



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTECNIA**

**IDENTIFICACIÓN DE EPÍTOPOS DE IMPORTANCIA  
DIAGNÓSTICA DEL VIRUS DE RINOTRAQUEÍTIS  
INFECCIOSA BOVINA (HERPESVIRUS BOVINO  
TIPO 1) MEDIANTE EL USO DE PHAGE DISPLAY**

**TESIS**

QU E PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA :

**YORDY NEGRETE MORENO**



ASESOR:  
DR. JOSÉ ALBERTO CANO BUENDÍA

Ciudad Universitaria, Cd.MX. 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## ABREVIATURAS

Aa	Aminoácido (s)
BoHV-1	Herpesvirus Bovino Tipo 1
CVE	Exantema vesicular coital
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsDNA	DNA de doble cadena
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
gB	Glicoproteina B
gC	Glicoproteina C
gD	Glicoproteina D
gE	Glicoproteina E
gH	Glicoproteina H
gK	Glicoproteina K
gL	Glicoproteina L
<i>H. somnis</i>	<i>Histophilus somni</i>
IBR	Rinotraqueítis infecciosa bovina
IN	Intranasal
IPB	Balanopostitis infecciosa Bovina
IPV	Vulvovaginitis infecciosa Bovina
<i>M. haemolytica</i>	<i>Mannheimia haemolytica</i>
MBDK	Madin Darby Bovine Kidney
Mg	Miligramos
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensajero
Ng	Nanogramos
Nm	Nanómetros
<i>P. multocida</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
p3	Proteína P3 de bacteriófago recombinante
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PEG	Polietilenglicol
REA	Análisis de restricción de endonucleasas
Rpm	Revoluciones por minuto
ssDNA	DNA de cadena simple
UFP	Unidades formadoras de placa
UL	Sección única larga
US	Sección única corta
MI	Microlitros
Mm	Micromolar

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Vacunología y Constatación en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) bajo la asesoría del MVZ José Alberto Cano Buendía.

A todo el personal académico, administrativo del departamento de Microbiología e Inmunología y a todos los amigos que contribuyeron a la realización de este trabajo.

Este proyecto fue financiado por el programa: DGAPA-PAPIIT con el número de proyecto IN220117.

# CONTENIDO

RESUMEN .....	1
1 INTRODUCCIÓN .....	2
1.1 ANTECEDENTES .....	2
1.2 HERPESVIRUS BOVINO TIPO 1 (BoHV-1) .....	3
1.2.1 ORGANIZACIÓN DEL GENOMA Y PROTEINAS VIRALES .....	3
1.2.2 SUBTIPOS .....	5
1.3 REPLICACIÓN VIRAL .....	5
1.4 PATOGENIA .....	6
1.5 RESPUESTA INMUNE AL BoHV-1 .....	7
1.6 LATENCIA DEL BoHV-1 .....	8
1.7 DIAGNÓSTICO DEL BoHV-1 .....	8
1.8 PHAGE DISPLAY .....	10
1.8.1 BIOPANNING .....	11
1.8.2 BACTERIOFAGO FILAMENTOSO M13 .....	12
1.8.3 PROCESO DE INFECCIÓN DEL BACTERIOFAGO M13 .....	13
1.8.4 MAPEO DE EPITOPOS UTILIZANDO PHAGE DISPLAY .....	15
2. JUSTIFICACIÓN .....	17
3. HIPOTESIS .....	18
4. OBJETIVOS .....	19
4.1 OBJETIVO GENERAL .....	19
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
5. MATERIAL Y MÉTODOS .....	20
5.1 BIOSELECCIONES .....	20
5.2 AMPLIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE FAGOS .....	20
5.3 TITULACIÓN DE FAGOS .....	21
5.4 ELISA .....	21
5.5 EXTRACCIÓN DE DNA .....	22
5.6 SECUENCIACIÓN DE DNA Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS .....	23
5.7 DOT BLOT .....	23
6. RESULTADOS .....	24
6.1 TÍTULOS DE LOS FAGOS OBTENIDOS EN LAS RONDAS DE BIOSELECCIÓN .....	24
6.2 ELISA .....	24

<b>6.2.1 SUERO COMERCIAL</b> .....	24
<b>6.2.2 POOL DE SUEROS BOVINOS</b> .....	26
<b>6.2.3 SUEROS BOVINOS INDIVIDUALES</b> .....	26
<b>6.3 SECUENCIAS OBTENIDAS</b> .....	27
<b>6.4 UBICACIÓN DE LOS MIMÓTOPOS IDENTIFICADOS SOBRE UN MODELO TRIDIMENSIONAL</b> .....	29
<b>6.5 DOT BLOT</b> .....	30
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	32
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	35
<b>ANEXO 1</b> .....	36
<b>REFERENCIAS</b> .....	39

## RESUMEN

La Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) representa pérdidas económicas en la industria ganadera de todo el mundo. El diagnóstico de esta enfermedad es clave para su prevención y control. El aislamiento viral, métodos serológicos y ensayos de neutralización son los métodos con los que podemos hacer el diagnóstico de esta enfermedad, sin embargo, tienen el inconveniente de que se necesita equipo especializado y personal capacitado, sin comentar el alto costo que conlleva analizar muestras de varios animales.

Se utilizó la técnica Phage Display con la finalidad de identificar mimótopos del Herpesvirus Bovino Tipo 1 (BoHV-1) virus causante de la IBR, se utilizó una biblioteca de péptidos Ph.D 12, con la que se realizaron 5 rondas de bioselección utilizando como blanco anticuerpos policlonales comerciales de la marca VMRD. Se seleccionaron 16 clonas al azar de la tercera, cuarta y quinta ronda de bioselección (48 clonas en total), Haciendo ensayos de ELISA utilizando el suero comercial VMRD y sueros de bovinos se analizó la reactividad de esas clonas con los anticuerpos anti BoHV-1. Se obtuvieron 2 clonas que se secuenciaron y analizaron, la clona **IBR 24** con la secuencia **SHTSHYGSVVHR** y la **IBR 33** con **TYTTSTVSSFRA**, que al realizar el alineamiento mostraron homología con las proteínas **UL6** y **UL21** del BoHV-1 respectivamente. Los valores de las densidades ópticas de las clonas obtenidos en los ensayos de ELISA no muestran diferencia con los controles negativos concluyendo que el uso de estas clonas y su valor diagnóstico pueden analizarse en estudios posteriores.

**Palabras clave: Diagnóstico IBR, IBR, Rinotraqueítis Infecciosa Bovina, Herpesvirus bovino tipo 1, Phage Display, mimótopos, biblioteca de péptidos, ELISA.**

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 ANTECEDENTES

La Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR), es una enfermedad de distribución mundial causada por la infección del Herpesvirus Bovino tipo 1 (BoHV-1)(1). La IBR provoca: muerte embrionaria, momificación de fetos, infertilidad, nacimiento de terneros débiles que mueren a los pocos días. El BoHV-1 puede transmitirse por secreciones respiratorias, oculares y genitales, sin embargo, la introducción de animales infectados al hato es la fuente más importante de infección. El ganado vacuno de todas las edades y razas son susceptibles, la infección puede ocurrir por primera exposición al virus; reactivación del virus en latencia o mediante vacunación durante el embarazo.(2)

La infección por BoHV-1 se disemina fácilmente, es de difícil control y se propaga ampliamente en los hatos. Las pérdidas económicas asociadas al BoHV-1 son amplias y diversas que van desde la producción reducida de leche, la repetición del estro hasta los abortos y gastos relacionados con el control de infecciones. Se estima un gasto financiero promedio de \$379 dólares por vaca debido a las numerosas pérdidas. La primo-infección por BoHV-1 está representada por la replicación del virus en la mucosa nasal, vaginal o prepucial que continúa con la penetración en las terminaciones nerviosas periféricas y la migración a través de los microtúbulos de los axones neuronales al cuerpo de las neuronas de los ganglios trigeminal y sacro donde establecen latencia. Esta condición hace que los animales se conviertan en portadores de por vida siendo potenciales diseminadores del virus y juegan un papel importante en el mantenimiento de la cadena epidemiológica del virus.(3)

A pesar de la baja tasa de mortalidad del BoHV-1, la infección con este agente ejerce un alto impacto económico debido a la infección fetal, el aborto y la reducción de la producción. La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) clasificó al BoHV-1 en la lista de enfermedades de notificación obligatoria, que consiste en enfermedades transmisibles que se consideran de importancia socioeconómica y/o de salud pública y, por lo tanto, de relevancia para el comercio internacional de animales y productos animales.(4)

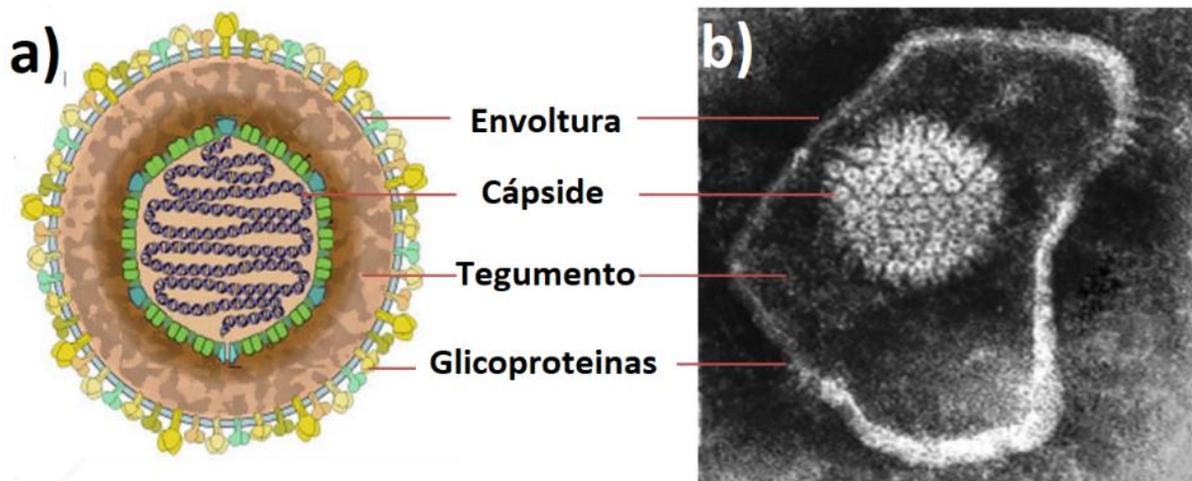
El primer reporte de IBR en México ocurrió en 1971 durante un brote en un rebaño lechero en el Estado de México. En 1972 el virus se aisló en dos rebaños lecheros en la Ciudad de México y Puebla. Estudios serológicos demostraron la presencia del virus en Yucatán, Veracruz y otros estados del país.(5)(6). IBR es una enfermedad ampliamente extendida en México, aunque su impacto económico y repercusión en los indicadores reproductivos no es bien conocido. (7)

La enfermedad pertenece al grupo 3 de SENASICA(8), constituido por aquellas enfermedades que se encuentran presentes en el territorio nacional consideradas como endémicas, mismas que representan un menor riesgo desde el punto de vista

epidemiológico, económico, de salud pública y para el comercio nacional e internacional, que pueden ser controlables a través de buenas prácticas pecuarias, de notificación mensual obligatoria al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica.

## 1.2 HERPESVIRUS BOVINO TIPO 1 (BoHV-1)

El BoHV-1 pertenece a la familia Herpesviridae, subfamilia Alphaherpesvirinae y al género Varicellovirus(9). La partícula típica de un Herpesvirus consiste en un “core” que contiene al genoma lineal de doble cadena (dsDNA) empaquetado en una cápside icosaédrica de un diámetro de entre 100 a 110nm. La cápside está rodeada por una estructura proteica poco organizada denominada como “tegumento” que contiene varias proteínas virales que cumplen con roles importantes en la iniciación de la infección a la célula, expresión de genes virales, ayudan en el transporte de las proteínas virales y en la regulación del empaquetamiento del DNA viral. Rodeando al tegumento se encuentra la envoltura viral y sus glicoproteínas; si se consideran al tegumento y la envoltura el tamaño del virión incrementa a aproximadamente 300nm.(10)

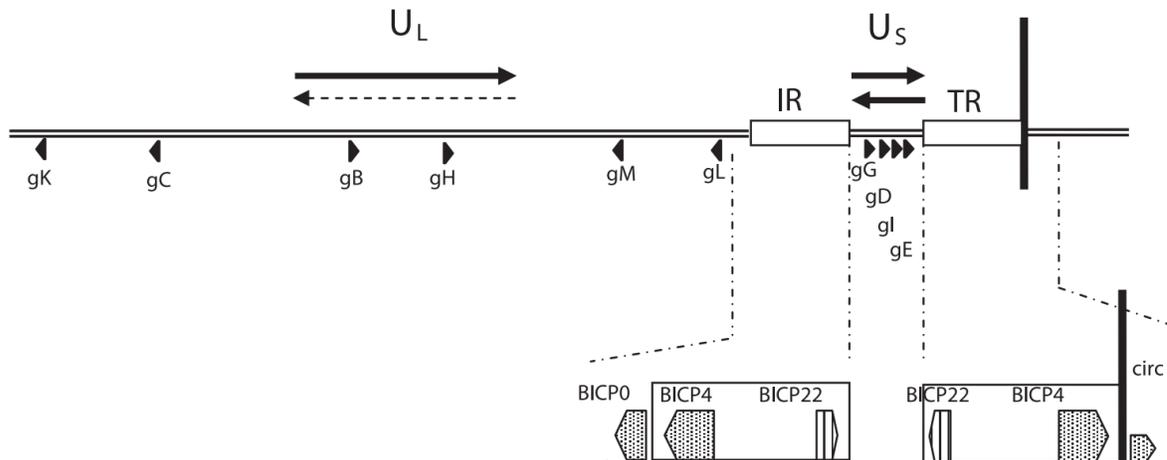


**Figura 1.- a)** Diagrama que representa las principales estructuras del BoHV-1, (imagen adaptada de [http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/526.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/526.html)). **b)** Microfotografía electrónica de Herpes Simplex Virus (HSV), (imagen adaptada de <http://pathmicro.med.sc.edu/mhunt/dna1.htm>)

### 1.2.1 ORGANIZACIÓN DEL GENOMA Y PROTEINAS VIRALES

El genoma del BoHV-1 consiste de DNA bicatenario (dsDNA) que bajo condiciones experimentales puede ser infeccioso, el tamaño varía entre 125 y 290 kbp dividido en dos únicas secciones, sección única larga (UL) y sección única corta (US). La sección US está flanqueada por secuencias invertidas de repetición interna (IR) y repetición terminal (TR).

En el genoma del BoHV-1 se han identificado un total de 73 marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican proteínas. El genoma del BoHV-1 codifica 33 proteínas estructurales, 13 de las cuales probablemente están asociadas a la envoltura y 10 de ellas tienen el potencial de codificar glicoproteínas.



