



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**IDENTIFICACIÓN DE EPÍTOPOS DE IMPORTANCIA
DIAGNÓSTICA DEL VIRUS DE DIARREA VIRAL BOVINA
MEDIANTE EL USO DE LA TÉCNICA PHAGE DISPLAY**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:
MIGUEL ANGEL CORTES RODRÍGUEZ**

**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.

Dedicatorias

A mi madre Leticia Rodríguez Pacheco y mi padre Guillermo Cortes González por creer en mí, su apoyo incondicional desde que inicie la carrera, las palabras de aliento, el amor que me brindaron y el ejemplo de nunca rendirse, ver su esfuerzo día a día me motivo a continuar y lograr mi objetivo, gracias por todo, esto también es para ustedes, gracias por apoyar mi amor a la ciencia, los amo.

A mis hermanos Guillermo Cortes Rodríguez y Josué Emanuel Cortes Rodríguez, siempre serán mi motivación para seguir creciendo y ser mejor para poder ser un ejemplo para ustedes, los amo.

A mis abuelas Victoria Rodríguez Pacheco y Raquel Gonzáles Ugalde por verme siempre con orgullo, el amor que me siguen brindando y la emoción de verme creciendo en todo sentido.

A mi abuelo que en paz descansa y aunque sé que no podrás leer esto, también sé que estarías feliz de ver que logre lo que me propuse, gracias por lo que me enseñaste, un abrazo hasta donde estés.

A Yordy Negrete Moreno, gracias shavo por hacer de este proyecto que empecé por ver tu entusiasmo algo tan memorable, por ser más que un amigo dentro y fuera del laboratorio y convertirte en mi familia, siempre voy a recordar todas las aventuras en el laboratorio y que fuiste la primer persona que creyó en mí en ese lugar, de nuevo, gracias hermano.

A Skarlet Villaseñor por todo el apoyo que me brindo durante la tesis, gracias por tu amistad y por la confianza para ayudarnos mutuamente, te convertiste en una gran amiga y siempre voy a recordar esas palabras de aliento y esas risas durante la tesis.

A mi asesor José Alberto Cano Buendía por todo lo que me enseñó, por la paciencia y la exigencia, por ser ejemplo de científico que aspiro a ser, gracias Doc por ver en mi cualidades que yo no lograba ver, darme su apoyo y consejos, gracias por la oportunidad de demostrarme que soy capaz de hacer ciencia y siempre dar lo mejor de mí, de brillar en donde no creí que podría hacerlo, será un orgullo ser su colega.

A mis amigos con los que termine la carrera Gonzalo Guerrero, Carlos Rodríguez y Cristian Basilio por siempre estar conmigo cuando sentía que no podría lograrlo y me dieron ánimos para seguir, gracias carneros.

A Rocío Estefanía Morales Guerrero por siempre apoyarme, gracias por darme los ánimos que en ocasiones yo no tenía y creer en mi cuando ni siquiera yo lograba hacerlo, por alentarme siempre y ayudarme a no rendirme, gracias tú, te amo y te always.

A mi perrita y compañera de vida, Canela, por ser mi modelo para las materias a lo largo de la carrera, mi cofre de confesiones y desahogos, por el amor que me ha dado a lo largo de estos 15 años conmigo, siempre serás la mejor compañía, perra oca.

A mi familia y amigos que me faltan porque aunque no están sus nombres plasmados les agradezco a todos por su cariño y amistad.

Agradecimientos

Este proyecto fue apoyado por: PAPIIT IN220117 de la UNAM, identificación de epítomos de importancia del virus de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (Herpes Virus Bovino Tipo 1) mediante el uso de Phage Display y su adaptación con fines diagnósticos al sistema multiplex Luminex.

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.

Al laboratorio de Virología, al Laboratorio de Brucelosis y Tuberculosis y al Laboratorio de Inmunofisiología y Proteómica en los cuales encontré la guía para poder resolver dudas así como amistades tan sinceras como valiosas, gracias por todo.

Al personal del laboratorio de inmunología en el Instituto de investigaciones biomédicas, a cargo de Gohar Gevorgyan Markosian con especial agradecimiento a Gonzalo Asariel Acero Galindo.

A todo el personal académico, administrativo del departamento de Microbiología e Inmunología.

Índice

Resumen.....	1
I. Introducción.....	2
I.I Antecedentes.....	2
I.II Virus de la diarrea viral bovina.....	4
I.II.I Características	4
I.II.II Replicación	5
I.II.III Genotipos y biotipos.....	10
I.II.IV Respuesta y alteraciones del sistema inmunológico e inmunidad generada	13
I.II.V Signología.....	17
I.II.VI Métodos diagnósticos.....	22
I.III Phage Display o Despliegue en fagos.....	27
I.III.I Generalidades.....	27
I.III.II Características del fago M13	28
I.III.III Bibliotecas de péptidos expresadas en fagos.	30
I.III.IV Biopanning o bioselección.	31
II. Justificación.....	32
III. Hipótesis	33
IV. Objetivos.....	34
IV.I Objetivo general	34
IV.II Objetivos específicos.....	34
V. Material y métodos	35
VI. Resultados y discusión.....	44
VII. Conclusión.....	53
VIII. Referencias.....	54
Anexo.....	77

Resumen

MIGUEL ANGEL CORTES RODRIGUEZ. Identificación de epítomos de importancia diagnóstica del virus de diarrea viral bovina mediante el uso de la técnica Phage Display (bajo la dirección del Dr. José Alberto Cano Buendía)

Teniendo presente que la Diarrea Viral Bovina (DVB) es causante de pérdidas económicas en la industria ganadera y debido a esto una metodología diagnóstica efectiva es imprescindible para su prevención y control. Diferentes metodologías diagnósticas como el aislamiento viral o RT-PCR son usadas para la identificación de esta enfermedad, teniendo como inconveniente que se necesitan equipos especializados, mano de obra con una capacitación especial y costos elevados a comparación del diagnóstico serológico. Por lo anterior y con la finalidad de identificar péptidos con características antigénicas específicas se utilizó la técnica Phage Display para la identificación de epítomos inmunodominantes de regiones hiperconservadas del virus de la Diarrea Viral Bovina (vDVB) que sean reconocidos por los anticuerpos de animales que han sido infectados naturalmente en México.

Utilizando una biblioteca de péptidos expresados en fagos Ph.D. -7 en 4 rondas de bioselección con un pool de sueros de bovinos de campo en México positivos a DVB identificando 3 clonas reactivas (MACD8, MACD9 y MACD14) utilizando un ensayo de ELISA; a estas 3 clonas se les realizó una extracción de ADN y se identificó la secuencia de aminoácidos que expresaban estas clonas NDRWESP, LSNNNLR y NLNRTNP respectivamente mostrando homología con la proteína no estructural NS5B la cual es una proteína hiperconservada del vDVB, estas clonas fueron probadas con ensayos de ELISA y Dot-blot en ambos ensayos se obtuvieron resultados que evidencian el reconocimiento de sueros individuales positivos a DVB junto al no reconocimiento de un suero negativo a DVB.

Palabras clave: Diarrea Viral Bovina, Phage Display, ELISA, Dot-blot, Diagnóstico serológico, epítomo inmunodominante, NS5B.

I. Introducción

I.I Antecedentes

La Diarrea Viral Bovina (DVB) también conocida como enfermedad de las mucosas, afecta en gran medida la producción bovina en México desde hace más de 60 años,¹ teniendo una amplia distribución a nivel mundial siendo una de las enfermedades virales más comunes y económicamente importante. Además de afectar al ganado bovino, esta enfermedad puede afectar a animales de otras especies domésticas y fauna silvestre como cabras, borregos, cerdos, bisontes, llamas, alpacas y venados cola blanca entre otros; esta enfermedad causa alteraciones digestivas, respiratorias, nerviosas, inmunológicas y reproductivas,^{2,3} ejemplos de ello son: pérdida de peso, baja producción láctea y cárnica, abortos, bajo índice de gestación y malformación en becerros o mortinatos; además de estos efectos directos, favorece la presentación de otras enfermedades infecciosas y/o parasitarias que impacta de forma negativa en la producción bovina.^{2,4,5}

La prevalencia a nivel nacional se encuentra alrededor del 69%⁶, además la Organización Mundial para la Salud Animal (OIE) incluyó esta enfermedad (DVB) en la lista de enfermedades de reporte obligatorio en bovinos por las pérdidas económicas que conlleva a nivel mundial, ya que altera negativamente todas las etapas del ciclo productivo y si en una zona libre de esta enfermedad es introducido un animal infectado en un lapso de 2 a 3 años, se convertirá en una zona endémica de la enfermedad, modificando su estatus zoonosanitario con todas las repercusiones que esto conlleva.^{3,4,7}

Las pérdidas económicas entre 1996 y 1999 se estiman en un promedio de entre 1,254 y 25,640 pesos mexicanos/vaca/año que con el cálculo de la inflación a la fecha actual (2020) se estima una pérdida mínima de entre 3,365 y 68,810 pesos mexicanos/vaca/año tomando en cuenta costos de inseminaciones para 1-2 partos, pérdidas en producción láctea, becerros que no pudieron ser vendidos entre otras, lo que hace que esta enfermedad sea de suma importancia.^{8,9}

Se correlaciona el aumento de la prevalencia de esta enfermedad con el grado de tecnificación de las instalaciones, porque un sistema intensivo conlleva a un hacinamiento mayor, aumentando el riesgo de contagio por el estrecho contacto entre animales teniendo como consecuencia que el virus se propague con mayor facilidad. Existen también animales que son inmunotolerantes lo que los hace persistentemente infectados (PI), estos animales nacieron de hembras infectadas los cuales podrían presentar un riesgo biológico, ya que se estima que podrían contagiar al 90% del hato que no presenta la enfermedad, los animales PI no generan anticuerpos lo que dificulta su diagnóstico y control.¹⁰

Por otro lado, tenemos unidades de producción en sistemas semi intensivos o de traspatio donde la falta de aplicación de metodologías diagnósticas, medidas de bioseguridad, así como de medicina preventiva, elevan la facilidad con la que se transmite la enfermedad.⁴

I.II Virus de la diarrea viral bovina

I.II.I Características

El comité internacional de taxonomía de virus (ICTV) clasifica al virus de la DVB (vDVB) en la familia *Flaviviridae* donde se agrupan diferentes virus que provocan enfermedades a diferentes especies de animales domésticos, silvestres y al humano. Dentro de esta familia encontramos 4 géneros: Flavivirus (Virus de Zika, Virus del Oeste del Nilo y Virus de la Fiebre Amarilla entre otros), Pegivirus (Pegivirus A y B), Hepacivirus (Virus de la Hepatitis C) y los Pestivirus donde se encuentra el vDVB y también podemos encontrar virus como el de la Peste Porcina Clásica y el virus de la Enfermedad de las Fronteras.¹¹⁻¹³

Los pestivirus son virus envueltos, esféricos y miden de 40 a 60 nm de diámetro. Se componen de una cadena simple de ARN sentido positivo (perteneciendo al grupo Baltimore IV) de 12,300 bases aproximadamente que posee en ambos extremos terminales regiones sin traducir o UTR (Untranslated region) envuelta en una cápside proteica de 27-29 nm de diámetro, rodeada por una membrana fosfolipídica con tres glicoproteínas ancladas a ella (Erns, E1 y E2).^{11,14} A diferencia de los demás virus en la familia *Flaviviridae* los virus del género pestivirus codifican dos proteínas únicas: Npro (con efecto auto proteolítico) y Erns (con actividad de RNasa), las cuales están relacionadas con la supresión de la respuesta inmune del hospedador mediada por interferón (IFN).¹⁵⁻²²

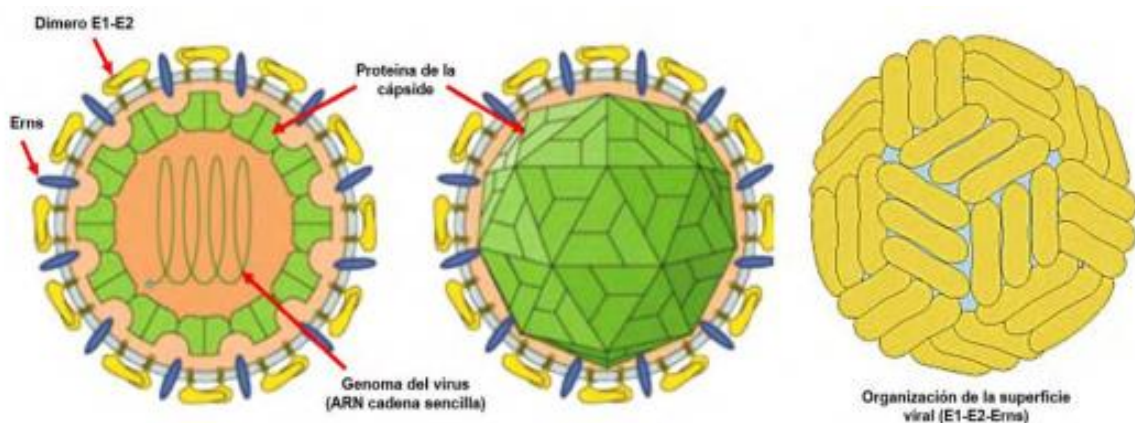


Figura 1. Estructura del virión del vDVB, morfología y componentes estructurales.^{11,23}

I.II.II Replicación

La adsorción del virus a la superficie celular se da gracias a un enlace entre receptores celulares y las glicoproteínas E virales, siendo el heterodímero E1-E2 y el homodímero E2-E2 los que tienen una mayor participación en el acoplamiento con el receptor CD46; para la glicoproteína E2 en específico encontramos al receptor lipoproteico de baja densidad (LDL-R),²⁴ el virus puede utilizar este receptor en células de diferentes especies animales,^{25,26} de manera complementaria la glicoproteína Erns (presente solo en los pestivirus) puede unirse a los glucosaminoglicanos presentes en la superficie celular participando en la adsorción.²⁷

La internalización del virus se da gracias a endocitosis dependiente de clatrina llegando al citoplasma donde se lleva a cabo la replicación viral,²⁸ la cadena de RNA del vDVB cuenta en su extremo 5' con una secuencia de nucleótidos que imitan la estructura CAP de los RNAm que tiene la función de entrada al sitio ribosomal interno²⁹ mediante la traducción de una poliproteína de aproximadamente 4000 aminoácidos (Figura 2).^{11,14,25}

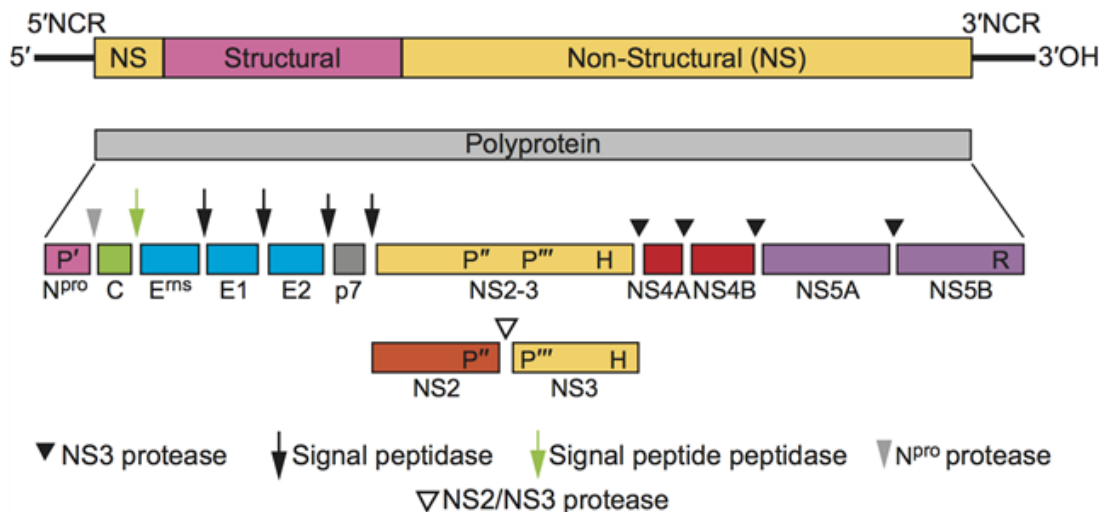


Figura 2. Esquema de la poliproteína resultante de la traducción del RNA del vDVB y los diferentes productos resultantes de esta.^{25,30}

Las proteínas estructurales son las siguientes:

- Proteína C: proteína que conforma la cápside viral, pequeña de 14 kDa, posee carga básica y tiene la función de empaquetar al RNA viral por su afinidad a este.^{31,32}
- Glicoproteína Erns: esta proteína no tiene equivalente en otros géneros de la familia *Flaviviridae*. Se encuentra en forma de homodímeros, casi la mitad de su estructura está glicosilada, participa en la adsorción al interactuar el carboxilo terminal de esta proteína con los glucosaminoglicanos de la superficie celular, pero no participa en la internalización del virión en la célula huésped y puede disociarse fácilmente de la envoltura viral.³³ Esta glicoproteína tiene la función de inhibir la síntesis de RNA de doble cadena interviniendo con la síntesis de éste en la célula infectada o las células adyacentes al ser secretada, además de inhibir la activación de los receptores tipo Toll (RTT-3 y 7).^{18,21} Sumado a esto, puede producir apoptosis de linfocitos derivando en una leucopenia e inmunosupresión.^{18,34,35}
- Glicoproteína E1 y E2: estas glicoproteínas como la glicoproteína Erns están presentes en la envoltura viral y son transmembranales, se encuentran en forma de homodímeros (E2-E2) que se forman en el estadio temprano en el ensamblaje y heterodímeros (E1-E2) que se forman en el estadio tardío una vez que la glicoproteína E1 es liberada del retículo endoplásmico rugoso; participan en la adsorción del virus a la superficie celular por medio de unión al receptor CD46 presente en células epiteliales, endoteliales, polimorfonucleares, linfocitos, monocitos y macrófagos; además de esto, también ayudan a la internalización del virión.^{26,36-38}

Las proteínas no estructurales se describen a continuación:

- Npro: es una autoproteasa con actividad autocatalítica que se autocataliza postraduccionalmente liberando la proteína C de la poliproteína obtenida de la traducción del material genoma viral. Actúa como antagonista del IFN-I mediante la degradación del receptor tipo toll 3 (RTT-3).^{16,35}

- p7: proteína pequeña de 6 a 7 kDa con capacidad para formar canales iónicos en retículo endoplásmico y aparato de Golgi, también es conocida como viroporina, está compuesta principalmente por aminoácidos hidrofóbicos, está codificada entre la glicoproteína E2 y la proteína no estructural 2 (NS2), participa en el estadio tardío del ensamblaje del virión y su posterior liberación.^{39,40}
- NS2 y NS3: la proteína NS2 es una cisteína proteasa que tiene participación en la regulación de la replicación del RNA de los pestivirus, responsable de la escisión del complejo NS2-3 por acción de la chaperona celular "Jiv" la cual permite la liberación de NS3.^{41,42} Las cepas no citopáticas, donde la actividad autoproteolítica de NS2 disminuye de manera significativa en las primeras horas de infección, pueden tener mutaciones, lo que haría que se convirtieran en cepas citopáticas teniendo mayor actividad proteolítica liberando más NS3 y estando libre de NS2 induce la activación de la apoptosis, por lo que se le considera un marcador de citopatogenicidad.^{43,44}
La proteína no estructural NS3 es una proteína conservada en los Pestivirus de 80 kDa y desencadena una respuesta inmune humoral importante, su dominio C-terminal es una proteasa que procesa el resto de las proteínas no estructurales de la poliproteína y el extremo N-terminal actúa como una RNA helicasa, por lo que es esencial para la replicación viral.⁴⁵⁻⁴⁷
- NS4A: esta proteína no estructural es necesaria para dar estabilidad a NS3 y cooperar con su actividad proteolítica, siendo la región central el cofactor dominante, teniendo interacción con la región N-terminal de NS3, además, interactúa con proteínas membranales del retículo endoplásmico donde se produce el RNA en sentido negativo (antigenoma) y RNA en sentido positivo.^{48,49}
- NS4B: es una proteína de aproximadamente 38KDa transmembranal en retículo endoplásmico, aparato de Golgi y mitocondrias, puede asociarse al complejo de replicación viral interactuando con NS3, NS5A y NS5B además de reorganizar membranas de células infectadas; mutaciones de esta proteína implican un cambio en el biotipo citopático a no citopático aun en presencia de concentraciones elevadas de NS3 ya que modifica la membrana mitocondrial alterando la activación de la apoptosis.^{50,51}

