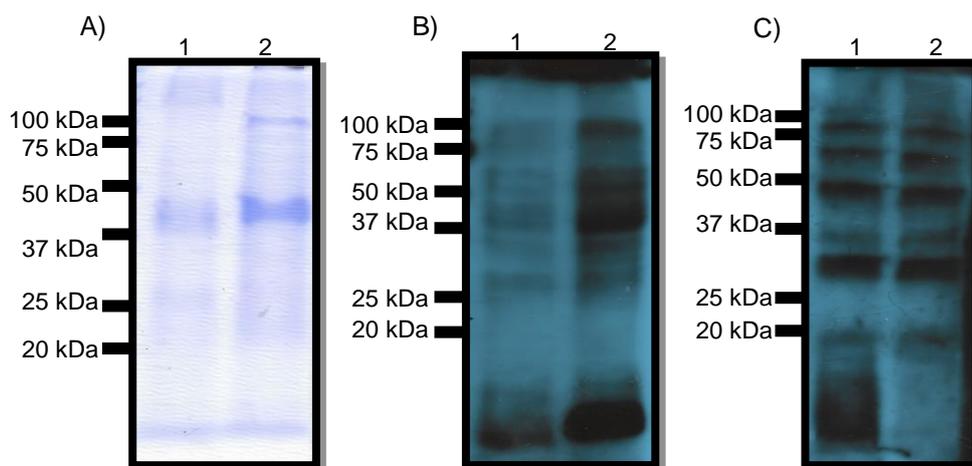


Figura 16 Inducción de la proteína recombinante del dominio 2 de gB de IBR. A) SDS-PAGE 15% teñido con azul de Coomassie, carril 1: sobrenadante del cultivo de bacterias control no inducidas, carril 2: sobrenadante del cultivo de bacterias inducidas. B) Western blot enfrentado a anticuerpo antihistidina-HRP, carril 1: sobrenadante del cultivo de bacterias control no inducidas, carril 2: sobrenadante del cultivo de bacterias inducidas. C) Western blot enfrentado a anticuerpos a partir de un pool de sueros de bovinos de campo positivos a IBR, carril 1: sobrenadante del cultivo de bacterias control no inducidas, carril 2: sobrenadante del cultivo de bacterias inducidas.

Se realizó la purificación de la proteína recombinante mediante FPLC; se obtuvieron las diferentes fracciones como se muestra en el cromatograma en la figura 17 y se sometieron a SDS-PAGE 15% y WB. En la figura 18A se observa el gel teñido con azul de Coomassie donde se evidencia la presencia de una banda de mayor intensidad para la proteína purificada en un peso cercano a los 37 KDa. Al realizar el WB con un anticuerpo antihistidina-HRP (figura 18B) se observa reconocimiento de dos bandas de proteína de 37 kDa y por debajo de los 20 kDa. Esta última proteína es probablemente el producto de una escisión de la proteína de 37 KDa. Por otro lado, al enfrentarlo a sueros de bovinos positivos a IBR (figura 18C), no se reconoce ninguna banda en la muestra de proteína purificada.