**Figura 2.- Organización del genoma del BoHV-1 incluyendo las dos únicas secuencias, la única larga (UL) y la única corta (US). La porción terminal está flanqueada por dos secuencias repetidas e invertidas (IR) y (TR). La localización de los 10 genes que codifican las glicoproteínas se indica con flechas negras. La barra negra vertical indica la unión observada después de la circularización del genoma. Imagen adaptada de Muylkens et al. (2007).**

De las 10 glicoproteínas, seis están en el segmento UL, gK, (UL53), gC (UL44), gB (UL27), gH (UL22). gM (UL10), y gL (UL1), mientras que las 4 glicoproteínas restantes se encuentran en la sección corta gG (US4), gD (US6) y gE (US8). Las otras proteínas principales de BoHV-1 son VHS (virion shutoff protein), VP8, VP16, BICPO y BICP4.(11)

Los genes del Herpesvirus se clasifican en tres grupos;

- I. Genes alfa (Tempranos inmediatos): aquellos que codifican proteínas relacionadas con las funciones reguladoras y la replicación del virus.
- II. Genes beta (Tempranos): aquellos que codifican proteínas estructurales.
- III. Genes gama (Tardíos): conjunto de genes “opcionales”, en el sentido de que no se encuentran en todos los Herpesvirus y no son esenciales para la replicación.(12)

**Tabla 1.** Funciones de las principales proteínas virales en la infección y replicación del BoHV-1

Proteína	Función
gB (glicoproteína B)	Adsorción, entrada, fusión y diseminación directa de célula a célula.
gC (glicoproteína C)	Adsorción.
gD (glicoproteína D)	Entrada y diseminación de célula a célula.
gI (glicoproteína I)	Diseminación de célula a célula.
gH (glicoproteína H)	Diseminación de célula a célula.
VHS (Virion host shutoff)	Apagado rápido de las síntesis de proteínas de la célula huésped
VP16 (alpha TIF) Trans inducing factor of alpha genes	Transactivador de los genes inmediatos tempranos del BoHV-1
BICP0 (Bovine infected cell protein 0)	Activador de promotores virales
VP8	Protein kinasa; mejora la función de TIF
BICP4 (Bovine infected cell protein 4)	Transactivador de algunos promotores de genes

## 1.2.2 SUBTIPOS

Por sus características antigénicas y genéticas el BoHV-1 se divide en tres subtipos distintos:(13)

- BoHV-1.1
- BoHV-1.2a
- BoHV-1.2b

Dichos subtipos pueden estar asociados con diferentes manifestaciones de la enfermedad, sin embargo, todos son antigénicamente similares, BoHV-1.1 y BoHV1.2a están relacionados principalmente con el síndrome respiratorio y los abortos. El subtipo BoHV-1.2b se considera moderadamente patógeno, puede causar vulvovaginitis/balanopostitis, pero aún no se ha relacionado con abortos. Todos los subtipos pueden infectar las vías respiratorias y genitales del ganado, aunque se ha sugerido que cada genotipo está más adaptado a uno de ellos.(14)

## 1.3 REPLICACIÓN VIRAL

El BoHV-1 se replica en las células de la mucosa del tracto respiratorio, del tracto genital y de los ojos.(15) Los virus de la familia Herpesviridae replican su genoma en el núcleo de la célula huésped, la replicación viral completa hasta la obtención de partículas infectantes tiene varias etapas.(16)

- **Adsorción:** el virus inicialmente se une al heparán sulfato de la superficie celular a través de la gB y gC del BoHV-1. Después de esta unión inicial, gB y gC se unen más fuerte a los receptores de la superficie celular, la naturaleza y propiedades de estos receptores aún no se han determinado.(11)
- **Fusión y penetración:** se produce una interacción entre la gD y la nectina 1 con la subsecuente penetración viral por fusión de la envoltura con la membrana celular. En esta etapa están involucradas al menos cuatro glicoproteínas gD, gB, gH y gI

- **Transporte:** el transporte citoplasmático de la nucleocápside y de las proteínas virales del tegumento va en dirección al núcleo, utilizando el complejo dineína, que está asociado con los microtúbulos de la célula infectada.
- **Expresión génica y replicación del genoma:** la proteína VP8 del tegumento actúa como señalizador de localización nuclear para BoHV-1, la proteína Virion Host Shut Off (VHS) tiene la función de bloquear la síntesis de proteínas celulares y la proteína 16 (VP16) o Trans Inducing Factor (alfa-TIF) es responsable de la activación y expresión de los genes alfa. La transcripción de los genes virales está regulada temporalmente durante la infección, ocurre en forma de cascada e incluye la expresión cinética de tres clases de genes:
  - Immediate Early (IE) o Alfa.
  - Early (E) o Beta.
  - Late (L) o Gama.
- **Morfogénesis:** el ensamblado de la cápside ocurre en el núcleo de las células a través de la interacción de determinadas proteínas virales (UL18, UL19, UL35, UL38). Las cápsides son completadas con moléculas de DNA viral a través de la interacción con varias proteínas
- **Maduración y egreso:** la maduración corresponde a la adquisición de la capacidad infectiva de las partículas virales recién formadas. Este proceso involucra etapas de formación de la nucleocápside (asociación de DNA viral con la cápside) y la asociación de la nucleocápside con la envoltura viral. La nucleocápside se asocia a la cara interna de la membrana nuclear alterada y luego debe adquirir un tegumento y envoltura para poder ser liberado como una partícula viral completa. Los mecanismos exactos de como sucede este proceso no se conocen a profundidad.(16)

## 1.4 PATOGENIA

El virus se multiplica en las células epiteliales de las mucosas, lo cual ocasiona los signos clínicos. Las lesiones primarias son focos de necrosis en la membrana nasal, laríngea, de la tráquea o de la mucosa genital, las lesiones pueden desaparecer para formar grandes pústulas que consisten en infiltrados masivos de leucocitos. Tras la viremia el virus es llevado a los órganos de multiplicación secundaria a través de puentes intercelulares, por sangre y sistema nervioso.(17)

El virus se replica rápidamente en la cavidad nasal y causa infección en vías respiratorias altas, lo que produce rinitis y traqueítis; el BoHV-1 causa daño en el tracto respiratorio, inmunosupresión e infección secundaria por bacterias que resulta en el complejo respiratorio bovino.(18)

Por lo general se manifiesta como una enfermedad febril aguda transitoria que solo en casos muy graves produce disnea inspiratoria causada por la obstrucción del flujo de aire por el exudado. Otras formas de infección por BoHV-1 incluyen rumenitis ulcerosa, enteritis y hepatitis multifocal en terneros recién nacidos, meningoencefalitis no supurativa, infertilidad, mastitis y necrosis ovárica. El tipo de enfermedad causada por el BoHV-1 depende más del sitio de entrada que de la cepa viral. El virus puede permanecer latente en los ganglios nerviosos, con recrudescencia después del estrés o la inmunosupresión. Este virus también causa aborto bovino, infecciones sistémicas de los terneros e infecciones genitales como la vulvovaginitis pustulosa infecciosa (IPV) y balanopostitis infecciosa (IPB).

La forma respiratoria de IBR se caracteriza por hiperemia grave y necrosis focal de la mucosa nasal, faríngea, laríngea, traqueal y a veces bronquial. Las lesiones de IBR se caracterizan microscópicamente por necrosis y exfoliación de células ciliadas seguida de reparación. Las infecciones bacterianas secundarias de estas áreas de necrosis dan como resultado la formación de una capa gruesa de material fibrinonecrótico (diftérico), en las vías respiratorias. Los cuerpos de inclusión intranucleares que se observan comúnmente en las infecciones por Herpesvirus rara vez se observan en infecciones de campo porque los cuerpos de inclusión ocurren solo durante las primeras etapas de la enfermedad. La secuela más importante de IBR es la neumonía, que es causada por la aspiración directa del exudado de las vías respiratorias o como resultado de un deterioro en los mecanismos de defensa pulmonar, lo que predispone al animal a una infección bacteriana.(19)

## **1.5 RESPUESTA INMUNE AL BoHV-1**

Las reacciones inflamatorias y celulares de la inmunidad innata son la primera respuesta a la infección por BoHV-1, la activación del complemento y el interferón son inducidos por la replicación del virus. La producción de citocinas tempranas conduce al reclutamiento y activación de diferentes células como macrófagos, neutrófilos polimorfonucleares y células NK. Estos efectores potencian la primera onda antiviral secretando citocinas en el epitelio infectado y matando las células infectadas por el virus.

La inmunidad celular específica se detecta a partir del quinto día después de la infección, y alcanza un pico a los 7-10 días post-infección. Generalmente coincide con la recuperación de las manifestaciones clínicas, Los linfocitos T colaboradores median la lisis de las células infectadas con BoHV-1 activando macrófagos y células NK a través de la secreción de interferón gamma e interleucina 2, y reclutando y promoviendo a la proliferación de linfocitos T citotóxicos específicos.

La inmunidad humoral se vuelve detectable a partir del décimo día post infección, probablemente participa en la eliminación de la infección por BoHV-1 neutralizando las partículas de virus libres de células. La respuesta de anticuerpos es de importancia crítica para prevenir infecciones secundarias y limitar las consecuencias

de la reactivación. Además, la inmunidad pasiva proporcionada por los anticuerpos calostrales de las vacas inmunes al BoHV-1 es totalmente eficaz para proteger al recién nacido contra enfermedades sistémicas y letales.

La BICP0 (Bovine infected cell protein 0) inhibe la transcripción del interferón (IFN) tipo 1. Esta inhibición de la señalización antiviral innata es inducida por la degradación de IRF3 (factor regulador 3 del IFN), una proteína involucrada en el complejo regulador que asegura la transcripción del IFN tipo 1. BoHV-1 posee otra estrategia de evasión de factores solubles de la respuesta inmune innata, este mecanismo de evasión está mediado por la interacción de gC con el tercer componente del complemento (C3), el mediador clave de la activación del complemento. Otra función inmunomoduladora conservada en alphaherpesvirus se ha identificado a través de la interacción de gG con varias quimiocinas. Tanto las formas solubles como ancladas a la membrana de BoHV-1 gG funcionan como proteínas de unión a quimiocinas de amplio espectro.

Con el fin de disminuir la detección y eliminación de células infectadas por virus por linfocitos T citotóxicos, el BoHV-1 regula negativamente la presentación de antígenos por el complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHCI). Dos mecanismos independientes son responsables de la regulación a la baja de las moléculas del MHCI: la proteína UL49.5 al bloquear el transportador asociado con el procesamiento de antígenos (TAP) y la proteína VHS (codificada por UL41) actúan juntos en esta inhibición.(20)

## **1.6 LATENCIA DEL BoHV-1**

Después de la primoinfección el BoHV-1 puede persistir en forma latente en las neuronas ganglionares del trigémino o sacro, e incluso en las tonsilas.(21)

Periódicamente la replicación del BoHV-1 se reactiva y puede transmitirse a otros animales. La reactivación puede ser desencadenada por el parto, transporte, movimiento de animales en nuevos rebaños, cambios en el clima, infecciones por otros agentes, alimento o dieta de mala calidad, por el tratamiento con corticosteroides, sobrepoblación. Los animales con infecciones latentes pueden ser una potencial fuente de infección, la vacunación puede reducir considerablemente la cantidad de virus excretado después de la reactivación.(22)

El número de animales en la fase de infección latente tiende a ser significativamente mayor que aquellos con signos clínicos. La inmunosupresión del huésped conduce a la reactivación del BoHV-1 haciendo que después de episodios de re excreción viral se facilite la transmisión y se dificulte el control.(23)

## **1.7 DIAGNÓSTICO DEL BoHV-1**

El control de la IBR depende del uso de pruebas diagnósticas eficientes, sensibles y específicas. La especificidad de estas pruebas está comprometida por una posible

reacción cruzada con anticuerpos de otros alpha herpes virus que están estrechamente relacionados con el BoHV-1. El análisis serológico es muy difícil debido a la similitud antigénica de los alpha herpes virus de rumiantes relacionados con el BoHV-1, estos virus reaccionan de forma cruzada en pruebas de ELISA y seroneutralización. Las pruebas serológicas disponibles en la actualidad son casi incapaces de discriminar a los alpha herpes virus relacionados.(24)

Las técnicas comunes para el diagnóstico de IBR son:

- **ELISA Indirecto:** se basa en la unión de anticuerpos específicos anti BoHV-1 presentes en la muestra problema a antígeno BoHV-1 fijado en los pozos de la placa. Los anticuerpos unidos se detectan utilizando antisuero anti-inmunoglobulina bovina (un segundo anticuerpo conjugado). Un suero positivo dará como resultado un cambio de color, tras añadir la solución de sustrato/cromógeno.
- **ELISA Competitivo:** se basa en bloquear la unión de un antisuero anti BoHV-1 o de un anticuerpo monoclonal anti BoHV-1 (marcados con enzima) al antígeno, debido a la presencia de anticuerpos de la muestra problema. Un suero positivo dará lugar a una escasa aparición de color tras añadir la solución de sustrato/cromógeno

Los métodos de ELISA se utilizan mucho, pero no se ha establecido un procedimiento estándar. Hay disponibles en el mercado varios tipos de ELISA, pero por razones de estandarización podría ser deseable comparar la calidad de los kits y realizar pruebas de los lotes para su comercialización antes de su uso.(25)

- **Seroneutralización:** tiene como propósito buscar anticuerpos neutralizantes en el suero de animales. Si se utiliza la incubación convencional del virus, la prueba presenta una sensibilidad de 89.2% y especificidad cercana al 100%. Sin embargo, es posible aumentar la sensibilidad a 94.4%, pero la especificidad disminuye a 93.2%. Una limitante de esta prueba es que solo es certera en hatos donde no se vacuna.
- **Inmunofluorescencia:** se utiliza para identificar antígenos en material fresco (riñones y glándulas adrenales). La prueba indirecta es más sensible pero no lo suficiente para justificar su uso, ya que es más demorada. En el examen directo de secciones congeladas de riñón fetal, la prueba tiene especificidad superior al 90% y sensibilidad de 67%
- **La técnica de inmunoperoxidasa:** se realizan impresiones en láminas portaobjetos a partir de los tejidos sospechosos, Estos últimos se incuban con anticuerpos contra el virus de IBR conjugados con una enzima, generalmente peroxidasa de rábano picante. Después de lavada, la impresión es tratada con el sustrato de la enzima y un cromógeno cuyos productos provocan una reacción coloreada directamente proporcional a la

cantidad de antígeno presente en la muestra, esta prueba tiene sensibilidad de 94%.