- NS5A: entre las funciones conocidas de esta proteína de alrededor de 58 kDa está el reclutamiento de componentes celulares para la replicación, además de estar unida a la membrana del retículo endoplásmico junto con NS4B y NS5B, se ha observado que tiene interacción con el factor-1 de elongación de la traducción (eEF1A) esencial para la viabilidad celular al regular la traducción del RNAm y organización del citoesqueleto.⁵²⁻⁵⁵
- NS5B: esta proteína se encuentra en el extremo carboxilo terminal de la poliproteína, tiene acción de RNA polimerasa dependiente de RNA, por lo que está involucrada directamente en la replicación del RNA por los mecanismos de elongación (Dependiente de cebador) y *de novo* (Independiente de cebadores), también tiene participación en el ensamblaje de la progenie viral y es una proteína altamente conservada en los pestivirus con la característica de no tolerar alteraciones en sus aminoácidos disminuyendo su capacidad de unirse al RNA y por consiguiente su actividad catalítica en la replicación, estas características la hacen el objetivo perfecto para el desarrollo de tratamientos antivirales aunque este tipo de terapias han resultado en una resistencia a este tipo de fármacos.⁵⁶⁻⁶⁰

Cuando se traduce el material genético del virus, la primera escisión se da en la proteína Npro, liberándose a sí misma y a la proteína C, continuando con Erns, E1 y E2, donde Erns y NS4B translocan estas glicoproteínas a la membrana del retículo endoplásmico, donde maduran y forman los homodímeros y heterodímeros, previamente mencionados, los cuales se encuentran asociados a la proteína calnexina.⁶¹⁻⁶⁴

Las proteínas no estructurales son procesadas por el complejo NS3-NS4A liberando las proteínas restantes, además de ensamblarse para formar los complejos de replicación (NS4A-NS4B-NS5A-NS5B) asociados a la membrana del retículo endoplásmico que por acción de NS5B, llevarán a cabo la síntesis de las cadenas negativas de RNA viral, también conocidas como antigenoma, que posteriormente funcionarán como templados o cebadores para codificar la cadena en sentido positivo, que servirá para el empaquetamiento y dar lugar a la progenie viral.^{25,64,65}

El ensamblaje y maduración de la progenie viral tiene lugar en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi, posteriormente, los viriones maduros son liberados mediante vesículas citoplasmáticas a través de membranas intracelulares (ver Figura 3) siendo la proteína p7 indispensable para desestabilizar las membranas y pueda ser posible la liberación del virión.^{30,40,66}

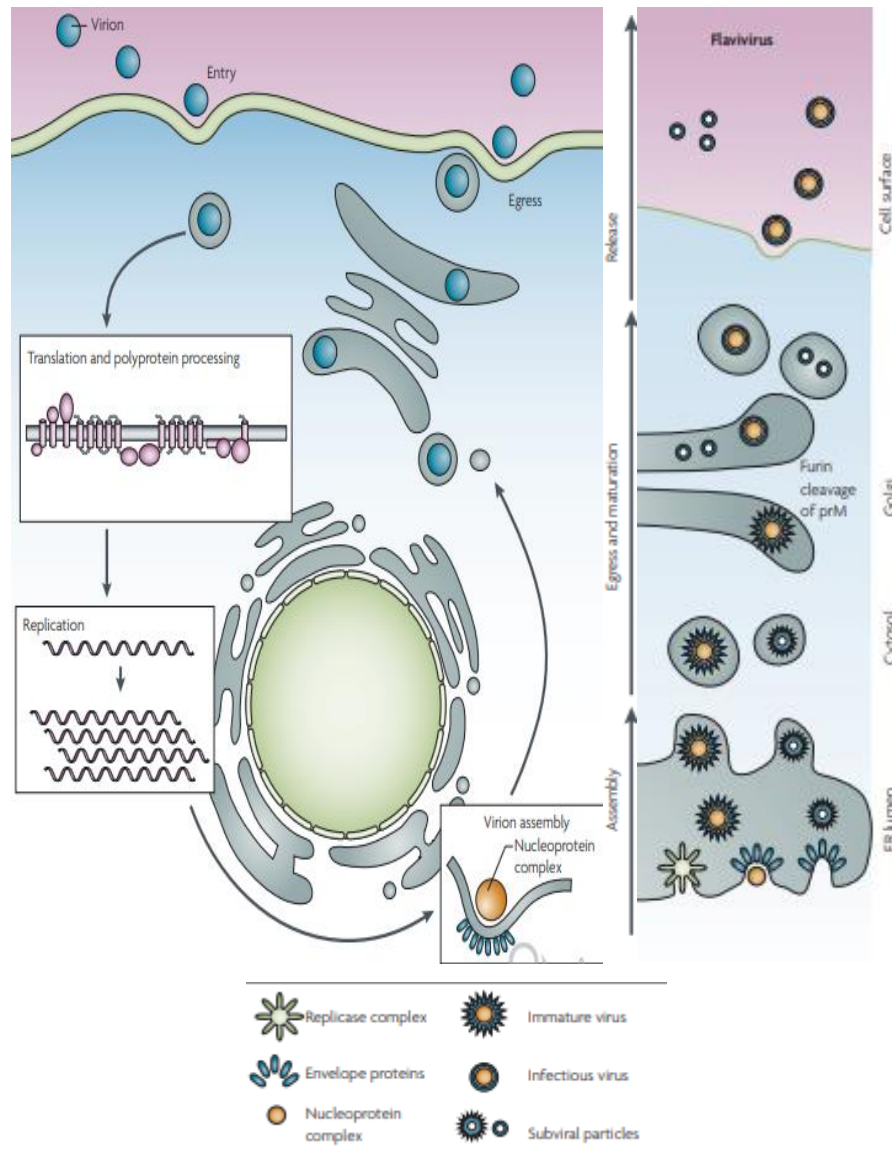


Figura 3. Representación de las fases de la replicación de la familia *Flaviviridae* con las diferencias entre sus diferentes géneros.³⁰

I.II.III Genotipos y biotipos

Los genotipos reflejan diferencias en el genoma a diferencia de los biotipos que evidencian las alteraciones que provocan en las células, tomando en cuenta lo anterior, el vDVB se ha dividido en 2 genotipos: vDVB tipo 1 y vDVB tipo 2.⁶⁷ Esta clasificación se realizó utilizando la similitud en la secuencia de la región 5'UTR, para posteriormente enfocarse en las diferencias que presentaban ambos genotipos en distintas partes del genoma.⁶⁸

El vDVB tipo 1 es responsable de procesos leves con signología inaparente, caracterizados por un leve aumento de la temperatura corporal, la presencia de lesiones moderadas a lo largo del aparato digestivo y en órganos del sistema inmune. En bovinos gestantes este genotipo puede inducir abortos. Los aislados de tipo 1 se emplean con frecuencia en el desarrollo de vacunas y métodos de diagnóstico, siendo los más usados en investigación.^{67,69}

El vDVB tipo 2 está asociado con enfermedad aguda severa,^{70,71} caracterizada por lo general por presentar un cuadro hemorrágico agudo, conocido como síndrome hemorrágico, provocando la muerte de los animales.⁷² Sólo una minoría de las cepas del vDVB tipo 2 causa enfermedad aguda severa, no siendo en general más virulentas que las de tipo 1.⁶⁷

Ambos tipos se han dividido en subgrupos o subgenotipos, teniendo 11 subgenotipos para el vDVB tipo 1 (1a,1b,1c,1d,1e,1f,1g,1h,1i,1j,1k) y 2 para el vDVB tipo 2 (1a,1b).^{73,74}

Este virus tiene dos biotipos, uno citopático (cp) que provoca la enfermedad conocida como enfermedad de las mucosas, teniendo como principal indicador molecular la presencia de las proteínas NS2 y NS3 disociadas con una concentración detectable y uno no citopático (ncp)⁷⁵ que está presente en animales PI (ver Figura 4), con la diferencia de que las proteínas NS2 y NS3 no se encuentran disociadas después de un periodo corto de tiempo durante la replicación viral, por lo que solo se detecta el complejo NS2/3 (la gran diversidad de ambos biotipos es atribuida a la gran capacidad de mutación de los virus con RNA)⁴⁴. Ambos biotipos de este virus afectan animales de todas las edades y estados fisiológicos en producción.⁷⁶⁻⁷⁸

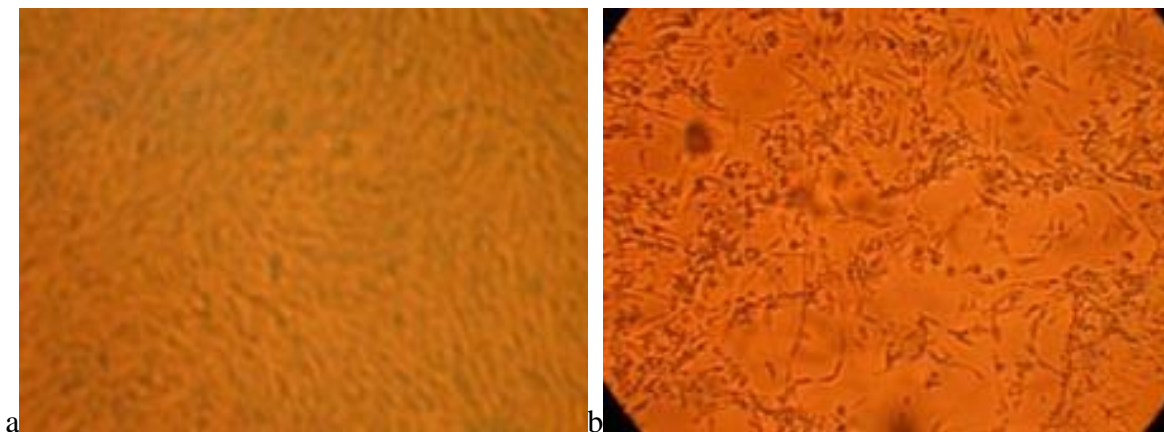


Figura 4. Cultivo celular en monocapa de cornete nasal de feto bovino (CNB) el cual fue infectado con una cepa ncp (a) sin cambios aparentes y con una cepa cp (b) donde se puede apreciar la muerte celular que es provocada por este biotipo del vDVB.⁷⁹

Se ha demostrado que el vDVB, dependiendo si es cp o ncp, tiene un tropismo diferente, teniendo el biotipo ncp aislado de órganos altamente irrigados como: pulmón, hígado, riñones, bazo y cavidad nasal, en cambio el biotipo cp fue aislado de órganos como: rumen, retículo, intestino delgado, colon, linfonodos mesentéricos y placas de Peyer.⁸⁰

El biotipo ncp dentro de estudios de laboratorio en cultivo celular no presenta cambios morfológicos en las células y es prácticamente imposible distinguir células sanas de células infectadas con este biotipo, además de eso, tiene la capacidad de provocar una inhibición del IFN-I evitando la apoptosis. Se relaciona directamente a la reproducción, causando alteraciones morfológicas en el feto, siendo este, el biotipo presente en animales PI con mayor prevalencia dentro de los hatos ganaderos. A su vez, por recombinación genética, este biotipo puede dar origen a un biotipo cp por una mutación en la proteína NS2 donde no se inhiba la acción de la chaperona ‘‘Jiv’’, teniendo como resultado cepas donde la escisión de NS2 de NS3 es posible, lo que haría que los animales PI presentaran la enfermedad conocida como enfermedad de las mucosas.^{18,81-83}

Un virus con biotipo cp, como ya se mencionó, puede surgir de la mutación de uno ncp que se caracteriza por alteraciones en la cromatina, morfología celular, formación de cuerpos apoptóticos y la culminación en muerte celular, todo lo anterior debido al proceso de síntesis de proteínas virales por la traducción del material genético. Este biotipo, a diferencia del ncp, induce la síntesis de IFN-I y da lugar a la apoptosis de macrófagos infectados, esto por las modificaciones celulares resultantes de la actividad de la proteína NS3 libre de NS2. Debido a una mutación en la proteína NS4B, un virus cp puede cambiar a ncp por su interacción y alteración de la apoptosis.^{18,50,51,82}

I.II.IV Respuesta y alteraciones del sistema inmunológico e inmunidad generada

Aunque se tengan biotipos cp y ncp, el efecto citopático se relaciona con la virulencia de cada cepa, ya que, se han registrado casos donde una cepa ncp pero altamente virulenta provoca la muerte de las células por medios diferentes a la escisión de la proteína NS3, los cuales aún no se han estudiado.⁸⁴

Cuando se presenta una infección por el vDVB se pueden alterar diversos órganos y tejidos, incluyendo células como: monocitos, disminuyendo su quimiotaxis así como la expresión de CD80/CD86 y el complejo principal de histocompatibilidad II (MHC II) en su superficie, células presentadoras de antígeno (CPA): macrófagos y células dendríticas presentando disminución en el número de receptores Fc y de complemento (C3b/iC3b) que son necesarias para la fagocitosis, neutrófilos reduciendo su actividad microbicida y linfocitos T y B induciendo su apoptosis por medio de los macrófagos infectados generando una inmunosupresión generalizada;^{85,86} sumado a la apoptosis inducida en linfocitos T por los efectos en macrófagos y células dendríticas se disminuye la presentación de antígeno.⁸⁷

Durante esta inmunosupresión, los monocitos circulantes y los macrófagos en tejidos encargados de reconocer componentes o moléculas conservadas de microorganismos denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) por los receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) se ve afectado por el vDVB en la señalización de los receptores tipo Toll (TLR), que se caracterizan por la liberación de citocinas como IL-1 β , Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) e IL-6, provocando una alteración en la respuesta proinflamatoria y antiviral, esta alteración en el sistema inmune aumenta el riesgo de presentar infecciones secundarias bacterianas o coinfecciones con agentes virales como Herpes virus bovino tipo 1 (BHV-1), Virus sincitial respiratorio bovino (bRSV) y Virus de la parainfluenza bovina 3 (BPIV3), agentes causales del complejo respiratorio bovino.^{84,88}

Para la síntesis de IFN-I es necesario que los TLR 3,7 y 8 presentes en la membrana celular o en membrana de endosomas celulares, detecten cadenas de RNA viral de cadena sencilla o de doble cadena; en el caso de receptores intracitoplasmáticos se encuentran los receptores citoplasmáticos similares a RIG-I, la proteína Erns actúa como antagonista de este interferón al inhibir la síntesis de la doble cadena de RNA y la proteasa Npro degrada al RTT-3 por lo que estas proteínas tienen una participación activa en la evasión de la respuesta inmune innata, lo que dificulta el desarrollo de la inmunidad adaptativa.^{18-20,89,90}

La proteína NS4B modula la activación de TLR-7 lo que también sería de ayuda para evasión del sistema inmune, este receptor depende del adaptador celular MyD88 donde el gen 88 es responsable de la diferenciación de células mieloides dando como resultado linfopenia e inmunosupresión, además, si llega a presentar una mutación, puede inhibir el proceso de apoptosis inducido por NS3,^{50,51,91} adicional a esto, la proteína NS5A interactúa en macrófagos con MyD88 inhibiendo la activación del factor de transcripción kB (NFkB).⁹²

Cuando una hembra con menos de 125 días de gestación se infecta con una cepa ncp del vDVB da como resultado animales PI ya el sistema inmune del embrión no lo reconoce como extraño y por acción del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHCII) incorpora a los antígenos virales a la memoria de antígenos propios,^{10,93,94} además, la cepa del vDVB presente en este fenómeno por su habilidad para evadir al sistema inmune inhibiendo la producción de IFN-I, TNF α , e IL- β , que a su vez inhibe respuestas de la inmunidad innata como la inflamación, apoptosis de células infectadas y por consiguiente la activación de linfocitos T favorece que exista esta tolerancia inmunológica.^{25,87} Otras alteraciones demostradas son: linfopenia empezando con linfocitos T citotóxicos (CD8+), seguido de los T cooperadores (CD4+), así como de citocinas proinflamatorias como IL-2 e IFN γ (Gamma), siendo este último indispensable para la respuesta inmune ya que permite la activación de las CPA.^{85,86,95} Un estudio reporta que esta disminución en el IFN- γ viene acompañada de una previa y débil inducción transitoria, que no puede terminar en una respuesta inmune adaptativa, ya que el sistema inmune no es maduro en esta etapa del desarrollo, teniendo como único resultado una disminución en la viremia fetal y el establecimiento de la infección persistente por la inmunotolerancia generada.^{96,97}

Respecto a la inmunidad de tipo humoral, si las CPA que tuvieron contacto con el vDVB, interactúan con los linfocitos B y estos a su vez con linfocitos T cooperadores (CD8+) (ver Figuras 5), tendrá como resultado la generación de manera temprana IgM, células plasmáticas y a su vez IgG con efecto protector así como células de memoria, correspondientes a la inmunidad adaptativa donde los anticuerpos serán los encargados de reconocer al antígeno y generar una protección al neutralizar al virus;^{98,99} para el caso del vDVB y el Virus de la hepatitis C se ha utilizado a la glicoproteína E2 como epítipo blanco, ya que se demostró que la inmunidad generada por este epítipo viral nativo o recombinante en vectores de expresión como *E. coli* o adenovirus, induce la generación de anticuerpos neutralizantes,^{100,101} con el inconveniente de que esta proteína es hipervariable, lo que hace que al tener un margen de mutación muy grande, esta proteína no pueda ser reconocida por los anticuerpos generados por una cepa diferente como lo son los biotipos cp y ncp aunque dentro de ellos puede haber variantes que también los hagan evadir a los anticuerpos.¹⁰² Al existir una alta variabilidad en la glicoproteína E2, se ha buscado utilizar otras proteínas del virus que puedan generar una respuesta inmune humoral efectiva y que los anticuerpos sean neutralizantes, ejemplos de estas proteínas son la proteína C de la cápside y proteínas no estructurales como NS3 o NS5B, que tienen una mayor conservación entre las diferentes cepas sin embargo un estudio realizado en otro virus de la familia *Flaviviridae* (Virus de la Hepatitis C), demostró que hay diferencias en la proteína no estructural NS5B de este y otros virus de esta familia.¹⁰³⁻¹⁰⁵

Las proteínas no estructurales NS3 y NS5B pueden desencadenar una respuesta humoral (una prevalencia de anticuerpos ante proteínas no estructurales de entre el 68 y 88% en virus como el de la hepatitis C¹⁰⁶) detectable con ELISA indirecto y aunque faltan estudios para evaluar su efecto protector, los resultados son prometedores, ya que detecta a ambos biotipos, lo que evidencia una clara conservación en proteínas no estructurales, sumado a esto, las proteínas no estructurales también hacen que se desencadene una respuesta celular importante incluso mayor que cuando se utilizan proteínas de envoltura, que en comparación, inducen una respuesta más débil.^{104,105,107,108}

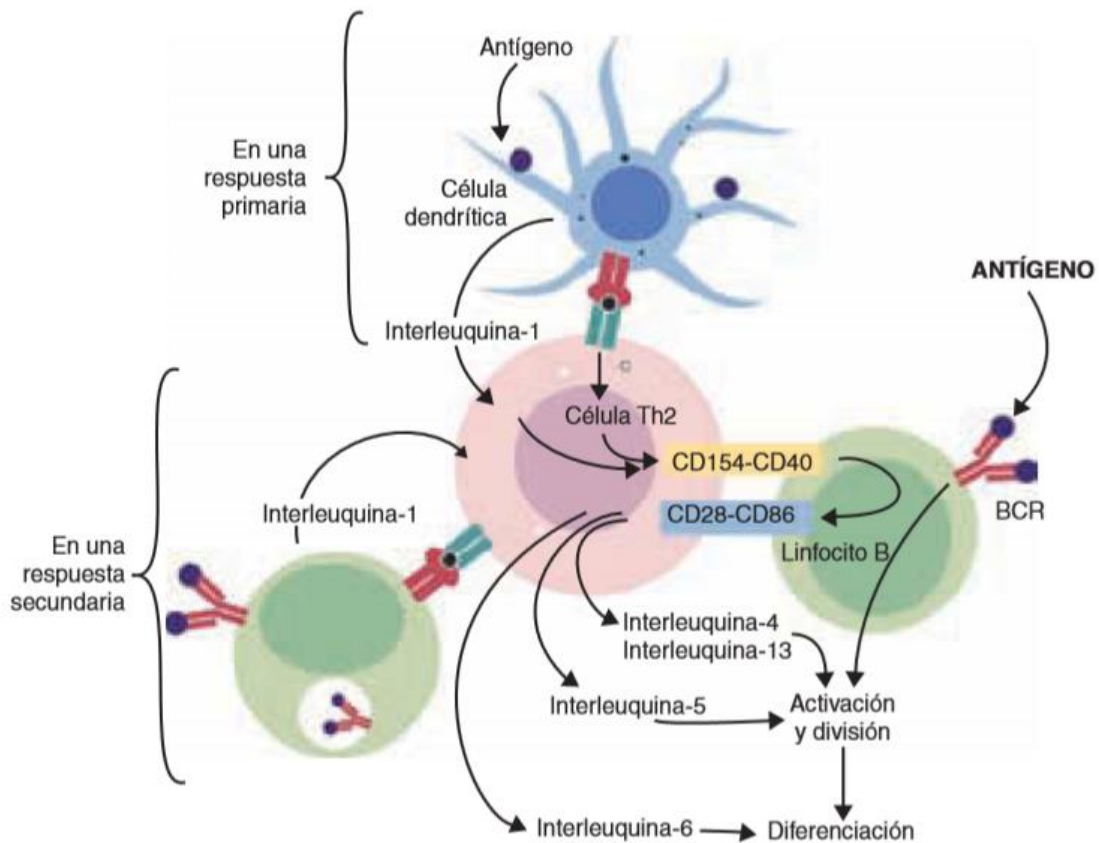


Figura 5. Secuencia de acontecimientos que sucede para que un linfocito B responda al antígeno. El linfocito B no solo debe ser estimulado por el antígeno sino que, también debe recibir la co-estimulación procedente del linfocito T cooperador y de las citocinas secretadas.⁹⁸