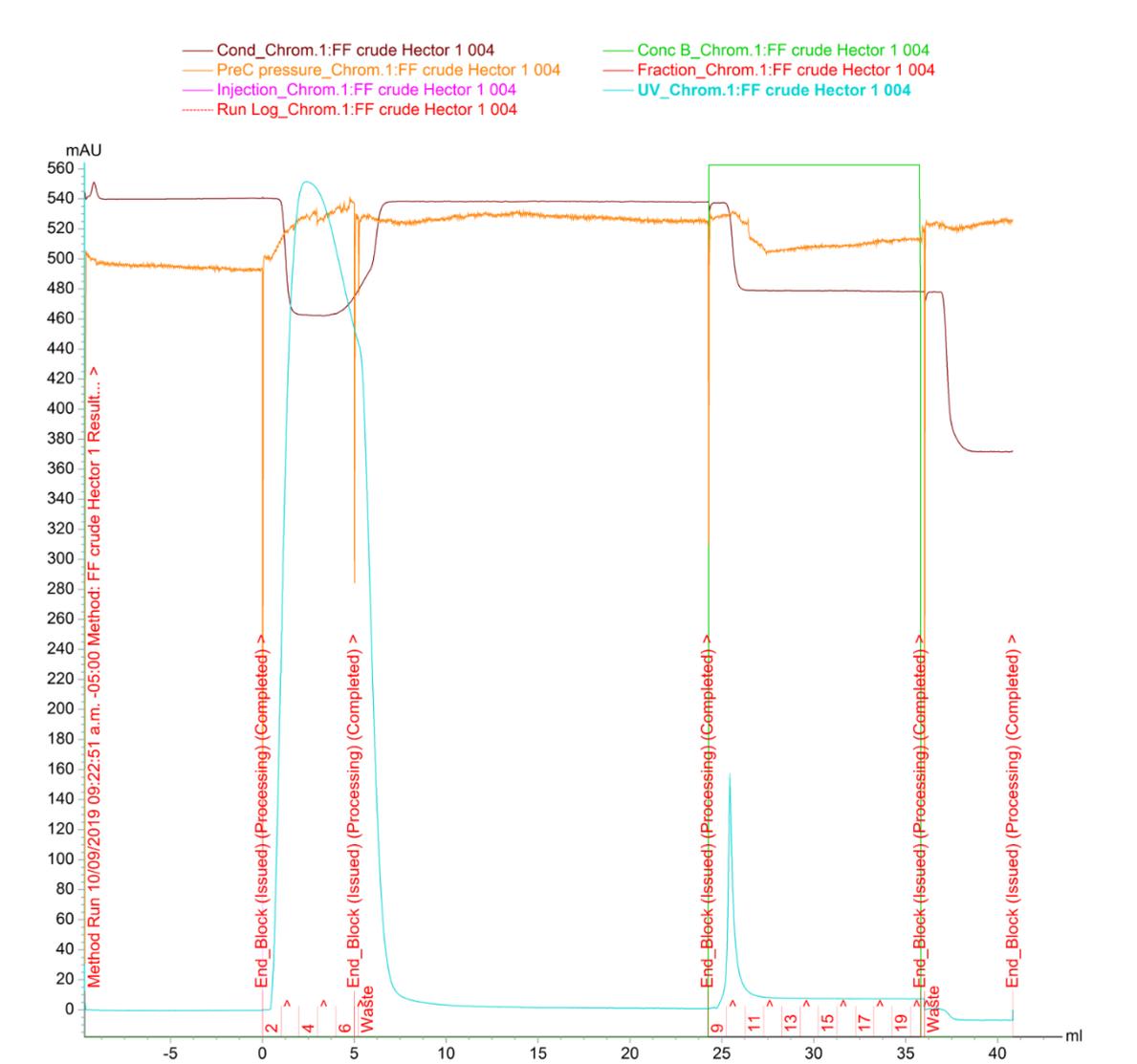


Figura 17 Cromatograma de la purificación de la proteína recombinante del fragmento gB de IBR