- **Aislamiento viral:** tiene por inconveniente no ser rápido ya que tarda al menos una semana; requiere de equipo, material y personal especializados. Si las muestras no se trabajan inmediatamente o son almacenadas deben congelarse a  $-70^{\circ}\text{C}$ .
- **Detección de efectos citopáticos:** en cultivos de células en monocapas homólogas o primarias, se incuban a  $37^{\circ}\text{C}$  y se observan diariamente para comprobar la aparición de efecto citopático; este efecto debe valorarse en comparación con cultivos no inoculados llamados testigos negativos, en especial los casos de virus que precisan periodos de incubación superiores a una semana.

A nivel oficial, para el diagnóstico de IBR se debe utilizar la prueba de seroneutralización, que ha sido aceptada internacionalmente como prueba de referencia. Como consecuencia a lo anterior, es necesario una prueba alternativa de equivalente valor o mejor especificidad, sensibilidad y más rápida para detectar apropiadamente a los animales y fetos infectados en las condiciones existentes en el campo.(26)

En México para el diagnóstico en los animales y reporte de prevalencias en diferentes estados se han utilizado las siguientes pruebas de ELISA;

- CIVTEST Laboratorios Hipra S.A.(27)
- Estuche comercial de ELISA para la detección de animales seropositivos a IBR (HerdCheck IBRgB, IDEXX Laboratories; 100% de sensibilidad y 99.8% de especificidad) a 450nm.(28)

## 1.8 PHAGE DISPLAY

El Phage Display es una técnica que describe la expresión de péptidos, proteínas o fragmentos de anticuerpos en la superficie de partículas víricas o fagos, Se describió por primera vez en 1985 cuando se demostró que se podrían expresar pequeños péptidos en la superficie del fago filamentoso M13 fusionadas a su cápside y que las partículas víricas individuales podían ser seleccionadas con base en su afinidad de unión por un sustrato determinado. El principal foco de interés de esta técnica ha sido la búsqueda y mejora de anticuerpos; sin embargo, el principio se puede aplicar a cualquier proteína o fragmento proteico que pueda ser expresado funcionalmente en *Escherichia coli*.(29)

Esta técnica se basa en la incorporación del gen codificante de la proteína o péptido de interés dentro del genoma del fago como una fusión a un gen que codifica una proteína de la cápside del bacteriófago; esta fusión asegura que cuando las partículas víricas se ensamblan, la proteína recombinante que será expresada esté en la superficie del fago maduro y que además la secuencia codificante esté

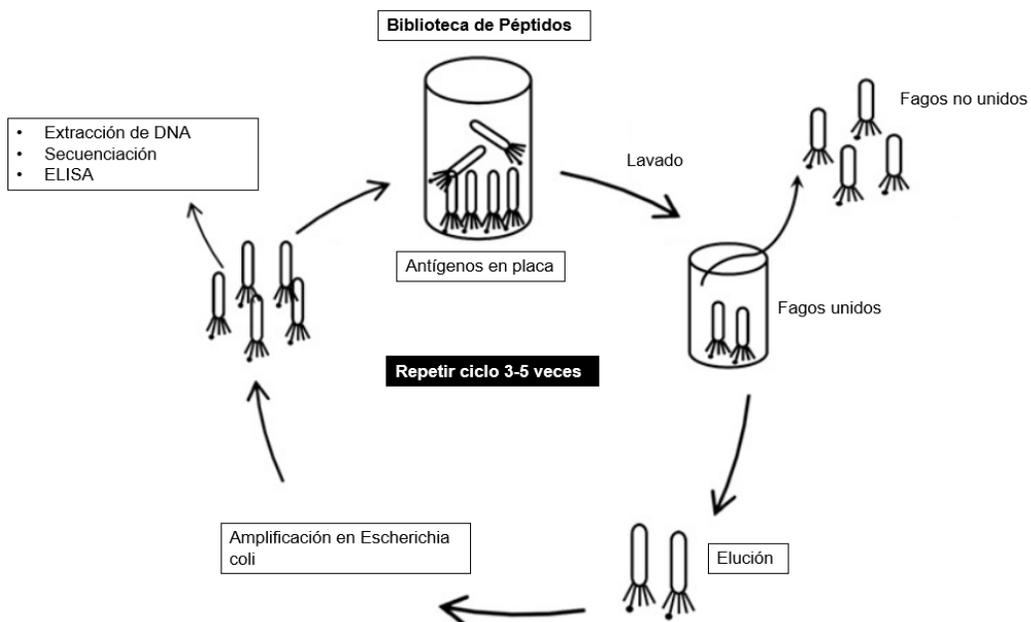
contenida en la misma partícula vírica. La proteína de la cápside sirve únicamente para anclar el péptido expresado y en teoría no debería interferir con su estructura.(29)

Debido a la gran versatilidad de la técnica permitió su uso en la investigación de patógenos, principalmente para la identificación de nuevos biomarcadores para el diagnóstico, terapia, o incluso producción de vacunas y péptidos antivirales. (30)(31)

La técnica de Phage Display ha sido utilizada para la obtención de mimótopos (una estructura que imita un epítipo) para el diagnóstico de varios patógenos, por ejemplo: Virus de inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1)(32), Virus de Diarrea Viral Bovina(33), *Taenia solium*(34), *Fasciola hepática*(35), *Haemonchus contortus* (36), *E coli. 0157*.(37)

### 1.8.1 BIOPANNING

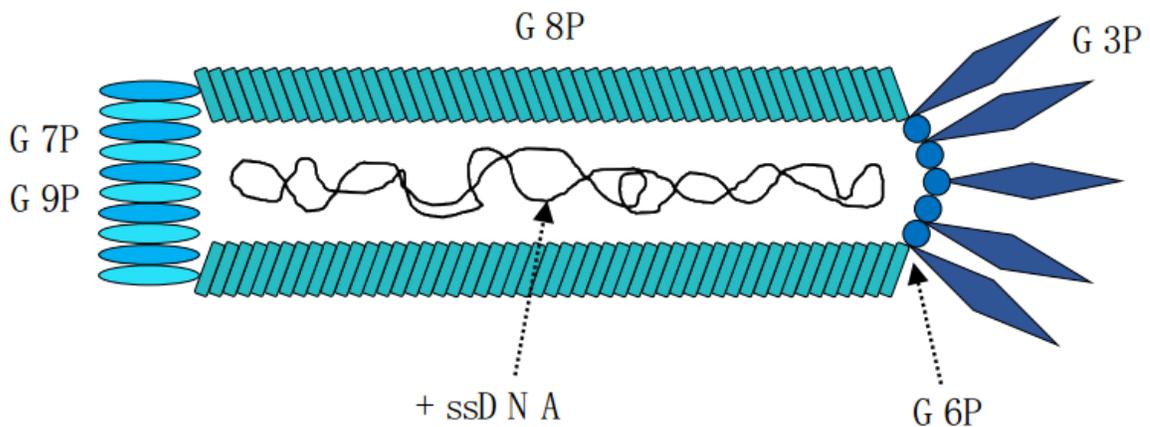
El biopanning es el procedimiento de selección por afinidad de los péptidos mostrados en los fagos, las bibliotecas de péptidos se incuban con antígenos o anticuerpos inmóviles en una placa sólida. Las partículas de fago que se unen a los objetivos se conservan para su posterior uso, mientras que los fagos que no se unieron son eliminados. Los fagos que se unieron son sometidos a un proceso de elución y se amplifican posteriormente por infección no lisogénica de bacterias.(38)



**Figura 3.-** Esquema representando el proceso de Biopanning en la selección de clonas con afinidad a un antígeno, imagen adaptada de E. Garet et al. *Toxicon* 55 (2010).(39)

## 1.8.2 BACTERIOFAGO FILAMENTOSO M13

Los bacteriófagos filamentosos (también llamado fagos) infectan solo bacterias Gram negativas, a través de la adsorción específica en la punta de los pili. Las partículas virales tienen una cápside de estructura tubular que rodea al ssDNA (+) con un diámetro de 6 a 7nm, una longitud de 930nm, el material genético tiene un tamaño de 6.4kbp. La cápside viral está compuesta por 5 proteínas de superficie, La proteína principal de la superficie es pVIII, una proteína de 50 aminoácidos que envuelve al genoma y conforma un cilindro con 2,300 copias. El resto de las proteínas de la cápside se localizan al final de la partícula viral, La tapa o el extremo distal consta de 3 a 5 copias de pVII y pIX, con un tamaño de 33 y 32 aminoácidos respectivamente. La cola en el extremo proximal está compuesta por 3 a 5 copias de pVI y pIII (de 12 y 406 aminoácidos respectivamente)

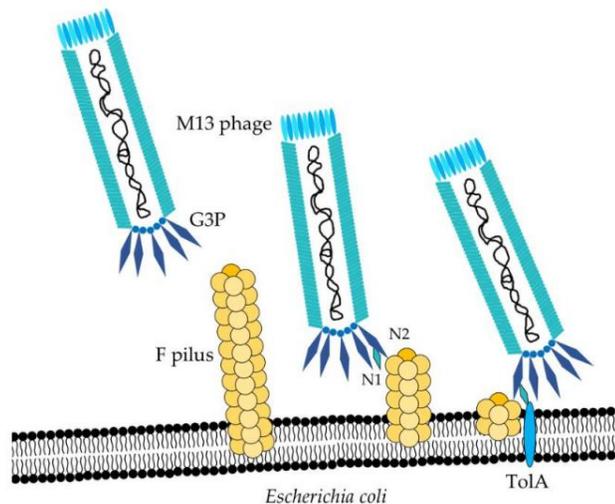


**Figura 4.-** Esquema representando el bacteriófago M13, bacteriófago que contiene una cadena simple de DNA ssDNA. El genoma contiene nueve genes, que codifican 11 proteínas. 5 de estas proteínas son proteínas de cápside (G3P, G6P, G7P, Y G9P), mientras que las 6 proteínas restantes son usadas para la replicación del genoma, ensamble y liberación, imagen adaptada de Line Ledsgaard et al. *Toxins* 10 (2018).

Los fagos filamentosos no lisan la célula huésped. El genoma de los fagos filamentosos es una cadena sencilla de DNA circular (ssDNA), llamada positiva (+), contiene once genes numerados como pI-pXI, y dos regiones intergénicas (IR). Los productos de los genes son clasificados en tres grupos de acuerdo con el papel que tienen en la biología del fago. La pII, pV y pX están relacionadas en la replicación del DNA viral, el segundo grupo son pIII, pVI, pVII, pVIII y pIX, estas son proteínas estructurales que conforman la cápside; finalmente pI, pIV y pXI están involucradas en la morfogénesis viral.(40)

### 1.8.3 PROCESO DE INFECCIÓN DEL BACTERIOFAGO M13

- **Adsorción:** los fagos utilizan el pili de la bacteria como receptor, la infección inicia cuando el dominio N2 de pIII se une a la punta del pili. El fago penetra la membrana externa y se introduce en el peptidoglicano.
- **Fusión y penetración:** tres proteínas integrales de la membrana (Q, R y A) son absolutamente requeridas para la infección. Estas median la despolimerización de las proteínas estructurales del virus en la membrana citoplasmática y la translocación del ssDNA viral dentro del citoplasma de la bacteria.(41)



**Figura 5.-** Infección de la *Escherichia coli* por el fago M13, La proteína G3P se une a la punta del pili de *E. coli*. imagen adaptada de Line Ledsgaard et al. *Toxins* 10 (2018).(42)

- **Expresión génica y replicación del genoma:** una vez que el cromosoma del fago ha sido internalizado en el citoplasma de la bacteria, la célula sintetizará la cadena de DNA complementaria negativa (-) del ssDNA (+).

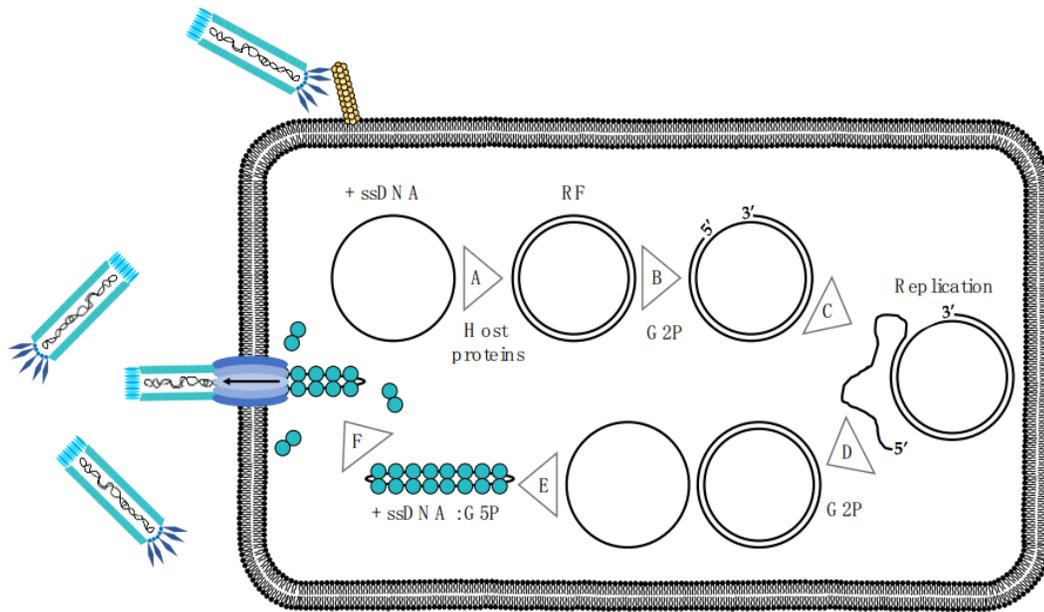
Las dos cadenas forman una doble cadena de DNA súper enrollada (dsDNA) que se conoce como Forma Replicativa (RF). La replicación del cromosoma M13 siempre usa la RF y es seguida por una replicación circular. Inicialmente la replicación empieza con G2P que comienza a acumularse y a aumentar su concentración que continua con un corte en la cadena positiva (+) en la RF y se une covalentemente a la región 5', la región 3' que es generada por el corte posteriormente comenzará con la elongación por la DNA polimerasa usando la cadena negativa (-) como molde. A lo largo del proceso de elongación, la cadena original unida a G2P (+) es físicamente desplazada por la REP HELICASA. Cuando se completa una ronda de replicación, la nueva cadena positiva (+) se corta en el origen por un nuevo G2P, que permanece unido al nuevo extremo 5'.