I.II.V Signología

El vDVB tiene la capacidad de provocar una gran variedad de manifestaciones clínicas en los animales que se infectan, dependiendo de factores como el biotipo al que pertenezca el virus que produce la infección, el estado inmune del rebaño y del animal de manera individual, la edad, la etapa de gestación en madres y la inmunidad que presenten las mismas; sin dejar de tomar en cuenta los patógenos oportunistas o coinfecciones que podrían presentarse.⁸¹

La infección aguda subclínica o de carácter moderado representa el 70-90% de las infecciones agudas por el vDVB, en animales inmunocompetentes se presenta de forma subclínica. En estos animales, dichas infecciones pasan desapercibidas en la mayoría de las ocasiones, mostrando como únicos signos fiebre, descarga oculonasal, diarreas leves, tos y leucopenia transitoria con inmunosupresión como consecuencia.^{75,109,110} Esta inmunosupresión favorece la aparición de agentes infecciosos oportunistas,¹¹¹ destacando aquellos que provocan enfermedades respiratorias bovinas que pueden dar origen al complejo respiratorio bovino^{84,88,112} y también se observa anorexia. Esta presentación de la enfermedad tiene una elevada morbilidad y baja mortalidad. El desarrollo de anticuerpos neutralizantes se da 14 a 28 días postinfección y, consecuentemente, la protección contra reinfecciones por cepas homólogas del virus es de por vida.¹¹³

Una presentación clínica muy común ocasionada por este virus es la diarrea viral bovina, la cual es ocasionada generalmente por cepas del genotipo 1 y algunas cepas de baja virulencia del genotipo 2, puede presentarse en animales de todas las edades, aunque suele verse con más frecuencia en animales de 6-24 meses de edad, seronegativos e inmunocompetentes. Al tomar muestras de animales con esta signología es posible aislar ambos biotipos siendo, sin embargo, más frecuente el biotipo ncp. Estos procesos cursan con una morbilidad alta y una mortalidad muy baja o nula.^{11,81,109}

Existe otra forma aguda grave de la diarrea viral bovina con elevada morbilidad y mortalidad, está causada por cepas ncp del vDVB tipo 2 de elevada virulencia, afectando a animales de todas las edades.^{71,114,115} La signología se caracteriza por fiebre alta (39,7 a 41°C), agalactia, diarrea acuosa, neumonía, produciéndose a menudo la muerte del animal a las 48 horas desde el comienzo de los signos. Estos animales presentan una reducción del 50% en linfocitos circulantes, trombocitopenia marcada, ulceraciones en la mucosa oral y depleción de los órganos linfoides.^{70,116,117} En algunos casos, este proceso evoluciona hacia una forma más grave denominada síndrome hemorrágico.^{72,118}

El síndrome hemorrágico es una forma clínica muy grave de la diarrea viral bovina, causada por virus ncp del vDVB tipo 2, con una mortalidad cercana al 25%.⁶⁷ Los animales que sufren este síndrome muestran fiebre, diarrea sanguinolenta, hemorragias en diferentes órganos, sangrados profusos en sitios de inyección, congestión en conjuntiva y mucosas anémicas con hemorragias petequiales y equimosis. Este síndrome se caracteriza por presentar una marcada trombocitopenia, leucopenia y neutropenia.^{75,119} Entre las lesiones más características destaca una importante depleción de los órganos linfoides, linfopenia por un incremento en la apoptosis de linfocitos, vacuolización de células del epitelio basal de la mucosa y vasculitis en diversos órganos.^{72,120,121}

La infección aguda por el vDVB altera la función ovárica y reduce la fertilidad causando ooforitis intersticial no purulenta con necrosis de células de la granulosa.^{122,123} Es posible detectar el antígeno viral en macrófagos y células del estroma ovárico, entre los días 6 a 60 post infección,¹²⁴ en células foliculares y ovocitos en distintos estados de maduración.¹²⁵ Además, las infecciones agudas ocasionan un retraso en el desarrollo de los folículos preovulatorios durante dos ciclos estrales consecutivos,¹²⁶ reducción de los niveles de estradiol durante la fase folicular¹²⁷ y disminución o ausencia de las oleadas de hormona luteinizante preovulatoria o retraso en el tiempo del pico de hormona luteinizante preovulatoria.¹²²

El vDVB puede afectar a los productos de la gestación de una hembra inmunocompetente seronegativa, teniendo como resultado diferentes alteraciones dependiendo del estadio de la gestación, que van desde la muerte del embrión hasta animales PI (ver Tabla 1).^{25,93}

Tabla 1. Efectos adversos en diferentes etapas de la gestación, causados por el vDVB.

<i>Días de gestación</i>	<i>Efectos adversos</i>
<i>1-40</i>	Muerte embrionaria y reabsorción.
<i>45-125</i>	Pueden presentarse abortos o malformaciones, así como animales con bajo peso al nacimiento e inmunotolerantes si la madre es infectada con una cepa ncp.
<i>125-175</i>	Se pueden observar malformaciones en la mayoría de los tejidos, incluso en tejido óseo, normalmente los animales desarrollarán inmunidad por anticuerpos neutralizantes y eliminan al virus, no obstante, pueden presentarse abortos en esta etapa.
<i>175-280</i>	Abortos menos frecuentes, pero existe la posibilidad de que se presenten, se observan crías débiles o normales pero seropositivos, generalmente con anticuerpos neutralizantes.

Los animales PI presentan grandes cantidades de virus en todos sus tejidos, aunque éste manifiesta un especial tropismo por las células epiteliales, linfoides y del sistema nervioso central,¹²⁸⁻¹³⁰ lo que junto a la ausencia del desarrollo del sistema inmunológico en el momento de la infección y la inhibición del IFN y por cepas ncp, favorece el establecimiento de un estado de inmunotolerancia que permite la persistencia del virus en el feto.^{83,131}

En estos animales existe ausencia de anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes, pero son inmunocompetentes, ya que responden frente a antígenos de virus heterólogos.^{111,132} La mortalidad de estos animales es muy superior a la de individuos no infectados, ya que alrededor del 50% mueren en el primer año de vida¹³³ debido a sus defectos funcionales en el sistema inmune, que inducen un estado de inmunosupresión y a una mayor predisposición frente a infecciones secundarias.^{134,135} Las lesiones que presentan estos animales son escasas y leves, no pudiéndose establecer una relación directa entre dichas lesiones y la presencia del virus.¹²⁸ Aunque, en algunos casos, podemos observar microscópicamente lesiones crónicas en piel y mucosas.¹³⁶

La enfermedad de las mucosas (EM) afecta solamente a los animales PI que sufren una superinfección por una cepa de biotipo cp homóloga antigénicamente similar, generalmente entre los 6 y 18 meses de edad.¹³⁵ Existen evidencias de que el biotipo cp del vDVB se puede originar a partir del ncp en animales PI, sin necesidad de ser infectados por una cepa diferente de un biotipo cp.^{43,44,137,138}

La EM es una forma esporádica, fatal, de curso agudo o crónico, que presenta una signología clínica caracterizada por la aparición de diarreas sanguinolentas, erosiones mucosas del tracto digestivo y cutáneas, presentándose la muerte a las 2 o 3 semanas de aparecer los signos clínicos.¹³⁸ Microscópicamente, los animales presentan enteritis fibrinosa, erosiones, ulceraciones y hemorragias en las superficies mucosas de la cavidad oral, esófago, compartimientos gástricos e intestino. Los animales muestran, además, depleción de los tejidos linfoides, especialmente intensa en el tejido linfoide asociado a mucosa, que induce un estado de inmunosupresión severo.¹³⁹⁻¹⁴¹ Esta depleción es consecuencia de la apoptosis de los linfocitos,¹⁴² principalmente de los linfocitos B y células plasmáticas en linfonodos.¹⁴³ En fases tempranas de la EM, los linfonodos se caracterizan por presentar áreas con bajos niveles de proliferación y alto grado de apoptosis.^{144,145}

Primer Síndrome: Diarrea Viral



Segundo Síndrome: Persistentemente infectados



Tercer Síndrome: Enfermedad de las mucosas

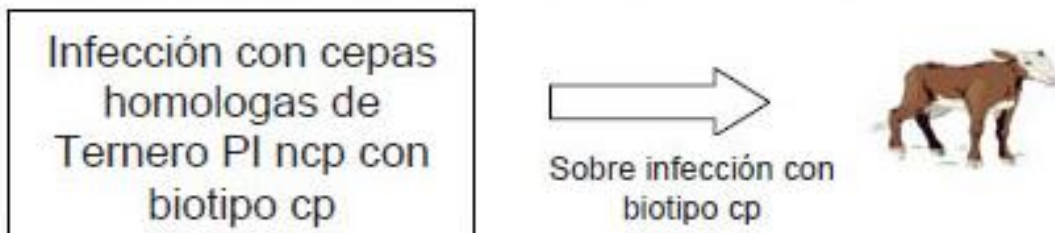


Figura 6. Esquema de las diferentes presentaciones de la infección por el vDVB dependiendo del biotipo, estado fisiológico e inmunológico del animal.¹¹

I.II.VI Métodos diagnósticos

Los métodos diagnósticos son de suma importancia para el control de esta enfermedad, ya que, la prevalencia es muy alta y al conocer qué animales o hatos tienen este virus, el control y eliminación de este agente infeccioso se haría de una forma efectiva.

Cuando un animal presenta signología de infección por vDVB, que en la mayoría de los casos son signos inespecíficos, a menos que sean casos de EM donde es más evidente el cuadro clínico,^{138,141} los métodos diagnósticos como son el aislamiento viral, RT-PCR o detección de antígeno viral (diagnósticos directos) son las pruebas de elección,¹³⁶ aunque las pruebas serológicas tienen ventaja, ya que se puede estudiar el estatus de un hato a través de un conjunto de sueros de distintos animales, lo que reduciría costos, tiempo y daría una perspectiva más amplia del manejo a seguir con ese hato.^{146,147}

Los diagnósticos serológicos para detectar infecciones por el vDVB son los siguientes:

- La inmunocromatografía es una técnica que tiene como fundamento la migración de anticuerpos a través de una membrana, por ejemplo, de nitrocelulosa, la muestra donde podrían estar o no presentes los anticuerpos es añadida a una zona donde se encuentra un conjugado (antígeno conjugado con un marcador colorimétrico). Si la muestra contiene el anticuerpo específico contra el antígeno de la prueba, éste se unirá al conjugado formando un complejo antígeno-anticuerpo que migrará a través de la membrana, donde habrá zonas con anticuerpos específicos contra otro epítipo del antígeno conjugado, teniendo una zona donde se evidencia si la muestra es positiva (cambio de color) o negativa (sin coloración) y una zona control donde el conjugado que no se unió a anticuerpos, es capturado, dando un cambio de color sin importar que la muestra sea positiva o negativa, esto para saber que la prueba funciona correctamente; así mismo, hay pruebas de inmunocromatografía donde la membrana solo contiene los últimos anticuerpos mencionados que capturan al conjugado y se añaden los demás reactivos y la muestra, así las zonas de control y de resultado solo cambian de color sin necesidad de que los complejos Ag-Ac o el conjugado libre migren. Esta prueba tiene como principales ventajas la rapidez con la que se puede realizar, así como la simplicidad de la misma, ya que no se necesita una máquina especial para realizar la lectura, además de que, al detectar anticuerpos, es una prueba con alta especificidad, de más del 92% y a pesar de las ventajas que presenta esta prueba, tiene la desventaja de que, si el antígeno usado tiene variables antigénicas entre diferentes regiones geográficas, podría no detectar a animales positivos con alguna cepa que sea antigénicamente diferente, por ejemplo el vDVB.¹⁴⁸⁻¹⁵¹

- La técnica de seroneutralización (SN) es una prueba punto final que tiene como fundamento la neutralización del vDVB por la acción de anticuerpos específicos contra este virus, usando diluciones constantes del suero del animal sospechoso, enfrentándola a cantidades constantes del vDVB, estas diluciones se inocularán en determinado número de cultivos celulares susceptibles, para verificar la presencia de anticuerpos neutralizantes en el suero, al inhibir la capacidad de infección del virus y por consiguiente no observar los efectos citopáticos consecuencia de la infección del vDVB; los resultados de estas inoculaciones serán procesadas por métodos cuantales como el método Reed & Munch, teniendo una medición comparable con estándares que nos ayudarán a determinar si un animal es seropositivo o seronegativo, siendo la alta especificidad la principal ventaja de esta prueba. Los anticuerpos neutralizantes son responsables del efecto protector del suero y están dirigidos contra antígenos específicos del virus, este método diagnóstico presenta la limitante de no detectar bajas concentraciones de anticuerpos, como en el caso de animales que lleven menos de 15-21 días postinfección, sumado a esto, el resultado de la prueba tardará más de un día en poder registrarse por la metodología empleada, lo que representa una desventaja importante, además de que, para poder producir todos los reactivos y biológicos necesarios para la prueba como el vDVB o los cultivos celulares usados como sistema hospedador susceptible se demora un tiempo considerable, lo que podría ser una limitante para el laboratorio que oferte este método diagnóstico.¹⁵²⁻¹⁵⁴

- La técnica ELISA indirecto cuyo principio es la detección de anticuerpos (Ac) específicos contra el vDVB que pueden o no estar presentes en el suero de los bovinos. La prueba consta de una placa con pocillos, los cuales tienen adheridos antígeno del vDVB pudiendo ser el virus completo o alguna proteína viral en específico (las más comunes son las de superficie), a esta placa sensibilizada con el antígeno, se le agrega el suero del animal sospechoso y posterior a ello se adicionan Ac mono o policlonales conjugados con una enzima, por ejemplo, la peroxidasa de rábano (HRP), la cual actuará sobre el sustrato cromógeno que se añadirá posteriormente (ver Figura 7); teniendo una sensibilidad cercana al 100% y una especificidad del 98.9% de acuerdo a un kit comercial del laboratorio IDEXX, con esto es posible detectar animales realmente positivos aunque tengan una concentración muy baja de anticuerpos, lo que lo hace un método confiable.^{152,155,156} Esta prueba se ha utilizado incluso con muestras de leche teniendo resultados positivos, ya que evidencia la presencia de hembras infectadas lo que es un factor importante para pensar en la presencia de animales PI. Aunque este método diagnóstico tenga muchas ventajas evidentes, tiene una clara desventaja, ya que para poder realizarla se necesita el vDVB o proteínas del mismo, que, para ser producidas, se necesita mucho tiempo y reactivos muy específicos así como personal con una capacitación muy especial, ya que se necesitan tener medidas de bioseguridad muy estrictas como el uso de filtros para el personal donde cambie su ropa de trabajo antes de entrar al laboratorio, gabinetes de flujo laminar, filtros para el aire que circula en las instalaciones, indumentaria especial para el personal, incubadoras con sistema de esterilización por luz ultravioleta, el uso de material esterilizado como: son los medios de cultivo, sueros fetales, enzimas, soluciones, contenedores, pipetas, etc; ultra congeladores para preservar las células, todo lo anterior para que los cultivos celulares donde se amplifique el virus no mueran y el virus no represente un riesgo por diseminación accidental por malas prácticas de laboratorio o descuidos del personal y aunque existan las proteínas recombinantes del vDVB, la manera de obtenerlas es muy tardado y costoso a largo plazo por los procedimientos, equipo y personal que se emplean.^{157,158}

Una desventaja en común de los métodos diagnósticos mencionados, es que el antígeno que se utiliza en ellos, son proteínas consideradas hipervariables como la glicoproteína E2 y Erns o el virus completo, que al igual que las glicoproteínas mencionadas, son antigénicamente diferentes al virus presente en la región donde se encuentran los animales que se piensan diagnosticar, así como el hecho de que hay virus cp y ncp las pruebas pueden tener como resultado falsos negativos.¹⁵⁸⁻¹⁶¹

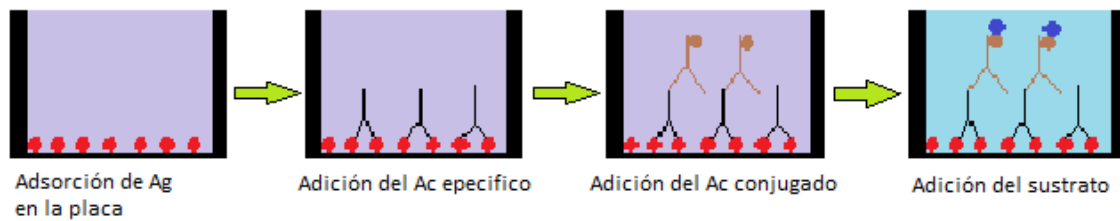


Figura 7. Esquema del diseño de ELISA indirecto donde los Ac específicos pueden o no estar presentes en el suero del animal sospechoso.¹⁶²

I.III Phage Display o Despliegue en fagos

I.III.I Generalidades

Esta técnica tiene como característica el uso de fagos filamentosos, como el M13, expresando un péptido exógeno en la proteína pIII, gracias a la inserción de la secuencia genética aleatoria o específica que codifica para diferentes aminoácidos (aa) en el genoma del fago en el área donde se encuentra la información de las proteínas de la cápside y fue descrita por Smith en 1985.¹⁶³⁻¹⁶⁵

Algunas ventajas que tienen estos fagos filamentosos como vectores de clonación son su estabilidad en un rango amplio de temperatura y pH, la estabilidad de las bacterias infectadas al producir grandes cantidades de fagos sin sufrir lisis; en el caso de *Escherichia coli* (*E. coli*) se ha observado que el proceso de amplificación de los fagos es muy rápido, llegando a producir títulos de 10^{13} fagos/ml en un cultivo de esta bacteria¹⁶⁶ y el genoma de estos virus es capaz de tolerar inserciones de ADN en regiones que no son esenciales para la replicación, por lo que no se alteran la infección o el ensamblaje.^{165,167}

Esta metodología resulta ser muy eficaz para seleccionar y producir péptidos que mimeticen epítomos (mimótopos) de importancia biológica, ya sean enzimas como la catepsina L producida por *Fasciola hepática*, receptores celulares usados por parásitos como *Eimeria ninakohlyakimovae*, epítomos inmunodominantes de virus como el vDVB o la creación de ligandos específicos como el receptor de la eritropoyetina,¹⁶⁸⁻¹⁷¹ esto puede tener distintos fines como método diagnóstico, inhibir enzimas, como agonista o antagonista en receptores o para la creación de inmunógenos con evidentes ventajas como que es un método más rápido que la replicación viral, menos costoso y no representa un riesgo en potencia, ya que no son capaces de producir enfermedad a animales o humanos y por el material que en esencia es el mismo que se usa para realizar cultivos de *E. coli*.¹⁶⁷

I.III.II Características del fago M13

Este fago es un Inovirus de la familia *Inoviridae* con ADN de cadena sencilla (Clasificación Baltimore en el grupo II), no lítico e infecta específicamente a bacterias *E. coli* que poseen el plásmido responsable de la expresión de pili F.^{172,173}

Tiene morfología tubular filamentosa altamente flexible de 880nm a 1µm y de 6.5nm a 10nm de diámetro, con un genoma circular de ADN de cadena sencilla en sentido positivo de 6,400 pares de bases, con una región llamada intergénica, la cual no codifica para ninguna proteína, sin embargo en esa región se localiza el sitio de origen para la síntesis del ADN viral en sentido positivo y la cadena complementaria en sentido negativo.^{174,175}

Los productos de los genes III, VI, VII, VIII y IX corresponden a la cápside viral siendo la proteína VIII o pVIII la más abundante, denominándose como la proteína mayor de la cápside, esta proteína tiene 50aa y con alrededor de 2,700 copias recubre al genoma formando una estructura helicoidal.¹⁷² En un extremo del fago, se encuentran entre 3 y 5 copias de dos proteínas menores de envoltura la VII o pVII de 32aa y la proteína IX o pIX de 33aa siendo ambas hidrofóbicas y al otro extremo del fago, se encuentran la proteína III o pIII de 406aa y la proteína VI o pVI de 112aa las cuales forman un complejo en la punta del filamento, siendo necesarias para finalizar el ensamblaje y mantener la estabilidad del virión siendo pVI hidrofóbica al contrario de pIII que es hidrofílica, esta última (pIII) también está involucrada en el proceso de infección (ver Figura 8).^{165,176}