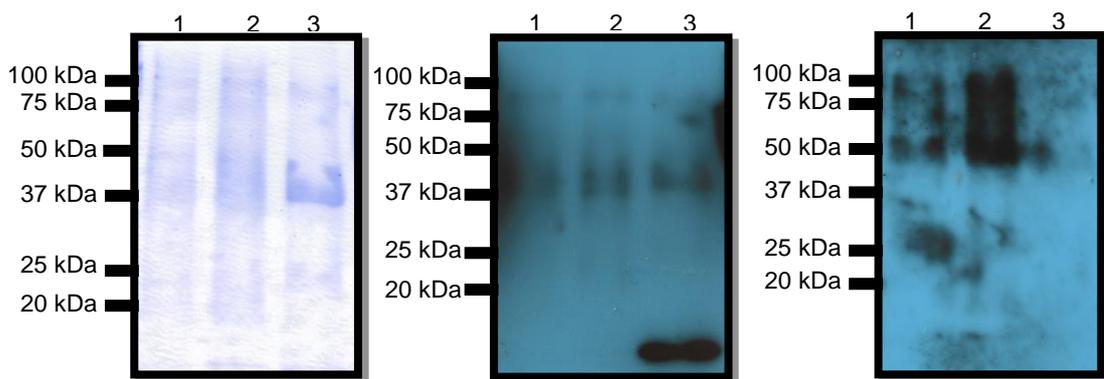


Figura 18 Detección del fragmento de la proteína recombinante purificada de gB de IBR. A) SDS-PAGE 15% teñido con azul de Coomassie, carril 1: sobrenadante del cultivo de bacterias inducidas no purificado, carril 2: fracción 4 FPLC, carril 3: Eluido de la proteína purificada. B) Western blot enfrentado a anticuerpo antihistidina-HRP, carril 1: sobrenadante del cultivo de bacterias inducidas no purificado, carril 2: fracción 4 FPLC, carril 3: Eluido de la proteína purificada. C) Western blot enfrentado a anticuerpos a partir de un pool de sueros de bovinos de campo positivos a IBR, carril 1: sobrenadante del cultivo de bacterias inducidas no purificado, carril 2: fracción 4 FPLC, carril 3: Eluido de la proteína purificada.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se construyó una proteína recombinante del dominio II de la glicoproteína B del alfaherpersvirus bovino tipo 1, a partir de un virus de campo. La proteína se produjo en *E. coli* con el vector de expresión pET-28b, que le confiere a la proteína un marcaje de histidinas que facilita su reconocimiento y purificación.

Se clonó el dominio II de la glicoproteína B porque en ella se han determinado diferentes epítomos tanto lineales como conformacionales que se asocian con anticuerpos neutralizantes (Heldwein *et al.* 2006). El dominio II es el responsable de la unión del virión que al fusionarse genera un cambio conformacional para el ingreso del virus a la célula (Cooper and Heldwein, 2015).

El dominio II comprende dos segmentos discontinuos, el primero del aminoácido leucina 142 a la asparagina 153 y el segundo de la cisteína 364 a la fenilalanina 460 con un motivo barril β de seis hebras en su centro y un bucle que se encuentra en el margen exterior del dominio. Todo el dominio I se inserta entre la primera y la segunda cadena β del dominio II. Se han identificado epítomos capaces de generar anticuerpos neutralizantes en los dominios I y II como se muestra en el cuadro 3 de este trabajo.

Para la identificación de los epítomos se han utilizado diferentes técnicas. Una de ellas es el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos a un solo aminoácido (Ala315 y Arg328 (mAb H233), Tyr303 (mAb H126), Arg304 (mAb H1375), Glu305 (mAb B4) e His308 (mAb H1435)) (Heldwein, 2006), o a péptidos que contienen epítomos conformacionales, como 1F10 que comprende del residuo Lys380 al Arg440 (Levings *et al.* 2015), o epítomos lineales, como el comprendido del residuo Gln331 al Val352 (péptido 8) (Gao *et al.* 1999). Otra técnica se basa en el mapeo de péptidos usando ensayos de inmunoadsorción enzimática (ELISA), como en el caso de los residuos Ala390 a Gly410 (mAb H1838) (Heldwein, 2006).

Por otro lado y para conocer la viabilidad de la producción de este fragmento de la glicoproteína B recombinante en un sistema bacteriano, se calcularon *a priori*, sus características físico-químicas *in silico*. Estas características fueron el número de aminoácidos, el peso molecular, los residuos cargados tanto positiva como negativamente, el punto isoeléctrico, la vida media, el índice de inestabilidad, el índice alifático y la hidrofobicidad de la molécula.

El fragmento que se clonó de la glicoproteína B de IBR consta de 322 aminoácidos con 39 residuos cargados negativamente y 42 cargados positivamente con un peso molecular de 36.55 kDa y que posee una estructura terciaria dándole complejidad a la molécula. También se determinó el punto isoeléctrico (PI) de 8.47 y se calcularon la vida media, el índice de inestabilidad y el índice alifático los cuales fueron de 5.5 h *in vitro*, 40.56 y 70.59, respectivamente y por último el grado de hidrofobicidad que fue de -0.496.

Las proteínas se consideran como los inmunógenos más potentes por lo que pueden desencadenar una buena respuesta inmune y por lo tanto pueden ser reconocidas por los anticuerpos, sin embargo, deben cumplir con ciertas características como pesar más de 10 kDa y tener una estructura compleja (Pavón *et al.*, 2016). La proteína generada en este trabajo consta de 322 aminoácidos y pesa 36.55 kDa, además de tener una estructura terciaria lo que la hace idónea para probarla como antígeno en una prueba diagnóstica.

Además de que se considere como buen antígeno, debe ser fácil de producir y escalable por lo que se determinaron otras características como el punto isoeléctrico, la vida media, el índice de inestabilidad, el índice alifático y el grado de hidrofobicidad, que nos dan información de que tan viable es su producción *in vitro*, su posterior purificación y uso.