Después de la disociación de la RF, la cadena antigua (+) se vuelve circular, lista para convertirse en una RF o para empaquetarse en nuevas partículas virales. En las primeras etapas de infección, todos los cromosomas ssDNA (+) recién formados se convertirán en RF, pero las etapas posteriores de la infección, donde la concentración de G5P es suficiente para el secuestro rápido de hebras (+), se evitará la formación de RF. Cuando el G5P se une al ssDNA, se dimeriza en una conformación consecutiva que conduce a la conversión de la apariencia circular del ssDNA a una apariencia más redondeada. El cromosoma entero del fago es cubierto por la G5P a excepción de una horquilla expuesta denominada señal de empaque. La señal de empaquetamiento es necesaria para el empaquetamiento del genoma del fago. G10`P juega un papel esencial pero desconocido para la acumulación estable de cadenas de ssDNA (+). El ssDNA unido por la proteína G5P es el sustrato para el ensamble del fago.

- **Morfogénesis:** el ensamblaje y la gemación del fago M13 es un proceso que incluye; pre-iniciación, iniciación, alargamiento y terminación. Durante la pre iniciación, se forma un complejo de ensamblaje que consiste en G1P, G11P Y G4P, que media el contacto cercano entre la membrana citoplasmática y la membrana externa, Además de una gran estructura generada por G4P, se genera un complejo multimérico que contiene de cinco a seis copias de G1P y g10P, formando potencialmente un segundo canal. La iniciación espera la formación del complejo de ensamblaje durante la pre iniciación, así como la acumulación de cromosomas M13 unidos a G5P, y posteriormente coloca G7P y G9P en la punta del complejo. Aquí G7P y G9P interactúan con la señal del empaquetamiento en el cromosoma del fago, lo que facilita el contacto con el G1P, lo que resulta en la unión de la tiorredoxina desde la célula.

Durante la elongación el G5P unido al genoma del fago se reemplaza con G8P para la translocación del DNA a través del canal que atraviesa la membrana.

**Maduración y egreso:** la translocación continúa hasta que el genoma del fago se haya recubierto por completo con G8P, momento en el que G3P y G6P colaboran en la liberación del fago de la bacteria. Si falta G3P o G6P, se pueden cargar genomas de fago adicionales a través del poro, lo que da como resultado la formación de una partícula de fago mucho más larga. Durante la determinación previa, los G3P embebidos en membrana unidos con G6P se incorporan en el extremo terminal de la partícula del fago. La terminación implica la liberación del fago, provocado por un cambio conformacional en el complejo G3P-G6P.



**Figura 6.-** Ciclo de infección del fago M13 **(A)** Tras la infección, el ssDNA (+) del fago M13 se convierte en la forma Replicativa (RF) bicatenaria. **(B)** Después de la acumulación adecuada, el G2P corta la cadena (+) en la RF y se une covalentemente hasta el extremo 5` **(C)** El genoma luego se replica desde el extremo 3` del corte, utilizando la hebra (-) como plantilla. El filamento (+) antiguo es re circularizado por el G2P unido después de la disociación, listo para convertirse en un RF o para empaquetarse en nuevos fagos M13 **(D)** La replicación del genoma continúa hasta que la concentración de G5P, los G5P se unirán al ssDNA **(E)** Cuando se acumula suficiente G5P, los G5P se unirán al ssDNA en una conformación dimérica consecutiva, causando una apariencia más en forma de barra del ssDNA. **(F)** Se forma un poro en la membrana, y el genoma del fago se transloca a través de este poro, mientras se ensambla la cápside del fago, imagen adaptada de Line Ledsgaard et al. *Toxins* 10 (2018).(42)

#### 1.8.4 MAPEO DE EPITOPOS UTILIZANDO PHAGE DISPLAY

Una de las aplicaciones más prometedoras de la tecnología Phage Display es enfrentar las bibliotecas de péptidos contra un blanco específico para la identificación o mapeo de epítopos. Los péptidos encontrados en la superficie de los bacteriófagos pueden imitar eficazmente las estructuras de epítopos presentes en los antígenos. Estos péptidos se llaman mimótopos. Los mimótopos imitan la estructura de los epítopos antigénicos, ofrecen potencial para ser utilizados como candidatos a vacunas o para métodos diagnósticos.

Cuando las secuencias peptídicas que imitan potencialmente la conformación de un epítopo antigénico se aíslan con éxito se requieren análisis adicionales para poder determinar sus propiedades inmunogénicas y antigénicas. Si un mimótopo derivado de la biblioteca se conoce como un potente inmunógeno y antígeno puede

considerarse como un candidato adecuado para la producción de vacunas. Cuando se usan clones de fagos como inmunógenos, el fago M13 de tipo salvaje puede explotarse como control.

Los mimótopos deben someterse a un paso de validación previa, en este procedimiento, estos mimótopos se evalúan mediante análisis bioinformáticos y ensayos experimentales como ELISA y posteriormente, se eligen las mejores clonas de fagos (por ejemplo, con los valores de reactividad más altos en los ensayos de ELISA) para evaluaciones in vivo o ex vivo.(43)

## 2. JUSTIFICACIÓN

La pérdida de la gestación en el ganado bovino, independiente de la etapa en la que ocurra, es un fenómeno multicausal y complejo, lo cual dificulta de manera importante su diagnóstico. En México se estima que en un 70% de las veces, las causas de los abortos permanecen como desconocidas. La pérdida de la gestación tiene un costo alto, se observó que la pérdida promedio por aborto es de 2,333 USD debido a un mayor intervalo entre partos y un incremento en la tasa de desecho.(28)

En México dentro de las actividades pecuarias, la producción de leche y carne de bovinos son las más importantes, ya que genera 134 mil millones de pesos (SHCP). Además, la carne de bovino aporta un 30% de la carne que se consume en el país; ubicándola en segundo lugar solo por debajo de la carne de pollo. Una de las limitantes por las que los niveles de producción de los bovinos se pueden ver afectados es por la presencia de enfermedades que afectan la reproducción como IBR, añadiendo la baja de peso, disminución de la producción de leche, gastos generados por el diagnóstico, tratamiento y restricciones en la movilización de animales.(44)(45)

Actualmente existen métodos serológicos para el diagnóstico de IBR, cada uno con sus desventajas, el poder sustituir el uso de los antígenos usados comúnmente por mimótopos expresados en fagos filamentosos puede hacer más accesibles, baratas y eficientes las pruebas diagnósticas, favoreciendo la toma de decisiones para la compra/venta de animales y control de la enfermedad.

### **3. HIPOTESIS**

Los mimótopos de BoHV-1 obtenidos mediante la técnica de Phage Display permiten la selección por afinidad de anticuerpos presentes en sueros de bovinos positivos a IBR.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Se identificarán los péptidos de importancia diagnóstica para Herpesvirus Bovino Tipo 1 a través de la técnica de Phage Display usando suero anti- BoHV-1 mediante el uso de bibliotecas de fagos filamentosos de 12 aminoácidos para poder utilizarlos como marcador.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

I. Identificar secuencias antigénicas específicas mediante el uso de bibliotecas de péptidos expresados en fagos filamentosos y el suero hiperinmune del objetivo específico.

II. Evaluar las secuencias obtenidas (epítomos/mimótopos) mediante la técnica de ELISA.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 BIOSELECCIONES

Se realizó la bioselección de una biblioteca de péptidos con el fin de identificar mimótopos que interaccionen con anticuerpos anti Herpesvirus Bovino tipo 1 (BoHV-1). Los péptidos se expresan en la proteína pIII de la cápside de bacteriófagos filamentosos. La biblioteca tiene una diversidad de  $10^9$ .

La bioselección se realizó de acuerdo a lo descrito por Guo & R. Chen con algunas modificaciones.(46) En breve: Cuatro pozos de una placa de ELISA (*Invitrogen Thermo FisherScientific, No. de Cat. 44-2404-21, USA*) se sensibilizaron cada uno con 0.5 ng de suero anti-FC de Bovino (*Novus Biologicals, No. de Cat. NBP1-72630, USA*) diluido en 100  $\mu$ L de amortiguador de carbonatos y se incubó a 4°C toda la noche. Posteriormente, los pozos se lavaron 4 veces con amortiguador de fosfato salino (PBS) 1X, se bloquearon con 200  $\mu$ L de PBS que contenía 2% de BSA (PBS-BSA) y se incubó durante 90 min a 37°C. Finalmente se lavaron los pozos e inmediatamente se agregaron 100 $\mu$ L de PBS-BSA al 0.1% con suero anti BoHV-1/IBR (*VMRD, No. de Cat. PC-IFA-IBR, USA*) diluido 1:50 y se continuo con una incubación por 4 h 30 min a 4°C y al termino los pozos se lavaron con PBS 1X y la placa sin contenido se incubó toda la noche a 4°C.

Pasado ese tiempo en cada uno de los 4 pozos de la placa se agregó la biblioteca de péptidos Ph.D.-12 Phage Display Peptide Library Kit. Para ello, se tomó un microlitro de biblioteca comercial (*NEW ENGLAND BioLabs, No. de Cat. E8110S, USA*) y se ajustó a un volumen de 100  $\mu$ L con PBS-BSA AL 0.1% y se continuo con una incubacion por 4 h 30 min a 4°C. Al término, los pozos se lavaron 4 veces con PBS-Tween-0.1% para eliminar a los bacteriófagos no unidos. Posteriormente los fagos unidos a los anticuerpos anti BoHV-1 se eluyeron mediante la adición de Glicina-HCl-0.2M pH 2.2 con una incubación por 10 min a temperatura ambiente y una por 10 min a 37°C. La solución recuperada se neutralizó con 10  $\mu$ L de Tris-HCl-1M pH 9.6 y los bacteriófagos presentes en la solución se conservaron en refrigeración hasta su uso. Los fagos residuales no específicos que no se eliminan mediante el lavado.

### 5.2 AMPLIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE FAGOS

Para amplificar los fagos se infectaron bacterias *E. coli* TG1, para ello se desarrolló el procedimiento establecido en el manual de BioLabs(47) con algunas modificaciones:

Previo a la amplificación de los fagos eluidos, se colocaron 500 $\mu$ L de bacteria *E. coli* TG1 en 10 ml de medio LB y se incubaron a 37°C y 250 rpm toda la noche. Una vez concluida la incubación de *E.coli*, se colocaron 500 $\mu$ L del cultivo de *E.coli* en 50 mL de medio LB y se agregó el volumen (350  $\mu$ L) de bacteriófagos eluidos y el matraz se incubó 4.5 h a 37°C a 250 rpm. Pasado este tiempo, el medio se

centrifugó a 11,000 rpm, a 4°C por 15 min, el precipitado que contenía la mayor cantidad de bacteria *E. coli* TGI se eliminó, mientras que el sobrenadante se recuperó y se le agregó 1/6 del volumen de una solución de polietilenglicol (PEG) que contenía 2M de NaCl, y se dejó incubando a 4°C toda la noche.

Al día siguiente se centrifugó a 11,000 rpm, 15 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante, el botón se resuspendió en 1.0 mL de amortiguador Tris (TBS) con 200 µL de PEG/NaCl se incubó 1 h a 4°C para después repetirse la precipitación y finalmente los fagos se resuspendieron en 200 µL de TBS. Los bacteriófagos obtenidos se mantuvieron a 4°C hasta su posterior uso.

### 5.3 TITULACIÓN DE FAGOS

Una vez obtenidos los fagos se procedió a realizar la titulación de los mismos siguiendo la metodología descrita por Costa et.al. 2013 (48), con algunas modificaciones. A continuación, se describe brevemente:

Los fagos se diluyeron en medio LB de manera seriada, en breve, se tomaron cuatro tubos falcón de 1.5 ml a los cuales se les colocó 499 µL de medio LB y un µL de los fagos amplificados para obtener una dilución final de  $5 \times 10^2$ . A partir de la primera dilución se procedió a realizar diluciones serias para obtener en el tubo 2 una dilución final de  $2.5 \times 10^4$ , en el tubo 3 se obtuvo una dilución de  $1.25 \times 10^8$  y en el tubo 4 se obtuvo una dilución  $6.25 \times 10^{10}$ .

De la última dilución se tomaron 10 µL que se depositaron en tubos que contenían 200 µL de *E. coli* TG1 y se incubó a 37°C por 5 min, luego la mezcla se depositó en un tubo que contenía 4 mL de Top Agar y finalmente la mezcla se colocó en una placa Petri con agar LB que contienen X-Gal (*Thermo Fisher Scientific, No. de Cat. R0404, Italia*) e IPTG (*Thermo Fisher Scientific, No. de Cat. R0392, Italia*) y se continuó con una incubación a 37°C toda la noche. Al término de este paso se cuantificó el número de unidades formadoras de placas y se multiplicó por el factor de dilución. El procedimiento descrito se desarrolló cinco veces tanto para fagos amplificados y eluidos.

Las unidades formadoras de placas que corresponden a bacteriófagos recombinantes se tornaron de color azul por la adición de IPTG/X-Gal al medio LB. Estas placas azules se extrajeron mecánicamente del agar y para su análisis de especificidad únicamente se tomaron placas que corresponden a una clona individual, para ello, 16 fagos de la tercera, 16 fagos de la cuarta y 16 fagos de quinta ronda para su amplificación.

### 5.4 ELISA

Para evaluar la interacción entre las clonas individuales contra anticuerpos anti BoHV-1 se desarrolló un ensayo de ELISA similar al descrito por Lehmann et.al. 2004(49), a continuación, se describe brevemente: primeramente se sensibilizó cada pozo de la placa de ELISA colocando los fagos a una concentración de  $2 \times 10^{11}$  diluidos en 200 µL de PBS y la placa se incubó a 4°C toda la noche. Posteriormente

se lavaron los pozos con 300µL de PBS – Tween-0.1 % y después se bloquearon los pozos con 200 µL de PBS-Leche 5% por 1 h a 37°C. Al término , los pozos se lavaron y se les agregó el suero anti BoHV-1/IBR comercial en una dilución 1:200 (en PBS Tween 0.01% + Leche 1%) y se procedió a una incubación por 1 h a 37°C. Finalizado este paso, se agregó suero anti-Fc de bovino conjugado con peroxidasa (*Novus Biologicals, No. de Cat. NBP1-73272, USA*), a una dilución 1:2,000, se continuo con una incubación por 1 h a 37°C, finalmente la placa se lavó y se colocó en cada pozo 100 µL del sustrato ABTS a la concentración de 548.68 g/mol (*Sigma, No. de Cat. 7329461, Alemania*), y se incubó a 37°C. Cada 15 min se realizaron lecturas de absorbancia a 405 nm hasta los 45 min. utilizando un lector de microplacas (*BioTek, modelo ELx808*).