La proteína pIII está dividida en 3 dominios que son N1, N2 (ambos se encuentran en el extremo N-terminal) y CT (localizado en el extremo C-terminal). En cuanto a sus funciones, el dominio N1 es el responsable de la translocación del material genético del fago al citoplasma bacteriano, el dominio N2 tiene como función la unión con el pili F y por último el dominio CT en conjunto con la proteína pVI, interactúan con la proteína pVIII manteniendo la estabilidad del virión; se conoce que estos tres dominios se encuentran divididos por regiones con secuencias repetidas de glicina, las cuales confieren flexibilidad, siendo estas regiones donde se incorporan las secuencias que codifican para péptidos exógenos.^{174,177,178}

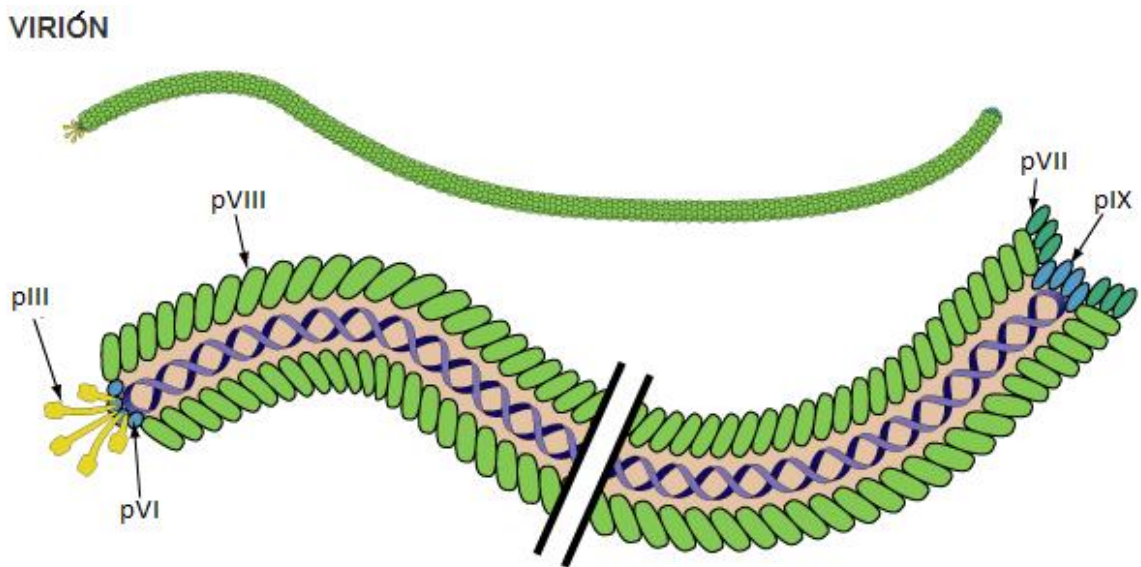


Figura 8. Morfología del fago M13.¹⁷⁹

I.III.III Bibliotecas de péptidos expresadas en fagos.

La tecnología de despliegue en fago ha dado lugar a la construcción de bibliotecas de péptidos, incorporando miles de millones de combinaciones de aminoácidos creando péptidos con una gran diversidad y eficiencia;¹⁶⁷ esta diversidad da como resultado que las bibliotecas contengan una población heterogénea de fagos con secuencias de péptidos aleatorios (solo un péptido en particular por fago, pudiendo tener varios fagos con el mismo péptido pero no un fago con diferentes tipos de péptidos), teniendo la particularidad de que, si algunos fagos son seleccionados, pueden ser adicionados a un cultivo bacteriano para su amplificación y obtener una progenie viral que seguirá expresando/desplegando los péptidos de manera uniforme usando comúnmente la proteína pIII, que es capaz de soportar la inserción de péptidos de entre 6 y 43 aa sin comprometer la estabilidad, infectividad o ensamblaje durante su replicación.^{164,171,180}

Actualmente, las bibliotecas de péptidos comerciales contienen un título que puede ir de concentraciones de 10^{12} a 10^{14} fagos/ml siendo 10^{13} la concentración más común y una diversidad biológica de aproximadamente 10^9 péptidos diferentes.¹⁸¹ De estas bibliotecas de péptidos, se pueden seleccionar los péptidos de interés relacionados a ligandos específicos a través de un proceso llamado biopanning o bioselección.^{182,183}

I.III.IV Biopanning o bioselección.

El proceso de bioselección consta de 4 etapas (ver Figura 9) que son:

- Inmovilización del ligando de interés.
- Interacción entre el ligando y la biblioteca de péptidos expresada en fagos eliminando a los que no se unieron por baja especificidad.
- Elusión de los fagos que se unieron al ligando.
- Amplificación de los fagos eluidos en cultivos de *E. coli* (posterior a este último paso se someterá a otra ronda de bioselección, llegando a tener entre 3 y 4 rondas).

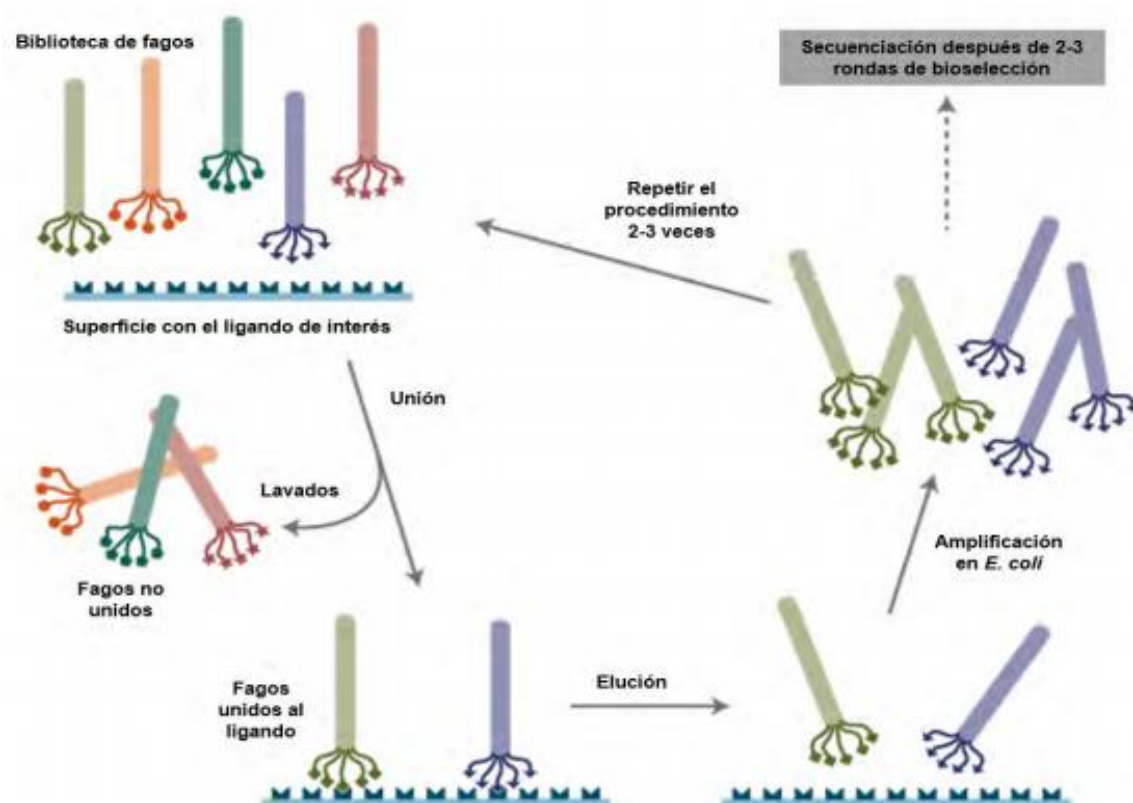


Figura 9. Procedimiento esquematizado de una ronda de bioselección de una biblioteca de péptidos expresados en fagos.¹⁸¹

II. Justificación

Teniendo en cuenta la hipervariabilidad en las proteínas usadas como antígenos en diagnósticos por serología como la glicoproteína E2 hace que este tipo de metodología no sea útil para detectar a todos los animales seropositivos ya que la hipervariabilidad antigénica de esta proteína haría que los anticuerpos de animales infectados con una variante antigénica de esta proteína no reconocieran al antígeno de la prueba teniendo resultados falsos negativos, lo que complica el control de esta enfermedad (DVB); sumado a esto, hay otras desventajas como el tiempo de producción de los antígenos, su complejidad y el riesgo biológico que representa el amplificar el vDVB así como su elevado costo de aproximadamente 300 a 500 pesos mexicanos por animal.

El objetivo del presente trabajo propone identificar péptidos con características antigénicas específicas, mediante bioselecciones con la técnica Phage display o despliegue en fago, esto con el objetivo de identificar epítomos inmunodominantes de regiones hiperconservadas del vDVB que sean reconocidos por los anticuerpos de animales que han sido infectados naturalmente, con esto se lograría un mapeo de epítomos presentes en cepas virales de México lo que solucionaría el problema de la variabilidad antigénica.

Al usar este tipo de metodología también se reducen costos y tiempo en la elaboración de antígenos, que podrían cumplir la función de antígenos de captura, que pueden ser utilizados en diferentes métodos diagnósticos serológicos para detectar animales seropositivos a DVB y se elimina el riesgo que representa amplificar el vDVB, ya que los bacteriófagos no pueden infectar células procariontes, por lo tanto, no pueden generar un problema sanitario.

Esto podría ayudar en un futuro a ser aplicado a metodologías que ayuden al control de la enfermedad, como un posible método diagnóstico efectivo y sin el riesgo de que la variabilidad antigénica entre distintas cepas interfiera en la detección de animales seropositivos.

Al utilizar sueros nacionales el mapeo sería más específico para las cepas presentes en el país, esto podría abrir el camino para inversión nacional y dejar de depender de laboratorios extranjeros, los cuales como ya se mencionó, podrían tener antígeno o virus que difieran con las cepas encontradas en territorio nacional, pudiendo afectar el resultado de los estudios.

III. Hipótesis

Los epítomos/mimótopos identificados por Phage Display tendrán características antigénicas similares al virus de la DVB, lo cual permitirá usarlos como antígenos en diferentes métodos diagnósticos basados en serología.

IV. Objetivos

IV.I Objetivo general

Identificar los epítomos/mimótopos inmunodominantes de importancia diagnóstica del virus de diarrea viral bovina a través de la técnica de Phage Display usando suero bovino anti-DVB.

IV.II Objetivos específicos

1.1. Identificar clonas específicas mediante bioselecciones, usando bibliotecas de péptidos expresados en fagos filamentosos y suero anti-DVB.

1.2. Analizar las secuencias de los fragmentos clonados en los fagos filamentosos seleccionados e identificar las secuencias de péptidos que expresan.

1.3. Evaluar las clonas seleccionadas mediante ensayos de ELISA para identificar a las más reactivas a sueros positivos a DVB y analizar su utilidad en ensayos serológicos.

V. Material y métodos

- Bioselección por el método despliegue en fago

Para este procedimiento se utilizaron placas de 96 pozos maxysorp (Thermo Fisher Scientific®), suero hiperinmune de conejo anti-IgG de bovino específicamente contra la porción FC (Novus Biologicals, No. de Catalogo NBP1-72630, USA), buffer de carbonatos, PBS, BSA, pool de sueros positivos a DVB procedente de animales de campo en México (proporcionados por el banco de sueros del departamento de reproducción de la FMVZ-UNAM), biblioteca de péptidos de visualización en fagos (Ph.D. -7 BioLabs® Inc., New England Biolabs No. Catalogo E8120S, USA), Glicina HCL y Tris-HCL.

Cuatro pozos de una placa de 96 pozos maxysorp fueron cubiertos con 100 μ L de suero hiperinmune de conejo anti-IgG de bovino en buffer de carbonatos (dilución 1:450) y se incubó a 37°C durante una hora.

Se desechó el sobrenadante y se realizaron lavados 4 veces con PBS 1x.

Se bloqueó cada pozo con PBS 1x BSA 2% (200 μ L por pozo) a 37°C durante una hora y media.

Se desechó el sobrenadante y se realizaron lavados 4 veces con PBS 1x.

Posteriormente se agregaron 100 μ L de pool de sueros de bovinos positivo a DVB en PBS BSA al 0.1% (Dilución 1:50) dejándolo una hora y media a 4°C.

Se realizaron lavados 4 veces con 200 μ L PBS 1x, con los pozos lavados y sin agregar nada más se dejaron toda la noche a 4°C.

Se colocó en cada pozo 100 μ L de la biblioteca de fagos en PBS-BSA 0.1% (dilución 1:100) y se dejó una hora y media a 37°C.

Los fagos no pegados fueron descartados lavando los pozos en las placas 4 veces con 200 μ L de PBS-Tween 20 al 0.1% y fueron eluidos mediante cambio de pH, agregando 100 μ L de Glicina HCL 0.2M (pH 2.2) a cada pozo, dejando la placa 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente 10 minutos a 37°C, para después recolectar en un microtubo para centrifuga con capacidad de 1.5ml, el cual debe contener 25 μ L de Tris HCL 1M (pH 9.6) para neutralizar el pH.

Este proceso de selección de fagos se realizó durante 4 rondas, tomando a partir de la segunda ronda el fago seleccionado para el procedimiento de amplificado de la elución de la ronda anterior.^{181,183-185}

- Amplificación y purificación de fagos

Para este procedimiento se utilizó medio líquido LB, cultivo de bacterias *E. coli* TG1, Polietilenglicol (PEG) al 20 % con NaCl al 2.5M y TBS.

Se infectaron bacterias *E. coli* TG1 con los fagos eluidos (300 uL), se dejaron creciendo las bacterias infectadas con agitación (250 rpm) durante 4.5 horas a 37°C.

Se recuperaron 45 ml del cultivo en un tubo cónico para centrifuga con capacidad de 50 ml y se centrifugó durante 15 minutos a máxima velocidad (11,000 rpm) a 4°C, posteriormente, se recuperó el sobrenadante agregando 1/6 del volumen total de una solución de PEG (20%) /NaCl (2.5M) para precipitar a los fagos a 4°C toda la noche.

Se centrifugó 20 minutos a máxima velocidad (14800 rpm) a 4°C y se eliminó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 1 mL de TBS en un microtubo para centrifuga con capacidad de 1.5 ml, agregando 1/6 del volumen total de una solución de PEG (20%)/NaCl (2.5M) para precipitar a los fagos y se centrifugó nuevamente a máxima velocidad (14800 rpm) por 10 minutos a 4°C, eliminando el sobrenadante y reconstituyendo el pellet en 200 µL de TBS.

Finalmente, se centrifugó a máxima velocidad (14800 rpm) por 10 minutos a 4°C tomando el sobrenadante, el cual contiene los bacteriófagos purificados.^{169,181,185,186}

- Titulación de fagos

Para esta metodología se utilizó cultivo líquido de *E. coli* TG1, agar LB en caja de Petri adicionado con IPTG (Thermo Fisher Scientific, No. de Cat. R0392, Italia) y X-Gal (Thermo Fisher Scientific, No. de Cat. R0404, Italia), medio LB líquido y fagos.

Se hicieron diluciones seriadas 1:500 de los fagos en 1000 uL de medio LB, tomando los primeros 2 uL del stock de fagos de las eluciones de cada biopanning y posterior a ello, se tomó el volumen a transferir de la última dilución lograda.

Se tomó entre 10 y 100 µL de la dilución 1, incubando por 5 minutos con 200uL de cultivo de *E. coli* TG1 crecido durante 14 horas.

Posteriormente la bacteria infectada se sembró en cajas Petri con medio LB e IPTG y X-Gal dejando en incubación toda la noche a 37°C.

Al día siguiente se cuantificó el número de zonas de inhibición de crecimiento celular (unidades formadoras de placa o UFP), de estas UFP se seleccionaron aleatoriamente 10 de la 3er ronda y 10 de la 4ta ronda de bioselección, a las cuales denominaremos como clonas.^{181,185}

- ELISA para medir reactividad de las clonas seleccionadas aleatoriamente usando pool de sueros positivos y negativos a DVB

Para este procedimiento se utilizaron placas de 96 pozos maxysorp, PBS, leche desnatada Nestle® Svelty, pool de sueros positivos y negativos a DVB, clonas seleccionadas aleatoriamente, Tween 20, Ac anti-IgG de bovino marcado con HRP (Novus Biologicals, No. de Cat. NBP1-73272, USA) y ABTS (Sigma, No. de Cat. 7329461, Alemania).

Se sensibilizó una placa de 96 pozos maxysorp con fagos a una concentración de 1×10^{12} UFP y se incubó durante toda la noche a 4 °C.

Posterior a la incubación, se lavó la placa 3 veces con 300 uL de PBS1x Tween 20 (Sigma-Aldrich®) al 0.1% por pozo, los lavados se llevaron a cabo al término de cada procedimiento.

Posteriormente, se bloqueó con 100 µL PBS1x 5% leche desnatada y se incubó 1 h a 37°C.

Una vez concluido el paso anterior, se diluyeron los sueros positivo y negativo contra DVB con PBS1x Tween 0.01% leche desnatada 1% a una dilución de 1:200, se colocaron 100 µL de la dilución en el pozo correspondiente y se incubó por 1 h a 37°C.

Por último, se realizó una dilución 1:2000 del Ac anti-IgG de bovino marcado con HRP agregando 100 µL a cada pozo, se dejó incubar 1 h a 37°C.

Para revelar se agregaron 100 µL de ABTS en cada pozo en un cuarto oscuro y finalmente se cubrió la placa con papel aluminio para dejar incubando durante 10, 20 y 30 min a 37°C.

Terminado este tiempo, se realizó la lectura a 405 nm agitando previamente durante 5 seg.

Para discriminar clonas positivas y negativas, se determinó el punto de corte tomando las lecturas del suero negativo, calculando el promedio y 3 desviaciones estándar.

Como un control negativo, se utilizó un pool de sueros negativos a DVB analizados por ELISA convencional.^{14,156,169,185}

- ELISA para comparar reactividad de las clonas seleccionadas enfrentándolas a sueros negativos y positivos a DVB

Para este procedimiento se utilizaron placas de 96 pozos maxysorp, PBS, leche desnatada, pool de sueros positivos y negativos a DVB y un suero individual positivo a IBR, clonas seleccionadas, Tween 20, Ac anti-IgG de bovino marcado con HRP y ABTS.

Se sensibilizó una placa de 96 pozos maxysorp con fagos seleccionados a una concentración de 1×10^{12} UFP y se incubó durante toda la noche a 4°C.

Posterior a la incubación, se lavó la placa 3 veces con 300 uL de PBS1x Tween 20 al 0.1% por pozo, los lavados se llevaron a cabo al término de cada procedimiento.

Posteriormente, se bloqueó con 100 µL PBS1x leche desnatada 5% y se incubó 1 h a 37°C.

Una vez concluido el paso anterior, se diluyeron los sueros positivo y negativo contra DVB y un suero individual positivo a IBR con PBS1x Tween 0.01%, leche desnatada 1% a una dilución de 1:200, se colocaron 100 µL de la dilución en el pozo correspondiente y se incubó por 1 h a 37°C.

Por último, se realizó una dilución 1:2000 del Ac anti-IgG de bovino marcado con HRP agregando 100 µL a cada pozo, se dejó incubar 1 h a 37°C.

Para revelar, se agregaron 100 µL de ABTS en cada pozo y finalmente se cubrió la placa con papel aluminio para dejar incubando durante 10, 20 y 30 min a 37°C.

Terminado este tiempo se realizó la lectura a 405 nm agitando previamente durante 5 seg.

Para discriminar clonas positivas y negativas, se determinó el punto de corte tomando las lecturas del suero negativo, calculando el promedio y 5 desviaciones estándar.

Como un control negativo, se utilizó un pool de sueros negativos a DVB analizados por ELISA convencional. ^{14,156,169,185}

- ELISA para comparar la reactividad de las clonas con sueros individuales positivos y negativos a DVB

Para este procedimiento se utilizaron placas de 96 pozos maxysorp, PBS, leche desnatada, sueros positivos y negativos a DVB y uno positivo a IBR, clonas seleccionadas, Tween 20, Ac anti-IgG de bovino marcado con HRP y ABTS.

Se sensibilizó una placa de 96 pozos maxysorp con fagos a una concentración de 1×10^{12} UFP y se incubó durante toda la noche a 4 °C.

Posterior a la incubación, se lavó la placa 3 veces con 300 uL de PBS1x Tween 20 al 0.1% por pozo, los lavados se llevaron a cabo al término de cada procedimiento.