El PI se define como el pH en el que la proteína tiene carga neta de cero. Esta proteína tiene carga neta positiva y carácter básico en condiciones de pH fisiológico, esto se debe a que a menor pH (comparado con su PI) hay una mayor concentración de iones H⁺ en el medio por lo que se unen a los

aminoácidos negativos confiriéndole esta característica. Este valor nos permitiría realizar una cromatografía de intercambio iónico o un isoelectroenfoco para una purificación debida a la carga neta de la proteína (Ashokan, 2008). Además, cuando las proteínas se encuentran en una solución con un pH cercano a su PI se vuelven menos solubles y pueden precipitar por lo que es importante para su tratamiento utilizar los buffers adecuados.

Se obtuvieron los valores de vida media, índice de inestabilidad, índice alifático y grado de hidrofobicidad para evaluar si la proteína podría ser producida *in vitro* y posteriormente utilizada como antígeno. La vida media calculada fue de 5.5 h que es la predicción del tiempo que toma en que la mitad de la concentración de la proteína pierda su función después de ser producida. Esto nos indica que la proteína podría ser degradada en poco tiempo después de su producción por lo que la purificación, el almacenaje y uso debería de realizarse enseguida de su producción. Aunado a esto, el índice de inestabilidad provee un estimado de la estabilidad de la proteína *in vitro* a las condiciones del medio y se considera como una proteína inestable cuando se obtenga un valor mayor a 40. En este caso, el índice de inestabilidad fue de 40.56 por lo que se considera inestable.

Por otro lado, el índice alifático que se obtuvo fue de 70.59 y es definido como el volumen relativo ocupado por cadenas alifáticas (que no producen anillos) determinadas por los residuos Ala, Val, Iso y Leu, que le otorgan termoestabilidad cuando se encuentra la proteína en forma globular. A mayor valor en este índice, mayor estabilidad en el medio debido a variaciones de temperatura por lo que la proteína se considera termoestable. Además, la proteína presenta 39 residuos de aminoácidos cargados negativamente (ácido aspártico y ácido glutámico) y 42 cargados positivamente (Arginina y lisina), estos aminoácidos permiten la interacción con el medio, lo que favorece la solubilidad de la proteína. También fue calculado el valor GRAVY que determina el grado de hidrofobicidad de la proteína el cual fue de -0.496. Al obtener un dato negativo en este parámetro, se determina la proteína como hidrofílica. Esto está dado por la presencia de grupos polares en las

cadena laterales localizadas en la superficie de las proteínas por lo que se favorece su solubilidad (Gasteiger *et al.*).

Por lo anterior, esta proteína puede ser considerada un buen antígeno debido a su tamaño, peso y complejidad, se considera termoestable e hidrofílica lo que favorecería su producción en el cultivo bacteriano, sin embargo tiene una vida media corta. Con estos datos podemos inferir que la proteína puede ser producida *in vitro* y que se podría purificar mediante diferentes técnicas y utilizarse como antígeno en un sistema diagnóstico.

A pesar de que los sistemas bacterianos no son los recomendados para la producción de proteínas recombinantes de virus, en este trabajo se pudo generar una proteína recombinante a partir de un virus de campo en un sistema de expresión bacteriano *E. coli*. Así mismo, se han construido algunas proteínas virales en este sistema las cuales han sido funcionales, como lo demuestran Tan *et al.* (2004), quienes expresaron una proteína recombinante del Norovirus en *E. coli* la cual demostró ser reconocida por sueros con anticuerpos contra las proteínas de cápside del norovirus y demostró no tener diferencias antigénicas con la proteína recombinante expresada en baculovirus. Por otra parte, Chiu *et al.* (2003) desarrollaron la proteína recombinante E del virus del dengue, demostrando que tiene la capacidad de bloquear la infección de las células con el virus al interactuar con su receptor, manteniendo así su función. De igual manera, Chen *et al.* (2006) desarrollaron una prueba de ELISA utilizando una proteína recombinante de nucleocápside de henipavirus donde observaron que reconocía los sueros infectados experimentalmente, así como sueros de campo positivos al agente. En el caso de la glicoproteína B de IBR, Chandranaik *et al.* (2014) la produjeron en un sistema bacteriano con *E. coli*, sin embargo, se utilizó únicamente para realizar análisis filogenéticos, por lo que no se conoce si la generación de esta proteína recombinante es antigénica y pueda ser reconocida por anticuerpos de animales infectados con el virus.