## 5.5 EXTRACCIÓN DE DNA

La extracción y purificación del DNA se realizó usando el procedimiento descrito por el fabricante (*New England BioLabs*) con algunas modificaciones, se describe a continuación:

El título de las clonas de interés se ajustó a  $2 \times 10^{11}$  en un volumen de 500 µL de TBS, el volumen se depositó en un microtubo de 1.5 ml al que se le añadieron después 500 µL de TBS y 200 µL de una solución PEG/NaCl. Este volumen total se mezcló y se incubo a temperatura ambiente por 10 min. Al término, el microtubo se centrifugo a 14,000 rpm por 10 min a 4°C y el sobrenadante se descartó y el precipitado o botón se resuspendió en 100 µL de amortiguador de yoduro 4.0 M y se agitó vigorosamente. Finalmente, se añadieron 250 µL de etanol y el microtubo se incubó durante 10 a 20 min a temperatura ambiente. Al término, el tubo se centrifugó a 14,000 rpm 10 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 500 µL de etanol frio al 70%, y nuevamente se centrifugo el tubo y se descartó el sobrenadante. El precipitado presente en el tubo se secó con vacío y se resuspendió en 20 µL de agua grado biología molecular. El contenido de DNA se cuantificado usando un espectrofotómetro *NanoDrop DM 1000 (Thermo Scientific)*.

Para su secuenciación se solicitó el servicio de Secuenciación Automatizada de DNA que ofrece el Instituto de Biotecnología de la UNAM, para ello, las muestras se enviaron siguiendo las instrucciones que indican en su página de internet, el procedimiento se describe a continuación: La mezcla de DNA/oligo se debe entregar en un volumen final de 16 µL en un tubo para PCR tapa plana de 200 µL. La mezcla debe contener 10 pmolar del oligo elegido para secuenciar y de 300 a 500 ng de plásmido. Para cumplir con los requerimientos se hizo el cálculo para obtener 500 ng de plásmido de las clonas individuales, se aforó hasta 15 µL con agua destilada ultra pura libre de DNAsas/RNAsas (*Thermo Fisher Scientific, No. de Cat. 15657708, Italia*) y por último se agregó 1µL de -96 gIII Sequencing Primer (*NEW ENGLAND BioLabs, No. de Cat. E8110S, USA*).

## 5.6 SECUENCIACIÓN DE DNA Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Todas las secuencias fueron analizadas con el programa **Sequencher versión 5.4.6** (DNA Sequence Analysis Software, GeneCodes Corporation, USA), se usó como referencia de búsqueda la secuencia de la proteína III del M13.

Una vez conocida la secuencia se utilizó la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del NCBI para conocer que porción de las proteínas de BoHV-1 podrían alinearse con las secuencias de aminoácidos expresadas por las clonas seleccionadas. Se realizó la búsqueda dirigida a BoHV-1 y se seleccionaron los resultados que tuvieran un porcentaje de identidad del 100% y un valor de “E” (e-value) menor a 70, el valor de “E” es un parámetro que describe la posibilidad que tiene esta secuencia de alinearse a la secuencia de interés en una base de datos.

## 5.7 DOT BLOT

Para evaluar la antigenicidad de las clonas seleccionadas se desarrolló el método de Dot Blot de acuerdo a Resende 2018 con algunas modificaciones(50), para ello se utilizó mezclas de sueros bovinos positivos o negativos a BoHV-1/IBR obtenidos del banco de sueros del departamento de Reproducción.

Se utilizaron fragmentos circulares de 2mm de diámetro de membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) los cuales se sensibilizaron con 10ul de cada clona a diferentes concentraciones ( $2 \times 10^9$  ufp/ml,  $2 \times 10^{10}$  ufp/ml y  $2 \times 10^1$  ufp/ml), una vez que la membrana recibió la dilución correspondiente de clona se incubó a temperatura ambiente, Y una vez que se secaron las membranas se depositaron en amortiguador de transferencia (ver anexo) hasta su equilibrio. UNA VEZ EQUILIBRADA LA MEMBRANA, se bloquearon con PBS – caseína al 5% en agitación por 1 h, y después se lavaron en 2 ocasiones con PBS-Tween al 0.05% y una con PBS 0.1M. Una vez concluido este paso, se agregaron los sueros bovinos diluidos 1:50 en PBS 0.1M, y se inició una incubación por 1 h en agitación, al término, nuevamente se lavó el papel y se agregó suero anti-Fc de bovino conjugado con peroxidasa (*Chemicon, No. de Cat. 92990, California*) a una dilución 1: 5,000 en PBS 0.1M, finalmente, las membranas se lavaron por última vez y se hizo el revelado por método cromogénico con diaminobencidina. La interpretación fue por observación de las membranas, se consideraron muestras positivas cuando la totalidad de la membrana cambió de color de blanco a café y se consideraron negativas las que no presentaron ningún cambio. Este mismo procedimiento se utilizó después para probar la reactividad de las clonas en presencia de sueros bovinos individuales positivos y negativos a BoHV-1/IBR.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 TÍTULOS DE LOS FAGOS OBTENIDOS EN LAS RONDAS DE BIOSELECCIÓN.

La biblioteca de bacteriófagos se sometió a 5 rondas de bioselección contra anticuerpos anti BoHV-1/IBR, reduciendo la concentración de anti-Fc bovino con la que sensibilizó la placa de ELISA en las últimas dos rondas.

El título de fagos obtenidos durante las cinco rondas de bioselección se resumen en la TABLA 2. El título de los fagos obtenidos en la elución y amplificación por el cálculo de unidades formadoras de placa.

*Tabla 2.- Títulos obtenidos al final de cada ronda de bioselección para BoHV-1/IBR ocupando la biblioteca de péptidos de 12 aminoácidos.*

Ronda de bioselección	Anti-Fc (ng)	Fago de entrada (UFP)	Fago de recuperación (UFP)	Fago amplificado (UFP)
1	0.5	$1.0 \times 10^{11}$	$5.3 \times 10^6$	$2 \times 10^{14}$
2	0.5	$2.0 \times 10^{12}$	$7.8 \times 10^6$	$5.8 \times 10^{15}$
3	0.5	$1.0 \times 10^{13}$	$1.0 \times 10^7$	$1.2 \times 10^{13}$
4	0.2	$1.0 \times 10^{11}$	$5.0 \times 10^5$	$6.2 \times 10^{13}$
5	0.1	$1.0 \times 10^{11}$	$1.0 \times 10^6$	$6.2 \times 10^{13}$

Los datos muestran que con el incremento de las rondas de selección se favorece el número de fagos eluidos y amplificados. Por ejemplo, al disminuir la cantidad de anti-Fc bovino en la cuarta y quinta ronda se aprecia cantidades similares de fagos amplificados y eluidos de las primeras tres rondas en donde se utilizó 2.5 y 5 veces más anti -Fc.

## 6.2 ELISA

### 6.2.1 SUERO COMERCIAL

Se analizaron 48 clonas obtenidas de la tercera, cuarta y quinta ronda de bioselección. Las clonas fueron evaluadas individualmente para medir su reactividad contra los anticuerpos anti IBR, se realizaron dos ensayos de ELISA por separado, uno para las primeras 24 clonas y la otra para las 24 restantes cada una con control negativo, los resultados mostraron que todas las lecturas de DO fueron diferentes, se consideró un valor superior a 0.067nm en el primer ensayo y de 0.034nm para el segundo, estos parámetros se obtuvieron calculando el promedio de la sumatoria de las densidades ópticas del control negativo más una desviación

estándar en cada ensayo de ELISA, utilizando estos valores como línea de corte se encontraron 18 clonas que mostraron reactividad a los anticuerpos anti IBR.

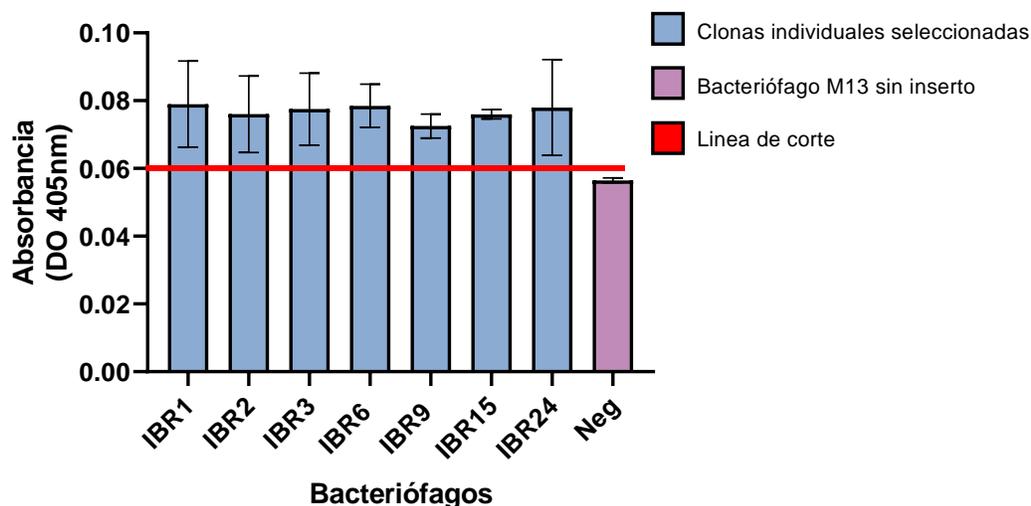


Figura 7. Reactividad de clonas seleccionadas con suero comercial anti-IBR.

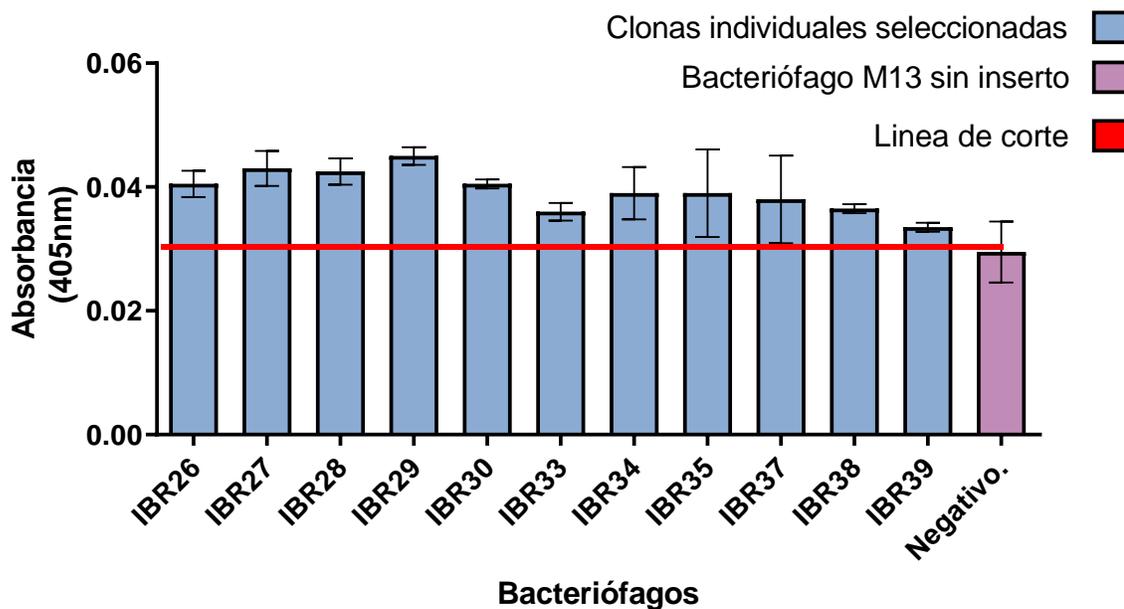


Figura 8. Reactividad de clonas seleccionadas con suero comercial anti IBR.

Las figuras 7 y 8 resumen los valores de absorbancia de las 18 clonas que mostraron una reactividad mayor utilizando el anticuerpo comercial “VMRD “como control positivo a IBR en comparación al control negativo que correspondió a la cepa silvestre la línea de corte se consideró utilizando el promedio de los valores de las densidades ópticas del control negativo.

## 6.2.2 POOL DE SUEROS BOVINOS

Para conocer la reactividad de las 18 clonas seleccionadas con un pool de sueros bovinos positivos y negativos a IBR se realizó el ELISA respectivo. La Figura 9 muestra los resultados de las densidades ópticas para cada clona.

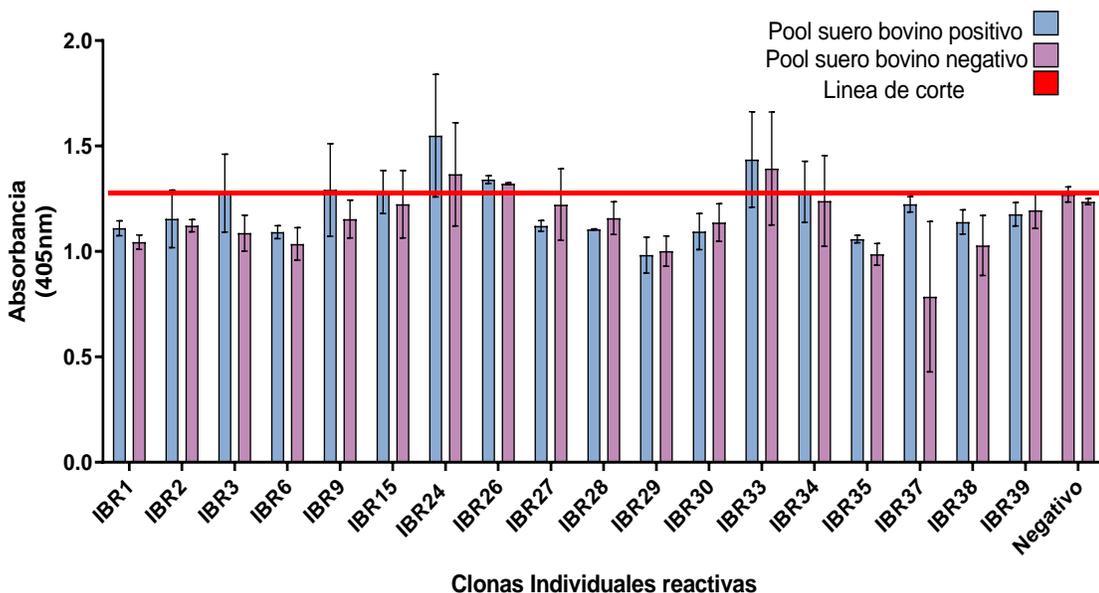


Figura 9. Clonas individuales enfrentadas a pool de sueros bovinos positivo y negativo a IBR.

En este ELISA se sensibilizó la microplaca con las 18 clonas individuales, se evaluó la reactividad con un pool de sueros bovinos positivos y negativos a IBR. La reactividad se visualizó utilizando un anticuerpo suero anti-Fc de bovino conjugado con peroxidasa, finalmente se colocó en cada pozo el sustrato ABTS, las barras azules corresponden a las clonas individuales enfrentadas a el suero positivo y las barrar moradas corresponden al suero negativo.