Posteriormente, se bloqueó con 100 µL PBS1x leche desnatada 5% y se incubó 1 h a 37°C.

Una vez concluido el paso anterior, se diluyeron los sueros positivo y negativo contra DVB y positivo a IBR con PBS1x Tween 0.01%, leche desnatada 1% a una dilución de 1:200, se colocaron 100 µL de la dilución en el pozo correspondiente y se incubó por 1 h a 37°C.

Por último, se realizó una dilución 1:2000 del Ac anti-IgG de bovino marcado con HRP agregando 100 µL a cada pozo, se dejó incubar 1 h a 37°C.

Para revelar, se agregaron 100 µL de ABTS en cada pozo y finalmente se cubrió la placa con papel aluminio para dejar incubando durante 10, 20 y 30 min a 37°C.

Terminado este tiempo se realizó la lectura a 405 nm agitando previamente durante 5 seg.

Para discriminar clonas positivas y negativas, se determinó el punto de corte tomando las lecturas del suero negativo, calculando el promedio y 10 desviaciones estándar.

Como un control negativo, se utilizó un suero negativo a DVB analizado por ELISA convencional.^{14,156,169,185}

- Extracción de ADN y secuenciación

Para la extracción se utilizaron las clonas seleccionadas, PBS, PEG/NaCl, buffer de ioduros, etanol absoluto, etanol al 70% y agua libre de DNAsas grado biología molecular (Thermo Fisher Scientific®).

De las clonas reactivas se llevó a cabo una extracción de ADN y posteriormente se realizó la secuenciación.

Se tomaron 20µL de la solución de fagos a un microtubo de 1.5ml, añadiendo 500uL de PBS 1x y 200µL de una solución de PEG (20%) / NaCl (2.5M), se mezcló y dejó reposar 20 min a temperatura ambiente.

Se centrifugó a 14,800 rpm por 10min a 4°C y se desechó el sobrenadante.

Se resuspendió el pellet en 100 µL de buffer de ioduros y se agregaron 250 µL de etanol absoluto (a -20°C), se agitó y se incubó de 20 min a temperatura ambiente.

Posteriormente, se centrifugó a 14,800 rpm 10min. a 4°C y se desechó el sobrenadante.

Se lavó el pellet con 500 µL de etanol al 70% (a -20°C), se volvió a centrifugar y decantar el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente.

Se resuspendió en 20 µL de agua grado biología molecular.

Por último, se cuantificó el ADN usando un espectrofotómetro y posteriormente se mandó a secuenciar al Instituto de biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), la secuenciación de DNA se realizó por el método de Sanger y se analizó con el programa Sequencher® version 5.4.6 DNA sequence analysis software, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA.^{185,187}

- Dot-blot

Para esta metodología se utilizaron membrana de nitrocelulosa, clonas seleccionadas, leche desnatada, buffer de transferencia, PBS, Tween 20, sueros positivos y negativo a DVB, Anti-IgG (Porción FC) de bovino conjugado con HRP y diaminobenzidina.

Se cortó nitrocelulosa (Sigma-Aldrich®) en círculos de 0.5 cm cada uno y se agregó la clona a evaluar, esperando a que se absorbiera sin secarse por completo.

Se utilizó buffer de transferencia para equilibrar la membrana y no permitir que se secase en los pasos posteriores.

Se colocó la membrana en solución de bloqueo PBS 1x leche desnatada (Nestle® Svelty) 5% y se incubó 1 hora en agitación a temperatura ambiente.

Se realizaron lavados con PBS 1x Tween 20 (Sigma-Aldrich®) 0.05% 2 veces y 1 vez más con PBS 1x (los 3 lavados durante 5 minuto cada uno y en agitación).

Se colocó la membrana en el Ac primario (Suero anti-DVB) en una dilución 1:50 en PBS 1x y se incubó 1 hora en agitación a temperatura ambiente.

Se realizó un lavado con PBS 1x Tween 20 al 0.05% 2 veces y 1 vez más con PBS 1x (los 3 lavados durante 5 minuto cada uno y en agitación).

Se colocó la membrana en el Ac secundario (Anti-Fc de bovino conjugado con HRP) en una dilución 1/5000 en PBS 1x y se incubó durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente.

Se reveló con el método cromogénico con Diaminobenzidina (Sigma-Aldrich®) diluida en peróxido de hidrogeno diluido 1:10.^{169,188,189}

VI. Resultados y discusión

Al realizar las bioselecciones y no tener una variante en la concentración de los sueros usados, el título de los fagos eluidos (ver Tabla 2) tiende a ser más alto en la última ronda de bioselección, resultados similares a los obtenidos por Ana L. Zamit et al. en el 2010 y Siqingaowa Suo et al. en el 2014 donde utilizaron la glicoproteína E2 del vDVB y proteínas del virus de la gastroenteritis transmisible respectivamente, en el caso del presente estudio se puede atribuir a que la presión de selección no tiene variantes y se tiene una mayor población de fagos con péptidos más específicos conforme se realizan las rondas.^{183,184}

Tabla 2. Título resultante de cada ronda de bioselección

<i>Ronda</i>	<i>Título de entrada</i>	<i>Título de salida</i>
<i>1</i>	2.0×10^{11}	1.8×10^6
<i>2</i>	1.6×10^{12}	1.7×10^6
<i>3</i>	1.0×10^{12}	6.4×10^6
<i>4</i>	1.1×10^{12}	1.0×10^7

Posterior a las bioselecciones se seleccionaron 20 clonas individuales aleatoriamente y fueron nombradas C1 a C20 las cuales se amplificaron y se les realizó un análisis de reactividad enfrentándolas con un pool de sueros negativos y un pool de sueros positivos a DVB de animales de campo en México (ver Figura 10), los resultados del ELISA mostraron resultados estadísticamente significativos para dos clonas de la tercera (C8 y C9) y una de la cuarta ronda (C14), estas clonas individuales se renombraron como MACD8, MACD9 y MACD14 para su mejor identificación, tomando como referencia la línea de corte con 3 desviaciones estándar y se eliminaron clonas con valores negativos extremos para poder realizar un mejor análisis. A diferencia de diversos estudios como los de Ana L. Zamit et al. en el 2010 y Atila T. Kalaycioglu et al. en el 2007 que usaron anticuerpos monoclonales contra la glicoproteína E2, los cuales fueron fabricados en laboratorios comerciales, resaltando que esta proteína tiene variaciones importantes lo que sería una clara limitante para su uso en este tipo de estudios, lo que se buscó evitar en el presente estudio al usar sueros de animales infectados con virus de campo del país, esperando que estén presentes anticuerpos contra epítomos conservados del virus.^{102,183,190,191}

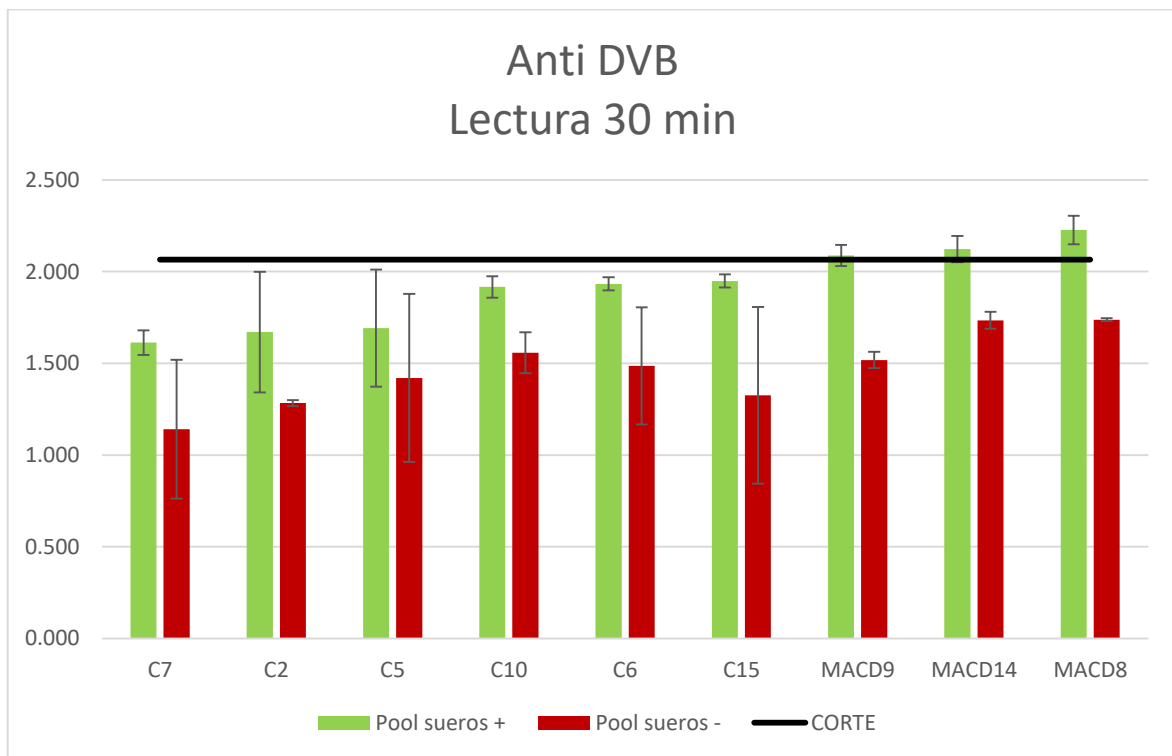


Figura 10. Reactividad de las clonas seleccionadas aleatoriamente enfrentadas a pool de sueros de campo positivos y negativos a DVB.

Una vez identificadas las clonas individuales más reactivas se les realizó una extracción de ADN y los resultados de secuenciación brindados por el Instituto de Biotecnología de la UNAM fueron analizados utilizando la base de datos BLAST. Se encontró que algunos aminoácidos de los péptidos seleccionados con el ELISA, donde se evaluó la reactividad de los fagos (Figura 10), muestran una similitud con una región de la poliproteína viral en la región de la proteína no estructural 5B (NS5B) (ver Tabla 3 y 4), que se conserva sin variaciones importantes entre diferentes cepas, siendo una proteína hiperconservada, lo que podría ser una evidente ventaja contra estudios donde se realizan técnicas similares donde la metodología de búsqueda de péptidos expresados en fagos se utilizan anticuerpos monoclonales contra la glicoproteína E2, ya que ésta presenta una variación importante donde algunas cepas del virus no son identificadas por anticuerpos específicos contra esta glicoproteína de otra cepa como en los estudios de Atila T. Kalaycioglu et al. del 2007, Dirk Dereg et al. de 1998 donde se evidenció la presencia de cepas que no eran reconocidas por los anticuerpos.^{190,192-194}

Tabla 3. Secuencias de aminoácidos presentes en los péptidos expresados en las 3 clonas más reactivas.

<i>Clona</i>	<i>Secuencia de aminoácidos</i>						
<i>MACD8</i>	N	D	R	W	E	S	P
<i>MACD9</i>	L	S	N	N	N	L	R
<i>MACD14</i>	N	L	N	R	T	N	P

Tabla 4. Coincidencia entre los péptidos expresados por las clonas más reactivas y péptidos del vDVB.

<i>Clona</i>	<i>Poliproteína</i>	<i>NS5B</i>
<i>MACD8</i>	+	+
<i>MACD9</i>	+	+
<i>MACD14</i>	+	+

El mapeo de epítomos de relevancia antigénica del vDVB es algo que se ha estudiado en distintas ocasiones, teniendo como resultado que muchos de los epítomos inmunodominantes se encuentran en regiones con una variabilidad alta entre diferentes cepas del mismo virus, como la glicoproteína E de la envoltura, lo que dificulta su aplicación en el diagnóstico y otras áreas de interés, pero al aplicar metodologías nuevas como el despliegue en fago se obtienen resultados prometedores, ya que se encuentran proteínas inmunodominantes hiperconservadas del virus, como lo son las no estructurales; en concreto el presente estudio evidencia la NS5B, que es necesaria para el ensamblaje y la liberación del virión.^{57,193,195}

Posterior al alineamiento con la proteína NS5B, se realizó un modelaje *in silico* de la proteína NS5B, marcando la posición de los epítomos identificados donde se observa que MACD8 y MACD14 son epítomos lineales a diferencia del epítomo de la clona MACD9 que no se encontró de manera lineal en el modelo, lo que puede señalar que este epítomo posiblemente sea conformacional (ver Figura 11), lo que sería una ventaja, ya que de esta manera tendría una especificidad mayor por el mejor acoplamiento con la región hipervariable de los anticuerpos, algo que se ha observado en estudios con la proteína no estructural NS3 en el estudio de Dirk Dereg et al. del 2005 donde se usó *E. coli* como vector de clonación de esta proteína, obteniendo resultados donde había interacción entre esta proteína y los sueros mediante ELISA y Western blot, aunque no fue posible hacer un mapeo de la misma, esto es atribuible a la conformación cristalizada de la proteína, algo que en el presente estudio se logró identificar gracias a las secuencias obtenidas y la comparación con la base de datos BLAST, así mismo, en concordancia con el estudio mencionado, una secuencia de aminoácidos no fue identificada, lo que podría indicar la presencia de un epítomo conformacional. A Villa-Mancera et al. en el 2015 obtuvieron resultados similares con la diferencia de que en ese estudio se utilizó la proteína N del virus del síndrome respiratorio y reproductivo del cerdo que es estructural.^{47,185,196}

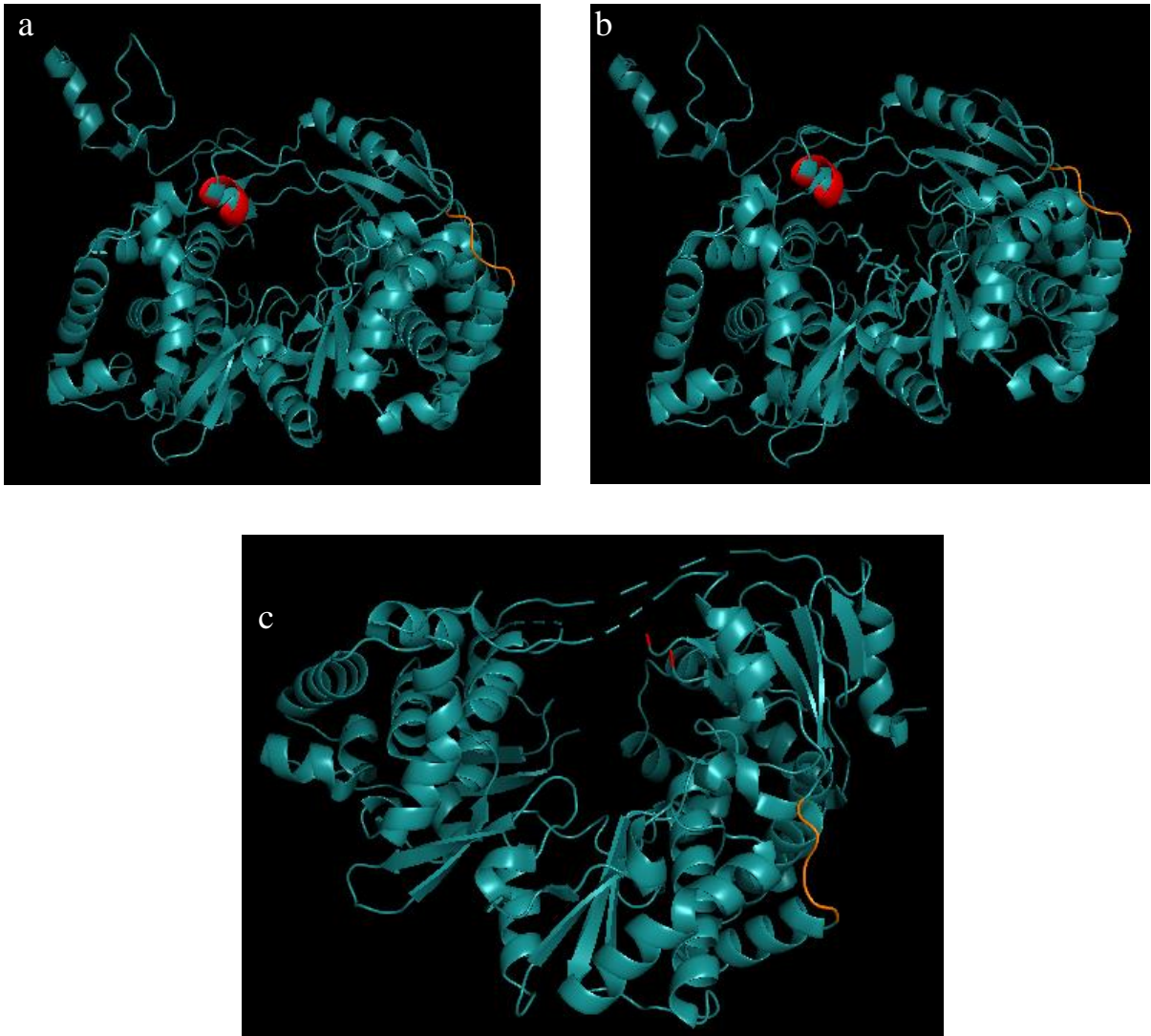


Figura 11. Modelos *in silico* de la proteína NS5B (**a**, **b** y **c**) marcando en cada uno de ellos a los epítomos expresados por las clonas MACD8 “Rojo” y MACD14 “Naranja”.

Al comparar la reactividad de las clonas seleccionadas enfrentándolas a diferentes sueros, se confirmó que estas son reconocidas por el pool de sueros contra DVB con una diferencia significativa (5 desviaciones estándar por encima de la línea de corte), a comparación de los sueros negativo y el pool de sueros contra Bronquitis infecciosa bovina (IBR) (ver Figura 12), esto confirmaría la información obtenida hasta este momento, siendo estas clonas epítomos que mimetizan (mimótopos) regiones inmunodominantes de la proteína no estructural NS5B y comparando con las validaciones de ELISA donde la especificidad es muy alta (>96%) realizadas por SR Lanyon et al. en el 2013, podemos observar que en este estudio se cumple con esta característica, teniendo una diferencia estadísticamente significativa, comparando la reactividad con un suero negativo a DVB e IBR, un pool de sueros positivos a DVB y un suero positivo a IBR, lo que podría ayudar a identificar a animales infectados con este virus en concordancia con el estudio realizado por Torstein Sandvik y Johan Krogsrud en 1995, donde también se utilizó una proteína no estructural por su alta conservación entre diferentes cepas del mismo virus.^{197,198}

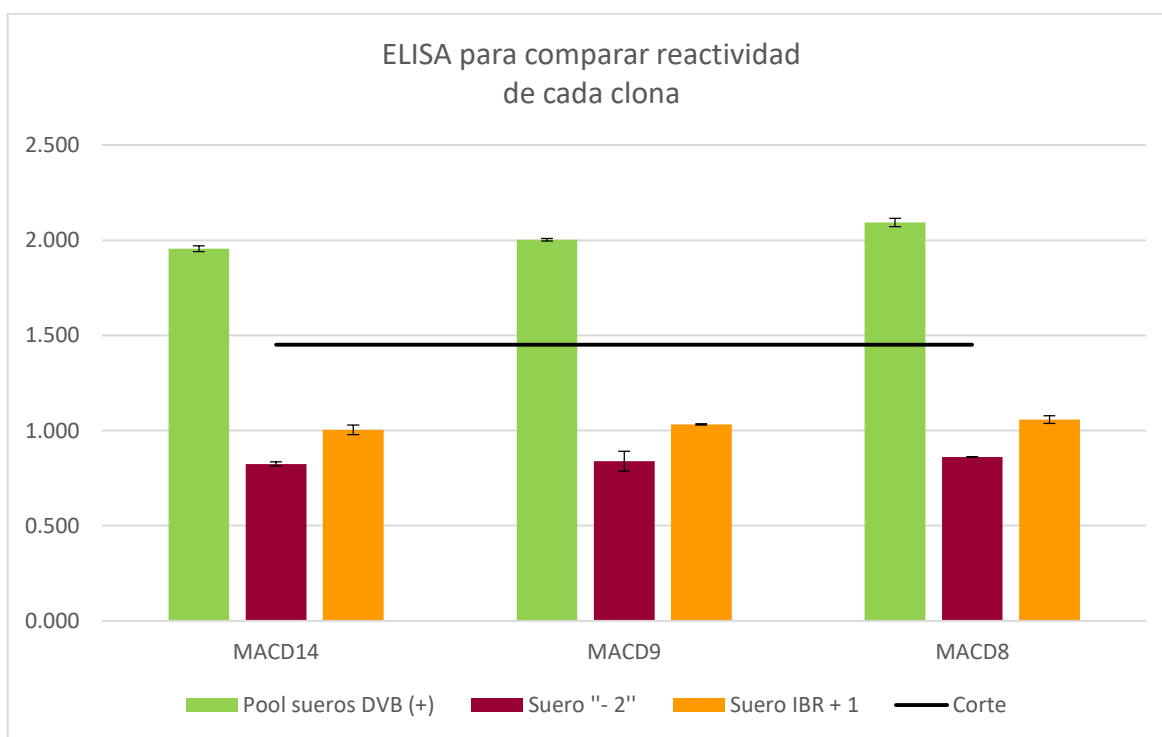


Figura 12. Reactividad de las clonas individuales enfrentadas a un pool de sueros positivos a DVB, un suero negativo a DVB y un suero positivo a IBR.