Por otro lado, se han producido fragmentos recombinantes específicamente de la glicoproteína B de IBR mediante sistemas eucariontes como el producido por Gao *et al.* (1999) donde utilizan el sistema de baculovirus para expresar la proteína, e identifican un fragmento del dominio II y III de los aminoácidos 254 al 532 como la región antigénica y activadora de la respuesta inmune celular. Además, identificaron epítomos lineales que eran reconocidos por anticuerpos monoclonales en los dominios II y III de la proteína. Por su parte, Fitzpatrick *et al.* (1988) transfectaron células LMTK de ratón con la proteína recombinante gB de IBR y observaron que el reconocimiento de esta proteína por anticuerpos monoclonales era indistinto entre la producida en este sistema y la producida en células infectadas con el virus. Además, demostraron que no hay diferencia en el reconocimiento a pesar de las diferencias en los patrones de glicosilación. Leary *et al.* (1992) clonaron un fragmento de la gB en células de osteosarcoma canino y en células MDBK; ambas mostraron un patrón de glicosilación similar, además de generar respuesta tanto celular como humoral. En este trabajo se produjo un fragmento del dominio II de la gB de IBR en un sistema bacteriano el cual no debería generar diferencia para su reconocimiento debido al tipo de producción como lo mencionan los estudios descritos previamente.

La proteína recombinante que se construyó en este trabajo, fue reconocida por los anticuerpos antihistidina en un peso cercano a los 37 kDa, sin embargo, la proteína no fue reconocida por los sueros de animales de campo positivos a IBR. Algunas posibilidades para explicar esto es que el plegamiento incorrecto de la proteína, la degradación proteolítica o la formación de agregados insolubles de proteínas no nativas conocidas como cuerpos de inclusión, interfieren con la función biológica (Baneyx and Mujacic, 2004). En el trabajo de Li *et al.* (1993), observaron que el uso de una vacuna recombinante, que expresa la proteína circumsporozoita del parásito de la malaria, no logró inducir protección al inocularla en roedores.

En este trabajo no se evidenció la actividad inmunogénica de la proteína en estructura terciaria, por lo que no se descarta el reconocimiento por los sueros de campo cuando la proteína se encuentra en estado nativo. En el

trabajo de Levings *et al.* (2015) demuestran el reconocimiento de epítomos conformacionales con anticuerpos monoclonales mediante virus neutralización o ensayo indirecto con anticuerpos fluorescentes (IFA por sus siglas en inglés), sin embargo, no obtienen reconocimiento con los anticuerpos monoclonales mediante una ELISA al desnaturalizar la proteína. Otro hecho a considerar para explicar nuestros resultados, es que se trabajó con geles SDS-PAGE en los que el estado de las proteínas resueltas es lineal, por lo que el reconocimiento antigénico puede no ser óptimo y por lo tanto no se logra ver una señal al interactuar con los anticuerpos presentes en la muestra de animales seropositivos.

Además, la posibilidad de un corte proteolítico como se sugiere en las figuras 16 y 18, al observar una banda de mayor intensidad en la muestra inducida en un peso por debajo de los 20 kDa, puede fragmentar los epítomos y por lo tanto evita la unión de los anticuerpos presentes en los sueros de animales positivos con la proteína recombinante pero no así de los anticuerpos antihistidina. Aunado a esto, puede ser debido a la vida media corta determinada en la caracterización fisicoquímica de la proteína recombinante.

Se ha demostrado que epítomos lineales de apenas 6 a 10 aminoácidos pueden ser antigénicos y que no es necesaria la presencia de la proteína completa para que estos sean reconocidos por el sistema inmune (Van Regenmortel, 2001). La gB se ha descrito como una de las principales glicoproteínas del virus y de las más conservadas entre esta familia. Una alternativa sería clonar otro fragmento que incluya los epítomos reportados fuera del dominio II, que sin embargo, se han descrito como críticos para el reconocimiento tanto por los linfocitos T como B, generando una respuesta tanto celular como humoral; dicha región va del aminoácido 319 al 508 (Gao *et al.*, 1999)

Antigenicidad es la capacidad de la proteína de interactuar específicamente con el parátomo en el anticuerpo, es decir, que sea reconocida por el sistema inmune. Inmunogenicidad es la capacidad de la proteína de inducir una respuesta inmune. En el supuesto de que la proteína recombinante producida

no sea antigénica no la exenta de poder ser inmunogénica al inocularla en un conejo para la producción de anticuerpos policlonales o de tener la capacidad de desencadenar una respuesta inmune, como la producción de citocinas en diferentes modelos celulares (Van Regenmortel, 2001). Como es el caso de Li *et al.* (2004) donde generaron una proteína recombinante y demostraron que al estimular macrófagos de ratón Raw 264.7 con esta, se promueve la producción de TNF α .