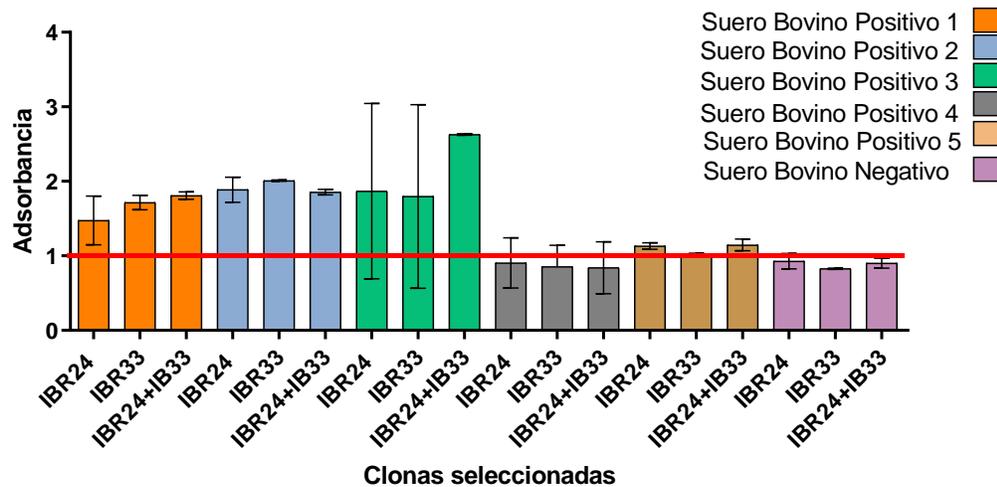
Se consideró un valor superior a 1.28nm (promedio de las sumatorias de los controles negativos más 3 desviaciones estándar) para considerar como positiva la reactividad de una clona, con este criterio únicamente las clonas IBR 24 e IBR 33 fueron consideradas como positivas.

## 6.2.3 SUEROS BOVINOS INDIVIDUALES

Para evaluar los reactivos del sistema de ELISA las clonas con mayor reactividad (IBR 24 e IBR33) se utilizaron en otro ensayo en el que se enfrentaron con 5 sueros bovinos individuales positivos diagnosticados por ELISA a BoHV-1/IBR y un suero negativo, todos en una dilución 1:200. Para este ELISA también se sensibilizaron pozos con la mezcla de ambas clonas ajustando a un título de  $2 \times 10^{11}$  UFP/ml para

probar si existe una sinergia que mejore la reactividad con los sueros positivos o disminuir la reacción con el suero negativo.

La figura 10 muestra la absorbancia obtenida de manera independiente en cinco sueros positivos a IBR y un suero negativo.



**Figura 10.** Ensayo de ELISA para determinar la reactividad de las clonas IBR24, IBR33 e IBR24+33 utilizando como blanco sueros bovinos individuales positivos a IBR.

La figura 10 muestra la reactividad de las clonas IBR24 e IBR33 enfrentándolas a sueros bovinos individuales, cada color corresponde a un suero diferente. La línea de corte se calculó obteniendo el promedio de las mediciones registradas de los controles negativos más 3 desviaciones estándar.

### 6.3 SECUENCIAS OBTENIDAS

Para conocer las secuencias de los aminoácidos de los fagótopos de BoHV-1, se realizó la extracción y secuenciación del ssDNA de las y se lograron obtener las secuencias de todas las clonas mediante alineamientos y comparación con estructuras de proteínas reportadas del BoHV-1.

El análisis de los resultados al considerar la biblioteca de fagos empleada mostró que todas correspondían a la biblioteca Ph.D. 12. De las 18 secuencias obtenidas ninguna corresponde al mismo fagótopo.

Los resultados muestran que las 18 clonas tuvieron lecturas diferentes. Cuando se consideró un valor de tres desviaciones estándar solo dos clonas (IBR24 e IBR33) mostraron reactividad al suero, la secuencia de aminoácidos de los péptidos expresados por ambas clonas *SHTSHYGSVVHR* y *TYTTSTVSSFRA*, es probable que exista un mimótopo de BoHV-1.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas en **BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool) <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

**Tabla 3.**-Secuencias obtenidas en el programa SEQUENCHER 5.4.6.

Clonas	Secuencia de nucleótidos	Secuencia de aminoácidos
IBR24	AGTCATACGAGTCATTATGGTTCTGTTGTTATGAGG	SHTSHYGSVVHR
IBR33	ACTTATACTACGTCGACGGTGTCTCTTTTCGTGCT	TYTTSTVSSFRA

Una vez conocidas las secuencias se utilizó la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del NCBI para conocer que porción de las proteínas de BoHV-1 podrían alinearse con las secuencias de aminoácidos expresadas por las clonas seleccionadas.

**Tabla 4.**- Homologías reportadas en BLAST.

IBR 24	E value	Per. Ident	Accesion
UL6 protein [Bovine Herpesvirus type 1.1]	48	100%	<a href="#">AFV53413.1</a>

IBR 33	E value	Per. Ident	Accesion
Tegument protein UL21 [Bovine alphaherpesvirus 1]	68	100%	<a href="#">NP_045338.1</a>

**SHTSHYGSVVHR:** Al analizar la ubicación de la secuencia reportada se encontró que el motivo de IBR24 se localiza en dos regiones de la UL6. La proteína UL6 está codificada en el genoma de todos los Herpesvirus, es necesaria para la replicación de los Herpesvirus.(51) La UL6 se identificó originalmente como una proteína menor de la cápside de HSV-1. Se encontró que los mutantes con delección de UL6 eran defectuosos para la encapsidación del ADN y dieron como resultado la acumulación de cápsides vacías en el núcleo de la célula infectada.(52)

Los estudios que utilizan mutantes de HSV-1 que codifican mutaciones sensibles a la temperatura o nulas han revelado que la encapsidación exitosa del ADN de HSV-1 requiere los productos proteicos de siete genes virales: UL6, UL15, UL17, UL25, UL28, UL32 y UL33. Se requieren seis de estas proteínas para la escisión del ADN viral (pUL6, pUL15, pUL17, pUL28, pUL32, pUL33), y cuando incluso una falta o no funciona, el ADN concatémico y las cápsides se acumulan dentro del núcleo de la célula infectada.

Doce copias de UL6 forman la estructura portal en forma de anillo a través de la cual el ADN viral entra y sale de la cápside. El análisis EM ha determinado que la estructura del portal del HSV-1 es similar a los portales del bacteriófago dsDNA y que reside en un único vértice de la cápside. Estos resultados sugieren que el ensamblaje de la cápside se inicia alrededor del portal y que debe existir un mecanismo regulador para garantizar que cada cápside contenga solo un portal.(53)

**TYTTSTVSSFRA:** La secuencia de IBR33 se trata de un epítotope continuo de la proteína UL21, esto refleja que las interacciones anticuerpo-antígeno están mediadas a través de la estructura terciaria.(54)

UL21 es una proteína de tegumento multifuncional conservada en alfaherpesvirus, tiene diferentes funciones esenciales, aunque poco conocidas en la replicación viral y la patogénesis. Las funciones de UL21 se han caracterizado bien en el virus del herpes simple (HSV) y el virus de la pseudorrabia (PRV). Estudios previos destacaron que la falta de UL21 resultó en una disminución de los títulos virales en HSV-1 y PRV, y un mutante de delección UL21 causó un retraso en la producción de ARNm viral, proteínas virales y viriones en HSV-2 y HSV-1.

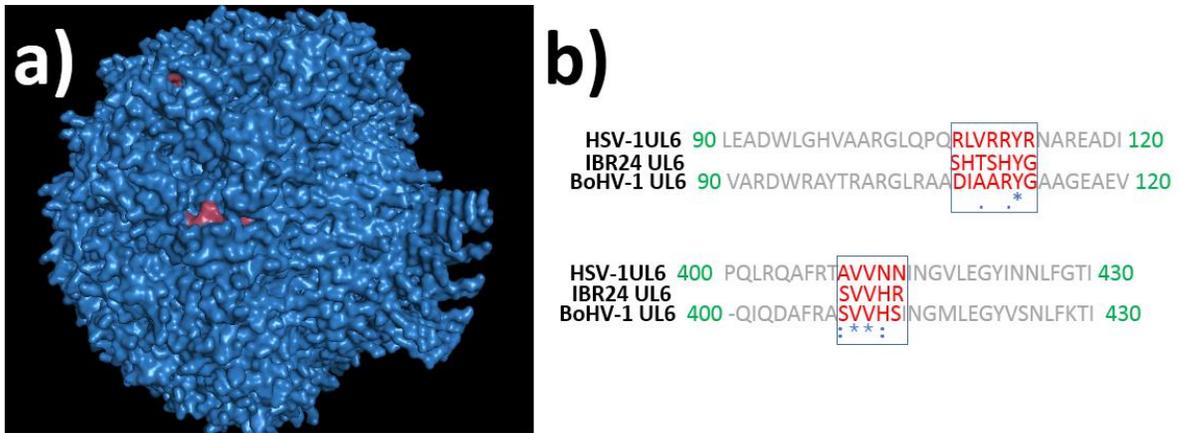
Los datos bioquímicos sugieren que la expresión del gen UL21 en PRV facilita el procesamiento del ADN viral y está directamente relacionada con la maduración de la cápside. Además, se demostró que UL21 es una proteína del tegumento asociada a la cápside en HSV-1 y PRV a través de una interacción con UL16, que conecta la cápside a la envoltura para promover la envoltura secundaria. En HSV-1, UL21 es fundamental para la función de la glicoproteína E al cooperar con las proteínas interactuantes UL11 y UL16. Además, en HSV-1 la UL21 promueve el movimiento viral intracelular al interactuar con los microtúbulos. Estos hallazgos demuestran que la proteína del tegumento UL21 es indispensable para la replicación eficaz del virus en cultivo celular, ya que la eliminación del gen UL21 resultó en defectos de crecimiento severos y placas más pequeñas.(55)

## **6.4 UBICACIÓN DE LOS MIMÓTOPOS IDENTIFICADOS SOBRE UN MODELO TRIDIMENSIONAL**

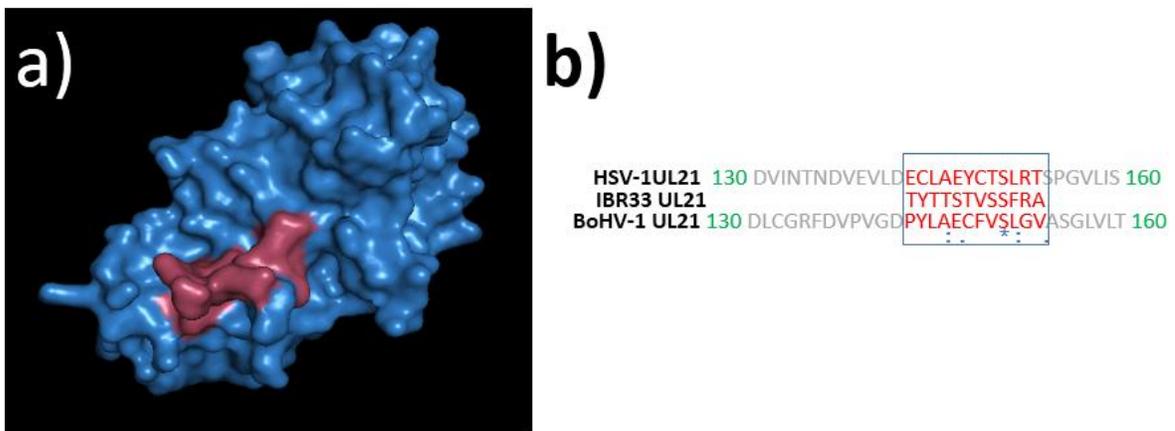
Con el fin de mapear la localización de los mimótopos específicos en las proteínas del BoHV-1 se obtuvieron las estructuras tridimensionales de las proteínas UL6 Y UL21 del HSV-1 reportadas en la base de datos en línea **GenBank** (International Nucleotide Sequence Database). Debido a que no se dispone de una estructura 3D de las proteínas UL21 y UL33 del BoHV-1 el análisis in silico de la familia.ico se realizó utilizando modelos 3D del HSV-1 como lo reportó Greycele et. al. (4)

Conocidas las secuencias se utilizó el programa “**Clustal Omega**” para conocer la porción de las proteínas de BoHV-1 podrían alinearse con las secuencias de aminoácidos expresadas por las clonas seleccionadas.

Una vez se obtuvieron los archivos de GenBank se utilizó el sistema de visualización molecular **PyMol**, distribuido por Schrödinger.



**Figura 11.- a) (En azul) Proteína UL6 de HSV-1. (En rojo) Epítipo discontinuo en la superficie de la proteína UL6 del HSV- 1 que mimetiza IBR24. b) Alineamiento de las secuencias de IBR24, HSV-1 y BoHV-1 utilizando la herramienta Clustal MUSCLE versión 3.8.**



**Figura 12.- a) (En azul) Proteína UL21 de HSV-1. (En rojo) Epítipo continuo en la superficie de la proteína UL21 del HSV- 1 que mimetiza IBR33. b) Alineamiento de las secuencias de IB33, HSV-1 y BoHV-1 utilizando la herramienta Clustal MUSCLE versión 3.8**

## 6.5 DOT BLOT

En el ensayo donde se utilizaron  $10^9$ ufp/ml,  $2 \times 10^{10}$ ufp/ml y  $2 \times 10^{11}$ ufp/ml de clonas individuales para sensibilizar las membranas de nitrocelulosa, todas las concentraciones de clonas causaron un cambio de color notable en los pools sueros que fueron diluidos 1:50, Sin embargo, el cambio de color más notable se dio en la concentración  $2 \times 10^{11}$  UFP para ambas clonas. El control negativo donde se utilizó el pool de sueros bovinos negativos a IBR no manifestó ningún cambio de color.

UFP \ Péptido	IBR24 (SHTSHYGSVVH)		IBR33 (TYTTSTVSSFRA)	
	Pool de sueros bovinos BoHV-1		Pool de sueros bovinos BoHV-1	
	Positivo (+)	Negativo (-)	Positivo (+)	Negativo (-)
2 X 10 <sup>11</sup>				
2 X 10 <sup>10</sup>				
2 X 10 <sup>9</sup>				
2 X 10 <sup>8</sup>				

**Figura 13.**-En los Dot Blot observamos que los péptidos reaccionan con la mezcla de sueros bovinos positivos a BoHV-1/IBR en las 4 concentraciones utilizadas, pero no lo hacen con la mezcla de bovinos negativos.

En el ensayo donde se utilizaron los sueros de animales individuales positivos a IBR nuevamente se demostró un cambio de color sensibilizando las membranas con una concentración de 2 X 10<sup>11</sup> UFP y diluyendo los sueros individuales 1:50, el suero negativo a IBR no mostró ningún cambio en su color.