Comparando la reactividad de las clonas usando sueros individuales de animales positivos a DVB, IBR y negativo a ambas (ver Figura 13), se logra apreciar una diferencia significativa entre la reactividad de cada uno de ellos y aun obteniendo una reactividad menor que cuando se usó el pool de sueros positivos a DVB, se sigue teniendo una diferencia estadísticamente significativa al usar 10 desviaciones estándar para la línea de corte tomando en cuenta lo descrito por SR Lanyon et al. en el 2013, lo que sigue dando resultados realmente positivos comparándose con otros estudios donde se utiliza antígeno viral como el estudio de Torstein Sandvik y Johan Krogsrud en 1995 mencionado en el resultado anterior, remarcando la ventaja de que usar estas clonas como antígeno de captura es más rápido y sencillo que producir antígeno crudo del vDVB o proteínas recombinantes.^{197,198}

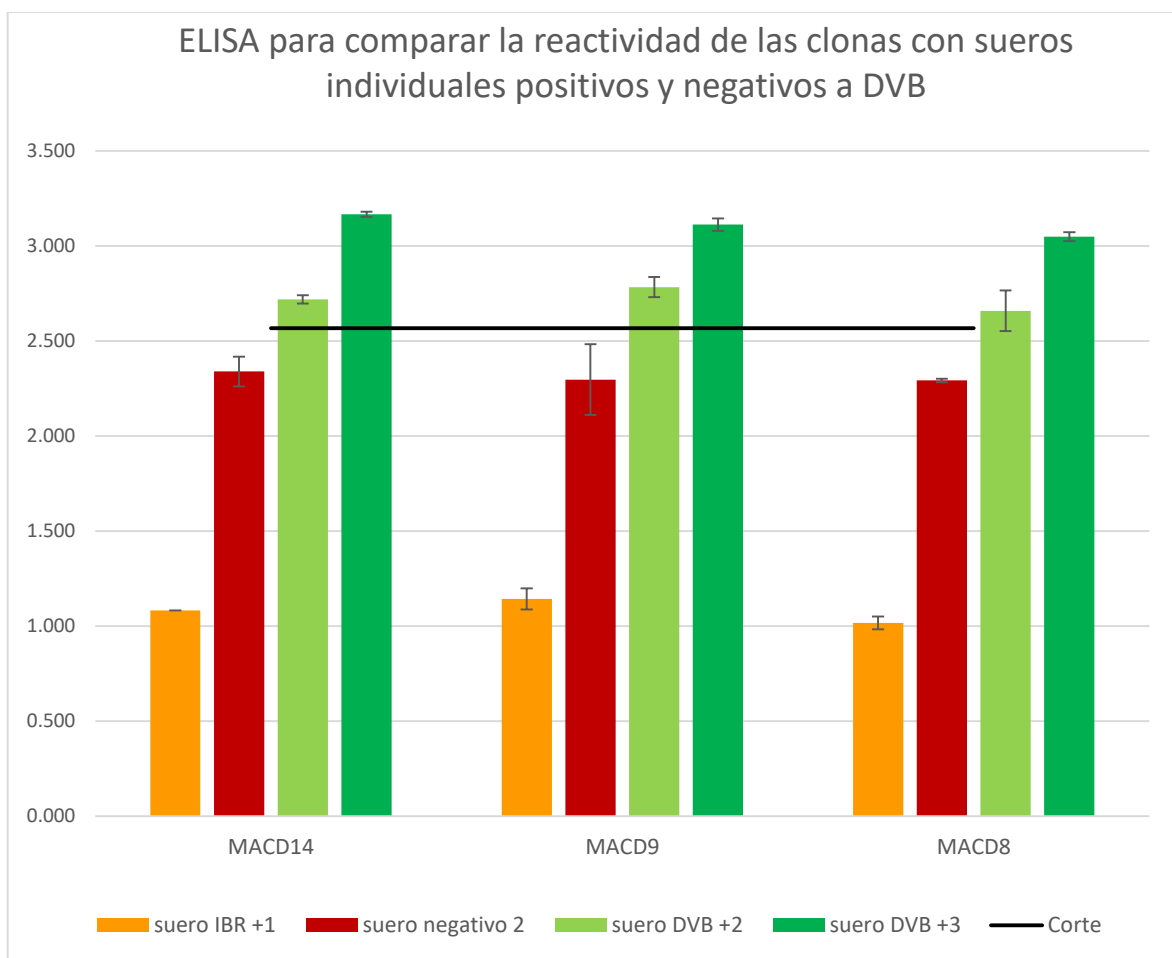


Figura 13. Reactividad de las clonas seleccionadas con sueros individuales de animales positivos a DVB, un suero negativo a DVB y un suero positivo a IBR.

Una vez obtenidos los resultados en las pruebas de ELISA se buscó otra alternativa que pudiera ser aplicable en métodos de diagnóstico por serología, siendo el Dot-blot una opción más rápida y aplicable en campo. Una vez realizado el protocolo para esta metodología los resultados (ver Tabla 5) muestran que las clonas MACD8 y MACD14 son reconocidas por los anticuerpos en un arreglo sólido diferenciando entre sueros negativos y positivos a DVB, a diferencia de la clona MACD9 que no reaccionó con un suero positivo número 5 además de reaccionar con el suero negativo, en comparación a un arreglo en un medio líquido como el ELISA, lo que podría explicarse con la información obtenida en la Figura 13, donde se evidencia que el epítipo expresado por esta clona no es lineal y solo pueda ser reconocido por los anticuerpos en un medio líquido; este tipo de resultados se han visto en ensayos de otros autores como los de Dirk Deregt et al. del 2005 así como Farhid Hemmatzadeh1 y Farhad Amini en el 2009, donde se coincide que este método puede llegar a tener resultados muy similares en cuanto a especificidad y sensibilidad en comparación con el ELISA, aunque tiene la limitante de solo tener resultados cualitativos. Además de llegar a resultados que podrían tener una aplicación real, este estudio tiene la ventaja de que, al no utilizar el vDVB o alguna proteína recombinante, la producción de los péptidos y por consiguiente de la prueba es más rápida.^{188,189,192}

Tabla 5. Dot-blot de clonas individuales enfrentadas 5 sueros positivos y 1 negativo a DVB.

<i>Suero</i>	-	+1	+2	+3	+4	+5
<i>MACD8</i>						
<i>MACD9</i>						
<i>MACD14</i>						

En el presente estudio se obtuvo como resultado la identificación de 3 péptidos que mimetizan a la proteína NS5B de manera lineal y conformacional evidenciando por medio de técnicas como ELISA que estos péptidos son reconocidos por sueros positivos a DVB de manera individual y en conjunto, sumado a esto, el uso de sueros negativos a DVB y sueros positivos a otra enfermedad como IBR mostró que no son reconocidos por estos sueros y en el caso del uso de Dot-blot se obtuvo un resultado que podría ser indicativo que el arreglo en fase sólida de esta prueba indirecta también podría ser utilizado con fines diagnósticos diferenciando sueros realmente negativos y positivos a DVB, lo que mostraría una ventaja en comparación con estudios como el de Melissa Batonick et. al. en el 2013 en el que se trabajó con el virus de la fiebre porcina clásica (otro miembro de la familia *Flaviviridae*), donde se utilizó una metodología similar usando la técnica Phage display y como epítipo relevante la glicoproteína E presente en la envoltura viral la cual a pesar de ser inmunodominante, es hipervariable, lo que podría dar como resultado el escape de algunas cepas a los métodos diagnósticos por serología, incluso mostrando que los péptidos mapeados son identificados por los sueros usados en esos estudios¹⁹⁹ o el de Ana L. Zamit et al. en el 2010 donde se usó esta misma proteína pero del vDVB teniendo resultados muy variables donde solamente algunos péptidos fueron reconocidos por los sueros.¹⁸³

VII. Conclusión

Al utilizar la técnica Phage Display, se logró identificar una proteína inmunodominante hiperconservada del vDVB, la proteína NS5B, mediante el análisis de las secuencias genéticas de los aminoácidos que conforman los epítomos obtenidos por medio de las bioselecciones, estos epítomos podrían ser usados para un método diagnóstico serológico eficaz y con ventajas sobre el vDVB por el bajo costo en la producción de fagos y la rapidez con la que se replican los fagos.

Los ensayos ELISA realizados, demostraron que estos péptidos fueron reconocidos por los anticuerpos específicos contra el vDVB de diferentes animales en pool y de manera individual, además de ser específicos, ya que el suero contra IBR mostró una reactividad menor, muy parecida a los sueros negativos.

El análisis de las clonas mediante Dot-blot demostró que, en una configuración en un medio sólido, las clonas siguen siendo identificadas satisfactoriamente por los sueros positivos a DVB, a excepción de la clona MACD9, siendo esta clona la única que no pudo ser adaptada a los modelos cristalizados, puede considerarse que la posibilidad de que sea conformacional sea el motivo de esta diferencia.

VIII. Referencias

1. Presencia del virus de la diarrea viral bovina y su asociación con otros cuadros patológicos en ganado en corral de engorda. Consultado junio 3, 2020. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-50922012000300004
2. Walz PH, Grooms DL, Passler T, et al. Control of Bovine Viral Diarrhea Virus in Ruminants. *J Vet Intern Med.* 2010;24(3):476–486. doi:10.1111/j.1939-1676.2010.0502.x
3. Machado G, Egocheaga RMF, Hein HE, et al. Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) in Dairy Cattle: A Matched Case-Control Study. *Transbound Emerg Dis.* 2016;63(1):e1–e13. doi:10.1111/tbed.12219
4. Betancur H, Gogorza L, Veterinaria FM-A, 2007 undefined. Seroepidemiología de la diarrea viral bovina en Montería (Córdoba, Colombia). *sedici.unlp.edu.ar*. Consultado marzo 4, 2020. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/11204>
5. Fulton RW, Ridpath JF, Confer AW, Saliki JT, Burge LJ, Payton ME. Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: Impact on disease and vaccination programmes. En: *Biologicals*. Vol 31. Academic Press; 2003:89–95. doi:10.1016/S1045-1056(03)00021-6
6. Fernández JVR, Utrera ÁR, Martínez JPZ, et al. Prevalence of antibodies against bovine viral diarrhoea in non-vaccinated cows from the States of Puebla, Tabasco and Veracruz, Mexico. *Rev Mex Ciencias Pecu.* 2018;9(3):555–566. doi:10.22319/rmcp.v9i3.4599
7. Sánchez-Castilleja Y, ... DR-R de S, 2012 undefined. Serological simultaneity of *Neospora caninum* with *Brucella abortus* and infectious bovine rhinotracheitis and viral diarrhoea viruses in herds from Hidalgo, Mexico. *cabdirect.org*. Consultado marzo 4, 2020. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20123298364>
8. Romero J, ... LV-R, 1999 undefined. Impacto económico de enfermedades animales en sistemas productivos en Sudamérica: estudios de caso. *Off Int des épizooties*.

9. Houe H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. En: *Veterinary Microbiology*. Vol 64. ; 1999:89–107. doi:10.1016/S0378-1135(98)00262-4
10. Salas DR, Peña TM, Aguilar Domínguez M, Martínez Herrera DI, García Vazquez ZS. Prevalencia de diarrea viral bovina en el estado de Veracruz, México. Published online 2009.
11. Vargas DS, Jaime J, Víctor ;, Vera J. *Perspectivas para el control del Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV) ▫ Perspectives to control Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) Perspectivas para o controle do vírus da diarreia viral Bovina (BVDV)*. Consultado junio 4, 2020. <http://rccp.udea.edu.co>
12. Thé Zé J, Lowes S, Parker J, Pybus OG. Evolutionary and Phylogenetic Analysis of the Hepaciviruses and Pegiviruses. doi:10.1093/gbe/evv202
13. Simmonds P, Becher P, Bukh J, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae ICTV VIRUS TAXONOMY PROFILES. *J Gen Virol*. 2017;98:2–3. doi:10.1099/jgv.0.000672
14. Veterinaria M. *Determinación de anticuerpos anti-diarrea viral bovina (DVB) mediante elisa competitivo en una población cautiva de venados cola blanca (Odocoileus virginianus) en Cundinamarca, Colombia.*; 2013. Consultado junio 3, 2020. https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria/18
15. Tautz N, Tews BA, Meyers G. The Molecular Biology of Pestiviruses. En: *Advances in Virus Research*. Vol 93. Academic Press Inc.; 2015:47–160. doi:10.1016/bs.aivir.2015.03.002
16. Gottipati K, Acholi S, Ruggli N, Choi KH. Autocatalytic activity and substrate specificity of the pestivirus N-terminal protease Npro. *Virology*. 2014;452–453:303–309. doi:10.1016/j.virol.2014.01.026
17. Krey T, Bontems F, Vonrhein C, et al. Crystal structure of the pestivirus envelope glycoprotein Erns and mechanistic analysis of its ribonuclease activity. *Structure*. 2012;20(5):862–873. doi:10.1016/j.str.2012.03.018

18. Schweizer M, Peterhans E. Noncytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus Inhibits Double-Stranded RNA-Induced Apoptosis and Interferon Synthesis. *J Virol.* 2001;75(10):4692–4698. doi:10.1128/jvi.75.10.4692-4698.2001
19. Meyers G, Ege A, Fetzer C, et al. Bovine Viral Diarrhea Virus: Prevention of Persistent Fetal Infection by a Combination of Two Mutations Affecting Erns RNase and Npro Protease. *J Virol.* 2007;81(7):3327–3338. doi:10.1128/jvi.02372-06
20. Python S, Gerber M, Suter R, Ruggli N, Summerfield A. Efficient Sensing of Infected Cells in Absence of Virus Particles by Blasmacytoid Dendritic Cells Is Blocked by the Viral Ribonuclease Erns. *PLoS Pathog.* 2013;9(6). doi:10.1371/journal.ppat.1003412
21. Zurcher C, Sauter K-S, Mathys V, Wyss F, Schweizer M. Prolonged Activity of the Pestiviral RNase Erns as an Interferon Antagonist after Uptake by Clathrin-Mediated Endocytosis. *J Virol.* 2014;88(13):7235–7243. doi:10.1128/jvi.00672-14
22. Hilton L, Moganeradj K, Zhang G, et al. The NPro Product of Bovine Viral Diarrhea Virus Inhibits DNA Binding by Interferon Regulatory Factor 3 and Targets It for Proteasomal Degradation. *J Virol.* 2006;80(23):11723–11732. doi:10.1128/jvi.01145-06
23. Pestivirus ~ ViralZone page. Consultado agosto 7, 2020. https://viralzone.expasy.org/39?outline=all_by_protein
24. Liang R, van den Hurk J V., Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S. Priming with DNA encoding E2 and boosting with E2 protein formulated with CpG oligodeoxynucleotides induces strong immune responses and protection from Bovine viral diarrhea virus in cattle. *J Gen Virol.* 2006;87(10):2971–2982. doi:10.1099/vir.0.81737-0
25. MacLachlan NJ, Dubovi EJ, Barthold SW, Swayne DE, Winton JR. *Fenner's veterinary virology: Fifth edition.* Elsevier Inc.; 2016.
26. Maurer K, Krey T, Moennig V, Thiel H-J, Rümenapf T. CD46 Is a Cellular Receptor for Bovine Viral Diarrhea Virus. *J Virol.* 2004;78(4):1792–1799. doi:10.1128/JVI.78.4.1792-1799.2004

27. Iqbal M, Flick-Smith H, Mccauley JW. *Printed in Great Britain Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E rns with cell surface glycosaminoglycans*. Vol 81.; 2000.
28. Grummer B, Grotha S, Greiser-Wilke I. Bovine viral diarrhoea virus is internalized by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *J Vet Med Ser B Infect Dis Vet Public Heal*. 2004;51(10):427–432. doi:10.1111/j.1439-0450.2004.00798.x
29. Shirokikh NE, Preiss T. Translation initiation by cap-dependent ribosome recruitment: Recent insights and open questions. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2018;9(4):e1473. doi:10.1002/wrna.1473
30. Murray CL, Jones CT, Rice CM. Architects of assembly: Roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(9):699–708. doi:10.1038/nrmicro1928
31. Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields virology*. 5th ed. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
32. Thiel HJ, Stark R, Weiland E, Rüménapf T, Meyers G. Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J Virol*. 1991;65(9):4705–4712. doi:10.1128/jvi.65.9.4705-4712.1991
33. Tews BA, Meyers G. The pestivirus glycoprotein E rns is anchored in plane in the membrane via an amphipathic helix. *J Biol Chem*. 2007;282(45):32730–32741. doi:10.1074/jbc.M706803200
34. Bruschke CJ, Hulst MM, Moormann RJ, van Rijn PA, van Oirschot JT. Glycoprotein Erns of pestiviruses induces apoptosis in lymphocytes of several species. *J Virol*. 1997;71(9).
35. Lussi C, Schweizer M. What can pestiviral endonucleases teach us about innate immunotolerance? *Cytokine Growth Factor Rev*. 2016;29:53–62. doi:10.1016/j.cytogfr.2016.03.003
36. El Omari K, Iourin O, Harlos K, Grimes JM, Stuart DI. Structure of a Pestivirus Envelope Glycoprotein E2 Clarifies Its Role in Cell Entry. *Cell Rep*. 2013;3(1):30–

35. doi:10.1016/j.celrep.2012.12.001
37. Krey T, Himmelreich A, Heimann M, et al. Function of Bovine CD46 as a Cellular Receptor for Bovine Viral Diarrhea Virus Is Determined by Complement Control Protein 1. *J Virol.* 2006;80(8):3912–3922. doi:10.1128/JVI.80.8.3912-3922.2006
38. Christmas SE, de la Mata Espinosa CT, Halliday D, Buxton CA, Cummerson JA, Johnson PM. Levels of expression of complement regulatory proteins CD46, CD55 and CD59 on resting and activated human peripheral blood leucocytes. *Immunology.* 2006;119(4):522–528. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02467.x
39. Luscombe CA, Huang Z, Murray MG, Miller M, Wilkinson J, Ewart GD. A novel Hepatitis C virus p7 ion channel inhibitor, BIT225, inhibits bovine viral diarrhea virus in vitro and shows synergism with recombinant interferon- α -2b and nucleoside analogues. *Antiviral Res.* 2010;86(2):144–153. doi:10.1016/j.antiviral.2010.02.312
40. Harada T, Tautz N, Thiel H-J. E2-p7 Region of the Bovine Viral Diarrhea Virus Polyprotein: Processing and Functional Studies. *J Virol.* 2000;74(20):9498–9506. doi:10.1128/jvi.74.20.9498-9506.2000
41. Li L, Wu R, Zheng F, Zhao C, Pan Z. The N-terminus of classical swine fever virus (CSFV) nonstructural protein 2 modulates viral genome RNA replication. *Virus Res.* 2015;210:90–99. doi:10.1016/j.virusres.2015.07.021
42. Müller A, Rinck G, Thiel H-J, Tautz N. Cell-Derived Sequences in the N-Terminal Region of the Polyprotein of a Cytopathogenic Pestivirus Downloaded from. *J Virol.* 2003;77(19):10663–10669. doi:10.1128/JVI.77.19.10663-10669.2003
43. Lackner T, Müller A, Pankraz A, et al. Temporal Modulation of an Autoprotease Is Crucial for Replication and Pathogenicity of an RNA Virus Downloaded from. *J Virol.* 2004;78(19):10765–10775. doi:10.1128/JVI.78.19.10765-10775.2004
44. Kümmerer BM, Tautz N, Becher P, Thiel HJ, Meyers G. The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses. En: *Veterinary Microbiology.* Vol 77. ; 2000:117–128. doi:10.1016/S0378-1135(00)00268-6
45. Xu J, Mendez E, Caron PR, et al. *Bovine Viral Diarrhea Virus NS3 Serine Proteinase:*

Polyprotein Cleavage Sites, Cofactor Requirements, and Molecular Model of an Enzyme Essential for Pestivirus Replication. Vol 71.; 1997.