Además de la gB, las glicoproteínas gC, gD y gE fueron reconocidas por los sueros de campo como se muestra en las figuras 3 y 5 de este trabajo, por lo que se podría pensar en producir proteínas recombinantes de estas glicoproteínas, ya sean proteínas completas o fracciones antigénicas. Así mismo, se podrían obtener proteínas virales o virus completo para utilizarlo como antígeno y así estandarizar las pruebas inmunodiagnósticas. Por otro lado, se podrían generar anticuerpos policlonales dirigidos al virus, para el desarrollo de una prueba serodiagnóstica tipo sándwich donde se detecte el antígeno o el virus completo para determinar animales portadores que no presenten signos clínicos (OIE, 2017).

CONCLUSIÓN

Se generó el fragmento del dominio II de la gB del alfaherpesvirus bovino tipo 1 que no fue reconocido por los anticuerpos de animales seropositivos a BoHV.

En este trabajo no se estandarizó la técnica luminex ya que a pesar de que se obtuvo la proteína recombinante, esta no fue reconocida por los sueros de campo.

PERSPECTIVAS

Para trabajos futuros es importante continuar con el desarrollo y diseño de pruebas diagnósticas con antígenos nacionales para evitar la dependencia de pruebas extranjeras. Así como hacer pruebas más específicas para las cepas virales que circulan en el país. Este trabajo es el inicio para establecer la generación de un panel diagnóstico múltiple con antígenos nacionales para diferentes enfermedades, por lo que es necesario la obtención de esta y otras proteínas virales o bacterianas, tanto recombinantes como nativas para poder realizar estudios seroepidemiológicos y conocer el estatus sanitario del hato nacional. Además de implementar medidas de control y erradicación de esta y otras enfermedades del complejo respiratorio y abortivo bovino.

REFERENCIAS

- Anderson, S. *et al.*, 2011. Development and evaluation of a Luminex multiplex serology assay to detect antibodies to bovine herpes virus 1, parainfluenza 3 virus, bovine viral diarrhoea virus, and bovine respiratory syncytial virus, with comparison to existing ELISA detection method. *Journal of Immunological Methods*, 366(1–2), pp.79–88. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2011.01.010>.
- Ashokan, K. V. and Pillai, M. M., 2008. In silico Characterization of silk fibroin protein using computational tools and servers. *Asian J. Exp. Sci.* 22 (3), pp. 265-274.
- Baines, J.D., 2011. Herpes simplex virus capsid assembly and DNA packaging: A present and future antiviral drug target. *Trends in Microbiology*, 19(12), pp.606–613. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2011.09.001>.
- Barber, K. *et al.*, 2017. Protein Composition of the Bovine Herpesvirus 1.1 Virion. *Veterinary Sciences*, 4(1), p.11. Available at: <http://www.mdpi.com/2306-7381/4/1/11>.
- Bowland, S.L. & Shewen, P.E., 2000. Bovine respiratory disease: Commercial vaccines currently available in Canada. *Canadian Veterinary Journal*, 41(1), pp.33–48.
- Byrne, K.M., Horohov, D.W. & Kousoulas, K.G., 1995. Glycoprotein B of bovine herpesvirus 1 binds heparin. *Virology*, 209, pp.230–235.
- Cedeño, D. *et al.*, 2011. Seroprevalence and risk factors associated to *Neospora caninum* in dairy cattle herds in the municipality of Pasto, Colombia. *Revista Lasallista de investigación*, 8, pp.61–68.
- Cooper, R.S. & Heldwein, E.E., 2015. Herpesvirus gB: A finely tuned fusion machine. *Viruses*, 7(12), pp.6552–6569.
- Córdova-Izquierdo, A. *et al.*, 2007. Seroprevalencia de enfermedades causantes de aborto bovino en el trópico húmedo mexicano. *Revista Veterinaria*, 18(2), pp.139–142.
- Eiras, C. *et al.*, 2009. Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 in cattle in Galicia (NW Spain). *Spanish Journal of Agricultural Research*, 7(4), pp.800–806.
- Elshal, M.F. & McCoy, J.P., 2006. Multiplex bead array assays: Performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. *Methods*, 38(4), pp.317–323.
- Espinosa C., L.F. *et al.*, 2016. *Evaluación de la seroprevalencia a nivel de hato de diarrea viral bovina tipo 1 y rinotraqueitis infecciosa bovina mediante el uso de pools de sueros bovinos en el estado de Chiapas*.
- Fauquet, C.M. *et al.*, 2005. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Eighth. eds., Elsevier Inc.
- François Baneyx and Mirna Mujacic, 2004. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature biotechnology*, 11(22), pp 1399-1408.
- Fulton, R.W. *et al.*, 2015. Bovine herpesvirus-1: Evaluation of genetic diversity of subtypes derived from field strains of varied clinical syndromes and their relationship to vaccine strains. *Vaccine*, 33(4), pp.549–558. Available at:

- <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X14015722#bib0035> [Accessed December 7, 2017].
- Gao, Y., Wang, C. & Splitter, G.A., 1999. Mapping T and B lymphocyte epitopes of bovine herpesvirus-1 glycoprotein B. *Journal of General Virology*, 80(10), pp.2699–2704.
- Gasteiger, E., *et al.*, 2005. Protein identification and analysis tools on the expasy server. *The proteomics protocol handbook*. pp 571-607
- González-García, M.A. *et al.*, 2009. Seroprevalence and risk factors associated with bovine herpesvirus type 1 (BHV1) infection in non-vaccinated cattle herds in Andalusia (South of Spain), 7(3), p.5. Available at: <http://revistas.inia.es/index.php/sjar/article/view/439/436>.
- Griffin, B.D., Verweij, M.C. & Wiertz, E.J.H.J., 2010. Herpesviruses and immunity: The art of evasion. *Veterinary Microbiology*, 143(1), pp.89–100. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.02.017>.
- Heldwein, E.E. *et al.*, 2006. Crystal Structure of Glycoprotein B from Herpes Simplex Virus 1. *Science*, 313(5784), pp.217–220. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1126548>.
- Heldwein, E.E. & Krummenacher, C., 2008. Entry of herpesviruses into mammalian cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(11), pp.1653–1668.
- Ji Ming Chen *et al.*, 2006. A comparative indirect ELISA for the detection of henipavirus antibodies based on a recombinant nucleocapsid protein expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Virological Methods*, 136 273–276.
- Jones, C. & Chowdhury, S., 2007. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. *Animal Health Research Reviews*, 8(2), pp.187–205.
- Keil, N. *et al.*, 1996. Inactivated Bovine Herpesvirus 1 Induces Apoptotic Cell Death of Mitogen-Stimulated Bovine Peripheral Blood Mononuclear Cells. , 70(6), pp.4116–4120.
- Kobiler, O. *et al.*, 2012. Virus strategies for passing the nuclear envelope barrier. *Nucleus (United States)*, 3(6), pp.526–539.
- Lash, G.E. *et al.*, 2006. Comparison of three multiplex cytokine analysis systems: Luminex, SearchLight™ and FAST Quant®. *Journal of Immunological Methods*, 309(1–2), pp.205–208.
- Leopold, P.L. & Pfister, K.K., 2006. Viral strategies for intracellular trafficking: Motors and microtubules. *Traffic*, 7(5), pp.516–523.
- Levings, R.L. *et al.*, 2015. Virus, strain, and epitope specificities of neutralizing bovine monoclonal antibodies to bovine herpesvirus 1 glycoproteins gB, gC, and gD, with sequence and molecular model analysis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 164(3–4), pp.179–193. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.02.009>.
- Li J. *et al.* 2004. Recombinant HMGB1 with cytokine-stimulating activity. *Journal of Immunological Methods* 289 211 – 223.
- LUMINEX, 2017. *Luminex® 200™*.
- Mei-Wui Chiu and Yun-Liang Yang, 2003. Blocking the dengue virus 2 infections on BHK-21 cells with purified recombinant dengue virus 2 E protein expressed in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 309, 672–678