Sueros bovinos individuales BoHV-1 \ Péptido UFP (2 X 10 <sup>11</sup> )	IBR24 (SHTSHYGSVVH)	IBR33 (TYTTSTVSSFRA)
Suero positivo 2 (+)		
Suero positivo 3 (+)		
Suero positivo 4 (+)		
Suero positivo 5 (+)		
Suero negativo 1 (-)		

**Figura 14.**- Dot Blot con sueros de animales individuales, se utilizó la concentración de bacteriófagos 2 X 10<sup>11</sup> los fagos reaccionaron a los sueros individuales positivos y no hubo reacción con el suero negativo.

## 7. DISCUSIÓN

Se realizó la selección de fagos que mimetizan la estructura de epítomos (mimótopos) de proteínas del BoHV-1 utilizando la técnica Phage Display. En la actualidad se utilizan con frecuencia proteínas recombinantes, las cuales ofrecen muchas ventajas respecto a los antígenos aislados de otras fuentes biológicas, como son la pureza, actividad específica, estandarización entre lotes. Actualmente las nuevas tecnologías permiten obtener péptidos específicos sin la necesidad de sistemas hospedadores.

**Panning:** A diferencia de trabajos como el de Japolla (56) o Hou (57) que obtuvieron péptidos que actúan como anticuerpos para la identificación de los virus de interés en este trabajo se seleccionaron fagos que imitaran estructuras del BoHV-1.

Se optó por la búsqueda de mimótopos del BoHV-1 para cumplir la necesidad de obtener al patógeno sin la utilización de sistemas hospedadores, por ello se utilizó un suero comercial positivo para la bio selección, otra posibilidad era utilizar sueros obtenidos de animales infectados naturalmente como realizó Hou (58) que obtuvo muestras de sangre de bovinos infectados con IBR para realizar pruebas serológicas, en su estudio comparó el diagnóstico de IBR por PCR con un ensayo de Amplificación de Polimerasa Recombinasa isotérmica donde hizo la observación de que las pruebas podrían verse afectadas por títulos bajos de anticuerpos.

Las cantidades de fago de entrada y fago de salida se determinaron por titulación en cada ronda, en la primera se obtuvo un título de  $5.3 \times 10^6$  UFP/ml y en la tercera ronda se obtuvo  $1.0 \times 10^7$  UFP/ml, en estas rondas se sensibilizaron los pozos de la placa de ELISA con 0.5ng de anti FC, en la cuarta ronda se redujo la cantidad de anti FC a 0.2ng y se obtuvo un título de  $5.0 \times 10^5$  UFP/ml, en la quinta ronda se usó 0.1ng de anti FC y se obtuvo un título de  $1.0 \times 10^6$  UFP/ml, estos aumentos en los títulos entre rondas sugieren que los fagos específicamente unidos a los anticuerpos anti IBR se tuvieron un enriquecimiento. Parecido a como reportó Hou (57) que en un estudio para buscar fagos que se unieran a la proteína G1 del BEFV también redujo la cantidad de el objetivo de interés para aumentar la unión más específica de los fagos, en su primera ronda obtuvo  $7.2 \times 10^3$  UFP/ml y en la cuarta ronda obtuvo  $7.2 \times 10^5$  UFP/ml.

La presentación de fagos específicos de BohV-1 en la primera ronda de selección fue de  $5.3 \times 10^6$ , en la tercera  $1 \times 10^7$  y en la quinta  $1 \times 10^6$  la amplificación de estos virus y su posterior uso en las siguientes rondas produjo aumentos en las recuperaciones (un aumento de 100 veces de la segunda a la tercera ronda). Este resultado coincidió con lo informado por Zamit y colaboradores(59) quienes utilizando una biblioteca comercial con 12 aminoácidos lineales para identificar epítomos/mimótopos de la proteína E2 del VDVB-1, el título de los fagos eluidos en la primera ronda fue de  $9.4 \times 10^5$  UFP/ml y en la tercera ronda  $1 \times 10^7$  UFP/mL, reportando el incremento en el enriquecimiento. El título de los fagos eluidos aumentó notoriamente después de la amplificación en *E. coli*.

**ELISA suero comercial/ pool de sueros bovinos:** Se observó poca diferencia al comparar la reactividad de las clonas con los sueros positivos y con los sueros negativos, informes indican que al final del biopanning las lecturas de ELISA obtenida con los antígenos de interés suelen ser tres o más veces la lectura de los controles negativos, en este estudio no se encontró una diferencia significativa, una alternativa para obtener valores más altos en las lecturas del ELISA es probar con otro protocolo, como lo utilizó Hernández (60), utilizando el mismo arreglo para el ELISA que el realizado en su biopanning, sensibilizando la placa con anticuerpos IgG, bloqueando y posteriormente agregó las clonas individuales obtenidas para la detección de la toxina Pet de *Escherichia coli* (60). Otra posibilidad es utilizar fagos no unidos en el panning como lo realizó Siqingaowa(61) que buscaba mimótopos de la proteína S del virus de la gastroenteritis transmisible porcino (TGEV). El control negativo utilizado en este trabajo fue un bacteriófago M13 que no expresa aminoácidos en su cápside.

Otra posible causa de la reactividad de las clonas individuales con los sueros negativos se debe a que los sueros bovinos pueden contener anticuerpos contra el fago M13, para eliminar esta reacción inespecífica existe la posibilidad de sintetizar los péptidos para utilizarlos como antígenos para pruebas de ELISA en un estudio futuro.

**Elisa sueros bovinos individuales:** En este ELISA no se encontró una sinergia evidente con la combinación de ambas clonas, hubo una reactividad con los sueros bovinos positivos 1, 2 y 3 pero con los sueros 4 y 5 no hubo una respuesta evidente, esta estrategia es similar a la que realizó Orozco 2015(62) que en su trabajo obteniendo mimótopos del virus de la Diarrea Viral Bovina sensibilizó la placa de ELISA con la mezcla de dos clonas individuales, una a dilución 1:100 y otra a 1:6,400, en este estudio se decidió sensibilizar con la mezcla de clonas IBR24 E IBR33 en igual proporción ajustándolas a un título de  $2 \times 10^{11}$  UFP/ml.

**Secuencias Obtenidas:** Todas las clonas seleccionadas tuvieron una secuencia de aminoácidos diferente, ninguna se repitió. Al analizarlas en BLAST 12 de 18 clonas tuvieron un 100% de identidad con proteínas del BoHV-1 entre ellas glicoproteínas de importancia diagnóstica,

Las secuencias **SHTSHYGSVVHR** y **TYTTSTVSSFRA** mostraron un 100% de homología con proteínas UL6 y UL 21 respectivamente lo que nos hace suponer que representan estructuras muy abundantes y activas en el suero hiperinmune. En el estudio de Juárez(33) que obtuvo mimótopos del Virus de la Diarrea Viral Bovina 2 (VDVB-2), utilizó la herramienta **AliView v1.17** y **Multialinv5.4.1**, con el que obtuvo porcentajes de homología con proteínas del VDVB que van del 71.45 para la Glicoproteína E2, 85.7% para la proteína Npro y 57.1% para la proteína N53.

Para evaluar el porcentaje de identidad podrían utilizarse también otros programas ya que solo se utilizó el programa **Sequencher versión 5.4.6**, esto podría contribuir al estudio de otras clonas con potencial diagnóstico que se obtuvieron en este estudio, por ejemplo, la clona IBR37 con la secuencia **GSAARTISPSLL** tuvo una homología del 83.33% con la gE que podría utilizarse

para la diferenciación de animales vacunados de los infectados ya que la vacuna contra IBR utiliza un virus con una delección de la gE, en los ensayos de ELISA, IBR37 también mostró una reactividad en el ELISA similar a la de IBR 24 e IBR33. Estos resultados son parecidos a los reportados por Berrocal (2013)(63), que analizó individualmente 36 clonas individuales obtenidas de la cuarta ronda de bioselección contra la proteína SAT de E. coli en un ensayo de ELISA similar al descrito en este trabajo, sensibilizaron la placa de Elisa con  $1 \times 10^{12}$  UFP/MI, utilizaron suero anti SAT a una concentración de 0.8ug/pozo, posteriormente utilizaron anticuerpos monoclonales anti M13 de conejo marcado con fosfatasa alcalina diluida 1:1,000, después de evaluar su reactividad únicamente 2 clonas se consideraron positivas a suero inmune.(63)

**Mapeo de los mimótopos:** En este estudio se realizó el mapeo de los mimótopos de las proteínas UL6 Y UL21 utilizando las estructuras reportadas del Herpes Simplex Virus (HSV-1), esta estrategia también la utilizó Greycele et. al. (4), que utilizó la estructura del HSV-1 para mapear mimótopos de la gB del BoHV-1 utilizando las proteínas del HSV-1 reportadas. Esta estrategia fue factible debido a la gran similitud entre miembros de la familia.

**Dot Blot:** Para obtener un resultado más específico de la sensibilidad y especificidad de esta prueba comparada con el diagnóstico por ELISA podría realizarse un experimento similar al reportado por Oliveira y colaboradores quienes utilizaron 96 sueros de bovinos positivos a prueba de Microaglutinación Microscópica (MAT) para estandarizar una prueba de Dot Blot para el diagnóstico de *Leptospira*.(64) Hoy en día son cada vez más demandadas las técnicas diagnósticas que pueden realizarse fácilmente y en el sitio donde se localiza el problema. El objetivo es que se puedan tomar decisiones rápidas, que reduzcan los costos del diagnóstico y la disminución de la enfermedad. Son fundamentales en países poco desarrollados donde el transporte de las muestras al laboratorio puede suponer mucho tiempo.

Los resultados obtenidos en este proyecto son relevantes ya que permitirán continuar realizando estudios utilizando el método de Phage Display para la obtención de fagótopos relacionados con la actividad específica de mimótopos inmunodominantes de virus, para posteriormente ser utilizados para el desarrollo de reactivos de inmunodiagnóstico o producción de inmunógenos.(33). La tendencia actual trata de reducir el uso de antibióticos y se dirige a la prevención, control y erradicación de los procesos infecciosos en la medicina veterinaria, mediante estudios epidemiológicos, el diagnóstico y vacunación siendo los elementos clave para el control de la salud animal. Cuanto más se detecte la enfermedad y más sensible y específico sea el diagnóstico, mejor será el control de la misma el seguimiento serológico de esas patologías constituye una herramienta clave en la gestión sanitaria de las mismas.

## 8. CONCLUSIONES

Teniendo como sistema de estudio el BoHV-1, el uso de Phage Display permite la selección de grandes colecciones de péptidos que pueden contribuir de manera significativa a la elucidación de la estructura de epítomos en términos de composición de aminoácidos, conformación y comportamiento antigénico e inmunogénico.(32)

- El método de Phage Display fue útil para identificar epítomos/mimótopos del BoHV-1.
- Los fagótopos obtenidos contra el BoHV-1 pueden ser de utilidad para el desarrollo de un método serológico para así dar un tratamiento oportuno al actual problema de la infección por BoHV-1.
- Utilizar el método de Dot Blot para el diagnóstico de IBR podría ser muy conveniente por su bajo costo y no requerir un laboratorio con equipo tan sofisticado, es posible analizar un gran número de muestras bajo condiciones favorables.
- Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los mimótopos seleccionados tienen características inmunológicas importantes y podrán ser utilizados para el desarrollo de herramientas diagnósticas para la detección de anticuerpos contra el BoHV-1. Este trabajo abre la posibilidad del uso de estos péptidos de ensayos para la identificación de fagótopos de otros patógenos con una importancia en la salud animal.

## ANEXO 1.

### Medios y soluciones

#### Buffer de Carbonatos (100 ml)

Reactivo	Cantidad
Carbonato de Sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	0.159 gr
Bicarbonato de Sodio ( $\text{NaHCO}_3$ )	0.293 gr
Agua destilada	100 ml

Ajustar pH con NaOH/HCl 1N, almacenar a 4°C

#### PBS 0.1M (1 L)

Reactivo	Cantidad
Cloruro de Sodio (NaCl)	8 gr
Cloruro de Potasio (KCl)	0.2 gr
Fosfato de disódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	1.44 gr
Fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.24 gr
Agua destilada	1 L

Esterilizar en autoclave y mantener a temperatura ambiente

#### PBS-BSA al 2% (100 ml)

Reactivo	Cantidad
PBS 0.1M estéril	100 ml
Albúmina sérica bovina (BSA)	2 gr

Esterilizar por filtración y conservar a 4°C

#### PBS-Tween 20 al 0.1% (1 L)

Reactivo	Cantidad
PBS 0.1M	1L
Tween 20	1ml

Mezclar en agitación constante con una barra magnética para evitar la formación de espuma y esterilizar por filtración.

#### Glicina HCl 0.2M (Ph 2.2) (100 ml)

Reactivo	Cantidad
Glicina	1.505 gr
Agua destilada	50 ml

Agregar la glicina a 50 ml de agua destilada estéril y mezclar en agitación con barra magnética, continuar con la agitación mientras se adiciona el ácido clorhídrico hasta

bajar el pH de la solución a 2.2, una vez obtenida la acidez requerida aforara a 100 ml con agua destilada estéril; esterilizar por filtración.

### **Tris-HCl 1M (pH9.6) (100 ml)**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Tris-HCl	12.144 gr
Agua destilada	100 ml

Aforar a 100 ml con agua destilada y esterilizar por filtración.

### **Medio LB (1 L)**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Bacto Triptona	10 gr
Extracto de levadura	5 gr
Cloruro de Sodio (NaCl)	5 gr
Agua destilada	1 L

Esterilizar en autoclave y mantener a temperatura ambiente

### **Top Agar (1 L)**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Bacto Triptona	10 gr
Extracto de levadura	5 gr
Cloruro de Sodio (NaCl)	5 gr
Agar	7 gr
Agua destilada	1 L

Esterilizar en autoclave y mantener a temperatura ambiente, derretir en microondas cuando requiera ocuparse.

### **PEG 20%/NaCl 2.5M (200 ml)**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Polietilenglicol 8,000	40 gr
NaCl	29.22 gr

Con el Polietilenglicol realizar una solución en 100 ml de agua destilada y esterilizar por autoclave, de la misma manera hacer una solución con el NaCl en 100 ml de agua destilada y esterilizar ambas soluciones en autoclave, una vez estériles esperar a que disminuya la temperatura para mezclarlas también en esterilidad.

### **TBS (1 L)**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Tris-HCl (pH7.5)	0.6057 gr
Cloruro de Sodio (NaCl)	0.8766 gr

Agua destilada	1 L
----------------	-----

Esterilizar en autoclave y mantener a temperatura ambiente

### Cajas de Medio LB + IPTG/Xgal (1 L)

Reactivo	Cantidad
Medio LB	1 L
Agar	15 gr
X-Gal	1 gr
IPTG	0.625 gr
Dimetil formamida	16.5 ml

- Primero se realiza una solución de X-Gal/IPTG, se realiza una solución de x-Gal en 4ml de dimetil formamida, de esta solución se toman 2 ml y se afora a 12.5 ml con dimetil formamida, posterior a ello se le añade el IPTG y se guarda en un contenedor que lo proteja de la luz.