46. Mahmoodi P, Shapouri MRSA, Ghorbanpour M, et al. Simple indirect Enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against bovine viral diarrhoea virus, based on prokaryotically expressed recombinant MBP-NS3 protein. *Jundishapur J Microbiol*. 2015;8(3):14311. doi:10.5812/jjm.14311
47. Deregt D, Dubovi EJ, Jolley ME, Nguyen P, Burton KM, Gilbert SA. Mapping of two antigenic domains on the NS3 protein of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Vet Microbiol*. 2005;108(1–2):13–22. doi:10.1016/j.vetmic.2005.02.010
48. Tautz N, Kaiser A, Thiel HJ. NS3 serine protease of bovine viral diarrhoea virus: Characterization of active site residues, NS4A cofactor domain, and protease-cofactor interactions. *Virology*. 2000;273(2):351–363. doi:10.1006/viro.2000.0425
49. Moulin HR, Seuberlich T, Bauhofer O, et al. Nonstructural proteins NS2-3 and NS4A of classical swine fever virus: Essential features for infectious particle formation. *Virology*. 2007;365(2):376–389. doi:10.1016/j.virol.2007.03.056
50. Qu L, McMullan LK, Rice CM. Isolation and Characterization of Noncytopathic Pestivirus Mutants Reveals a Role for Nonstructural Protein NS4B in Viral Cytopathogenicity. *J Virol*. 2001;75(22):10651–10662. doi:10.1128/jvi.75.22.10651-10662.2001
51. Weiskircher E, Aligo J, Ning G, Konan K V. Bovine viral diarrhoea virus NS4B protein is an integral membrane protein associated with Golgi markers and rearranged host membranes. *Virol J*. 2009;6(1):185. doi:10.1186/1743-422X-6-185
52. Johnson CM, Perez DR, French R, Merrick WC, Donis RO. The NS5A protein of bovine viral diarrhoea virus interacts with the α subunit of translation elongation factor-1. *J Gen Virol*. 2001;82(12):2935–2943. doi:10.1099/0022-1317-82-12-2935
53. Zahoor MA, Yamane D, Mohamed YM, et al. Bovine viral diarrhoea virus non-structural protein 5A interacts with NIK- and IKK β -binding protein. *J Gen Virol*. 2010;91(8):1939–1948. doi:10.1099/vir.0.020990-0

54. Tellinghuisen TL, Paulson MS, Rice CM. The NS5A Protein of Bovine Viral Diarrhea Virus Contains an Essential Zinc-Binding Site Similar to That of the Hepatitis C Virus NS5A Protein. *J Virol.* 2006;80(15):7450–7458. doi:10.1128/jvi.00358-06
55. Grassmann CW, Isken O, Tautz N, Behrens S-E. Genetic Analysis of the Pestivirus Nonstructural Coding Region: Defects in the NS5A Unit Can Be Complemented intrans. *J Virol.* 2001;75(17):7791–7802. doi:10.1128/jvi.75.17.7791-7802.2001
56. Duan H, Ma Z, Xu L, Zhang A, Li Z, Xiao S. A novel intracellularly expressed NS5B-specific nanobody suppresses bovine viral diarrhea virus replication. *Vet Microbiol.* 2019;240:108449. doi:10.1016/j.vetmic.2019.108449
57. Ansari IH, Chen L-M, Liang D, Gil LH, Zhong W, Donis RO. Involvement of a Bovine Viral Diarrhea Virus NS5B Locus in Virion Assembly. *J Virol.* 2004;78(18):9612–9623. doi:10.1128/jvi.78.18.9612-9623.2004
58. Curti E, Jaeger J. Residues Arg283, Arg285, and Ile287 in the Nucleotide Binding Pocket of Bovine Viral Diarrhea Virus NS5B RNA Polymerase Affect Catalysis and Fidelity. *J Virol.* 2013;87(1):199–207. doi:10.1128/jvi.06968-11
59. Lai VCH, Kao CC, Ferrari E, et al. Mutational Analysis of Bovine Viral Diarrhea Virus RNA-Dependent RNA Polymerase. *J Virol.* 1999;73(12):10129–10136. doi:10.1128/jvi.73.12.10129-10136.1999
60. Newcomer BW, Neill JD, Marley MS, Ridpath JF, Givens MD. Mutations induced in the NS5B gene of bovine viral diarrhea virus by antiviral treatment convey resistance to the compound. *Virus Res.* 2013;174(1–2):95–100. doi:10.1016/j.virusres.2013.03.007
61. Myers TM, Kolupaeva VG, Mendez E, et al. Efficient Translation Initiation Is Required for Replication of Bovine Viral Diarrhea Virus Subgenomic Replicons. *J Virol.* 2001;75(9):4226–4238. doi:10.1128/JVI.75.9.4226-4238.2001
62. Macovei A, Zitzmann N, Lazar C, Dwek RA, Branza-Nichita N. Brefeldin A inhibits pestivirus release from infected cells, without affecting its assembly and infectivity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;346(3):1083–1090.

doi:10.1016/j.bbrc.2006.06.023

63. Jordan R, Nikolaeva O V., Wang L, et al. Inhibition of host ER glucosidase activity prevents Golgi processing of virion-associated bovine viral diarrhea virus E2 glycoproteins and reduces infectivity of secreted virions. *Virology*. 2002;295(1):10–19. doi:10.1006/viro.2002.1370
64. Salonen A, Ahola T, Kääriäinen L. Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2004;285:139–173. doi:10.1007/3-540-26764-6_5
65. Chen Y, Xiao J, Xiao J, et al. Classical swine fever virus NS5A regulates viral RNA replication through binding to NS5B and 3'UTR. *Virology*. 2012;432(2):376–388. doi:10.1016/j.virol.2012.04.014
66. Liang D, Chen L, Ansari IH, et al. A replicon trans-packaging system reveals the requirement of nonstructural proteins for the assembly of bovine viral diarrhea virus (BVDV) virion. *Virology*. 2009;387(2):331–340. doi:10.1016/j.virol.2009.02.019
67. Ridpath JF, Bolin SR, Dubovi EJ. Segregation of Bovine Viral Diarrhea Virus into Genotypes. *Virology*. 1994;205(1):66–74. doi:10.1006/viro.1994.1620
68. Ridpath JF, Bolin SR. The Genomic Sequence of a Virulent Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) from the Type 2 Genotype: Detection of a Large Genomic Insertion in a Noncytopathic BVDV. *Virology*. 1995;212(1):39–46. doi:10.1006/viro.1995.1451
69. Pellerin C, Van den Hurk J, Lecomte J, Tijssen P. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*. 1994;203(2):260–268. doi:10.1006/viro.1994.1483
70. Archambault D, Béliveau C, Couture Y, Carman S. Clinical response and immunomodulation following experimental challenge of calves with type 2 noncytopathogenic bovine viral diarrhea virus. *Vet Res*. 2000;31(2):215–227. doi:10.1051/vetres:2000117
71. Liebler-Tenorio EM, Ridpath JF, Neill JD. Distribution of viral antigen and development of lesions after experimental infection with highly virulent bovine viral

- diarrhea virus type 2 in calves. *Am J Vet Res.* 2002;63(11):1575–1584. doi:10.2460/ajvr.2002.63.1575
72. Stoffregen B, Bolin SR, Ridpath JF, Pohlenz J. Morphologic lesions in type 2 BVDV infections experimentally induced by strain BVDV2-1373 recovered from a field case. En: *Veterinary Microbiology.* Vol 77. Elsevier; 2000:157–162. doi:10.1016/S0378-1135(00)00272-8
73. Vilček Š, Paton DJ, Durkovic B, et al. *Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups* *. Vol 146.; 2001.
74. Flores EF, Ridpath JF, Weiblen R, Vogel FSF, Gil LHVG. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV-2) isolates: Evidence for a subgenotype within BVDV-2. *Virus Res.* 2002;87(1):51–60. doi:10.1016/S0168-1702(02)00080-1
75. Bolin SR, Grooms DL. Origination and consequences of bovine viral diarrhea virus diversity. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract.* 2004;20(1):51–68. doi:10.1016/j.cvfa.2003.11.009
76. Peterhans E, Bachofen C, Stalder H, Schweizer M. Cytopathic bovine viral diarrhea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. *vetres.org.* doi:10.1051/vetres/2010016
77. Decaro N, Lucente M, Mari V, ... FC-E infectious, 2011 undefined. Atypical pestivirus and severe respiratory disease in calves, Europe. *ncbi.nlm.nih.gov.* Consultado marzo 4, 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3381567/>
78. Fulton RW, Saliki JT, Confer AW, et al. Bovine viral diarrhea virus cytopathic and noncytopathic biotypes and type 1 and 2 genotypes in diagnostic laboratory accessions: clinical and necropsy samples from cattle. *J Vet Diagn Invest.* 2000;12(1):33–38. doi:10.1177/104063870001200106
79. Araínga MR, Rivera HG, Carlos Huamán JG, Manchego AS. *FENOTIPO Y GENOTIPO DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL AISLADO DE BOVINOS EN EL PERÚ PHENOTYPE AND GENOTYPE OF BOVINE VIRAL DIARRHOEA VIRUS*

ISOLATED IN PERUVIAN CATTLE. Vol 21.; 2010.

80. Brownlie J, Thompson I, Curwen A. Bovine virus diarrhoea virus - Strategic decisions for diagnosis and control. *In Pract.* 2000;22(4):176–187. doi:10.1136/inpract.22.4.176
81. Lértora WJ. *Diarrea viral bovina: actualización*. Vol 14.; 2003. Consultado agosto 2, 2020. <https://revistas.unne.edu.ar/index.php/vet/article/view/684>
82. Kümmerer BM, Meyers G. Correlation between Point Mutations in NS2 and the Viability and Cytopathogenicity of Bovine Viral Diarrhea Virus Strain Oregon Analyzed with an Infectious cDNA Clone. *J Virol.* 2000;74(1):390–400. doi:10.1128/jvi.74.1.390-400.2000
83. Harding MJ, Cao X, Shams H, et al. Role of bovine viral diarrhoea virus biotype in the establishment of fetal infections. *Am J Vet Res.* 2002;63(10):1455–1463. doi:10.2460/ajvr.2002.63.1455
84. Schaut RG, Ridpath JF, Sacco RE. Bovine Viral Diarrhoea Virus Type 2 Impairs Macrophage Responsiveness to Toll-Like Receptor Ligation with the Exception of Toll-Like Receptor 7. Roques P, ed. *PLoS One.* 2016;11(7):e0159491. doi:10.1371/journal.pone.0159491
85. Lambot M, Hanon E, Lecomte C, Hamers C, Letesson JJ, Pastoret PP. Bovine viral diarrhoea virus induces apoptosis in blood mononuclear cells by a mechanism largely dependent on monocytes. *J Gen Virol.* 1998;79(7):1745–1749. doi:10.1099/0022-1317-79-7-1745
86. Atluru D, Gudapaty S, Xue W, et al. In vitro inhibition of 5-lipoxygenase metabolite, leukotriene B4, in bovine mononuclear cells by bovine viral diarrhoea virus. *Vet Immunol Immunopathol.* 1992;31(1–2):49–59. doi:10.1016/0165-2427(92)90086-6
87. Chase CCL. The impact of BVDV infection on adaptive immunity. *Biologicals.* 2013;41(1):52–60. doi:10.1016/j.biologicals.2012.09.009
88. Adler H, Jungi TW, Pfister H, Strasser M, Sileghem M, Peterhans E. Cytokine regulation by virus infection: bovine viral diarrhoea virus, a flavivirus, downregulates

- production of tumor necrosis factor alpha in macrophages in vitro. *J Virol.* 1996;70(4).
89. Zurcher C, Sauter K-S, Mathys V, Wyss F, Schweizer M. Prolonged Activity of the Pestiviral RNase Erns as an Interferon Antagonist after Uptake by Clathrin-Mediated Endocytosis. *J Virol.* 2014;88(13):7235–7243. doi:10.1128/jvi.00672-14
 90. Peterhans E, Schweizer M. BVDV: A pestivirus inducing tolerance of the innate immune response. *Biologicals.* 2013;41(1):39–51. doi:10.1016/j.biologicals.2012.07.006
 91. Seago J, Hilton L, Reid E, et al. The Npro product of classical swine fever virus and bovine viral diarrhoea virus uses a conserved mechanism to target interferon regulatory factor-3. *J Gen Virol.* 2007;88(11):3002–3006. doi:10.1099/vir.0.82934-0
 92. Schaut RG, McGill JL, Neill JD, Ridpath JF, Sacco RE. Bovine viral diarrhoea virus type 2 in vivo infection modulates TLR4 responsiveness in differentiated myeloid cells which is associated with decreased MyD88 expression. *Virus Res.* 2015;208:44–55. doi:10.1016/j.virusres.2015.05.017
 93. Lección 18: Preñez (gestación) de los rumiantes. Consultado marzo 4, 2020. <http://www.fao.org/3/T0690S/t0690s06.htm>
 94. Sánchez-Ramón S, Butnaru D. Modelos de reconocimiento inmunológico: tolerancia e inmunidad en el marco de la evolución del conocimiento científico. *Inmunologia.* 2013;32(4):139–147. doi:10.1016/J.INMUNO.2013.09.001
 95. Rhodes SG, Cocksedge JM, Collins RA, Morrison WI. Differential cytokine responses of CD4+ and CD8+ T cells in response to bovine viral diarrhoea virus in cattle. *J Gen Virol.* 1999;80(7):1673–1679. doi:10.1099/0022-1317-80-7-1673
 96. Smirnova NP, Webb BT, McGill JL, et al. Induction of interferon-gamma and downstream pathways during establishment of fetal persistent infection with bovine viral diarrhoea virus. *Virus Res.* 2014;183:95–106. doi:10.1016/j.virusres.2014.02.002
 97. Platt R, Coutu C, Meinert T, Roth JA. Humoral and T cell-mediated immune responses to bivalent killed bovine viral diarrhoea virus vaccine in beef cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008;122(1–2):8–15. doi:10.1016/j.vetimm.2007.11.009

98. Tizard IR. *Introducción a la inmunología veterinaria*. 8va ed.; 2009.
99. Rajput MKS, Darweesh MF, Braun LJ, Mansour SMG, Chase CCL. Comparative humoral immune response against cytopathic or non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus infection. *Res Vet Sci*. 2020;129:109–116. doi:10.1016/j.rvsc.2020.01.012
100. Mehdy Elahi S, Bergeron J, Nagy E, et al. *Induction of humoral and cellular immune responses in mice by a recombinant fowlpox virus expressing the E2 protein of bovine viral diarrhoea virus*. doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb13419.x
101. Repositorio de Tesis en Ciencias Biomédicas y de la Salud de Cuba - Respuesta inmune específica contra el virus de la hepatitis C en individuos crónicamente infectados y su modificación mediante intervenciones terapéuticas que incluyen la preparación vacunal CIGB-230. Consultado agosto 23, 2020. <http://tesis.sld.cu/index.php/index.php?P=FullRecord&ID=264>
102. Stokstad M, Brownlie J, Collins ME. Analysis of variation of bovine viral diarrhoea virus E2 sequence following transplacental infection of cattle. *Vet Microbiol*. 2004;102(3–4):141–145. doi:10.1016/j.vetmic.2004.06.015
103. Nobiron I, Thompson I, Brownlie J, Collins ME. Co-administration of IL-2 enhances antigen-specific immune responses following vaccination with DNA encoding the glycoprotein E2 of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Microbiol*. 2000;76(2):129–142. doi:10.1016/S0378-1135(00)00238-8
104. Elahi SM, Shen SH, Harpin S, Talbot BG, Elazhary Y. Investigation of the immunological properties of the bovine viral diarrhoea virus protein NS3 expressed by an adenovirus vector in mice. *Arch Virol*. 1999;144(6):1057–1070. doi:10.1007/s007050050569
105. Ingravallo P, Lahser F, Xia E, et al. Characterization of monoclonal antibodies that specifically recognize the palm subdomain of hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase. *Virus Res*. 2001;75(2):179–187. doi:10.1016/S0168-1702(01)00239-8
106. Chen M, Sallaberg M, Sonneborg A, et al. Limited humoral immunity in hepatitis C

- virus infection. *Gastroenterology*. 1999;116(1):135–143. doi:10.1016/S0016-5085(99)70237-4
107. Young NJ, Thomas CJ, Thompson I, Collins ME, Brownlie J. Immune responses to non-structural protein 3 (NS3) of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in NS3 DNA vaccinated and naturally infected cattle. En: *Preventive Veterinary Medicine*. Vol 72. ; 2005:115–120. doi:10.1016/j.prevetmed.2005.08.013
 108. Elahi SM, Shen SH, Talbot BG, Massie B, Harpin S, Elazhary Y. Induction of humoral and cellular immune responses against the nucleocapsid of bovine viral diarrhea virus by an adenovirus vector with an inducible promoter. *Virology*. 1999;261(1):1–7. doi:10.1006/viro.1999.9828
 109. Wilhelmsen CL, Bolin SR, Ridpath JF, Cheville NF, Kluge JP. Experimental Primary Postnatal Bovine Viral Diarrhea Viral Infections in Six-month-old Calves. *Vet Pathol*. 1990;27(4):235–243. doi:10.1177/030098589002700404
 110. Brock K V. Diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 1995;11(3):549–561. doi:10.1016/S0749-0720(15)30466-7
 111. Potgieter LN. Immunology of bovine viral diarrhea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 1995;11(3):501–520. doi:10.1016/S0749-0720(15)30464-3
 112. Hamers C, Couvreur B, Dehan P, et al. Differences in Experimental Virulence of Bovine Viral Diarrhoea Viral Strains Isolated from Haemorrhagic Syndromes. *Vet J*. 2000;160(3):250–258. doi:10.1053/tvj.2000.0500
 113. Fredriksen B, Sandvik T, Løken T, Ødegaard SA. Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine virus diarrhoea virus. *Vet Rec*. 1999;144(5):111–114. doi:10.1136/vr.144.5.111
 114. Ridpath JF, Bolin SR. Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. *Mol Cell Probes*. 1998;12(2):101–106. doi:10.1006/mcpr.1998.0158
 115. Jones LR, Weber EL. Application of single-strand conformation polymorphism to the study of bovine viral diarrhea virus isolates. *J Vet Diagnostic Investig*. 2001;13(1):50–

56. doi:10.1177/104063870101300110
116. David GP, Crawshaw TR, Gunning RF, Hibberd RC, Lloyd GM, Marsh PR. Severe disease in adult dairy cattle in three UK dairy herds associated with BVD virus infection. *Vet Rec.* 1994;134(18):468–472. doi:10.1136/vr.134.18.468
117. Hibberd RC, Turkington A, Brownlie J. Fatal bovine viral diarrhoea virus infection of adult cattle. *Vet Rec.* 1993;132(9):227. doi:10.1136/vr.132.9.227
118. Corapi W V., Elliott RD, French TW, Arthur DG, Bezek DM, Dubovi EJ. Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Am Vet Med Assoc.* 1990;196(4):590–596. Consultado septiembre 1, 2020. <https://europepmc.org/article/med/2154423>
119. Rebhun WC, French TW, Perdrizet JA, Dubovi EJ, Dill SG, Karcher LF. Thrombocytopenia Associated With Acute Bovine Virus Diarrhea Infection in Cattle. *J Vet Intern Med.* 1989;3(1):42–46. doi:10.1111/j.1939-1676.1989.tb00327.x
120. Liebler-Tenorio EM, Ridpath JF, Neill JD. Lesions and tissue distribution of viral antigen in severe acute versus subclinical acute infection with BVDV2. En: *Biologicals.* Vol 31. Academic Press; 2003:119–122. doi:10.1016/S1045-1056(03)00026-5
121. Ellis JA, West KH, Cortese VS, et al. Lesions and Distribution of Viral Antigen Following an Experimental Infection of Young Seronegative Calves with Virulent Bovine Virus Diarrhea Virus-Type II. *Can J Vet Res.* 1998;62(3):161–169. Consultado septiembre 1, 2020. </pmc/articles/PMC1189471/?report=abstract>
122. McGowan MR, Kafi M, Kirkland PD, et al. Studies of the pathogenesis of bovine pestivirus-induced ovarian dysfunction in superovulated dairy cattle. *Theriogenology.* 2003;59(3–4):1051–1066. doi:10.1016/S0093-691X(02)01136-6
123. Ssentongo YK, Johnson RH, Smith JR. ASSOCIATION OF BOVINE VIRAL DIARRHOEA-MUCOSAL DISEASE VIRUS WITH OVARITIS IN CATTLE. *Aust Vet J.* 1980;56(6):272–273. doi:10.1111/j.1751-0813.1980.tb05722.x
124. Grooms DL, Brock K V., Ward LA. Detection of bovine viral diarrhoea virus in the