- Mettenleiter, T.C., 2004. Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Research*, 106(2 SPEC.ISS.), pp.167–180.
- Metzler, A.E. & Matile, H., 1985. European Isolates of Bovine Herpesvirus 1 : A Comparison of Restriction Endonuclease Sites , Polypeptides , and Reactivity with Monoelonal Antibodies. 9.
- Ming Tan *et al.*, 2004. *E. coli*-Expressed Recombinant Norovirus Capsid Proteins Maintain Authentic Antigenicity and Receptor Binding Capability. *Journal of Medical Virology*. 74:641–649.
- Muylkens, B. *et al.*, 2007. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Veterinary Research*, 38(2), pp.181–209.
- Newcomb, W.W. *et al.*, 2003. Assembly of the Herpes Simplex Virus Capsid : Identification of Soluble Scaffold-Portal Complexes and Their Role in Formation of Portal-Containing Capsids Assembly of the Herpes Simplex Virus Capsid : Identification of Soluble Scaffold-Portal Complexes an. , 77(18), pp.9862–9871.
- Newcomb, W.W. & Brown, J.C., 2007. Uncoating the Herpes Simplex Virus Genome. *Journal of Molecular Biology*, 370(4), pp.633–642.
- Nicola, A. V, Mcevoy, A.M. & Straus, S.E., 2003. Roles for Endocytosis and Low pH in Herpes Simplex Virus Entry into HeLa and Chinese Hamster Ovary Cells. *Allergy*, 77(9), pp.5324–5332. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=153978&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Odeón, A.C. *et al.*, 2001. Seroprevalencia de la Diarrea Viral Bovina , Herpesvirus Bovino y Virus Sincicial Respiratorio en Argentina. *Revista de Medicina Veterinaria*, 82(4), pp.216–220.
- OIE, 2017. Rinotraqueitis infecciosa bovina/Vulvovaginitis pustular infecciosa. *Manual Terrestre de la OIE*, 1.
- Okazaki, K. *et al.*, 2006. The amino-terminal residue of glycoprotein B is critical for neutralization of bovine herpesvirus 1. *Virus Research*, 115(2), pp.105–111.
- Pavón, L. *et al.*, 2016. Inmunología molecular, celular y traslacional. Ed. Wolters Kluwer, Barcelona, España. pp 150-155
- Ray, C. a. *et al.*, 2005. Development, validation, and implementation of a multiplex immunoassay for the simultaneous determination of five cytokines in human serum. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36(5), pp.1037–1044.
- Rijsewijk, F.A.M. *et al.*, 1999. Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains. *Journal of General Virology*, 80(6), pp.1477–1483.
- Robinson, K.E. *et al.*, 2008. The essential and non-essential genes of Bovine herpesvirus 1. *Journal of General Virology*, 89(11), pp.2851–2863.
- Saravanajayam, M., Kumanan, K. & Balasubramaniam, A., 2015. Seroepidemiology of infectious bovine rhinotracheitis infection in unvaccinated cattle. *Veterinary World*, 8(12), pp.1416–1419.
- Sayers, R.G., 2016. Associations between exposure to bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) and milk production, reproductive performance, and mortality in Irish dairy herds. *J Dairy Sci*, In press(2), pp.1340–1352. Available at: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-11113>.
- Schwytzer, M. & Ackermann, M., 1996. Molecular virology of ruminant herpesviruses. *Veterinary Microbiology*, 53(1–2), pp.17–29.

- Segura-Correa, J.C. *et al.*, 2016. Seroprevalence and risk factors associated with bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus in North-Eastern Mexico. *Open Veterinary Journal*, 6(2), pp.143–149.
- Shengqiang Li *et al.*, 1993. Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8+ T-cell-mediated protective immunity against malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90 5214-5218.
- Solis-Calderon, J.J. *et al.*, 2003. Seroprevalence of and risk factors for infectious bovine rhinotracheitis in beef cattle herds of Yucatan, Mexico. *Preventive Veterinary Medicine*, 57(4), pp.199–208.
- Van Regenmortel M. H. V., 2001. Antigenicity and Immunogenicity of Synthetic Peptides. *Biologicals* 29 209–213.
- Wang, J., Horner, G.W. & O’Keefe, J.S., 2006. Genetic characterisation of bovine herpesvirus 1 in new zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 54(2), pp.61–66.
- Zhu, L. *et al.*, 2017. Effects of the synthetic corticosteroid dexamethasone on bovine herpesvirus 1 productive infection. *Virology*, 505(February), pp.71–79.

ANEXO 1

Medio suplementado:

Medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)

500 ml

HEPES 25 mM

Suero fetal bovino (SFB) 10%

Medio de infección:

DMEM 500 ml

HEPES 25 mM

SFB 2%

PBS 10x:

Cloruro de sodio (NaCl) 87.7 g

Fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4) 1.5 g

Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) 13 g

Ajustar el pH 7.4

Aforar con agua destilada 1 L

PBS 1x:

PBS 10x 100 ml

Agua destilada 900 ml

Medio SOC:

Medio LB 10 ml

Cloruro de potasio (KCl) 250 mM 100 μl

Cloruro de magnesio (MgCl_2) 2M 50 μl

Glucosa 20 mM

Solución de cloruros:

Cloruro de magnesio (MgCl_2) 80 mM

Cloruro de calcio (CaCl_2) 20 mM