- Una vez que se tiene preparado el X-Gal/IPTG se agrega al medio LB cuando aún está líquido, se mezcla y se preparan los agares en cajas Petri.

### Buffer de yoduros

Reactivo	Cantidad
TRIS-HCl (pH8.0)	0.1211 gr
EDTA	0.0292 gr
Yoduro de Sodio (NaI)	59.95 gr

Aforar a 100 ml con agua destilada, mantener a temperatura ambiente protegido de la luz, descartar si se nota cambio de transparente a un color amarillo.

### Buffer de transferencia

Reactivo	Cantidad
TRIS Base 1M	48 ml
Glicina 1M	39 ml
Metanol al 100%	20 ml
SDS (AL 10%)	30 µl

### Diaminobencidina

Reactivo	Cantidad
Peróxido de hidrógeno 30%	2 µl
PBS Tween 0.05%	1 ml

Agregar 3,3 diaminobencidina antes de usarse

## REFERENCIAS

1. Muratore E, Bertolotti L, Nogarol C, Caruso C, Lucchese L, Iotti B, et al. Surveillance of Infectious Bovine Rhinotracheitis in marker-vaccinated dairy herds: Application of a recombinant gE ELISA on bulk milk samples. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. 2017;185:1–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.01.003>
2. Feliciano M, Sánchez S, Rubén Hernández O, Lázaro H, Hernández A, Arcelia AI, Efrén Díaz A, Félix Martínez E, et al. Seroprevalence and risk factors for reproductive diseases in dairy cattle in Mexico. *J Vet Med Anim Heal*. 2016;8(8):89–98.
3. Alves SVP, da Costa EP, Queiroz-Castro VLD, Machado-Neves M, Guimarães JD, Gomes LL, et al. Bovine herpesvirus 1 can impact the bovine oocyte development during in vitro maturation. *Res Vet Sci* [Internet]. 2019;123(December 2018):135–40. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.12.020>
4. Almeida GR, Goulart LR, Cunha-Junior JP, Bataus LAM, Japolla G, Brito WMED, et al. A conformational epitope mapped in the bovine herpesvirus type 1 envelope glycoprotein B by phage display and the HSV-1 3D structure. *Res Vet Sci* [Internet]. 2015;101:34–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.05.021>
5. Solís-Calderón JJ, Segura-Correa VM, Segura-Correa JC, Alvarado-Islas A. Seroprevalence and risk factors for infectious bovine rhinotracheitis in beef cattle herds of Yucatan, Mexico. *Prev Vet Med*. 2003;57(4):199–208.
6. Dora RS, Concepción AA, Felipe MP, Zeferino G, Vázquez, Anabel CR, Mariel Anguez. Seroprevalence and risk factors associated with infectious bovine rhinotracheitis in unvaccinated cattle in southern Veracruz, Mexico. *African J Microbiol Res*. 2013;7(17):1716–22.
7. Solorio Rivera J, Segura Correa J, Magaña Urbina A. Rinotraqueitis infecciosa bovina en hatos lecheros de la región Cotzacoatlán-Téjaro. *Técnica Pecu en México*. 2005;43(1):27–37.
8. Mediante A, Cual EL, Dan SE, En AC, Unidos LOSE, Las M. Dof: 29/11/2018. 2020 p. 1–15.
9. Kaddour A, Bouyoucef A, Fernandez G, Prieto A, Geda F, Moula N. Bovine herpesvirus 1 in the northeast of Algiers, Algeria: Seroprevalence and associated risk factors in dairy herd. *J Adv Vet Anim Res*. 2019;6(1):60–5.
10. Riaz A. Recent Understanding of the Classification and Life Cycle of Herpesviruses- A Review. *Sci Lett*. 2017;5(2):195–207.
11. Biswas S, Bandyopadhyay S, Dimri U, H. Patra P. Bovine herpesvirus-1 (BHV-1) - a re-emerging concern in livestock: A revisit to its biology, epidemiology, diagnosis, and prophylaxis. *Vet Q*. 2013;33(2):68–81.
12. Contents C. Herpesvirales. En: Fenner's Veterinary Virology. 2011. p. 179–201.
13. Fulton RW, d'Offay JM, Eberle R, Moeller RB, Campen H Van, O'Toole D, et al. Bovine herpesvirus-1: Evaluation of genetic diversity of subtypes derived from field strains of varied clinical syndromes and their relationship to

- vaccine strains. *Vaccine* [Internet]. 2015;33(4):549–58. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.11.033>
14. Dagalp SB, Farzani TA, Dogan F, Alkan F, Ozkul A. Molecular and antigenic characterization of bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) strains from cattle with diverse clinical cases in Turkey. *Trop Anim Health Prod*. 2020;52(2):555–64.
  15. Nandi S, Kumar M, Yadav V, Chander V. Serological Evidences of Bovine Herpesvirus-1 Infection in Bovines of Organized Farms in India. *Transbound Emerg Dis*. 2011;58(2):105–9.
  16. Puentes R. Tesis de Maestría PEDECIBA Área Biología Subárea Microbiología Universidad de la Republica Desarrollo de una proteína recombinante de Herpesvirus bovino tipo 1 ( BoHV-1 ) y evaluación de la especificidad antigénica in vivo . Rodrigo Eduardo Puentes Palomb. Vol. 1. 2016.
  17. Sánchez A, Medina R, Arce D De. diagnostic of Bovine herpesvirus type-1 ). 2008;IX:1–16.
  18. Chase CCL, Fulton RW, O'Toole D, Gillette B, Daly RF, Perry G, et al. Bovine herpesvirus 1 modified live virus vaccines for cattle reproduction: Balancing protection with undesired effects. *Vet Microbiol* [Internet]. 2017;206(2016):69–77. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.03.016>
  19. McGavin.pdf.
  20. Muylkens B, Thiry J, Kirten P, Schynts F, Thiry E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet Res*. 2007;38(2):181–209.
  21. Sánchez T. G, Benito Z. A, Rivera G. H. Seroprevalencia Del Virus De La Rinotraqueítis Infecciosa Bovina En Ganado Lechero Del Valle De Lima. *Rev Investig Vet del Perú*. 2013;14(1):54–60.
  22. Raaperi K, Orro T, Viltrop A. Epidemiology and control of bovine herpesvirus 1 infection in Europe. *Vet J* [Internet]. 2014;201(3):249–56. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.05.040>
  23. Queiroz-Castro VLD, da Costa EP, Alves SVP, Guimarães JD, Dohanik VT, Santos MR, et al. Detection of bovine herpesvirus 1 in genital organs of naturally infected cows. *Theriogenology*. 2019;130:125–9.
  24. Gür S, Erol N, Yapıcı O, Kale M, Tan MT, Turan T, et al. The role of goats as reservoir hosts for bovine herpes virus 1 under field conditions. *Trop Anim Health Prod*. 2019;51(4):753–8.
  25. OIE. Rinotraqueítis infecciosa bovina / vulvovaginitis pustular infecciosa. *Man las Pruebas Diagnóstico y las Vacunas para los Anim Terr* 2019. 2019;8–11.
  26. De C. Comparación de tres pruebas diagnósticas para el aborto por rinotraqueítis infecciosa bovina en hatos lecheros. *Vet Mex*. 2006;37(2):151–63.
  27. I YMS, li JGRD, li MP, li SC. Simultaneidad serológica de *Neospora caninum* con *Brucella abortus* y los virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina y diarrea viral bovina en bovinos pertenecientes al Estado de Hidalgo, México. *Rev Salud Anim*. 2012;34(2):95–100.
  28. Meléndez Soto RM, Flores AGV, Muñoz EJ, Aparicio ED, Segura-Correa

- JC, Barrera ALG. Factores de riesgo asociados a la presencia de aborto y desempeño reproductivo en ganado lechero de Aguascalientes, México. *Rev Mex Ciencias Pecu.* 2010;1(4):391–401.
29. Arabidopsis -Pseudomonas. 2012.
  30. Moreira GMSG, Fuhner V, Hust M. Phage Display and Selections on Cells Wieland Fahr and André Frenzel Abstract. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2018;1701:321–30. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7447-4>
  31. Liu K, Huan B. Peptide P3 Selected from Phage Display Screen Shows Antiviral Activity against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *J Biomed Sci.* 2016;05(02):1–10.
  32. Yadira Palacios Rodriguez Tesis Phage Display2007.pdf.
  33. Susana Juarez tesis Phage Display Diarrea Viral Bovina 2016.pdf.
  34. Karla Verónica Tellez Tesis Phage Display 2006.pdf.
  35. Alfonso Reyes Lugo tesis Phage Display Fasciola Hepática 2009.pdf.
  36. Enrique Vazques tesis Phage Display 2016.pdf.
  37. Armando NO. TESIS: POSIBLE EMPLEO DE PÉPTIDOS MIMOTOPOS OBTENIDOS POR PHAGE DISPLAY DEL LPS DE E. coli O157 EN EL DISEÑO DE VACUNAS CONTRA LA BACTERIA. 2016;
  38. Zambrano-Mila MS, Blacio KES, Vispo NS. Peptide Phage Display: Molecular Principles and Biomedical Applications. *Ther Innov Regul Sci* [Internet]. 2020;54(2):308–17. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s43441-019-00059-5>
  39. Garet E, Cabado AG, Vieites JM, González-Fernández Á. Rapid isolation of single-chain antibodies by phage display technology directed against one of the most potent marine toxins: Palytoxin. *Toxicon.* 2010;55(8):1519–26.
  40. Pacheco S, Soberón M. Phage display : Fundamentals and applications. *Tools to Understand Protein-Protein Interact.* 2012;661(2):143–61.
  41. Russel M, Lowman HB, Clackson T, Al ET. Introduction to phage biology and phage display. *Phage Disp A Pract Approach.* 2004;(January 2004):1–26.
  42. Ledsgaard L, Kilstrup M, Karatt-Vellatt A, McCafferty J, Laustsen AH. Basics of antibody phage display technology. *Toxins (Basel).* 2018;10(6).
  43. Aghebati-Maleki L, Bakhshinejad B, Baradaran B, Motallebnezhad M, Aghebati-Maleki A, Nickho H, et al. Phage display as a promising approach for vaccine development. *J Biomed Sci* [Internet]. 2016;23(1):1–18. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s12929-016-0285-9>
  44. Manuel V, Díaz M, Ignacio JH, García JÁ. Directivo.
  45. Zapata J, Ossa J, Bedoya G, Zuluaga F. Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (RIB). Caracterización Molecular de una cepa Colombiana de Herpesvirus Bovino tipo 1. *Rev colomb cienc pecu.* 2002;15(14):92–9.
  46. Peptides L, Guo X, Chen RR. An Improved Phage Display Procedure for Identification of. *Society.* 2006;
  47. NEB. Phage Display Instruction Manual. *NEB Manuals* [Internet]. 2017; Disponible en: <https://www.neb.com/-/media/catalog/datacards-or-manuals/manuale8100.pdf%0Ahttp://www.rmjordan.com/manuals/D-1803Pos1Ar4web.pdf>
  48. Costa LE, Lima MIS, Chávez-Fumagalli MA, Menezes-Souza D, Martins VT,

- Duarte MC, et al. Subtractive phage display selection from canine visceral leishmaniasis identifies novel epitopes that mimic leishmania infantum antigens with potential serodiagnosis applications. *Clin Vaccine Immunol.* 2014;21(1):96–106.
49. Lehmann D, Sodoyer R, Leterme S. Characterization of BoHV-1 gE envelope glycoprotein mimotopes obtained by phage display. *Vet Microbiol.* 2004;104(1–2):1–17.
  50. Bastos CR, Mathias LA, Jusi MMG, Santos RF dos, Silva GCP da, André MR, et al. Evaluation of dot-blot test for serological diagnosis of bovine brucellosis. *Brazilian J Microbiol [Internet].* 2018;49(3):564–8. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.10.002>
  51. Brown JC, Newcomb WW. Herpesvirus capsid assembly: Insights from structural analysis. *Curr Opin Virol [Internet].* 2011;1(2):142–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2011.06.003>
  52. Kornfeind EM, Visalli RJ. Human herpesvirus portal proteins: Structure, function, and antiviral prospects. *Rev Med Virol.* 2018;28(3):1–15.
  53. Heming JD, Conway JF, Homa FL. Herpesvirus capsid assembly and DNA packaging. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2017;223:119–42.
  54. De Plano LM, Carnazza S, Franco D, Rizzo MG, Conoci S, Petralia S, et al. Innovative IgG Biomarkers Based on Phage Display Microbial Amyloid Mimotope for State and Stage Diagnosis in Alzheimer’s Disease. *ACS Chem Neurosci.* 2020;11(7):1013–26.
  55. Shahin F, Raza S, Yang K, Hu C, Chen Y, Chen H, et al. Bovine herpesvirus 1 tegument protein UL21 plays critical roles in viral secondary envelopment and cell-to-cell spreading. *Oncotarget.* 2017;8(55):94462–80.
  56. Japolla G, Penido AFB, Almeida GR, Bataus LAM, Cunha JP, Ribeiro C, et al. Characterization of Monoclonal Antibodies against Bovine herpesvirus type 1 selected by Phage Display Technology. *Semin Agrar.* 2017;38(6):3915–20.
  57. Hou P, Zhao G, He C, Wang H, He H. Biopanning of polypeptides binding to bovine ephemeral fever virus G1 protein from phage display peptide library. *BMC Vet Res.* 2018;14(1):9–12.
  58. Hou P, Wang H, Zhao G, He C, He H. Rapid detection of infectious bovine Rhinotracheitis virus using recombinase polymerase amplification assays. *BMC Vet Res.* 2017;13(1):1–10.
  59. Zamit 2010.pdf.
  60. Ulises Hernandez Tesis Phage Display 2010.pdf.
  61. Suo S, Wang X, Zarlenga D, Bu R e., Ren Y, Ren X. Phage display for identifying peptides that bind the spike protein of transmissible gastroenteritis virus and possess diagnostic potential. *Virus Genes.* 2015;51(1):51–6.
  62. Ana Marina Orozco tesis Phage Display 2015.pdf.
  63. Pérez AB. IDENTIFICACIÓN MÉTODO PHAGE DISPLAY MIMÓTOPOS EPÍTOPES INMUNODOMINANTES PROTEÍNA SAT. 2013;
  64. Silva HO, Souza MA de, Tavares TCF, Soares PM, Lima AMC. Development and standardization of the Dot Blot test for serological diagnosis of bovine leptospirosis. *Res Soc Dev.* 2021;10(6):e22710615091.