- ovaries of cattle acutely infected with bovine viral diarrhea virus. *J Vet Diagnostic Investig.* 1998;10(2):125–129. doi:10.1177/104063879801000201
125. Fray MD, Prentice H, Clarke MC, Charleston B. Immunohistochemical Evidence for the Localization of Bovine Viral Diarrhea Virus, a Single-stranded RNA Virus, in Ovarian Oocytes in the Cow. *Vet Pathol.* 1998;35(4):253–259. doi:10.1177/030098589803500403
126. Grooms DL, Brock K V., Pate JL, Day ML. Changes in ovarian follicles following acute infection with bovine viral diarrhea virus. *Theriogenology.* 1998;49(3):595–605. doi:10.1016/S0093-691X(98)00010-7
127. Fray MD, Mann GE, Clarke MC, Charleston B. Bovine viral diarrhea virus: Its effects on estradiol, progesterone and prostaglandin secretion in the cow. *Theriogenology.* 1999;51(8):1533–1546. doi:10.1016/S0093-691X(99)00096-5
128. Liebler-Tenorio EM, Ridpath JF, Neill JD. Distribution of viral antigen and tissue lesions in persistent and acute infection with the homologous strain of noncytopathic bovine viral diarrhea virus. *J Vet Diagnostic Investig.* 2004;16(5):388–396. doi:10.1177/104063870401600504
129. Shin T, Acland H. *Tissue distribution of bovine viral diarrhea virus antigens in persistently infected cattle.* Vol 2.; 2001.
130. Njaa BL, Clark EG, Janzen E, Ellis JA, Haines DM. Diagnosis of persistent bovine viral diarrhea virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimens. *J Vet Diagnostic Investig.* 2000;12(5):393–399. doi:10.1177/104063870001200501
131. Charleston B, Brackenbury LS, Carr B V., et al. Alpha/Beta and Gamma Interferons Are Induced by Infection with Noncytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus In Vivo. *J Virol.* 2002;76(2):923–927. doi:10.1128/jvi.76.2.923-927.2002
132. Bolin SR. Control of bovine viral diarrhea infection by use of vaccination. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1995;11(3):615–625. doi:10.1016/S0749-0720(15)30470-9

133. BOCK R, RODWELL B, McGOWAN M. Detection of calves persistently infected with bovine pestivirus in a sample of dairy calves in south-eastern Queensland. *Aust Vet J.* 1997;75(9):656–659. doi:10.1111/j.1751-0813.1997.tb15364.x
134. Muñoz-Zanzi CA, Hietala SK, Thurmond MC, Johnson WO. Quantification, risk factors, and health impact of natural congenital infection with bovine viral diarrhea virus in dairy calves. *Am J Vet Res.* 2003;64(3):358–365. doi:10.2460/ajvr.2003.64.358
135. Confer AW, Fulton RW, Step DL, Johnson BJ, Ridpath JF. Viral antigen distribution in the respiratory tract of cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus subtype 2a. *Vet Pathol.* 2005;42(2):192–199. doi:10.1354/vp.42-2-192
136. Bielefeldt-Ohmann H. The pathologies of bovine viral diarrhea virus infection. A window on the pathogenesis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1995;11(3):447–476. doi:10.1016/S0749-0720(15)30461-8
137. Paton DJ. Pestivirus diversity. *J Comp Pathol.* 1995;112(3):215–236. doi:10.1016/S0021-9975(05)80076-3
138. Becher P, Orlich M, Thiel H-J. RNA Recombination between Persisting Pestivirus and a Vaccine Strain: Generation of Cytopathogenic Virus and Induction of Lethal Disease. *J Virol.* 2001;75(14):6256–6264. doi:10.1128/jvi.75.14.6256-6264.2001
139. Bolin SR, Grooms DL. Origination and consequences of bovine viral diarrhea virus diversity. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract.* 2004;20(1):51–68. doi:10.1016/j.cvfa.2003.11.009
140. Liebler EM, Waschbüsch J, Pohlenz JF, Moennig V, Liess B. Distribution of antigen of noncytopathogenic and cytopathogenic bovine virus diarrhea virus biotypes in the intestinal tract of calves following experimental production of mucosal disease. *Arch Virol Suppl.* 1991;3:109–124. doi:10.1007/978-3-7091-9153-8_13
141. Wilhelmsen CL, Bolin SR, Ridpath JF, Cheville NF, Kluge JP. Lesions and localization of viral antigen in tissues of cattle with experimentally induced or naturally acquired mucosal disease, or with naturally acquired chronic bovine viral

- diarrhea. *Am J Vet Res.* 1991;52(2):269–275. Consultado septiembre 2, 2020. <https://europepmc.org/article/med/1849384>
142. Teichmann U, Liebler-Tenorio EM, Pohlenz JE. Ultrastructural changes in follicles of small-intestinal aggregated lymphoid nodules in early and advanced phases of experimentally induced mucosal disease in calves. *Am J Vet Res.* 2000;61(2):174–182. doi:10.2460/ajvr.2000.61.174
143. Liebler EM, Küsters C, Pohlenz JF. Experimental mucosal disease in cattle: changes of lymphocyte subpopulations in Peyer’s patches and in lymphoid nodules of large intestine. *Vet Immunol Immunopathol.* 1995;48(3–4):233–248. doi:10.1016/0165-2427(95)05440-H
144. Liebler-Tenorio EM, Pohlenz JF. Experimental mucosal disease of cattle: Changes in cell proliferation in lymphoid tissues and intestinal epithelium. *J Comp Pathol.* 1997;117(4):339–350. doi:10.1016/S0021-9975(97)80081-3
145. B Grummer VMIG-W. Cytopathogenic bovine viral diarrhea viruses induce apoptosis in bovine cell cultures. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* Published online 1998:29–31. Consultado septiembre 2, 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9499630>
146. Kramps JA, Maanen C Van, Wetering G Van De, et al. A simple, rapid and reliable enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) specific antibodies in cattle serum, plasma and bulk milk. En: *Veterinary Microbiology.* Vol 64. ; 1999:135–144. doi:10.1016/S0378-1135(98)00265-X
147. Weinberg CR, Umbach DM. Using Pooled Exposure Assessment to Improve Efficiency in Case-Control Studies. *Biometrics.* 1999;55(3):718–726. doi:10.1111/j.0006-341X.1999.00718.x
148. Estela Benavides Edin Roberth. Frecuencia de Presentación de Parvovirus y Coronaviriosis Canina Diagnosticados por Inmuncromatografía en la ciudad de Chota – Cajamarca. Published online 2017.
149. Kameyama K, Sakoda Y, Tamai K, et al. Development of an immunochromatographic test kit for rapid detection of bovine viral diarrhea virus antigen. *J Virol Methods.*

- 2006;138(1–2):140–146. doi:10.1016/j.jviromet.2006.08.005
150. Flores-Chávez M, Cruz I, Rodríguez M, et al. Comparación de técnicas serológicas convencionales y no convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas importada en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28(5):284–293. doi:10.1016/j.eimc.2009.07.005
151. Almudena Muñoz Simón. *PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO PARA MALARIA.*; 2018.
152. REINHARDT G, CARRASCO L, TADICH N, RIEDEMANN S. COMPARACIÓN ENTRE DOS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO PARA DIARREA VIRAL BOVINA (DVB) EN 50 PREDIOS DE LA X REGIÓN, CHILE: SERONEUTRALIZACIÓN Y ENZIMOINMUNOENSAYO INDIRECTO (ELISA-I)* *Arch Med Vet*. 2001;33(2):173–183. doi:10.4067/S0301-732X2001000200006
153. Islas A, Quinteros G, Flores M, Quezada M, Diaz N, Sierra M. Detección de anticuerpos contra el virus de la peste porcina clásica mediante la prueba inmunoenzimática (CIV-ELISA) y seroneutralización. *Arch Med Vet*. 1997;29(2):213–220. doi:10.4067/s0301-732x1997000200006
154. Castillo C Del, Gómez A, FMVZ-UNAM MN-, DF M, 2003 undefined. Manual de laboratorio. Prácticas de virología.
155. Abad-Zavaleta. *Prevalence of infectious bovine rhinotracheitis and bovine viral diarrhea in females in three seasons in the downtown area of Veracruz*. Consultado marzo 4, 2020. http://nova_scientia.delasalle.edu.mx/ojs/index.php/Nova/article/view/433
156. Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*. 2015;72:4–15. doi:10.1016/j.peptides.2015.04.012
157. Dubovi EJ. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus. *Biologicals*. 2013;41(1):8–13. doi:10.1016/j.biologicals.2012.06.004

158. Marzocca MP, Seki C, Giambiagi SM, et al. Truncated E2 of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) expressed in *Drosophila melanogaster* cells: A candidate antigen for a BVDV ELISA. *J Virol Methods*. 2007;144(1–2):49–56. doi:10.1016/j.jviromet.2007.03.023
159. Kwang J, Littledike ET, Donis RO, Dubovi EJ. Recombinant polypeptide from the gp48 region of the bovine viral diarrhoea virus (BVDV) detects serum antibodies in vaccinated and infected cattle. *Vet Microbiol*. 1992;32(3–4):281–292. doi:10.1016/0378-1135(92)90151-I
160. Nelson G, Marconi P, Periolo O, La Torre J, Alvarez MA. Immunocompetent truncated E2 glycoprotein of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) expressed in *Nicotiana tabacum* plants: A candidate antigen for new generation of veterinary vaccines. *Vaccine*. 2012;30(30):4499–4504. doi:10.1016/j.vaccine.2012.04.068
161. PEDRERA1 M, RISALDE MA, , J.L. ROMERO-TREVEJO ADSA, et al. *DIARREA VÍRICA BOVINA: ETIOLOGÍA, FORMAS CLÍNICAS, DISTRIBUCIÓN DEL VIRUS Y PATOGENIA-REAL ACADEMIA DE CIENCIAS VETERINARIAS DE ANDALUCÍA ORIENTAL.*; 2007. Consultado mayo 13, 2021. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/2973184.pdf>
162. *Diagnóstico de Toxoplasmosis por técnicas inmunológicas*. Consultado septiembre 16, 2020. <http://www.bioltis.fmed.edu.uy/Prainmuno2009.pdf>
163. Rajotte D, Canada S, Pasqualini R. *Identification of receptor ligands with phage display peptide libraries.*; 1999. Consultado mayo 26, 2020. <https://www.researchgate.net/publication/12978425>
164. Arap MA. Phage display technology - Applications and innovations. *Genet Mol Biol*. 2005;28(1):1–9. doi:10.1590/S1415-47572005000100001
165. Kügler J, Zantow J, Meyer T, Hust M. Oligopeptide M13 Phage Display in Pathogen Research. *Viruses*. 2013;5(10):2531–2545. doi:10.3390/v5102531
166. Rakonjac J, Bennett NJ, Spagnuolo J, Gagic D, Russel M. *Filamentous Bacteriophage: Biology, Phage Display and Nanotechnology Applications*.

Consultado septiembre 18, 2020. <http://www.cimb.org>

167. Pande J, Szewczyk MM, Grover AK. Phage display: Concept, innovations, applications and future. *Biotechnol Adv.* 2010;28(6):849–858. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.07.004
168. Ruiz A, Pérez D, Muñoz MC, et al. Targeting essential *Eimeria ninakohlyakimovae* sporozoite ligands for caprine host endothelial cell invasion with a phage display peptide library. *Parasitol Res.* 2015;114(11):4327–4331. doi:10.1007/s00436-015-4666-x
169. Villa-Mancera A, Quiroz-Romero H, Correa D, et al. Induction of immunity in sheep to *Fasciola hepatica* with mimotopes of cathepsin L selected from a phage display library. *Parasitology.* 2008;135(12):1437–1445. doi:10.1017/S003118200800471X
170. Chaparro J, de DP-R de la UI, 2009 undefined. III Simposio Nacional de Virología. *redalyc.org.* Consultado septiembre 18, 2020. <https://www.redalyc.org/pdf/3438/343835694008.pdf>
171. Uchiyama F, Tanaka Y, Minari Y, Tokui N. Designing scaffolds of peptides for phage display libraries. *J Biosci Bioeng.* 2005;99(5):448–456. doi:10.1263/jbb.99.448
172. Kay B, Winter J, McCafferty J. Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual. Published online 1996. Consultado septiembre 18, 2020. https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=1qCum7pWOFwC&oi=fnd&pg=PP1&dq=phage+display+of+peptides+and+proteins:+a+laboratory+manual,+academic+press&ots=msk8DYIVY3&sig=bPBMISNaw0A5t_foGhVIVLJRwZM
173. Catalina PP, Angela-Victoria HM, Andrés-Fernando GB, Martha-Josefina VF. Fagoterapia, alternativa para el control de las infecciones bacterianas. Perspectivas en Colombia. *Univ Sci.* 2015;20(1):43–60. doi:10.11144/Javeriana.SC20-1.faci
174. Barbas C, Burton D, Scott J, Silverman G. Phage display: a laboratory manual. Published online 2004.
175. van Wezenbeek PMGF, Hulsebos TJM, Schoenmakers JGG. Nucleotide sequence of the chromosomal gene for human fibroblast (β 1) interferon and of the flanking

- regions. *Gene*. 1981;14(3):137–143. doi:10.1016/0378-1119(80)90093-1
176. Endemann H, Model P. Location of filamentous phage minor coat proteins in phage and in infected cells. *J Mol Biol*. 1995;250(4):496–506. doi:10.1006/jmbi.1995.0393
177. Makowski L. Phage display: structure, assembly and engineering of filamentous bacteriophage M13. *Curr Opin Struct Biol*. 1994;4(2):225–230. doi:10.1016/S0959-440X(94)90312-3
178. Rakonjac J, Model P. Roles of pIII in filamentous phage assembly. *J Mol Biol*. 1998;282(1):25–41. doi:10.1006/jmbi.1998.2006
179. Inovirus ~ ViralZone page. Consultado septiembre 19, 2020. <https://viralzone.expasy.org/558>
180. Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR. Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol*. 1994;12(1):433–455. doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.002245
181. BioLabs NE. *Phage Display Instruction Manual*.; 2017. <https://www.neb.com/-/media/catalog/datacards-or-manuals/manuale8100.pdf%0Ahttp://www.rmjordan.com/manuals/D-1803Pos1Ar4web.pdf>
182. Hammers CM, Stanley JR. Antibody phage display: Technique and applications. *J Invest Dermatol*. 2014;134(2):1–5. doi:10.1038/jid.2013.521
183. Zamit, A. L.; Ostrowski, M.; Fondevila, N.; Wigdorovitz, A.; Romera, A.; Bratanich AC. Use of phage displayed peptides libraries for epitope mapping of Bovine Viral Diarrhea Virus E2 protein. Published online 2010.
184. 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):51–56. doi:10.1007/s11262-015-1208-7
185. Villa-Mancera A, Reynoso-Palomar A, Utrera-Quintana F, et al. Identificación de

- nuevos péptidos de una biblioteca de despliegue en fagos con un anticuerpo monoclonal específico a la proteína N del virus PRRS. *Arch Med Vet.* 2015;47(3):325–331. doi:10.4067/S0301-732X2015000300009
186. Kick B, Hensler S, Praetorius F, Dietz H, Weuster-Botz D. Specific growth rate and multiplicity of infection affect high-cell-density fermentation with bacteriophage M13 for ssDNA production. *Biotechnol Bioeng.* 2017;114(4):777–784. doi:10.1002/bit.26200
 187. EVALUACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN DE MICOPLASMAS PARA SU EMPLEO EN EL DIAGNÓSTICO POR PCR. Consultado septiembre 25, 2020. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2009000200006
 188. Hemmatzadeh Farhid Hemmatzadeh F, Amini F. Dot-blot enzyme immunoassay for the detection of bovine viral diarrhoea virus antibodies. *Vet Arh.* 2009;79(4):343–350.
 189. Brock K V., Potgieter LND. Detection of bovine viral diarrhoea virus in serum from cattle by dot blot hybridization assay. *Vet Microbiol.* 1990;24(3–4):297–306. doi:10.1016/0378-1135(90)90179-Y
 190. Kalaycioglu AT, Russell PH, Howard CR. Selection of mimotopes of Bovine Viral Diarrhoea Virus using a solid-phase peptide library. *Vaccine.* 2007;25(41):7081–7086. doi:10.1016/j.vaccine.2007.07.066
 191. Bolin SR, Ridpath JF. Glycoprotein E2 of bovine viral diarrhoea virus expressed in insect cells provides calves limited protection from systemic infection and disease. *Arch Virol.* 1996;141(8):1463–1477. doi:10.1007/BF01718248
 192. Deregts D, Bolin SR, Van Den Hurk J, Ridpath JF, Gilbert SA. Mapping of a type 1-specific and a type-common epitope on the E2 (gp53) protein of bovine viral diarrhoea virus with neutralization escape mutants. *Virus Res.* 1998;53(1):81–90. doi:10.1016/S0168-1702(97)00129-9
 193. Marini M del R. Identificación del virus de la diarrea viral bovina mediante

- Inmunohistoquímica en abortos bovinos de la cuenca lechera santafesina y comparación con los resultados obtenidos con el aislamiento viral y la inmunofluorescencia directa. Published online 2008.
194. Nuevos antecedentes en el comportamiento del virus de la diarrea viral bovina. Situación en Chile. Published 2004. Consultado agosto 2, 2020. http://web.uchile.cl/vignette/avancesveterinaria/CDA/avan_vet_simple/0,1423,SCID%253D12971%2526ISID%253D479%2526PRT%253D12968,00.html
 195. Li Y, Jia Y, Wen K, et al. Mapping B-cell linear epitopes of NS3 protein of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Immunol Immunopathol.* 2013;151(3–4):331–336. doi:10.1016/j.vetimm.2012.11.011
 196. Calvo JC, Martínez JC, Patarroyo ME, et al. *DE LA PREDICCIÓN AL ANÁLISIS ANTIGÉNICO: TRAS LAS HUELLAS DE UN EPÍTOPE CONFORMACIONAL.*
 197. Lanyon S, Anderson M, Bergman E, Reichel M. Validation and evaluation of a commercially available ELISA for the detection of antibodies specific to bovine viral diarrhoea virus (bovine pestivirus). *Aust Vet J.* 2013;91(1–2):52–56. doi:10.1111/j.1751-0813.2012.01010.x
 198. Sandvik T, Krogsrud J. *Evaluation of an antigen-capture ELISA for detection of bovine viral diarrhoea virus in cattle blood samples.* Vol 7.; 1995.
 199. Batonick M, Loeffen W, Metwally SA, Mayr GA. Identification and characterization of mimotopes of classical swine fever virus E2 glycoprotein using specific anti-E2 monoclonal antibodies. *Virus Res.* 2013;175(1):12–19. doi:10.1016/j.virusres.2013.03.016

Anexo

* Buffer de carbonatos

- 0.293 gr de Bicarbonato de sodio
- 0.159 gr de Carbonato de sodio

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

* PBS 1X (1L)

- 8gr de Cloruro de sodio (NaCl)
- 0.2gr de Cloruro de potasio (KCl)
- 1.44gr de Fosfato disódico (Na_2HPO_4)
- 0.24 gr de Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)

Aforar a 1L con agua destilada y esterilizar por autoclave.

* PBS-BSA al 2% (100ml)

- 100ml de PBS 1X (estéril)
- 2 gr de Albumina sérica bovina (BSA)

Esterilizar por filtración y conservar a 4°C

* PBS-Tween 20 al 0.1%

- 1L de PBS 1X (estéril)
- 1ml de Tween 20

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) (100ml)

- 1.505 gr de Glicina
- Ácido clorhídrico 1M

Agregar la glicina a 50 ml de agua destilada estéril y mezclar con agitación con barra magnética, continuar con la agitación mientras se adiciona el ácido clorhídrico hasta bajar el pH de la solución a 2.2 y una vez obtenida la acidez requerida aforar a 100 ml con agua destilada estéril; esterilizar por filtración.

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

- 12.114 gr de Tris-HCl

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

* Medio LB (1L)

- 10 gr de triptona
- 5 gr de extracto de levadura
- 5 gr de NaCl

Aforar a 1 L con agua destilada y esterilizar en autoclave

*Para hacer Agar LB añadir 15 gr de agar bacteriológico antes de esterilizar.

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

- 40 gr de PEG 8000
- 29.22 gr de NaCl

Con el PEG 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

por autoclave, una vez estériles ambas soluciones esperar a que la temperatura siga siendo alta pero permita el manejo y en esterilidad mezclar las soluciones.

* TBS (100 ml)

- 0.8766 gr de NaCl
- 0.6057 gr de Tris-HCl

Aforar a 100 ml con agua destilada y esterilizar con autoclave.

* Agar LB con IPTG/X-Gal

- 1 L de agar LB
- 1 gr de X-Gal
- 0.625 gr de IPTG
- 16.5 ml de dimetil formamida
- Para preparar el X-Gal/IPTG primero se realiza una solución de X-Gal en 4 ml 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 Agar LB cuando aún esta líquido, se mezcla gentilmente y se preparan los agares en cajas Petri.

* Buffer de yoduros (100ml)

- 0.1211 gr de Tris-HCl
- 0.0292 gr de EDTA
- 59.956 gr de NaI

Aforar a 100 ml con agua destilada y guardar cubriendo de la luz.

* Buffer de transferencia

- Tris 1M 48 ml
- Glicina 1M 39 ml
- Metanol al 100% 20 ml
- SDS al 10% 30 μ l